

THESE

présentée à

L'UNIVERSITE BORDEAUX 1

ECOLE DOCTORALE DE SCIENCES CHIMIQUES

par **Mélanie BLASI**

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR

SPECIALITE : CHIMIE ORGANIQUE

Extraction liquide-solide sélective en milieu hydroalcoolique: Application à la réduction du pouvoir de combinaison des vins blancs liquoreux

Soutenue le 14 Décembre 2005

Après avis de :

M. Olivier Donard, Directeur de Recherches au CNRS à l'Université de Pau et des pays de l'Adour

Rapporteur

M. Michel Moutounet, Directeur de Recherches INRA à l'Université de Montpellier

Rapporteur

Devant la commission d'examen formée de :

Mme Hélène Budzinski, Directrice de Recherches au CNRS à l'Université de Bordeaux I

Présidente

M. Olivier Donard, Directeur de Recherches au CNRS à l'Université de Pau et des pays de l'Adour

Rapporteur

M. Michel Moutounet, Directeur de Recherches INRA à l'Université de Montpellier

Rapporteur

M. Denis Dubourdieu, Professeur à l'Université Victor Ségalen - Bordeaux II

Examineur

M. Eric Fouquet, Professeur à l'Université de Bordeaux I

Examineur

M. Hervé Deleuze, Maître de conférences à l'Université de Bordeaux I

Directeur de thèse

Membre invité :

M. Jean-Christophe Barbe, Maître de conférences à l'ENITA de Bordeaux

*A mon petit monde,
D'ici et de l'au-delà*

Arré chenspéné

Ce travail a été effectué au Laboratoire de Chimie Organique et Organométallique (UMR 5802) de l'Université de Bordeaux I, à l'École Nationale d'Ingénieurs des Travaux Agricoles de Bordeaux et à la Faculté d'Oenologie de Bordeaux II – Victor Ségalen.

Mes premiers remerciements vont à Madame Hélène Budzinski, Directrice de Recherches au CNRS, pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de présider le jury de cette thèse.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à Messieurs Michel Moutounet, Directeur de Recherches à l'INRA, et Olivier Donard, Directeur de Recherches au CNRS, pour avoir examiné ce mémoire en tant que rapporteurs et membres du jury.

Je tiens également à remercier Monsieur Denis Dubourdieu, Professeur à la Faculté d'Oenologie, pour avoir accepté de participer à ce jury et pour les conseils qu'il m'a prodigués.

J'adresse également mes plus vifs remerciements à Monsieur Eric Fouquet, Professeur à l'Université, pour avoir participé au jugement de ce travail.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à Monsieur Hervé Deleuze, Maître de Conférences à l'Université, pour m'avoir guidé tout au long de ses trois années. En tant que directeur de thèse, il a su trouver l'équilibre entre un encadrement sérieux et efficace et la volonté de m'accorder une certaine autonomie nécessaire à ma formation doctorale.

Je remercie également Monsieur Jean-Christophe Barbe, Maître de Conférences à l'ENITA, pour avoir participé à ce jury et pour l'aide qu'il m'a apporté dans la partie œnologique de ce travail.

Ces travaux n'auraient pas été réalisés sans le soutien matériel du Conseil Interprofessionnel du Vin de Bordeaux. Mes remerciements s'adressent aux membres de cette interprofession pour l'intérêt qu'ils ont porté à cette étude et la confiance qu'ils nous ont accordée.

Enfin j'associe à ces remerciements l'ensemble des personnes que j'ai côtoyé au long de ces trois années, qu'ils soient membres permanents des laboratoires, invités ou étudiants. La liste serait trop longue pour tous les nommer sans commettre quelques oublis. Les enrichissements, aux niveaux professionnels et personnels, qu'ils m'ont apportés peuvent difficilement se résumer en quelques mots, mais ils me seront de fidèles compagnons pour l'avenir.

Sommaire

Introduction	1
I Le dioxyde de soufre	3
I.1 Présentation du dioxyde de soufre	3
I.2 La chimie du dioxyde de soufre	6
I.2.1 Le dioxyde de soufre libre	6
I.2.2 Le dioxyde de soufre combiné	7
II Les différents protagonistes de l'étude	9
II.1 Les dérivés carbonylés à extraire	9
II.1.1 L'éthanal ou acétaldéhyde	9
II.1.2 L'acide pyruvique	9
II.1.3 L'acide 2-oxoglutarique	10
II.1.4 Le 5-oxofructose	10
II.2 Réactivité des dérivés carbonylés	16
II.2.1 Généralités sur la réactivité des dérivés carbonylés	17
II.2.2 Les réactions possibles	18
II.2.2.1 La réaction de mono-addition	18
II.2.2.2 La réaction de bi-addition	19
II.2.2.3 La réaction d'addition-élimination	19
II.3 Sélection des fonctions extractives	20
II.3.1 Critères à respecter	20
II.3.2 Les réactifs envisagés	21
II.3.2.1 Les composés soufrés	21
II.3.2.1.1 Les sulfites	21
II.3.2.1.2 Les acides sulfiniques	21
II.3.2.2 Les composés azotés	23
II.3.2.2.1 Les O-benzylhydroxylamines	24

II.3.2.2.2 Les dérivés des hydrazines	25
II.3.2.2.3 Les diamines	27
II.3.2.3 Bilan des réactifs retenus	28
II.4 Dosages enzymatiques	31
II.4.1 Intérêt des dosages enzymatiques	31
II.4.2 Spectroscopie	32
II.4.3 Dosages utilisés	34
II.4.3.1 Dosage enzymatique de l'éthanal	35
II.4.3.2 Dosage enzymatique de l'acide pyruvique	36
II.4.3.3 Dosage enzymatique de l'acide 2-oxoglutarique	37
II.4.3.4 Mesure de la disparition du 5-oxofructose	39
II.5 Conclusion	39
III Etude des agents d'extraction en milieu homogène modèle	41
III.1 Extraction en milieu homogène : efficacité des agents d'extraction testés	42
III.1.1 Extractions des dérivés carbonylés	42
III.1.1.1 Extraction de l'éthanal, de l'acide pyruvique et de l'acide 2-oxoglutarique	42
III.1.1.2 Extraction du 5-oxofructose	44
III.1.2 Vérification de la non compétition des sucres	44
III.1.3 Bilan sur les agents d'extraction	48
III.2 Cinétiques des extractions avant et après SO₂	48
III.2.1 Extraction avant ajout de SO ₂	48
III.2.1.1 Extraction de l'éthanal avant ajout de SO ₂	49
III.2.1.2 Extraction de l'acide pyruvique avant ajout de SO ₂	49
III.2.1.3 Extraction de l'acide 2-oxoglutarique avant ajout de SO ₂	50
III.2.1.4 Bilan des extractions en milieu homogène avant ajout de SO ₂	51
III.2.2 Extraction après ajout de SO ₂	52
III.2.2.1 Extraction de l'éthanal après ajout de SO ₂	52
III.2.2.2 Extraction de l'acide pyruvique après ajout de SO ₂	54
III.2.2.3 Extraction de l'acide 2-oxoglutarique après ajout de SO ₂	55
III.2.2.4 Bilan des extractions en milieu homogène après ajout de SO ₂	56

III.3 Conclusion	56
IV Synthèse des supports fonctionnalisés	59
IV.1 Supports polymères	60
IV.1.1 Support polymère organique	60
IV.1.2 Synthèse de réactifs supportés par polymérisation de monomères fonctionnels	64
IV.1.2.1 Synthèse de styrènes fonctionnels pour la O-benzylhydroxylamine	64
IV.1.2.2 Synthèse de styrènes fonctionnels pour la phénylsulfonylhydrazine	67
IV.1.2.3 Bilan sur la synthèse de supports fonctionnalisés par co-polymérisation en suspension aqueuse	72
IV.1.3 Synthèse de réactifs supportés par fonctionnalisation de polymères	72
IV.1.3.1 Synthèse de supports	72
IV.1.3.1.1 Agent de réticulation	72
IV.1.3.1.2 Polymérisation en suspension	73
IV.1.3.2 Greffage de la fonction O-benzylhydroxylamine	75
IV.1.3.2.1 Voie de greffage utilisant la N-hydroxyphthalimide	76
IV.1.3.2.2 Voie de greffage utilisant l'acétonoxime	79
IV.1.3.2.3 Bilan sur le greffage de la fonction O-benzylhydroxylamine	86
IV.1.3.3 Greffage de la fonction phénylsulfonylhydrazine	86
IV.1.3.3.1 Voie de greffage utilisant l'acide chlorosulfonique	87
IV.1.3.3.2 Voie de greffage utilisant le chlorure de thionyle	89
IV.1.3.3.3 Bilan sur les greffages de la fonction phénylsulfonylhydrazine	93
IV.1.3.4 Bilan général sur les greffages sur support polymère	93
IV.2 supports à base de silice	94
IV.2.1 Supports de silice	94
IV.2.2 Greffage de la O-benzylhydroxylamine	98
IV.2.2.1 Fonctionnalisation du support de base	98
IV.2.2.1.1 Synthèse du greffon	98
IV.2.2.1.2 Greffage du 2-(4-chlorométhylphényl)-éthyltriméthoxysilane	99
IV.2.2.2 Modification d'un support	100
IV.2.2.2.1 Voie de greffage utilisant la N-hydroxyphthalimide	100
IV.2.2.2.2 Voie de greffage utilisant l'oxime de l'acétone	101
IV.2.2.3 Bilan sur le greffage de la fonction O-benzylhydroxylamine	102

IV.2.3 Greffage de la phénylsulfonylhydrazine	103
IV.2.3.1 Synthèse de greffon	103
IV.2.3.2 Utilisation du 2-(4-chlorosulfonylphényl)-éthyltriméthoxysilane	104
IV.2.3.3 Bilan du greffage de la fonction phénylsulfonylhydrazine	107
IV.2.4 Bilan sur les synthèses de silice fonctionnalisées	107
IV.3 Conclusion sur la synthèse des supports fonctionnalisés	108
V Etude des agents d'extraction en milieu hétérogène modèle	109
V.1 Extractions en milieu hétérogène avant ajout de SO₂	110
V.1.1 Extraction de l'éthanal avant ajout de SO ₂	110
V.1.2 Extraction de l'acide pyruvique avant ajout de SO ₂	112
V.1.3 Extraction de l'acide 2-oxoglutarique avant ajout de SO ₂	113
V.1.4 Extraction du 5-oxofructose avant ajout de SO ₂	114
V.1.5 Bilan des extractions avant ajout de SO ₂	115
V.2 Extraction après ajout de SO₂	116
V.2.1 Extraction de l'éthanal après ajout de SO ₂	117
V.2.2 Extraction de l'acide pyruvique après ajout de SO ₂	118
V.2.3 Extraction de l'acide 2-oxoglutarique après ajout de SO ₂	118
V.2.4 Extraction du 5-oxofructose après ajout de SO ₂	119
V.2.5 Bilan des extractions après ajout de SO ₂	120
V.3 Conclusion sur les extractions en milieu hétérogène	121
VI Extraction dans un vin blanc liquoreux	125
VI.1 Extraction par le support PP22	127
VI.1.1 Extraction sous agitation	127
VI.1.1.1 Extraction de l'éthanal sous agitation	128
VI.1.1.2 Extraction de l'acide pyruvique sous agitation	129
VI.1.1.3 Extraction de l'acide 2-oxoglutarique sous agitation	129
VI.1.1.4 Extraction du 5-oxofructose sous agitation	130
VI.1.1.5 Mesure du dioxyde de soufre sous agitation	132
VI.1.1.6 Bilan de l'extraction sous agitation	133
VI.1.2 Extraction sans agitation	135

VI.1.2.1	Extraction de l'éthanal sans agitation	135
VI.1.2.2	Extraction de l'acide pyruvique sans agitation	136
VI.1.2.3	Extraction de l'acide 2-oxoglutarique sans agitation	137
VI.1.2.4	Extraction du 5-oxofructose sans agitation	138
VI.1.2.5	Mesure du dioxyde de soufre sans agitation	139
VI.1.2.6	Bilan de l'extraction sans agitation	141
VI.1.3	Bilan des extractions en utilisant le support PP22	142
VI.2	Extraction par le support PP23	144
VI.2.1	Extraction sous agitation	144
VI.2.2	Extraction sans agitation	146
VI.2.3	Bilan des extractions utilisant le support PP23	147
VI.3	Extraction par le support PP24	149
VI.3.1	Extraction sous agitation	149
VI.3.2	Extraction sans agitation	151
VI.3.3	Bilan des extractions utilisant le support PP24	153
VI.4	Extraction par le support Si	154
VI.4.1	Extraction sous agitation	154
VI.4.2	Extraction sans agitation	156
VI.4.3	Bilan des extractions utilisant le support Si	157
VI.5	Conclusion sur les extractions des vins blancs liquoreux	159
VII	Compléments à l'étude	161
VII.1	Tentative d'identification de contaminants	161
VII.2	Tests de dégustation et extraction d'autres vins	162
VII.2.1	Vin blanc liquoreux	163
VII.2.2	Tests d'extraction sur d'autres vins	164
VII.3	Conclusion des compléments à l'étude	166
VIII	Conclusion générale	169
IX	Partie expérimentale	173

Bibliographie	213
Annexe 1 Extraction par le support PP23	223
Annexe 2 Extraction par le support PP24	229
Annexe 3 Extraction par le support Si	235
Annexe 4 Analyse des contaminants	241
Annexe 5 Analyse de l'évolution des contaminants après lavage des supports	246
Annexe 6 Recherche de la phénylsulfonylhydrazine	248

Introduction

Le dioxyde de soufre est un additif conjuguant à la fois des actions antioxydantes et antimicrobiennes qui est universellement utilisé en œnologie.

Le dioxyde de soufre est notamment ajouté lors de l'étape dite de "mutage" des vins blancs liquoreux. Cette opération est destinée à stopper la fermentation. Lorsque l'on ajoute du SO₂ au vin, il s'établit un équilibre entre les différentes formes de ce composé. Une partie réagit avec des dérivés carbonylés pour donner des combinaisons bisulfiteuses. L'autre partie correspond au dioxyde de soufre libre. Les dérivés carbonylés, présents dans les vins blancs liquoreux, sont issus du métabolisme des levures fermentaires. Il est nécessaire de garder quelques dizaines de milligrammes par litre de dioxyde de soufre libre dans le vin pour assurer sa stabilité, ce qui correspond à plusieurs centaines de milligrammes par litre de dioxyde de soufre total car une quantité importante se combine aux dérivés carbonylés et devient inactive vis-à-vis des levures. La toxicité liée à ces combinaisons ou aux produits issus de leur métabolisme incite les autorités à modifier les normes régissant la présence de "SO₂" dans les vins. La diminution des quantités de dioxyde de soufre présentes dans les vins a fait à ce titre l'objet de plusieurs études récentes.^{1,2}

Le dioxyde de soufre libre présent est indispensable à la bonne conservation des vins. C'est donc la quantité de dioxyde de soufre combiné qui doit être réduite. Cette quantité est liée à la quantité de dérivés carbonylés présents dans le vin. Il importe donc d'éliminer ces composés carbonylés du vin de façon à diminuer le pouvoir de combinaison du dioxyde de soufre et donc la dose de SO₂ total nécessaire à une bonne stabilité du produit.

L'élimination d'une substance non désirée dans un milieu réactionnel est un problème auquel le chimiste est très souvent confronté. Il doit alors trouver une méthode efficace, la plus simple possible à mettre en œuvre, mais surtout qui n'altère pas les autres produits présents dans le milieu. Une méthode de choix est l'extraction liquide-solide, procédé qui tend à se répandre lorsqu'on cherche à purifier une solution.³⁻⁶ Il s'agit de mettre en présence deux

¹ Pouzalques N., Masson G., Guitard A. Comprendre et maîtriser l'état de combinaison du SO₂ dans les vins rosés, *Forum Aredvi 26 juin 2003*, Chambre Régionale d'Agriculture d'Aix-en-Provence, 34-38

² Vinsonneau E., Anneraud M., Benesteau F., Chretien P. Utilisation de la microfiltration tangentielle au mutage sur vins moelleux et liquoreux : synthèse de trois années d'essais *www.matevi-france.com*, 15 p.

³ Thurman E. M., Mills M. S. Solid-phase extraction, principles and practice. New York: Wiley, **1998**, 344 p.

Introduction

réactifs dont l'un, l'agent d'extraction, est fixé sur un support insoluble. Le support est mis en contact avec la solution. Après réaction, le support est éliminé du milieu réactionnel par simple filtration. On obtient ainsi d'un côté la solution purifiée et de l'autre le support portant l'agent d'extraction lié au composé que l'on cherchait à extraire.

Cette étude a porté sur l'extraction liquide-solide des dérivés carbonylés majoritairement responsables de la combinaison bisulfite. Après les avoir identifiés, la réactivité de ces composés a été étudiée. La réaction mise en œuvre lors de cette extraction doit respecter un certain nombre de critères. Plusieurs molécules susceptibles de correspondre à ces exigences ont été retenues et leur efficacité comme agent d'extraction des dérivés carbonylés en milieu homogène a été testée. Les molécules les plus efficaces ont été fixées sur des supports insolubles, de type polymère ou silice. Les supports ainsi obtenus ont ensuite été utilisés pour effectuer des extractions en milieu hétérogène. Les supports ayant donné les meilleurs résultats ont enfin été testés sur différents vins.

⁴ Flynn D. L., Crich J. Z., Devraj R. V., Hockerman S. L., Parlow J. J., South M. S., Woodard S. Chemical library purification strategies based on principles of complementary molecular reactivity and molecular recognition *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, *119*(21), 4874-4881

⁵ Kaldor S. W., Siegel M. G., Fritz J. E., Dressman B. A., Hahn P. J. Use of solid supported nucleophiles and electrophiles for the purification of non-peptide small molecule libraries, *Tetrahedron Lett.*, **1996**, *37*(40), 7193-7196

⁶ Ley S. V., Baxendale I. R., Bream R. N., Jackson P. S., Leach A. G., Longbottom D. A., Nesi M., Scott J. S., Storer I., Taylor S. J. Multi-step organic synthesis using solid-supported reagents and scavengers : a new paradigm in chemical library generation *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, **2000**, 3815-4195

I Le dioxyde de soufre

I.1 Présentation du dioxyde de soufre

La généralisation de l'utilisation du dioxyde de soufre (autrefois appelé anhydride sulfureux et quelquefois désigné simplement par "SO₂") pour la production des vins remonte vraisemblablement à la fin du XVIII^e siècle. Ses nombreuses propriétés en font un auxiliaire indispensable au vinificateur.^{7,8}

Le dioxyde de soufre présente diverses propriétés d'intérêt oenologique. Les nombreuses études menées jusqu'à ce jour n'ont pas permis de mettre en évidence de substitut présentant une telle polyvalence.

Le dioxyde de soufre agit comme antiseptique, inhibant le développement des micro-organismes que sont les levures et les bactéries lactiques et acétiques. Les doses permettant de tuer les cellules sont variables en fonction des espèces. L'activité vis-à-vis des levures est liée au SO₂ qualifié de libre, qui sera décrit ultérieurement.⁹ Au cours de la conservation, il évite ainsi la formation de troubles de levures, la refermentation des vins doux et les différentes altérations bactériennes et levuriennes.

Le dioxyde de soufre a également une activité d'antioxydant. Il est plus oxydable que certains constituants du vin. La réaction, lente, met les vins à l'abri de l'oxydation de nature strictement chimique. Le dioxyde de soufre préserve les vins d'une oxydation trop intense des composés phénoliques et de certains éléments de l'arôme ; il prévient la madérisation, combinant des molécules telle que l'éthanal, responsable du caractère "d'évent" lorsqu'il est libre ; il contribue à fixer un niveau d'oxydoréduction suffisamment bas, favorable au développement des qualités sensorielles au cours de la conservation et du vieillissement.

⁷ Ribéreau-Gayon J., Peynaud E., Ribéreau-Gayon P., Sudraud P. *Traité d'œnologie : Sciences et techniques du vin, tome 4 : Clarification et stabilisation. Matériels et installations*, 2^e édition. Paris : Dunod, **1977**, 643 p.

⁸ Ribéreau-Gayon P., Dubourdieu D., Donèche B., Lonvaud A. *Traité d'œnologie 1 – Microbiologie du vin. Vinifications*, 5^e édition. Paris : Dunod, **2004**, 641 p.

⁹ Ingram M. The germicidal effect of free and combined sulfur dioxide *J. Soc. Chem. Ind., Lond., Trans. Commun.*, **1948**, 67, 18-21

Enfin par son activité antioxydasique, le dioxyde de soufre inhibe le fonctionnement des enzymes d'oxydation (tyrosinase, laccase) et éventuellement il assure leur destruction. Par ce mécanisme, le dioxyde de soufre protège les moûts de l'oxydation, avant leur départ en fermentation. Il évite également l'oxydation catalysée par les oxydases des vins issus des vendanges pourries.

L'addition de dioxyde de soufre au vin soulève des objections d'ordre hygiénique qu'il faut prendre en compte, même si ce produit peut se prévaloir d'un usage très ancien. La toxicité du dioxyde de soufre est étudiée depuis le début du XX^e siècle.

Des études menées sur l'animal ont montré que, suivant l'espèce considérée et pour une prise unique de sulfite de sodium, la DL 50 (dose létale pour 50 % des individus) est comprise entre 0,7 et 2,5 g de SO₂ par kilogramme de poids corporel. La toxicité aiguë du sulfite de sodium est par conséquent voisine de celle de produits aussi inoffensifs que le carbonate monosodique (bicarbonate de sodium) ou le chlorure de potassium.¹⁰

La toxicité chronique a aussi été étudiée sur l'animal. L'absorption régulière, pendant plusieurs générations, d'une nourriture contenant 1,5 g de SO₂.kg⁻¹ conduit à trois types de complications :

- déficit en thiamine lié à sa destruction par le dioxyde de soufre
- modification histopathologique de l'estomac
- croissance ralentie des animaux

Ces résultats ont permis de déterminer que la dose maximum sans toxicité pour le rat était de 72 mg.kg⁻¹ de poids corporel. Cette valeur a amené l'Organisation Mondiale de la Santé à fixer la dose journalière admissible (DJA) à 0,7 mg de SO₂ par kilogramme de poids corporel.¹¹

La toxicité chez l'homme a également fait l'objet d'études qui ont montré que des symptômes d'intoxication (nausées, vomissements, irritations gastriques) apparaissaient pour une absorption de 4 g de sulfite de sodium en une seule dose. En revanche, aucun effet

¹⁰ Lanteaume M. T., Ramel P., Jaulmes P., Manin D. Détermination et comparaison des DL50 du métabisulfite de potassium de l'éthanal et de leur combinaison (hydroxy-éthane-sulfonate de potassium) par voie orale sur le rat de souche wistar *Ann. Falsif. Exp. Chim.*, **1969**, 62, 231-241

¹¹ Ramel P., Lanteaume M. T., Jaulmes P. Quelques recherches sur la toxicité de l'anhydride sulfureux libre et combiné *Berichte Internationale Fruchtsaft-Union, Wissenschaftlich-Technische Kommission*, **1972**, 12, 177-187

secondaire n'a été observé avec des prises quotidiennes de 400 mg de dioxyde de soufre, pendant 25 jours. L'éventuelle toxicité chez l'homme est attribuée à la destruction de la thiamine ou vitamine B₁ par les sulfites, mais les sulfites sont absents à un pH voisin de 2, correspondant à la digestion stomacale. Des études ont également mis en évidence des réactions allergiques aux sulfites pour des doses ingérées très faibles (de l'ordre du milligramme) ; elles concernent principalement des sujets asthmatiques (4 à 10 % des individus). Ces réactions allergiques ont conduit la Food and Drugs Administration à rendre obligatoire aux Etats-Unis la mention de la présence de sulfites, lorsque la dose dépasse 10 mg.l⁻¹, alors que rien n'a été clairement démontré sur la sensibilité des sujets non asthmatiques.¹²

Compte tenu d'une DJA de 0,7 mg.kg⁻¹.j⁻¹, la dose acceptable pour l'homme est comprise entre 42 et 56 mg par jour en fonction de son poids, compris entre 60 et 80 kg. De par leur conservation avec du SO₂, les vins apportent une quantité non négligeable de SO₂ à l'homme, au regard des normes fixées par l'OMS. Pour certains vins, la consommation d'une demi-bouteille (375 ml) par jour peut même apporter une quantité de SO₂ nettement supérieure à la limite préconisée. On comprend donc pourquoi il est nécessaire de trouver un moyen de diminuer le taux de SO₂ présent dans les vins, diminution qui de plus est régulièrement réclamée par les hygiénistes au sein des instances internationales.

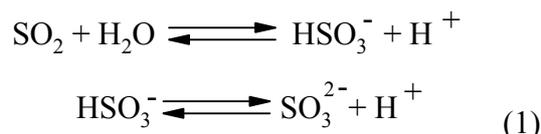
La teneur en SO₂ doit être soigneusement ajustée. Des doses trop fortes sont à proscrire pour des raisons d'ordre réglementaire et de dépréciation du vin (neutralisation de l'arôme, apparition caractéristique d'odeur suffocante et irritante, sensation de brûlure en fin de dégustation). Les doses maximales en SO₂ sont réglementées. Le recours à des doses trop faibles comporte des risques puisque le vin ne sera pas correctement préservé et pourra s'altérer rapidement. La connaissance de la chimie de cette molécule est nécessaire pour effectuer un ajustement précis des quantités présentes.

¹² Jaulmes P., Bres J. Cinétique de l'action de l'anhydride sulfureux sur la thiamine et la cocarboxylase : possibilité d'action des sulfites sur la thiamine pendant la digestion *Bull. O. I. V.*, **1973**, 46, 507-515

I.2 La chimie du dioxyde de soufre

I.2.1 Le dioxyde de soufre libre

On admet, lors de la mise en solution de SO_2 , l'établissement des équilibres suivants :¹³



La molécule d'acide H_2SO_3 n'existerait pas en solution. Elle possède néanmoins deux fonctions acides dont les pK sont respectivement $\text{pK}_1=1,81$ et $\text{pK}_2=6,91$. L'ion sulfite SO_3^{2-} est absent au pH du vin (de l'ordre de 3,5), alors que le dioxyde de soufre est présent majoritairement sous forme d'hydrogénosulfite HSO_3^- mais aussi sous forme moléculaire. La connaissance de la proportion de l'acide libre (ou "SO₂ actif") et de l'hydrogénosulfite (HSO_3^-) est importante, étant donné qu'une bonne part des propriétés œnologiques est attribuée au premier. Le calcul se fait par application de la loi d'action de masse et en considérant que l'activité de l'eau est voisine de 1, et conduit à l'équation suivante :

$$\text{Log} ([\text{HSO}_3^-]/[\text{SO}_2]) = \text{pH} - \text{pK} \quad (2)$$

Ainsi pour un pH variant entre 3 et 4, la proportion de SO_2 moléculaire varie de 6 à 0,6 %, expliquant la nécessité d'un sulfitage plus important lorsque le pH du vin est plus élevé. La valeur du pK est influencée par différents paramètres qui sont la température, le degré alcoolique et la force ionique, c'est-à-dire la concentration en sels (anions et cations du vin, par exemple SO_4^{2-} , CO_3^{2-} ..., K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ ...). Ces facteurs influencent donc la proportion de dioxyde de soufre à l'état de SO_2 actif.¹⁴

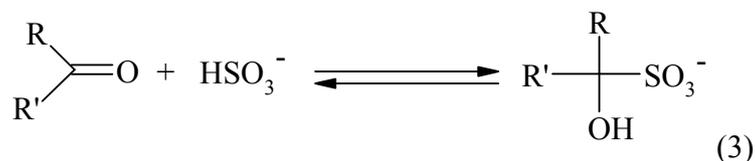
L'ion hydrogénosulfite (HSO_3^-) représente la fraction de l'acide dissocié correspondant. Avec le SO_2 actif, il représente "l'anhydride sulfureux libre" ou le "dioxyde de soufre libre", telle que cette notion est définie en œnologie.

¹³ Pascal P. *Nouveau traité de chimie minérale. Tome XIII, 2° fascicule*. Paris : Masson, **1961**, 1236-1243

¹⁴ Usseglio-Tomasset L. *Chimie œnologique*, 2° édition française. Paris, Londres, New York : Lavoisier Technique & Documentation, **1995**, 387 p.

I.2.2 Le dioxyde de soufre combiné

Les bisulfites possèdent la propriété de se fixer sur les molécules possédant une fonction carbonyle pour donner une combinaison bisulfitique selon une réaction réversible (3).¹⁵



R' peut être un atome d'hydrogène (aldéhyde) ou un groupement carboné (cétone). L'ensemble des combinaisons bisulfitiques correspond au dioxyde de soufre combiné, tel qu'il est défini en œnologie. La somme du "SO₂ libre" et du "SO₂ combiné" est égale au "SO₂ total". Par rapport au SO₂ libre, le SO₂ combiné possède des propriétés antiseptiques ou antioxydantes beaucoup moins importantes, voire nulles.

La position de l'équilibre est donnée par la relation (4) qui relie entre elles les concentrations molaires des différents corps.¹⁶

$$\frac{[\text{RR}'\text{C}=\text{O}] \times [\text{HSO}_3^-]}{[\text{RR}'\text{C}(\text{OH})\text{SO}_3^-]} = K_d \quad (4)$$

K_d est une constante caractéristique des aldéhydes et cétones susceptibles de combiner le SO₂. La teneur en hydrogénosulfite est assimilée au SO₂ libre. Elle est de l'ordre de 10⁻³ M.

Si la valeur de K_d est faible, inférieure ou égale à 0,003.10⁻³ M, à l'équilibre le rapport entre la molécule carbonylé sous forme combinée [RR'C(OH)SO₃⁻] et sous forme libre [RR'C=O] sera proche de 100, c'est-à-dire que la molécule carbonylée sera considérée comme pratiquement entièrement sous sa forme combinée, sa concentration étant 100 fois celle de la molécule sous forme libre. Il ne peut exister du SO₂ libre que dans la mesure où la molécule en question est entièrement combinée. Par ailleurs, la combinaison est considérée comme

¹⁵ Grignard V., Dupont G., Locquin R., Baud P. *Traité de chimie organique, tome VII*. Paris : Masson, **1950**, 769-770

¹⁶ Burroughs L. F., Sparks A. H. Sulfite-binding power of wines and ciders. II. Theoretical consideration and calculation of sulfite-binding equilibria *J. Sci. Food Agric.*, **1973**, 24, 199-206

stable et définitive, aux conditions de conservation des vins, dans le sens que la disparition du SO₂ libre par oxydation n'entraîne pas un déplacement appréciable de l'équilibre.

Si la valeur de K_d est élevée, égale ou supérieure à $30 \cdot 10^{-3}$ M, à l'équilibre la molécule carbonylée existe 100 fois plus sous forme libre que sous forme combinée. La molécule combinante est considérée comme très peu combinée. Par ailleurs, la combinaison correspondante est peu stable. Lorsque le SO₂ libre disparaît par oxydation, la dissociation de cette combinaison, nécessaire au rétablissement des équilibres, va régénérer le SO₂ libre.

Il est maintenant temps de considérer les dérivés carbonylés responsables de la combinaison du dioxyde de soufre.

II Les différents protagonistes de l'étude

II.1 Les dérivés carbonylés à extraire

Quatre dérivés carbonylés ont été retenus pour cette étude. Ils sont responsables de la plus grande partie du piégeage du SO₂ dans les vins blancs liquoreux.

II.1.1 L'éthanal ou acétaldéhyde

L'éthanal (**1**) peut provenir de l'oxydation de l'éthanol. C'est également un intermédiaire important dans les mécanismes de la fermentation des sucres par les levures et de la piqûre acétique (schéma 1).

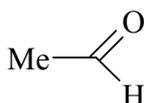


Schéma 1 : Ethanal

Sa masse molaire est de 44 g.mol⁻¹. Sa teneur dans les vins est comprise entre 0,005 et 0,5 g.l⁻¹.¹⁷ La combinaison bisulfite de l'éthanal (CH₃-CHOH-SO₃⁻), combinaison stable dans les milieux acides, est la forme la plus générale de sa présence. Cette combinaison est considérée comme irréversible aux conditions de conservation des vins (99 % combiné). La valeur très faible de la constante de dissociation (0,0024.10⁻³ M)¹⁸ justifie cette affirmation.

II.1.2 L'acide pyruvique ou acide 2-oxo-propan-1-oïque

L'acide pyruvique (**2**) (schéma 2) est un produit secondaire issu de la fermentation alcoolique.

¹⁷ Navarre C. *L'œnologie*, 2^e édition. Londres, Paris, New York : Lavoisier-Technique & Documentation, **1991**, 324 p.

¹⁸ Burroughs L. F., Sparks A. H. Sulfite-binding power of wines and ciders I. Equilibrium constants for the dissociation of carbonyl bisulfite compounds *J. Sci. Food Agric.*, **1973**, 24, 187-198

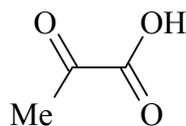


Schéma 2 : Acide pyruvique

Sa masse molaire est de 88 g.mol^{-1} . Sa teneur dans les vins est comprise entre 0,01 et $0,5 \text{ g.l}^{-1}$ avec une moyenne autour de $0,1 \text{ g.l}^{-1}$.¹⁹ La valeur de la constante de dissociation (K_d) est de $0,3.10^{-3} \text{ M}$, ce qui entraîne une responsabilité importante dans la combinaison avec le SO_2 .²⁰

II.1.3 L'acide 2-oxoglutarique ou acide 2-oxo-pentan-1,5-dioïque

L'acide 2-oxoglutarique (3) (schéma 3) est également un produit secondaire issu de la fermentation alcoolique.

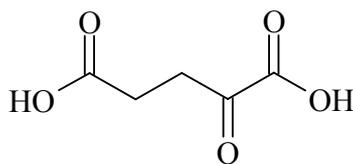


Schéma 3 : Acide 2-oxoglutarique

Sa masse molaire est de 144 g.mol^{-1} . Sa teneur dans les vins est comprise entre 0,002 et $0,35 \text{ g.l}^{-1}$ avec une moyenne à $0,1 \text{ g.l}^{-1}$. La valeur de la constante de dissociation (K_d) est assez faible ($0,5.10^{-3} \text{ M}$).²⁰ Ce composé présente donc une certaine importance dans la combinaison avec le SO_2 .

II.1.4 Le 5-oxofructose ou D-threo-hexo-2,5-diulose

Le 5-oxofructose (4) (schéma 4) est issu de l'action de *Gluconobacter oxydans* sur les baies de raisins atteintes par *Botrytis cinerea*.

¹⁹ Ribéreau-Gayon J., Peynaud E., Sudraud P., Ribéreau-Gayon P. *Traité d'œnologie. Sciences et techniques du vin, tome 1 – analyse et contrôle des vins*, 2^e édition. Paris : Dunod, 1982, 645 p.

²⁰ Blouin J. *Contribution à l'étude des combinaisons de l'anhydride sulfureux dans les moûts et les vins*. Th.: Bordeaux II: 1965: n°117: 177 p.

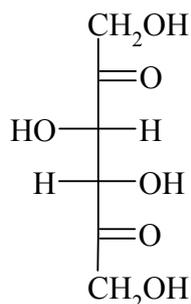


Schéma 4 : 5-oxofructose

Sa masse molaire est de $178 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Sa teneur dans les vins est très variable en fonction de la vendange. La valeur de sa constante de dissociation (K_d) est assez faible ($0,485\cdot 10^{-3} \text{ M}$), comme pour les trois autres composés.²¹ Il présente donc également une responsabilité non négligeable dans la combinaison du SO_2 .

Les trois premiers composés étudiés sont commerciaux, alors que le 5-oxofructose n'est pas un produit commercial. Il est donc nécessaire de le synthétiser pour étudier sa combinaison en solution modèle. Le produit ainsi obtenu permettra de réaliser des solutions modèles afin d'effectuer toutes les études d'extraction nécessaires. Deux approches ont été relevées dans la littérature, l'une chimique et l'autre enzymatique.

La voie chimique consiste à oxyder un sucre.²² Le sorbose donne un meilleur rendement que le fructose lorsque l'oxydation est réalisée en présence de brome.²³ L'oxydation du fructose se fait bien en présence de platine sur charbon.²⁴ Le produit est à chaque fois obtenu après séparation par chromatographie d'échange d'ions.

L'obtention du 5-oxofructose par voie enzymatique peut être réalisée selon deux approches différentes.

²¹ Barbe J.-C. La combinaison du dioxyde de soufre dans les moûts et les vins issus de raisins botrytisés. Th.: Sc. Biol. et Méd.: Bordeaux II: **2000**, n° 745, 165 p.

²² Gallezot P. Metal catalysis in the conversion of biosustainable resources *Catalysis by metals*, Ed. A. J. Renouprez, H. Jobic. Les Ulis : Springer, **1997**, 201-221

²³ Whiting G. C., Cogging R. A. Formation of 2,5-D-threo-diketose *Chem. Ind.*, **1963**, 1925-1926

²⁴ Heinen A. W., Peters J. A., van Bekkum H. The oxidation of fructose on Pt/C catalysts. The formation of D-threo-hexo-2,5-diulose and the effect of additives *Carbohydrate Research*, **1997**, 304, 155-164

La première méthode utilise l'enzyme pyranose oxydase qui est extraite du mycélium de *Peniophora gigantea*²⁵ avant d'être immobilisée sur un support, l'Eupergit C 250 L, une résine époxy.²⁶ La conversion du fructose se fait à température ambiante dans l'eau, puis la résine est extraite du milieu réactionnel.^{27,28} Après ultrafiltration et lyophilisation, le 5-oxofructose est obtenu avec un rendement de l'ordre de 85 %.

La deuxième méthode passe par une autre voie enzymatique.²⁹ La 5-fructose-déshydrogénase,^{30,31} permet d'oxyder spécifiquement le fructose en 5-oxofructose, en présence d'un co-enzyme, le 2,6-dichlorophénolindophénol. Le mélange est difficilement séparable, aussi le produit est-il conservé en solution. C'est cette voie qui a été mise en œuvre afin de préparer le 5-oxofructose pour effectuer des essais d'extraction. Elle a été réalisée en collaboration avec J.-C. Barbe de l'ENITA (schéma 5).²¹

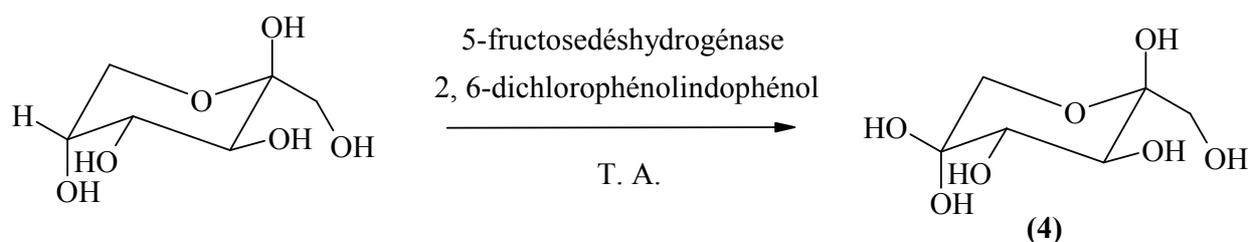


Schéma 5 : Synthèse du 5-oxofructose

La méthode appliquée est une synthèse biochimique dont le principal intérêt est la spécificité de l'enzyme utilisée qui ne catalyse que l'oxydation du fructose en 5-oxofructose (schéma 5) ; ainsi la quantité de fructose consommée correspond exactement à celle du

²⁵ Danneel H.-J., Rössner E., Zeck A., Giffhorn F. Purification and characterization of a pyranose oxidase from the basidiomycete *Peniophora gigantea* and chemical analyses of its reaction products *Eur. J. Biochem.*, **1993**, *214*, 795-802

²⁶ Boller T., Meier C., Menzler S. Eupergit oxirane acrylic beads: how to make enzymes fit for biocatalysis *Organic Process Research & Development*, **2002**, *6(4)*, 509-519

²⁷ Huwig A., Danneel H.-J., Giffhorn F. Laboratory procedures for producing 2-keto-D-glucose, 2-keto-D-xylose and 5-keto-D-fructose from D-glucose, D-xylose and L-sorbose with immobilized pyranose oxidase of *Peniophora gigantea* *J. Biotechnol.*, **1994**, *32*, 309-315

²⁸ Freimund S., Huwig A., Giffhorn F., Köpper S. Rare keto-aldehydes from enzymatic oxidation: substrates and oxidation products of pyranose 2-oxidase *Chem. Eur. J.*, **1998**, *4(12)*, 2442-2455

²⁹ Barbe J.-C., de Revel G., Joyeux A., Lonvaud-Funel A., Bertrand A. Role of carbonyl compounds in SO₂ binding phenomena in musts and wines from botrytized grapes *J. Agric. Food Chem.*, **2000**, *48*, 3413-3419

³⁰ Yamada Y., Aida K., Uemura T. Enzymatic studies on the oxidation of sugar and sugar alcohol *J. Biochem.*, **1967**, *61(5)*, 636-646

³¹ Ameyama M., Shinigawa E., Matsushita K., Adachi O. D-fructose dehydrogenase of *Gluconobacter industrius*: purification, characterization, and application to enzymatic microdetermination of D-fructose *J. Bacteriol.*, **1981**, *145(2)*, 814-823

5-oxofructose produite. La formation du 5-oxofructose sera donc suivie par la disparition du fructose. Ce suivi est réalisé par dosage enzymatique, basé sur les réactions suivantes (schéma 6) :

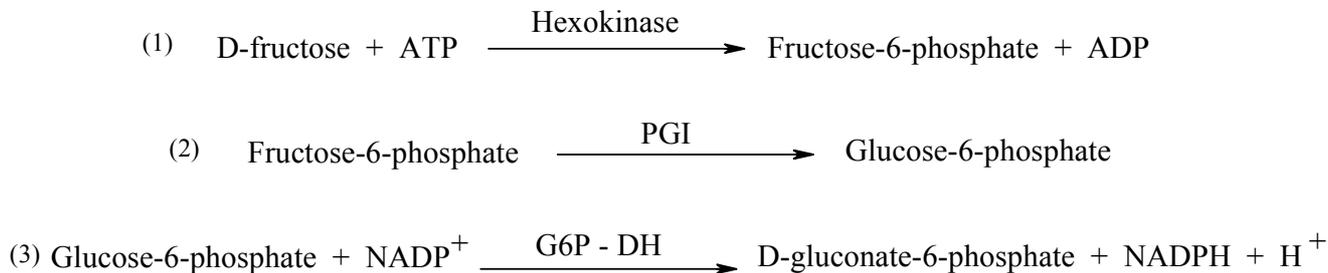


Schéma 6 : Réactions intervenant dans le suivi enzymatique de la disparition du fructose

Le D-fructose est phosphorylé en D-fructose-6-phosphate en présence de l'enzyme hexokinase et d'adénosine-5'-triphosphate, avec la formation simultanée d'adénosine-5'-diphosphate. L'hexokinase est une enzyme relativement peu spécifique que l'on trouve dans toutes les cellules et qui catalyse la phosphorylation d'hexoses comme le D-glucose, le D-mannose et le D-fructose.³² Le second substrat de l'hexokinase est un complexe Mg^{2+} -ATP. En fait, l'ATP non complexé est un puissant inhibiteur compétitif de l'hexokinase. Le mécanisme de la réaction est présenté sur le schéma 7.

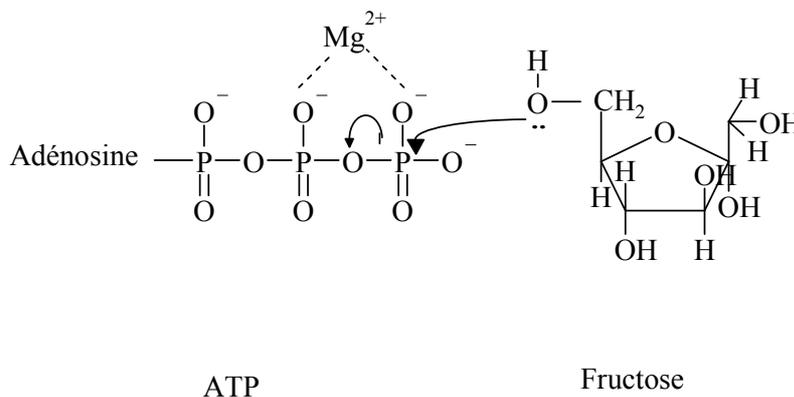


Schéma 7 : Mécanisme de la réaction de l'hexokinase

Il s'agit d'un mécanisme Bi Bi aléatoire au cours duquel l'enzyme forme un complexe ternaire avec le glucose et Mg^{2+} -ATP avant que ne débute la réaction. Le groupe $-\text{OH}$ porté par le C₆ du glucose effectue une attaque nucléophile du phosphate en position γ du complexe.

³² Voet D., Voet J. G. *Biochimie*, 2^o édition. Bruxelles : DeBoeck Université, 2005, 444-483

Il semble qu'en se complexant avec les atomes d'oxygène du phosphate, le Mg^{2+} masque leurs charges négatives, rendant l'atome de phosphore plus accessible pour l'attaque nucléophile.

Le D-fructose-6-phosphate est ensuite converti en D-glucose-6-phosphate par la phosphoglucose isomérase. Le mécanisme réactionnel de la réaction catalysée par la phosphoglucose isomérase est proposé sur le schéma 8 ; il met en jeu une catalyse générale acide-base par l'enzyme. Les résidus catalytiques BH^+ et B' du centre catalytique seraient respectivement la lysine et la glutamine.

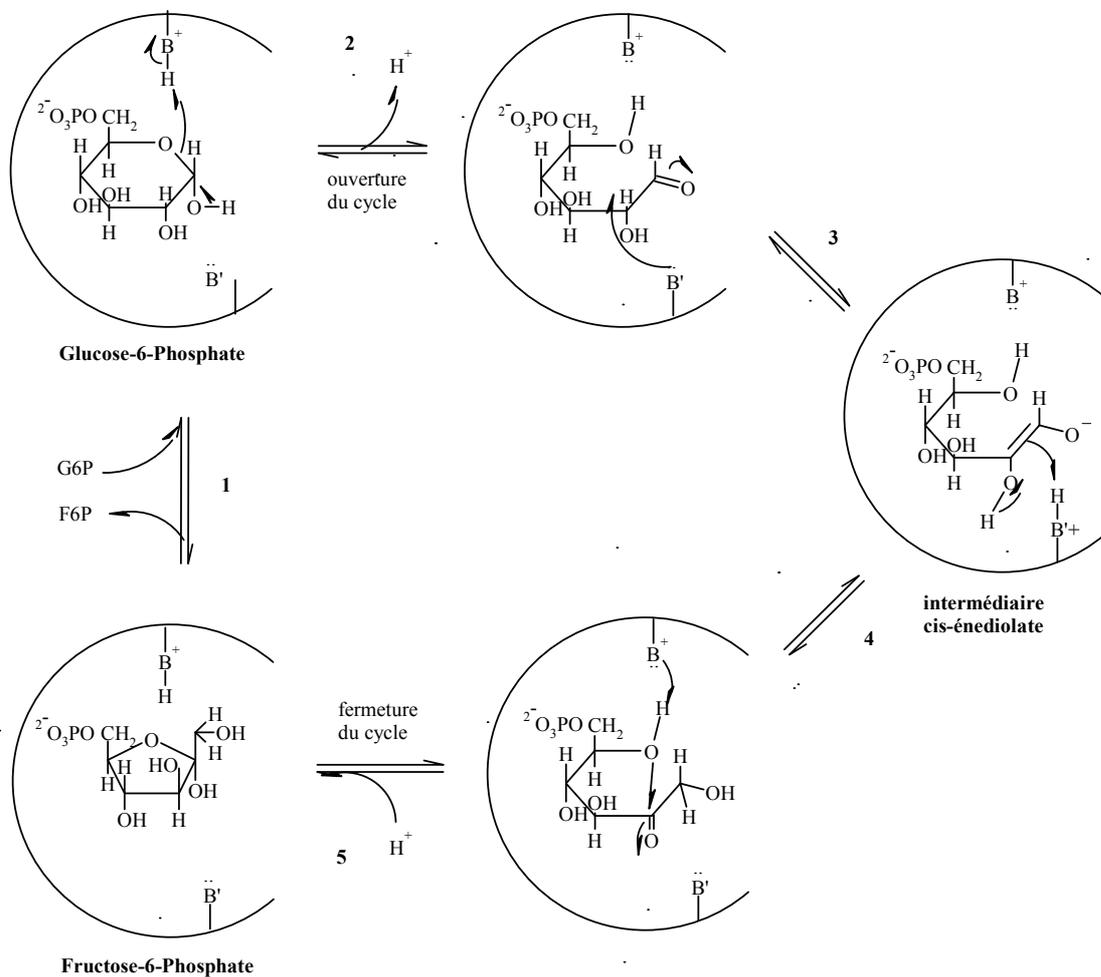


Schéma 8 : Mécanisme réactionnel de la phosphoglucose isomérase

1 : Liaison du substrat

Chapitre II : Les différents protagonistes de l'étude

2 : Un groupe acide, probablement le groupe ϵ -NH₂ de la lysine, catalyse l'ouverture du cycle

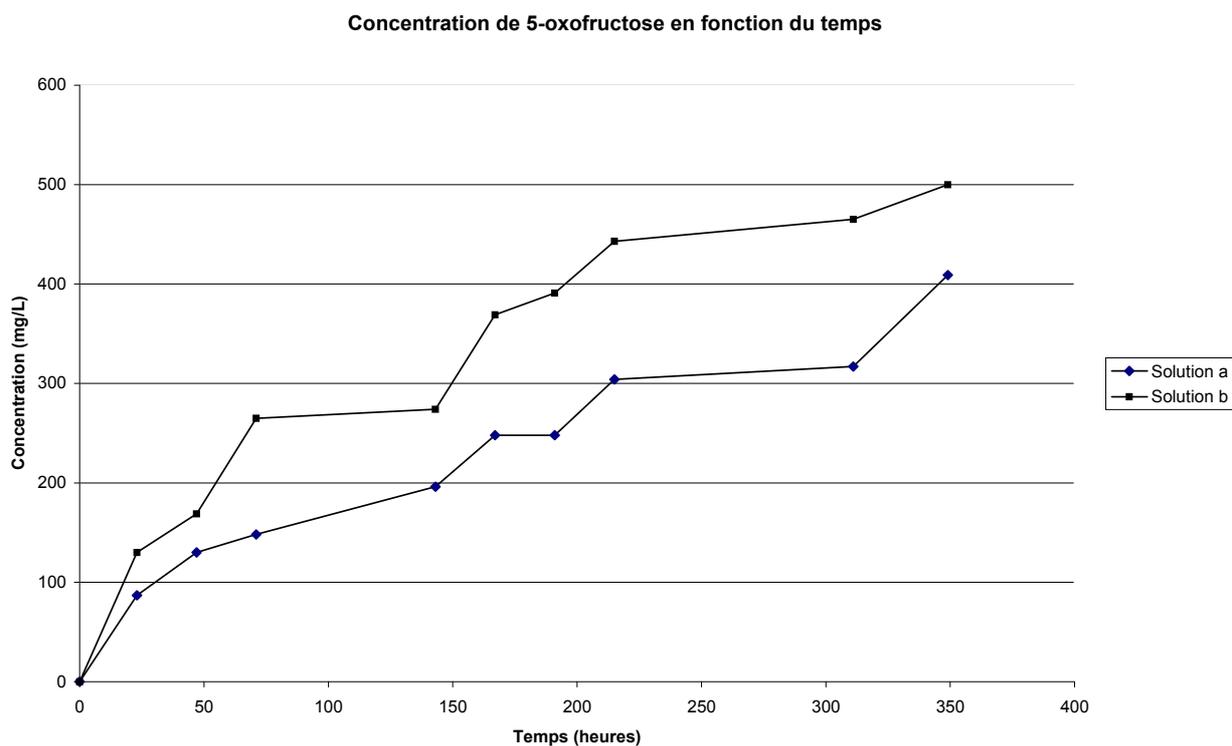
3 : Un groupe basique, probablement le groupe carboxylate de la glutamine, capte le proton acide du C₂ pour donner un intermédiaire *cis*-énediolate (ce proton est acide car il est en position α du groupe carbonyle).

4 : le proton se replace sur le C₁ au cours d'un transfert global de protons. Les protons captés par des bases sont labiles et s'échangent rapidement avec les protons du milieu.

5 : Fermeture du cycle et formation du produit, qui est finalement libéré pour redonner l'enzyme libre, complétant ainsi le cycle catalytique.

Le D-glucose-6-phosphate réagit ensuite avec le NADP pour former du D-gluconate-6-phosphate. La quantité de NADPH formée durant la réaction est proportionnelle à la quantité de D-fructose. La réduction du NADP est mesurée par la diminution de son absorbance à la longueur d'onde de 340 nm.

Le mélange réactionnel est une solution aqueuse contenant du fructose et de la fructose déshydrogénase. Le mélange est saturé en co-enzyme, le 2,6-dichlorophénol-indophénol (environ 1 g.l⁻¹). Régulièrement 2 ml de cette solution sont prélevés pour réaliser le dosage du fructose. L'évolution de la dégradation du fructose est présentée sur le graphique 1.



Graphique 1 : Evolution du taux de 5-oxofructose en fonction du temps

Au bout de 12 jours, nous avons ainsi pu obtenir deux solutions de 80 ml de volume chacune, contenant respectivement $0,4 \text{ g.l}^{-1}$ et $0,5 \text{ g.l}^{-1}$ de 5-oxofructose. L'enzyme utilisée pour les deux solutions provenait du même flacon et les solutions ont été rigoureusement soumises aux mêmes conditions. Cette synthèse a été plusieurs fois remise en œuvre dans les mêmes conditions. Ceci nous a permis d'observer le caractère difficilement reproductible de cette synthèse. La quantité moyenne obtenue est toujours de l'ordre de $0,4 \text{ g.l}^{-1}$, mais il est difficile de prévoir exactement la quantité qui sera produite. Les solutions de 5-oxofructose ont été filtrées sur membrane de $0,45 \mu\text{m}$ de façon à éliminer notamment le 2,6-dichlorophénolindophénol non soluble. Les solutions obtenues sont conservées au congélateur.

II.2 Réactivité des dérivés carbonylés

Une recherche bibliographique sur les réactions chimiques auxquelles les dérivés carbonylés (aldéhyde ou cétone) sont susceptibles de participer a été effectuée. L'objectif était de rechercher toutes les réactions permettant de générer une liaison covalente forte avec un

dérivé carbonyle. Les molécules qui permettent la création de cette liaison doivent de plus être susceptibles d'être attachées sur un support par une fonction secondaire.

II.2.1 Généralités sur la réactivité des dérivés carbonyles

Le groupe carbonyle est constitué d'un atome de carbone et d'un atome d'oxygène hybridés sp^2 , situés dans le même plan que les substituants portés par l'atome de carbone, les liaisons étant à 120° . L'oxygène porte deux doublets non liants. La liaison est courte et forte ($175-180 \text{ kcal.mol}^{-1}$). A la perpendiculaire de ce plan se trouvent deux orbitales p portées respectivement par le carbone et l'oxygène et formant une liaison π . Ce nuage π est affecté par la différence d'électronégativité entre les deux atomes, provoquant une polarisation de la double liaison. L'atome de carbone est alors susceptible de subir une attaque nucléophile (schéma 9).^{33,34}

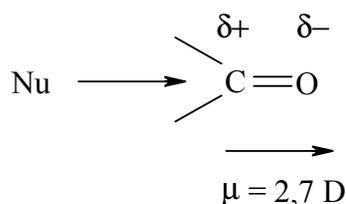


Schéma 9 : L'attaque nucléophile sur la fonction carbonyle

Pour réaliser l'extraction du dérivé carbonyle voulu, le plus simple consiste à introduire dans le milieu un nucléophile susceptible de conduire à une réaction avec la fonction carbonyle et si possible présentant un équilibre déplacé vers les produits. Les recherches bibliographiques nous ont permis de trouver un certain nombre de réactions répondant à ces critères.

³³ Vollhardt K. P. C., Schore N. E. *Traité de chimie organique*, 2^e édition. Bruxelles : DeBoeck Université, **1995**, 629-674

³⁴ Patai S. *The chemistry of the carbonyl group*. London-New York-Sidney : Interscience Publishers, a division of John Wiley & Sons, **1966**, 1027 p.

II.2.2 Les réactions possibles

II.2.2.1 La réaction de mono-addition

La première réaction possible est une mono-addition sur l'atome de carbone du carbonyle. Il n'y a dans ce cas aucun composé libéré dans le milieu réactionnel. C'est par exemple le cas de la formation des hémiacétals par addition d'un alcool en catalyse acide (schéma 10).



Schéma 10 : Formation d'un hémiacétal

La formation de la liaison carbone-soufre, qui se produit en milieu acide, est également une réaction de type mono-addition (schéma 11).^{15,35,36} Il s'agit de la réaction conduisant à la combinaison du dioxyde de soufre dans les vins.

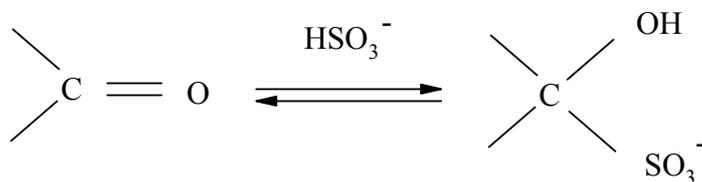


Schéma 11 : Formation de la liaison bisulfite

La réaction d'addition peut également conduire à la formation d'une liaison de type carbone-carbone. Cette liaison sera simple, comme dans le cas de l'utilisation d'organomagnésien,³⁷ ou double, comme dans le cas de la réaction de Wittig.

³⁵ Guillou-Largeteau I. Etude de substances de faible poids moléculaire combinant le dioxyde de soufre dans les vins blancs issus de vendange botrytisée. Mise en évidence du rôle de l'hydroxypropanedial. Th : Sc. Biol. et Med. : Bordeaux II : **1996**, n° 425, 196 p.

³⁶ Berké B. Le devenir du dioxyde de soufre dans les vins de Bordeaux. Th: Sc. Biol. et Med.: Bordeaux II: **1998**, n° PSB1, 232 p.

³⁷ Ashly E. C., Laemmle J., Neumann H. M. Organometallic reaction mechanism. VIII. Detailed description of the mechanism of methylmagnesium bromide addition to 2-methylbenzophenone *J. Am. Chem. Soc.*, **1972**, 94, 5421-5434

Pour être complet, on peut citer l'addition de l'acide cyanhydrique³⁸ ou l'addition d'hydrure. Ces composés présentent deux inconvénients. Ils ne possèdent pas de fonction secondaire permettant de les fixer sur un support et ils conduisent à des composés toxiques.

II.2.2.2 La réaction de bi-addition

La seconde réaction à considérer est la bi-addition (schéma 12). Dans ce cas il y a élimination d'eau dans le milieu. C'est par exemple la réaction utilisée pour la protection des fonctions carbonyles par l'addition d'alcools, de diols ou de thiols.³⁹

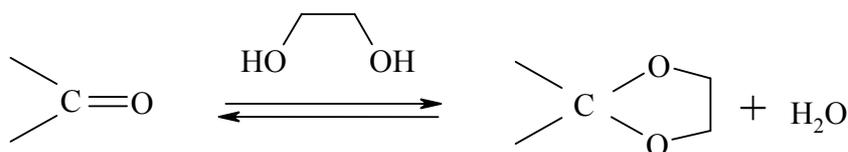


Schéma 12 : Formation d'un acétal

II.2.2.3 La réaction d'addition-élimination

Enfin viennent les réactions d'addition-élimination (Schéma 13). C'est par exemple le cas de l'addition d'amine primaire sur un carbonyle, conduisant à la formation d'une imine. Cette réaction libère également une molécule d'eau dans le milieu.⁴⁰

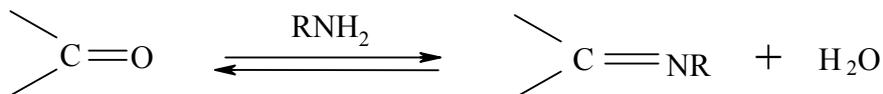


Schéma 13 : Formation d'une imine

Cette réaction peut également s'appliquer au cas des amines secondaires, conduisant alors à la formation d'énamines. Les nucléophiles de type carboné passant par la formation

³⁸ Prelog V., Kobelt H. Über die Abhängigkeit der Dissoziationskonstanten der ringhomologen Cyclanoncyanhydrine von der Ringgröße *Helv. Chim. Acta*, **1949**, 32, 1187-1192

³⁹ Kocienski P.J. *Protecting groups*. New York : Thieme, **1994**, 155-184

⁴⁰ Carey F. A., Sundberg R. J. *Chimie Organique Avancée, tome 1, Structure moléculaire et mécanismes réactionnels*, 3^e édition. Paris, Bruxelles : DeBoeck Université, **1996**, 802 p.

intermédiaire d'un énolate conduisent également à des réactions d'addition-élimination avec formation d'une liaison carbone-carbone.

II.3 Sélection des fonctions extractives

Les réactions envisageables avec les composés nucléophiles peuvent donc être de deux types. Soit il s'agit d'une simple addition. Soit il s'agit d'une addition suivie d'une élimination. Toutes les réactions possibles des dérivés carbonylés ne sont toutefois pas applicables dans cette étude.

II.3.1 Critères à respecter

La réaction d'extraction liquide-solide envisagée doit respecter un certain nombre de contraintes liées à la nature du milieu à traiter. La réaction mise en œuvre devra donc se réaliser :

- En milieu hydroalcoolique à un pH de l'ordre de 3,5 qui est celui des vins considérés
- A température ambiante, de façon à ne pas altérer les autres composés présents dans le milieu
- Sans ajout de catalyseur, qui serait un facteur de pollution supplémentaire dans le milieu et serait susceptible de favoriser des réactions secondaires parasites
- Sans libérer de produit secondaire autre que de l'eau dans le milieu

Compte tenu de ces critères, nous sommes d'ores et déjà dans l'obligation de restreindre les réactions possibles sur les nucléophiles. Toutes les réactions conduisant à la formation d'une liaison carbone-carbone sont à éliminer. Elles nécessitent en effet de donner un caractère nucléophile à l'atome de carbone soit par l'emploi de catalyseurs (comme dans la réaction de Wittig), facteurs de pollution du milieu, soit par le biais d'un intermédiaire réactionnel de type organométallique, inutilisable en milieu hydroalcoolique. Les réactifs de type oxygénés ne sont pas non plus envisageables pour cette étude. Dans ce cas, la réaction présente un équilibre, avec libération d'eau dans le milieu. Il serait nécessaire d'éliminer l'eau à mesure de sa formation pour que la réaction soit déplacée vers le piégeage des dérivés carbonylés. Il n'est pas envisageable d'éliminer cette eau dans un milieu constitué déjà d'au moins 85 % d'eau. D'autres nucléophiles sont donc étudiés.

En résumé la réaction doit être très ou totalement déplacée vers les produits, et non équilibrée pour favoriser l'extraction envisagée. Elle doit permettre dans les conditions imposées de former une liaison forte. Elle ne doit pas libérer d'autres composés que de l'eau dans le milieu.

II.3.2 Les réactifs envisagés

Un certain nombre de composés répondent aux conditions réactionnelles imposées.

II.3.2.1 Les composés soufrés

Les conditions de réactions ont permis d'envisager l'utilisation de réactifs soufrés. Deux types de composés ont été considérés.

II.3.2.1.1 Les sulfites

Les premiers réactifs possibles pouvant correspondre à nos critères de recherches sont les sulfites ou monoesters d'acides sulfureux,⁴¹ de la forme ROSO_2H , où R est une chaîne alkyle. Ils ont été assez peu étudiés. Ces composés se sont en effet révélés de faible stabilité et donc peu utilisables. Ils ont été identifiés sous forme de sels, généralement utilisés dans la composition d'électrolytes aqueux pour des batteries rechargeables.⁴² Aucune réaction n'a été signalée avec les dérivés carbonylés. Leur manque de stabilité fait que leur utilisation pour l'extraction envisagée est impossible. Les sulfites sont donc à exclure de notre étude.

II.3.2.1.2 Les acides sulfiniques

Les autres réactifs envisageables sont les acides sulfiniques qui sont de la forme RSO_2H . R peut être un groupe alkyle ou aryle, ce dernier conduisant à une famille de composés beaucoup plus stables et donc plus intéressants à utiliser. Ces composés sont à la

⁴¹ McCormack W. B., Lawes B. C. Sulfuric and sulfurous esters *Encyclopedia of Chemical Technology* / ed. Kirk R. E., Othmer D. F., Kroschwitz J., Howe-Grant M., 4^e édition. New York-London-Sydney-Paris : Wiley-Interscience Publication, 1997, vol 23, 409-428

⁴² Hong G., Takeushi E.S. (Wilson Greatbatch Limited, USA) Eur. Pat. Appl. EP 1022799, 2000

fois des nucléophiles, du fait de la présence d'un doublet d'électrons sur l'atome de soufre, et des acides forts. Ils peuvent donc engendrer une grande variété de réactions.⁴³⁻⁴⁵

Les acides sulfiniques permettent un grand nombre de réactions avec différents dérivés carbonylés. En se limitant aux conditions précises de la réaction voulue, c'est-à-dire dans une solution hydroalcoolique, à température ambiante et sans catalyseur, les possibilités restent encore assez nombreuses. Les acides sulfiniques réagissent bien avec les aldéhydes (schéma 14)⁴³ sans libération dans le milieu d'une espèce secondaire indésirable.

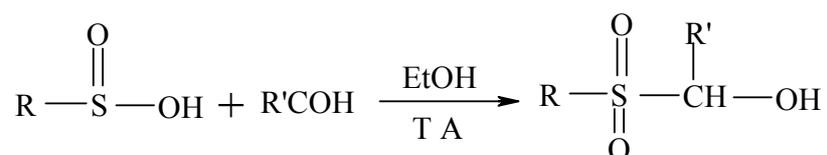


Schéma 14 : Réaction d'un acide sulfinique avec un aldéhyde

Les acides sulfiniques réagissent également avec les cétones α,β -insaturées (schéma 15), toujours en respectant les conditions imposées par l'utilisation ultérieure envisagée.⁴⁶

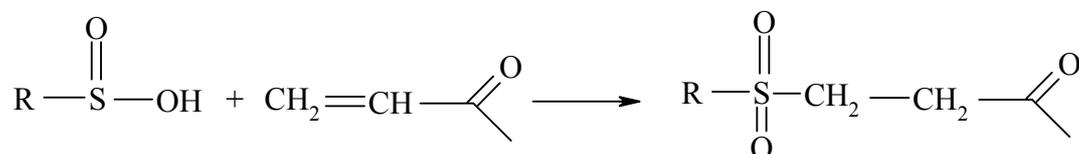


Schéma 15 : Réaction d'un acide sulfinique avec une cétone α,β -insaturée

On peut signaler que les acides α,β -insaturés réagissent également bien avec les acides sulfiniques. Malheureusement les tentatives réalisées avec les cétones saturées n'ont jamais été couronnées de succès.⁴⁷

⁴³ Oae S., Kunieda N. *Organic chemistry of sulfur*. New York : 1977, Plenum Press, 713 p.

⁴⁴ Filby W.G., Günther K., Penzhorn R.D. Improved method for the synthesis of aliphatic sulfinic acids *J. Org. Chem.*, **1973**, 38(23), 4070-4071

⁴⁵ Vercauteren J., Berké B., Soulet S., Cheze C. Brevet FR 2 851 250 – A1, **2003**

⁴⁶ Zoller T., Breuilles P., Klein S., Uguen D., De Cian A., Fischer J. Fine tuning of the [2+2] vs [4+2] selectivity of 1,1-substituted dienes in cycloaddition reactions *Tetrahedron Lett.*, **1999**, 40(51), 9015-9018

⁴⁷ Kohler E. P., Reimer M. Some addition-reaction of sulfinic acids, *Chem. Ber.*, **1904**, 31, 163-185

La méthode la plus utilisée pour obtenir les acides sulfiniques avec de bons rendements consiste à réduire les chlorures de sulfonyle par un traitement au zinc ou au fer dans une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium. Les chlorures d'arylsulfonyles sont réduits par le sulfite de sodium. D'autres méthodes peuvent permettre également d'y accéder. L'oxydation directe de mercaptans aliphatiques avec l'acide *m*-chloroperbenzoïque donne de bons rendements.⁴⁸ La condensation d'un hydrocarbure aromatique avec le dioxyde de soufre aboutit à la formation d'une liaison carbone-soufre.⁴⁸ Les acides sulfiniques sont également obtenus par réaction du dioxyde de soufre avec le réactif de Grignard correspondant, suivi d'un traitement acide. Les sels d'aryle diazonium réagissent avec le dioxyde de soufre en présence de cuivre pour conduire aux acides arylsulfiniques.⁴⁹ Les possibilités sont variées, la liste étant loin d'être close. Il reste alors à choisir la méthode la mieux adaptée au groupe R voulu, selon la forme la plus facile à obtenir (par voie de synthèse ou suivant sa disponibilité commerciale).

On peut donc dire qu'en ce qui concerne les aldéhydes et les cétones α,β -insaturées l'utilisation des acides sulfiniques donne de très bons résultats. La réaction se fait dans les conditions voulues et sans libérer dans le milieu un autre composé. Ils répondent assez bien aux critères de sélection. Il reste à connaître leur stabilité dans le milieu réactionnel envisagé. Une molécule est retenue dans cette famille pour tester l'efficacité et la stabilité dans les conditions d'utilisation. Il s'agit de l'acide phénylsulfinique (**5**) (schéma 16).

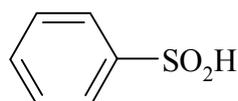


Schéma 16 : Acide phénylsulfinique

II.3.2.2 Les composés azotés

Les composés soufrés donnent de bons résultats mais ne réagissent pas sur certains dérivés carbonylés. Il est donc intéressant d'explorer une autre piste qui ouvrirait sur un plus large domaine d'utilisation. Les composés azotés sont connus pour réagir avec les dérivés

⁴⁸ Andersen K. K. *Comprehensive Organic Chemistry. The synthesis and reactions of organic compounds.* Oxford: Pergamon Press, **1979**, vol. 3, 317-329

⁴⁹ Truce W. E., Murphy A. M. The preparation of sulfuric acids *Chem. Rev.*, **1951**, 48(1), 69-124

carbonylés.⁵⁰ Certains composés de cette famille permettent d'effectuer des dosages de ces dérivés dans une solution. Ces méthodes sont basées sur le piégeage des dérivés carbonylés par des réactions d'addition-élimination. L'extraction des dérivés carbonylés pourrait donc se faire en utilisant de telles molécules.⁵⁰

II.3.2.2.1 Les O-benzylhydroxylamines

Les O-alkylhydroxylamines sont des composés réagissant efficacement avec les aldéhydes et les cétones. Ces composés de type RONH_2 sont conservés sous forme de chlorhydrates, c'est-à-dire associés avec le chlorure d'hydrogène pour neutraliser cette base où R est un groupe alkyle ou aryle. Signalons que le chlorhydrate de O-(pentafluorobenzyl)hydroxylamine (PFBOA) (**6**) (schéma 17) a été utilisé pour effectuer des dosages de dérivés carbonylés dans des milieux aqueux.^{50,51} Une fois le dérivé carbonylé piégé, il peut être dosé par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. C'est donc une réaction très intéressante pour extraire les dérivés carbonylés.

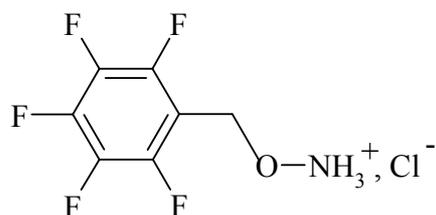


Schéma 17 : Chlorhydrate de O-(pentafluorobenzyl)hydroxylamine

La réaction avec le dérivé carbonylé se fait en solution hydroalcoolique pour donner des oximes avec libération d'eau. L'acide chlorhydrique peut être piégé par l'ajout de pyridine, mais cette addition ne serait pas en accord avec les conditions réactionnelles fixées au départ.⁵² Le milieu étant lui-même acide au départ, la modification de pH ne sera peut être pas significative au regard de la quantité d'hydroxylamine placée dans le milieu. Il serait cependant plus raisonnable de libérer l'hydroxylamine par l'action d'une base avant de l'utiliser, de façon à s'affranchir de ce problème de relargage dans le milieu (schéma 18).

⁵⁰ De Revel G., Bertrand A. A method for the detection of carbonyl compounds in wine: glyoxal and methylglyoxal *J. Sci. Food Agric.*, **1993**, 61, 267-272

⁵¹ Yamada H., Somiya I. The determination of carbonyl compounds in ozonated water by the PFBOA method, *Ozone science & engineering*, **1989**, vol. 11, pp 127-141, printed in the USA

⁵² Bryant W. M. D., Smith D. M. Improved hydroxylamine method for the determination of aldehydes and ketones. Displacement of oxime equilibria by means of pyridine *J. Am. Chem. Soc.*, **1935**, 57, 57-61

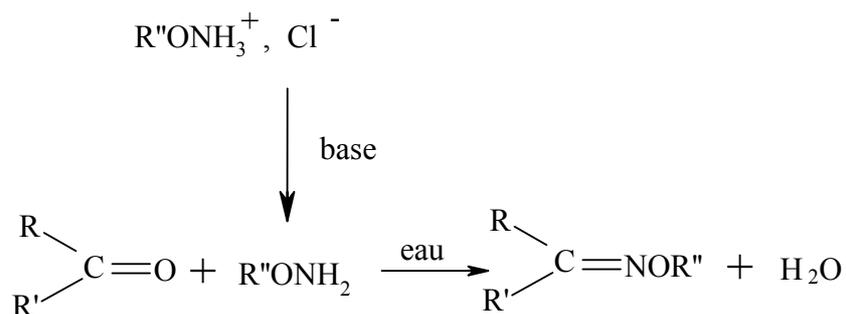


Schéma 18 : Réaction d'une hydroxylamine

Le chlorhydrate de O-(pentafluorobenzyl)hydroxylamine est préparé par réaction du N-hydroxylphthalimide sur le bromure de pentafluorobenzyle. Le produit obtenu est ensuite mis en présence d'hydrate d'hydrazine et de chlorure d'hydrogène pour accéder au composé souhaité.^{53,54} Dans ce cas, la présence d'atomes de fluor sert notamment à augmenter le point d'ébullition pour mieux séparer les composés présents ayant réagi avec l'hydroxylamine. Ce composé est utilisé comme agent de dérivation pour réaliser des analyses. Compte tenu de notre objectif, la O-benzylhydroxylamine (**7**) d'accès plus facile sera utilisée (schéma 19).

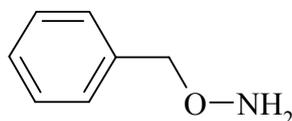


Schéma 19 : O-benzylhydroxylamine

II.3.2.2.2 Les dérivés des hydrazines

Les hydrazines de la forme RNHNH₂ réagissent bien avec les dérivés carbonylés, mais certains de ces composés sont assez réactifs, voire même explosifs sous certaines conditions et leur utilisation est trop contraignante. Les sulfonylhydrazines, beaucoup plus stables, sont des composés de la forme RSO₂NHNH₂, où R est un groupe alkyle ou aryle.

⁵³ Cancilla D.A., Que Hee S.S. O-(2,3,4,5,6-pentafluorophenyl)methylhydroxylamine hydrochloride: a versatile reagent for the determination of carbonyl-containing compounds *J. Chromatogr.*, **1992**, 627, 1-16

⁵⁴ Youngdale G. A. New compounds: synthesis of O-(pentafluorobenzyl)hydroxylamine hydrochloride *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **1976**, 65(4), 625-626

Les réactions des sulfonylhydrazines avec des dérivés carbonyles conduisent à la formation d'une double liaison azote-carbone avec libération d'eau dans le milieu suivant le mécanisme de la réaction d'addition-élimination (schéma 20).^{55,56}

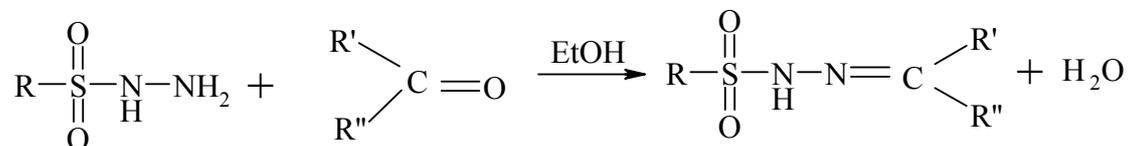
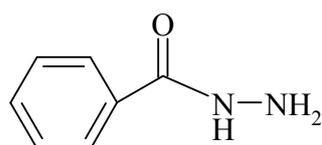


Schéma 20 : Réaction d'une sulfonylhydrazine

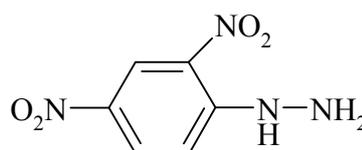
Comme dans le cas des composés soufrés, la quantité d'eau relarguée est négligeable par rapport au reste de la solution au vu de la concentration des composés à extraire.

Les semicarbazides ou réactifs de Girard,⁵⁷ composés où un groupe carbonyle est placé entre un phényl et le groupe hydrazinyle, réagissent de manière similaire avec les dérivés carbonyles (schéma 21).

La 2,4-dinitrophénylhydrazine (DNPH), où l'hydrazine est liée à un benzène substitué en -2 et -4 par des groupes nitro, est aussi un composé utilisé pour extraire des dérivés carbonyles (schéma 21).^{58,59}



Semicarbazides



2,4-dinitrophénylhydrazine

Schéma 21 : Molécules réagissant avec les dérivés carbonyles

⁵⁵ Galioglu O., Akar A. Polymer-bound sulfonyl hydrazine and reaction with cycloketones *Eur. Polym. J.*, **1989**, 25(3), 313-316

⁵⁶ Kamogawa H., Kanzawa A., Kadoya M., Naito T., Nanasawa M. Conversions of carbonyl compounds via their polymeric sulfonylhydrazones into alkenes, alkanes and nitriles *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1983**, 56(3), 762-765

⁵⁷ Singh R.P., Subbarao H.N., Dev S. Organic reactions in a solid matrix – VI Silica-gel supported reagents for the isolation of aldehydes and ketones *Tetrahedron*, **1981**, 37, 843-846

⁵⁸ Breckenridge S.M., Yin X., Rosenfeld J.M., Yu Y.H. Analytical derivatizations of volatile and hydrophilic carbonyls from aqueous matrix onto a solid phase of a polystyrene-divinylbenzene macroreticular resin *J. Chromatogr. B*, **1997**, 694, 289-296

⁵⁹ Critchfield F.E. *Organic functional group analysis*. Oxford, New York: Pergamon Press, **1963**, vol. 8, 60-80

Les dérivés des hydrazines sont donc des composés à retenir pour l'extraction des dérivés carbonylés.

Des études ont déjà été réalisées sur des supports dans le cas des sulfonylhydrazines.⁶⁰ Bien que toutes les fonctions supportées ne réagissent pas forcément, en raison de leur manque d'accessibilité, ces résultats sont encourageants pour notre étude. Il faut toutefois noter que les conditions expérimentales appliquées diffèrent de celles envisagées. La phénylsulfonylhydrazine (**8**) sera retenue pour la suite de cette étude (schéma 22).

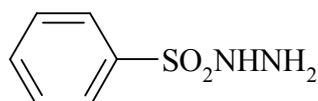


Schéma 22 : Phénylsulfonylhydrazine

II.3.2.2.3 Les diamines

Une dernière famille de composés susceptibles de réagir avec les dérivés carbonylés est intéressante à considérer. Il s'agit de diamines où les atomes d'azotes sont séparés par un groupe éthylène et sont substitués par des groupes identiques ou différents, suivant les cas.

La N,N'-diméthyl-1,2-éthanediamine réagit avec une cétone α -hydroxylée pour former un cycle insaturé en libérant deux molécules d'eau (schéma 23).⁶¹

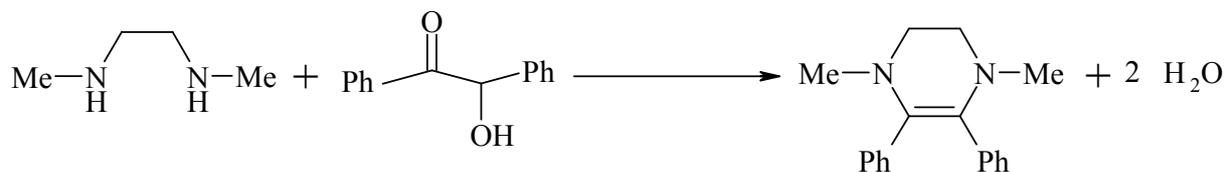


Schéma 23 : Réaction d'une diamine

⁶⁰ Emerson D.W., Emerson R.R., Joshi S.C., Sorensen E.M., Turek J.E. Polymer-bound sulfonylhydrazine functionality. Preparation, characterization and reactions of copoly(styrene-divinylbenzenesulfonylhydrazine) *J. Org. Chem.*, **1979**, 44(25), 4634-4639

⁶¹ Handley R.S., Stern A. J., Schaap A. P. Effects of heteroatom substituents on the properties of 1,2-dioxetanes *Tetrahedron Lett.*, **1985**, 26(27), 3183-3186

Les tests sur cette famille de composés sont peu nombreux mais dans l'ensemble assez encourageants. C'est une voie qu'il serait probablement intéressant de développer. Le relargage d'eau dans le milieu n'est pas, là non plus, un critère pour éliminer ces composés.

Les atomes d'azote sont les sites réactifs mais peuvent être également constitutifs d'un motif polymérique, ce qui élimine le risque de libération dans le milieu réactionnel d'un composé non désiré. En contrepartie, le support devra avoir une certaine flexibilité pour permettre la cyclisation lors de cette réaction.

La réaction sur le polymère se fait dans les conditions voulues avec les aldéhydes, libérant une molécule d'eau (schéma 24).⁶²

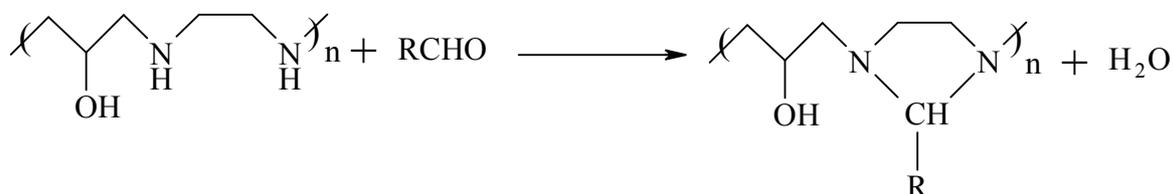


Schéma 24 : Réaction d'une polyéthylènimine avec un aldéhyde

La polyéthylènimine (**8**) est le composé retenu dans cette catégorie de réactifs pour la suite de l'étude (schéma 25).

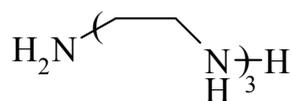


Schéma 25 : Polyéthylènimine

II.3.2.3 Bilan des réactifs retenus

Il existe plusieurs fonctions susceptibles d'être greffées sur support afin de pouvoir réaliser l'extraction de dérivés carbonylés. Quatre composés sont retenus comme agents d'extraction susceptibles de réagir suivant les conditions imposées pour cette étude. Ils sont représentatifs des différentes familles de composés rencontrées lors de l'étude

⁶² Biçak N., Soydan A. B., Senkal B. F., Koza G., Yener M. 1,2-diaminoethane-containing epoxy resins for separation of aldehydes *React. Funct. Polym.*, **1999**, 39(3), 197-205

bibliographique. Il s'agit de l'acide phénylsulfinique (5), de la O-benzylhydroxylamine (7), de la phénylsulfonylhydrazine (8) et de la polyéthylèneimine (9). Trois de ces composés sont disponibles dans le commerce. La O-benzylhydroxylamine n'étant pas commerciale, il a été nécessaire de réaliser sa synthèse. La réaction mise en œuvre est décrite ci-dessous (schéma 26).⁶³

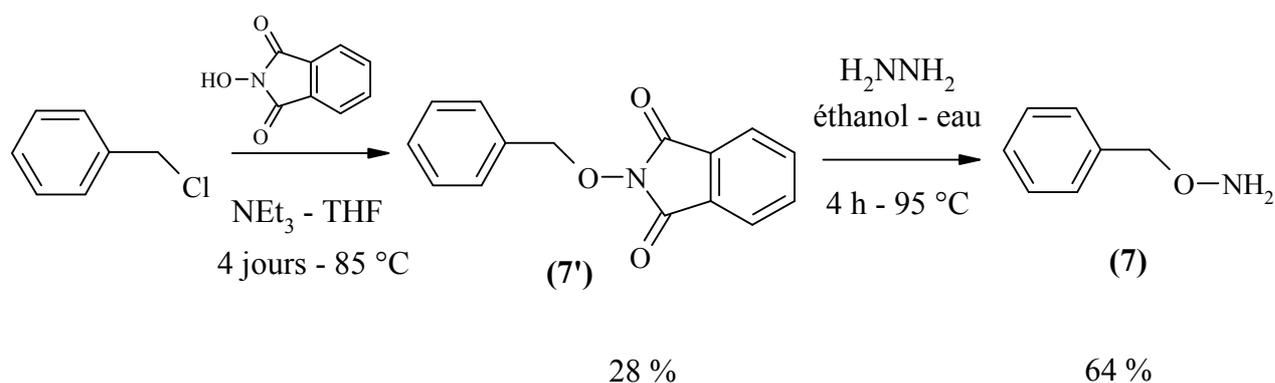


Schéma 26 : Synthèse de la O-benzylhydroxylamine à partir de la N-hydroxylphthalimide

La mise en œuvre de cette méthode a donné un liquide jaune, de pureté RMN de 95 %, présentant une forte odeur, avec un rendement global de 18 %. Les rendements reportés dans la littérature varient entre 55 et 67 %. La remise en œuvre de la réaction n'a pas permis d'améliorer le rendement de la première étape pour une raison qui reste inexplicable. L'halogène peut être différent de l'atome de chlore. Cette méthode peut aussi être utilisée pour synthétiser des composés *para* substitués ou -2 et -4 substitués.⁶⁴ Le bilan matière n'est pas entièrement satisfaisant. Lors de l'étape de déprotection de la fonction amine par l'hydrazine, une grande quantité de matière est perdue inutilement.

Il existe d'autres méthodes pour obtenir la O-benzylhydroxylamine qui n'ont pas été mises en pratique. Elles correspondent un peu plus à la nouvelle politique de l'économie d'atomes. Nous en décrivons ci-dessous quelques unes.

⁶³ Zhou W.-J., Hsieh Y.-L., Pratt L. M., Patten T. E. Experimental and computational studies of bulk polymerization of styrene in the presence of N-(O-(1-phenylmethoxy)oxy)phthalimide or cyclohexanone-O-(1-phenylmethoxy) *Polymer Bulletin*, **2001**, *46*, 43-50

⁶⁴ McKay A. F., Garmaise D. L., Paris G. Y., Gelblum S. Bacteriostats III. Oxyamines and their derivatives *Can. J. Chem.*, **1960**, *38*, 343-358

Une autre méthode passe par la formation de la O-benzylacétoxime. Le chlorure de benzyle est mis à réagir avec l'acétonoxime. Cette réaction peut être effectuée en utilisant la soude⁶⁵ ou de l'éthanolate de sodium préparé par addition à froid de sodium métallique dans de l'éthanol⁶⁶ pour amorcer la réaction. La O-benzylhydroxylamine sera libérée par traitement à l'acide chlorhydrique et la déprotection n'entraînera cette fois qu'une petite perte de matière (schéma 27). Cette méthode peut également être utilisée pour des cycles *para*-substitués.⁶⁷

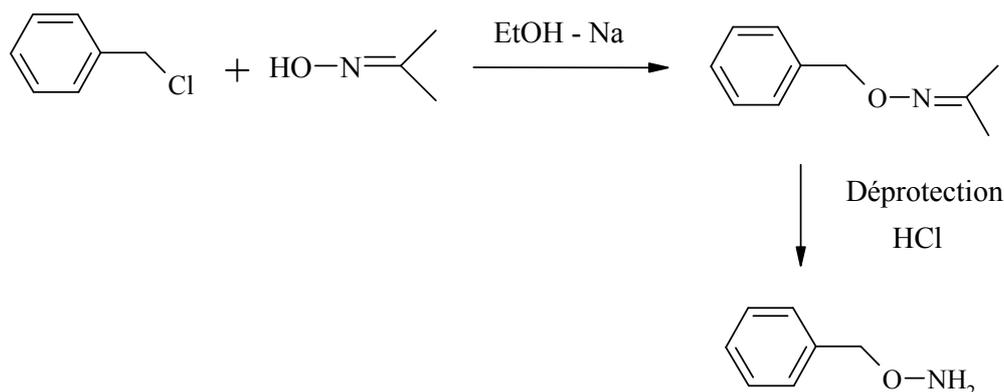


Schéma 26 : Synthèse de la O-benzylhydroxylamine par utilisation de l'acétonoxime

Une dernière méthode relevée consiste à utiliser un anion aminohydroxyde en présence d'un composé halogéné (schéma 28).⁶⁸

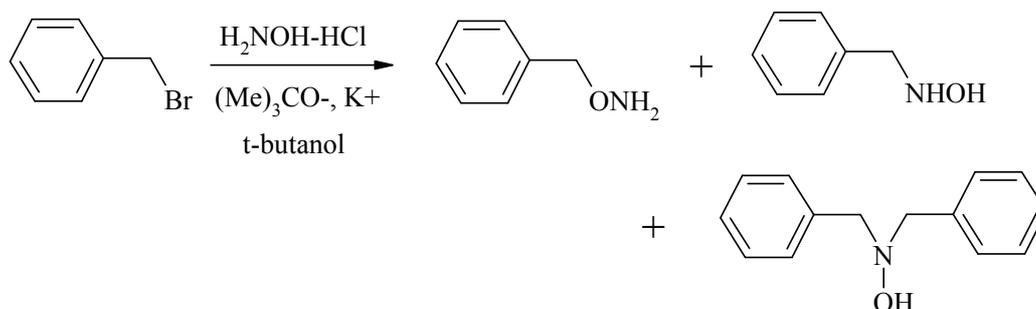


Schéma 28 : Synthèse de la O-benzylhydroxylamine par l'utilisation d'un anion aminohydroxyde

⁶⁵ Klein U., Bushmann E., Keil M., Gotz N., Harreus A. US Patent 592351, **1996**

⁶⁶ Knox G. R., Pason P. L., Willison D. Ferrocene derivatives. 23. Isocyanoferrrocene and isothiocyantoferrrocene *Organometallics*, **1990**, 9, 301-306

⁶⁷ Mooradian A. The rearrangement of substituted O-aryl oximes to 5- and 7-substituted benzofurans *Tetrahedron Lett.*, **1967**, 8(5), 407-408

⁶⁸ Kashima C., Yoshiwara N., Omote Y. Alkylation of aminohydroxy anion, dissociated species of hydroxylamine *Tetrahedron Lett.*, **1982**, 23(29), 2955-2956

Le rendement total rapporté pour cette réaction est de 52 %. Elle conduit à un mélange de trois produits. Le produit majoritaire est la O-benzylhydroxylamine (66 %). Les deux autres composés formés sont la N-benzylhydroxylamine (22 %) et la N,N'-dibenzylhydroxylamine (12 %). Aucune séparation de ces produits n'est proposée. Cette méthode n'a pas non plus été mise en œuvre.

II.4 Dosages enzymatiques

La méthode d'analyse retenue pour le suivi des extractions de l'éthanal, de l'acide pyruvique et de l'acide 2-oxoglutarique est le dosage enzymatique. Cette méthode a été retenue pour la simplicité de sa mise en œuvre et la spécificité des mesures.

II.4.1 Intérêt des dosages enzymatiques

Les enzymes sont des protéines dont le rôle biologique est de catalyser les différentes réactions de transformations qui se produisent dans les organismes.^{69,70} Les enzymes diffèrent des catalyseurs chimiques par plusieurs points importants.⁷¹

Les vitesses des réactions catalysées par des enzymes sont multipliées par des facteurs compris entre 10^6 et 10^{12} par rapport aux mêmes réactions sans catalyseur. Elles sont également supérieures aux réactions correspondantes catalysées par un catalyseur chimique.

Les réactions catalysées par des enzymes ont lieu dans des conditions relativement douces : températures inférieures à 100 °C, pression atmosphérique et pH proche de la neutralité, alors que les réactions sous la dépendance d'un catalyseur chimique nécessitent souvent des températures et des pressions élevées ainsi que des pH extrêmes. Elles ne nécessitent pas la mise sous atmosphère inerte, contrairement aux catalyseurs chimiques fragiles.

Les enzymes ont des spécificités beaucoup plus grandes vis-à-vis de leurs substrats (réactifs) et de leurs produits que les catalyseurs chimiques, les réactions enzymatiques ne

⁶⁹ Wallach J. *Les enzymes*. Paris : Nathan, **1997**, 128 p.

⁷⁰ Weil J.-H. *Biochimie générale*, 7^e édition. Paris : Masson, **1994**, 566 p.

⁷¹ Voet D., Voet J. G. *Biochimie*, 2^e édition. Bruxelles : DeBoeck Université, **2005**, 332-344

donnant par exemple que rarement des produits secondaires. Généralement le site de liaison du substrat correspond à configuration spatiale à la surface de la molécule d'enzyme dont la forme est complémentaire à celle du substrat (complémentarité géométrique). De plus, les acides aminés qui constituent le site de liaison sont disposés afin d'interagir spécifiquement avec le substrat pour l'attirer (complémentarité électronique). Les molécules qui diffèrent du substrat en forme ou dans la distribution de leurs groupes fonctionnels ne peuvent pas se lier à l'enzyme efficacement, c'est-à-dire qu'elles ne peuvent pas former de complexes enzyme - substrat qui conduisent à la formation de produits.

L'intérêt de l'utilisation des enzymes dans les analyses tient donc principalement dans leur capacité à réagir spécifiquement avec un composé précis dans un mélange.⁷² Ceci permet d'éliminer toutes les étapes de séparation des composés et diminue le temps nécessaire pour les analyses. De plus, au regard des conditions douces utilisées, les enzymes offrent en plus la possibilité de pouvoir détecter et mesurer des substances "labiles" qui ne pourraient pas être détectées par d'autres méthodes.

II.4.2 Spectroscopie

La spectrophotométrie est la méthode d'étude de la réaction enzymatique la plus utilisée, aussi bien dans le domaine du visible que dans l'ultraviolet. Elle est basée sur l'absorption par le milieu réactionnel de la lumière, à une longueur d'onde donnée.⁶⁹ Si I_0 est l'intensité de la lumière incidente et I celle de la lumière transmise, l'absorbance est définie par le rapport suivant (5) :

$$A = \log \left(\frac{I_0}{I} \right) \quad (5)$$

La loi de Beer-Lambert relie l'absorbance d'une solution contenant une molécule donnée, à la concentration c par la formule (6) :

$$A = \varepsilon l c \quad (6)$$

⁷² Bergmeyer H.-U. *Methodes of enzymatic catalysis*. New York and London: Verlag Chemie New York, Academic Press, 1963, 1064 p.

l étant la distance parcourue par le faisceau absorbé et ε le coefficient d'absorption molaire de la molécule qui absorbe, caractéristique de cette molécule à une longueur d'onde donnée. Cette relation est valable à de faibles concentrations, notamment pour pouvoir négliger des facteurs instrumentaux ainsi que de possibles associations entre les molécules. Une des caractéristiques de la loi de Beer-Lambert est son additivité. Dans le cas des réactions considérées ici, où un substrat est modifié en son produit par catalyse enzymatique, cela revient à écrire qu'à un temps donné t et à la longueur d'onde λ donnée, l'absorbance du mélange est donnée par la relation suivante (7) :

$$A_t = \varepsilon_s l c_0 + x l (\varepsilon_s - \varepsilon_p) \quad (7)$$

x étant la concentration du substrat transformé en produit, s étant le substrat, p étant le produit et $\varepsilon_s l c_0 = A_0$ est l'absorbance initiale. L'absorbance varie donc proportionnellement à la transformation du substrat en produit via la catalyse enzymatique.

Le couple de coenzymes NAD(P)H/NAD(P) est associé à de nombreuses enzymes d'oxydoréduction et permet le suivi de la réaction catalysée, même si les substrats et produits n'absorbent ni dans le domaine du visible, ni dans l'UV. C'est le cas des molécules qui sont considérées dans cette étude. Les formes oxydées et réduites de ces coenzymes sont présentées sur le schéma 29 :

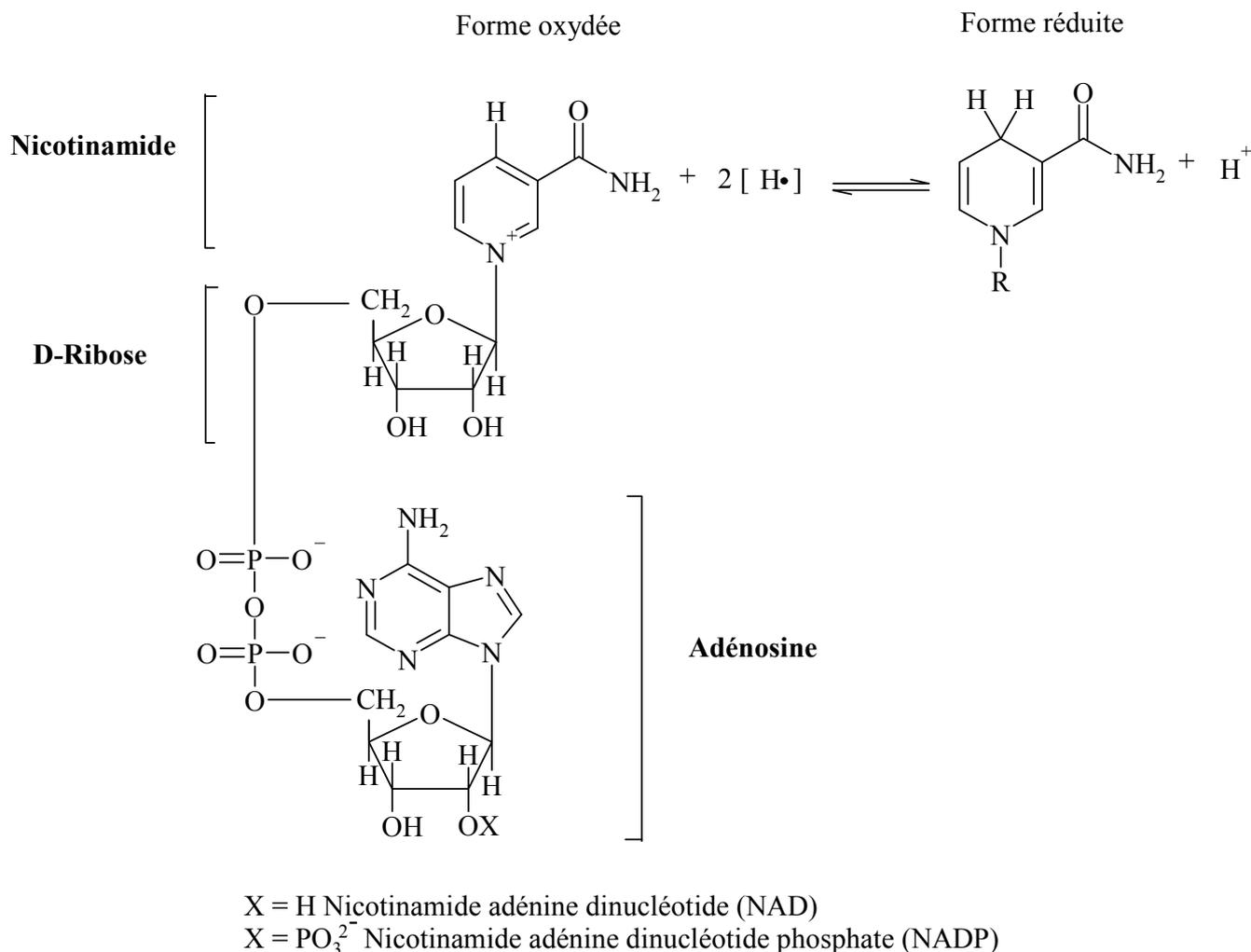


Schéma 29 : Structures et réactions des coenzymes à nicotinamide

Ces formes ont des spectres UV voisins, à l'exception d'une bande d'absorption vers 340 nm caractéristique de la forme réduite avec un coefficient d'absorption ϵ de 6,220 l.mol⁻¹.cm⁻¹. Ceci permet un suivi des réactions pour des variations de concentration inférieures à 10⁻⁴ mol.l⁻¹.

II.4.3 Dosages utilisés

Plusieurs dosages enzymatiques ont été utilisés au cours de cette étude. Dans les cas de l'éthanal, de l'acide pyruvique et de l'acide 2-oxoglutarique, ces dosages ont permis de suivre l'évolution de la quantité de chaque dérivé carbonyle restant dans le milieu au cours des extractions réalisées. La spécificité de ces dosages permet en effet de suivre l'évolution des

composés aussi bien en mélange complexe que dans une solution ne contenant qu'un seul composé. Dans le cas du 5-oxofructose, il n'existe pas de dosage enzymatique spécifique de ce composé. Nous allons tâcher de détailler les dosages enzymatiques utilisés.

II.4.3.1 Dosage enzymatique de l'éthanal

La quantité d'éthanal restant est mesurée en utilisant un kit de dosage enzymatique fourni par Boehringer Mannheim. En présence d'aldéhyde déshydrogénase, l'éthanal est oxydé en acide acétique par le NAD. La quantité de NADH formée durant la réaction est proportionnelle à la quantité d'éthanal initialement présente. La réduction du NAD est mesurée par l'augmentation de son absorbance à la longueur d'onde de 340 nm. Le mécanisme de la réaction mise en œuvre est présenté sur le schéma 30.^{73,74}

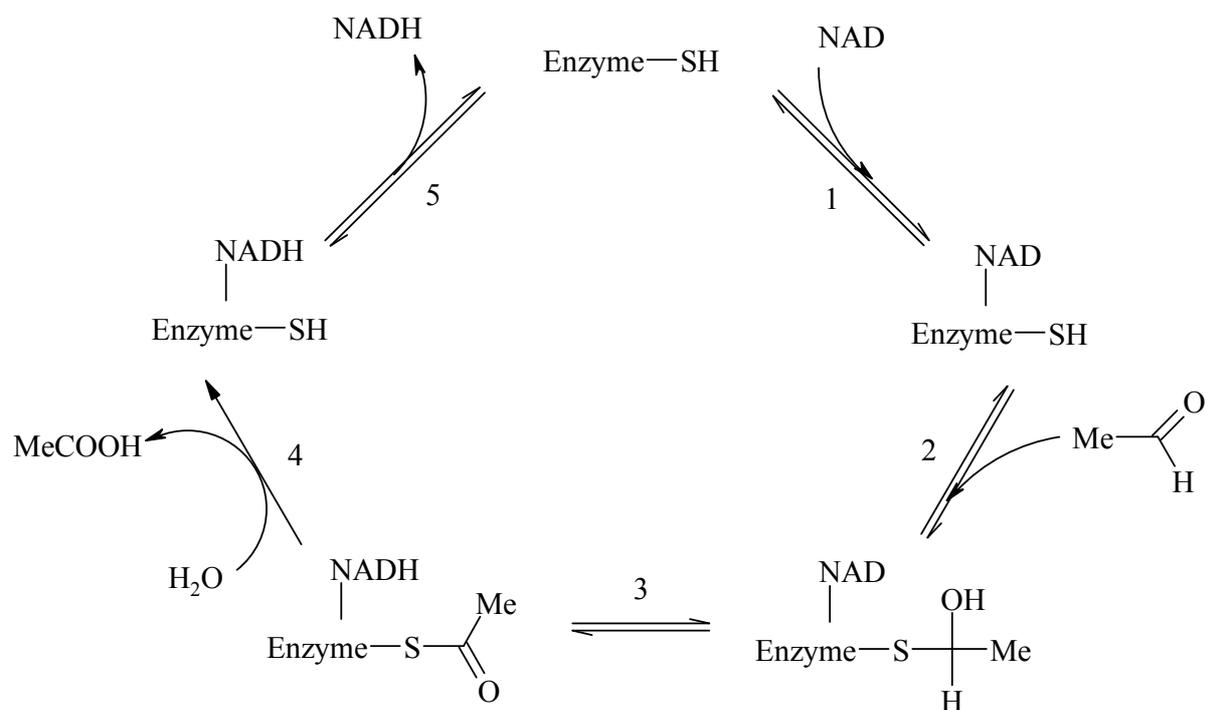


Schéma 30 : Mécanisme de l'oxydation de l'éthanal en présence d'aldéhyde déshydrogénase

- 1 : Arrivée du NAD à proximité des acides aminés Cys-243, Asp-114 et Glu-333 (qui permet l'arrachement d'un proton sur une molécule d'eau)

⁷³ Dickinson F. M. Aldehyde dehydrogenase: kinetics and mechanism *Biochem. Soc. Trans.*, **1989**, 17(2), 299-300

⁷⁴ Hempel J., Perozich J., Chapman T., Rose J., Boesch J. S., Liu Z.-J., Lindahl R., Wang B.-C. Aldehyde dehydrogenase catalytic mechanism. *Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism 7* /Ed by Weiner et al. New York : Kluwer Academic/Plenum Publishers, **1999**, 53-59

- 2 : Fixation de l'aldéhyde par la Cys-243 et la Asp-114 (liaison faible avec le proton de la fonction -OH)
- 3 : Réduction du NAD
- 4 : Libération de l'acide acétique
- 5 : Départ du NADH

II.4.3.2 Dosage enzymatique de l'acide pyruvique

En présence de L-lactate déshydrogénase, le pyruvate est réduit en L-lactate par le NADH.⁷⁵ La quantité de NAD formée durant la réaction est proportionnelle à la quantité de pyruvate initialement présente. L'oxydation du NADH est mesurée par la diminution de son absorbance à la longueur d'onde de 340 nm.⁷⁶

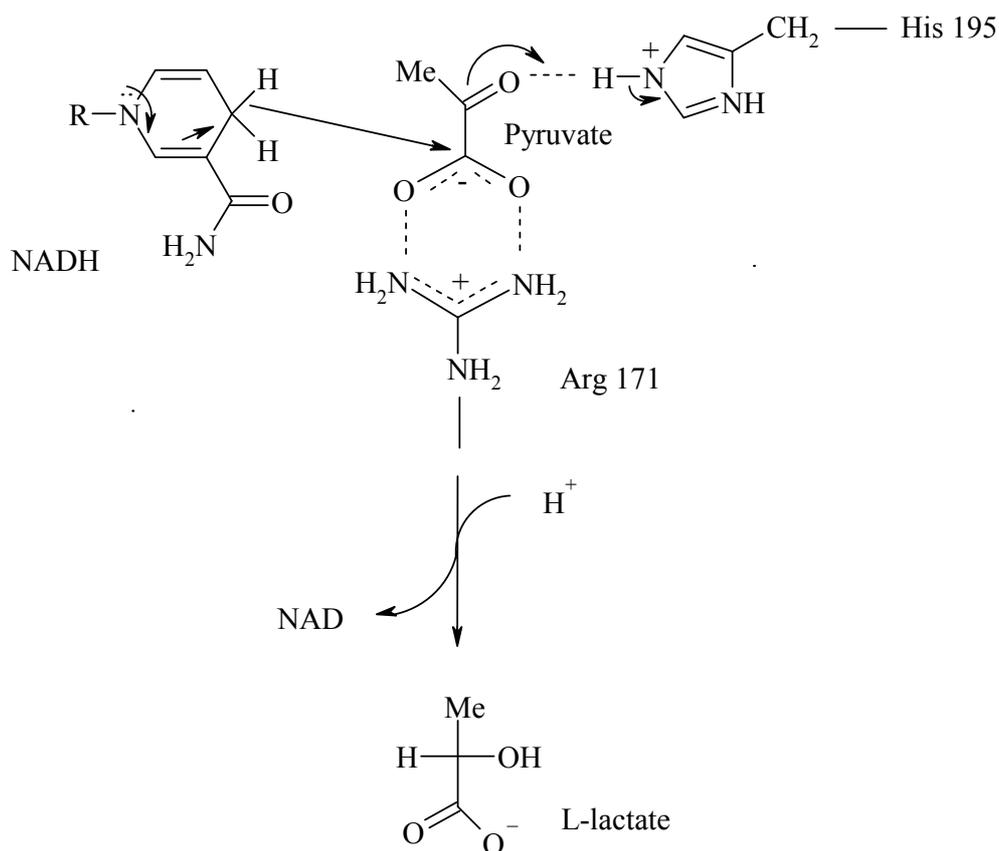


Schéma 31 : Mécanisme de la réduction de l'acide pyruvique en présence de la lactate déshydrogénase

⁷⁵ Sinnott M. *Comprehensive Biological Catalysis A mechanistic reference, volume III. Radical reactions and oxidation/reduction*. London : Academic Press, **1998**, 1-82

⁷⁶ Blouin J. Application des méthodes enzymatiques optiques au dosage de certains constituants des boissons *Chimie Anal.*, **1964**, 46(10), 513-523

Les deux acides aminés qui contribuent le plus à la stabilité de l'ensemble au niveau énergétique sont Arg-171 et His-195. His-195 est en outre le donneur de proton lors de la réduction du cétoacide et l'accepteur dans l'autre sens. L'Asp-168 forme une liaison hydrogène avec le cycle imidazole qui stabilise l'ensemble Enzyme-His⁺ : NADH : complexe ternaire du cétoacide. Cette interaction charge-charge est critique concernant la stabilisation des énergies du groupe ternaire.

II.4.3.3 Dosage enzymatique de l'acide 2-oxoglutarique

En présence de glutamate déshydrogénase, le 2-oxoglutarate réagit avec le NADH et les ions NH₄⁺ pour former du L-glutamate et du NAD.⁷⁵ La quantité de NAD formée durant la réaction est proportionnelle à la quantité de 2-oxoglutarate initialement présente. L'oxydation du NADH est mesurée par la diminution de son absorbance à la longueur d'onde de 340 nm.⁷⁶ Le mécanisme de la réaction est décrit sur le schéma 32.

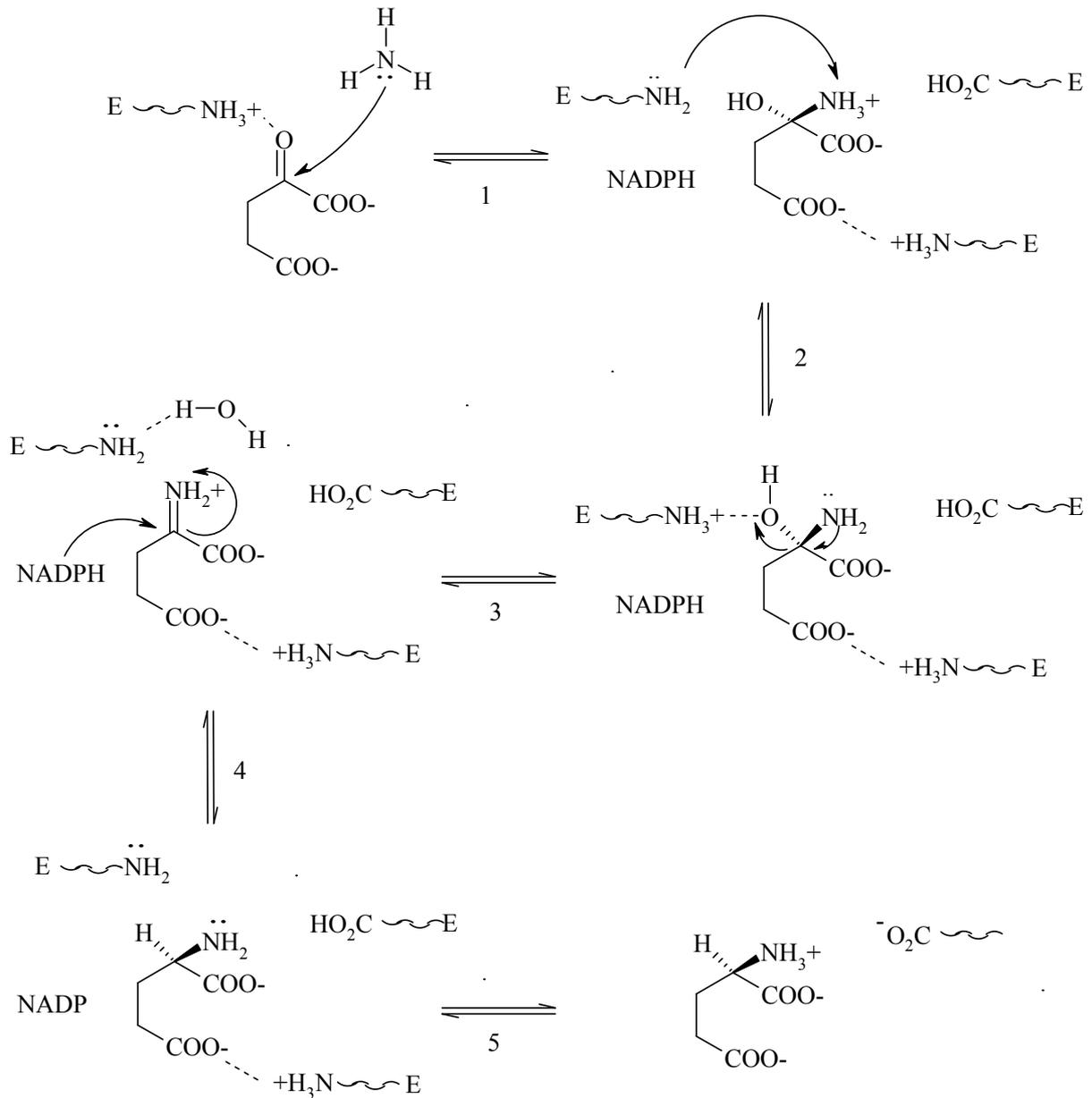


Schéma 33 : Mécanisme de la réduction de l'acide 2-oxoglutarique en présence de la glutamate déshydrogénase

- 1 : Le doublet d'électrons porté par la molécule d'ammoniac attaque le carbone de la fonction carbonyle
- 2 : La fonction amine d'un acide aminé de l'enzyme arrache un proton à l'ammonium
- 3 : Réduction intramoléculaire, libérant une molécule d'eau
- 4 : Oxydation du NADPH
- 5 : Libération du L-glutamate dans le milieu réactionnel pour redonner l'enzyme libre

II.4.3.4 Mesure de la disparition du 5-oxofructose

Il n'existe pas de dosage enzymatique permettant de suivre l'évolution de la quantité de 5-oxofructose restant en solution. Elle est mesurée par couplage chromatographie en phase gazeuse – spectrométrie de masse (CPG/SM) après dérivation grâce à l'O-(pentafluorobenzyl)hydroxylamine.^{53,77,78} La réaction mise en œuvre est décrite sur le schéma 34 ci-dessous.

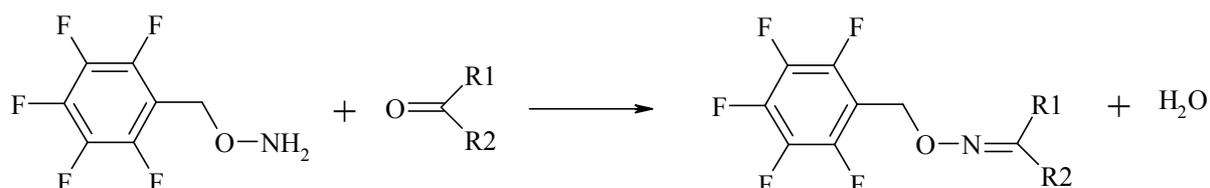


Schéma 34 : Réaction du PFBOA avec un dérivé carbonyle

Cette réaction est très semblable aux réactions d'extraction. Le PFBOA (**6**) est d'ailleurs une forme perfluorée de la O-benzylhydroxylamine (**7**) retenue comme agent.

II.5 Conclusion

L'objectif de cette étude est de diminuer le dioxyde de soufre total présent dans les vins blancs liquoreux en diminuant la quantité de dioxyde de soufre combiné. Pour cela on envisage d'extraire quatre dérivés carbonylés présents dans les vins, responsables de la plus grande partie du piégeage du dioxyde de soufre. Il s'agit de l'éthanal, l'acide pyruvique, l'acide 2-oxoglutarique et du 5-oxofructose. Ce dernier composé, non commercial, a été synthétisé afin de pouvoir étudier son extraction.

L'étude bibliographique de la réactivité des dérivés carbonylés et des réactions auxquelles ils sont susceptibles de participer a été réalisée. Compte tenu de ces réactions et des contraintes imposées pour les extractions, quatre molécules ont été retenues comme agents d'extractions potentiels. Il s'agit de l'acide phénylsulfinique, de l'O-benzyl-

⁷⁷ Guillou I., Bertrand A., de Revel G., Barbe J.-C. Occurrence of hydroxypropanedial in certain musts and wines *J. Agric. Food Chem.*, **1997**, *45*, 3382-3386

⁷⁸ Flamini R. Some advances in the knowledge of grape, wine and distillates chemistry as achieved by mass spectrometry *J. Mass Spectr.*, **2005**, *40*, 705-713

Chapitre II : Les différents protagonistes de l'étude

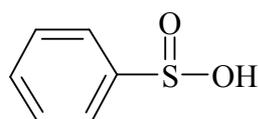
hydroxylamine (synthétisé au laboratoire car non commerciale), de la phénylsulfonylhydrazine et de la polyéthylènimine. Ces molécules sont susceptibles de réagir dans les conditions imposées et possèdent des fonctions secondaires qui permettront par la suite, si ces molécules sont retenues, de les fixer sur des supports.

L'efficacité des extractions sera suivie par l'utilisation de dosages enzymatiques pour l'éthanal, l'acide pyruvique et l'acide 2-oxoglutarique. Ceci permet un dosage spécifique des composés. En outre, ce dosage ne nécessite pas de séparation, diminuant ainsi la perte d'information liée à une récupération incomplète des produits. Le suivi de l'extraction du 5-oxofructose se fera par analyse chromatographique après dérivation.

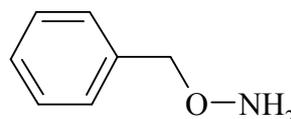
L'efficacité des agents d'extraction retenus va être vérifiée en solution homogène.

III Etude des agents d'extraction en milieu homogène modèle

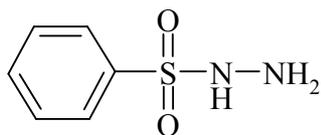
La première partie de cette étude a porté sur la sélection de molécules susceptibles de réagir avec les dérivés carbonylés suivant les conditions imposées. Quatre nucléophiles ont été retenus au terme de l'étude bibliographique. Il s'agit de l'acide phénylsulfonique (**5**), de la O-benzylhydroxylamine (**7**), de la phénylsulfonylhydrazine (**8**) et de la polyéthylèneimine (**9**) (schéma 35). Les trois premiers composés sont commerciaux. Le quatrième a été synthétisé au laboratoire.



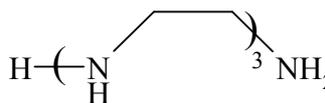
Acide phénylsulfonique (5)



O-benzylhydroxylamine (7)



Phénylsulfonylhydrazine (8)



Polyéthylèneimine (9)

Schéma 35 : Agents d'extraction

Dans un premier temps, les molécules non commerciales nécessaires à la réalisation de l'étude en milieu homogène modèle ont été synthétisées. Il s'agit de l'un des dérivés carbonylés à extraire, le 5-oxofructose (**4**), et de l'un des agents d'extraction, la O-benzylhydroxylamine (**7**). L'efficacité de ces agents d'extraction, dans les conditions réactionnelles imposées par l'étude, doit être vérifiée. Une étude cinétique de l'extraction en milieu modèle des meilleurs agents d'extraction sera également réalisée pour compléter l'étude en milieu modèle homogène.

III.1 Extraction en milieu homogène : efficacité des agents d'extractions testés

L'efficacité des quatre nucléophiles retenus à extraire les dérivés carbonylés choisis a été testée sur des solutions modèles.

III.1.1 Extractions des dérivés carbonylés

Les extractions ont été réalisées d'une part sur une solution modèle contenant l'éthanal, l'acide pyruvique et l'acide 2-oxoglutarique et d'autre part sur une solution modèle contenant uniquement le 5-oxofructose. Ce choix a été dicté par des raisons de disponibilité des dérivés carbonylés.

III.1.1.1 Extraction de l'éthanal, de l'acide pyruvique et de l'acide 2-oxoglutarique

Les extractions se font sur une solution modèle préparée au laboratoire. Elle est composée de :

- 50 mg.l⁻¹ d'éthanal
- 100 mg.l⁻¹ d'acide pyruvique
- 100 mg.l⁻¹ d'acide 2-oxoglutarique
- 4 g.l⁻¹ d'acide tartrique (tampon)

La solution est faite dans un mélange eau-éthanol à 12 % en volume d'éthanol et ramené à un pH de 3,5 par ajout d'une solution aqueuse concentrée de soude.

L'extraction est réalisée à température ambiante en présence d'un excès d'agent d'extraction (3 équivalents) par rapport aux dérivés carbonylés présents dans le milieu modèle. Les flacons contenant les mélanges (solution modèle + agent d'extraction) sont placés sur un agitateur rotatif par culbutage tournant à 9 tours/min. Les résultats des extractions mesurés par la méthode des dosages enzymatiques sont présentés dans le tableau 1.

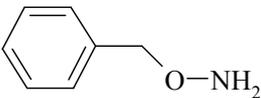
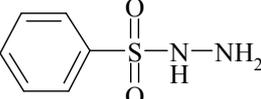
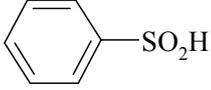
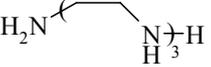
Agent d'extraction	Quantité de dérivé piégé en 15 et 60 minutes (%)					
	Ethanal		Acide pyruvique		Acide 2-oxoglutarique	
	15 min	60 min	15 min	60 min	15 min	60 min
	98,6	100	98	98	100	100
	96	96	91	91	91	100
	0	0	0	0	3	6
	0	0	0	0	8	10

Tableau 1 : Efficacité des agents d'extractions sélectionnés sur l'éthanal, l'acide pyruvique et l'acide 2-oxoglutarique en milieu homogène

Les valeurs reportées dans le tableau 1 montrent que les extractions, lorsqu'elles se font, sont rapides. La O-benzylhydroxylamine extrait 98,6 % de l'éthanal en 15 minutes. L'extraction atteint 100 % après une heure de mise en contact. L'acide pyruvique et l'acide 2-oxoglutarique sont respectivement extraits à 98 % et 100 % dès le premier quart d'heure et ces valeurs n'évoluent pas après une heure. La phénylsulfonylhydrazine est également un bon agent d'extraction. 96 % de l'éthanal et 98 % de l'acide pyruvique ont réagi après 15 minutes de mise en contact. Au bout d'une heure, ces valeurs sont constantes. L'acide 2-oxoglutarique est extrait à 91 % par la phénylsulfonylhydrazine en quinze minutes et l'extraction est totale au bout d'une heure. L'acide phénylsulfinique et la polyéthylènimine n'extraient au bout d'une heure que quelques pourcents de l'acide 2-oxoglutarique et sont inefficaces dans les cas de l'éthanal et de l'acide pyruvique. Au bout de 24 heures, aucune évolution n'est observée. Ces deux composés ne sont donc pas efficaces pour l'extraction de l'éthanal et de l'acide pyruvique et peu efficaces dans le cas de l'acide 2-oxoglutarique.

III.1.1.2 Extraction du 5-oxofructose

En ce qui concerne l'efficacité des agents d'extraction vis-à-vis du 5-oxofructose, la méthode mise en œuvre a été légèrement différente. Une solution modèle comparable à celle décrite dans le cas des autres composés a été préparée à partir d'une solution de 5-oxofructose congelée. La concentration de la solution était de l'ordre de 135 mg.l^{-1} . Dans des échantillons séparés, trois équivalents de chaque agent d'extraction ont été additionnés à la solution. Les flacons ont été placés sur l'agitateur rotatif par culbutage tournant à 9 tours.min^{-1} . Des prélèvements effectués à des temps donnés ont été placés au congélateur de façon à arrêter les réactions et figer le milieu.

Les mesures montrent que tous les échantillons présentent la même quantité de 5-oxofructose et qu'aucune extraction ne s'est faite. Plus vraisemblablement, on peut supposer que le PFBOA forme avec le 5-oxofructose un composé beaucoup plus stable qu'avec les agents d'extraction retenus. En solution homogène, aucune séparation n'est possible après réaction, tous les composés étant encore présents dans le milieu et les équilibres totalement déplacés en faveur de la molécule la plus stable, qui est celle formée à partir du PFBOA et du 5-oxofructose. Il n'est donc pas possible de déterminer de cette façon l'efficacité des agents d'extraction vis-à-vis du 5-oxofructose.

III.1.2 Vérification de la non compétition des sucres

Les vins blancs liquoreux sont des mélanges extrêmement complexes d'un point de vue chimique. Tous les paramètres susceptibles d'intervenir ne peuvent pas être étudiés sur les solutions modèles. Des solutions modèles composées d'eau, d'éthanol et de dérivés carbonylés à extraire ont été réalisées afin de vérifier l'efficacité des agents d'extractions retenus. Le fructose et le glucose sont des composés largement présents dans les vins (respectivement de l'ordre de 75 g.l^{-1} et 25 g.l^{-1}). Leurs formes ouvertes (minoritaires dans les solutions considérées, de l'ordre de 1 %) contenant une fonction carbonyle (schéma 36), il était nécessaire de vérifier que ces molécules ne perturbaient pas l'extraction des dérivés carbonylés.⁷⁹ Il est apparu important d'effectuer de nouvelles extractions en solution en utilisant une solution modèle contenant ces sucres.

⁷⁹ Binker R. W. *Modern Carbohydrate chemistry*. New York: Marcel Dekker Inc., 1988, 343 p.

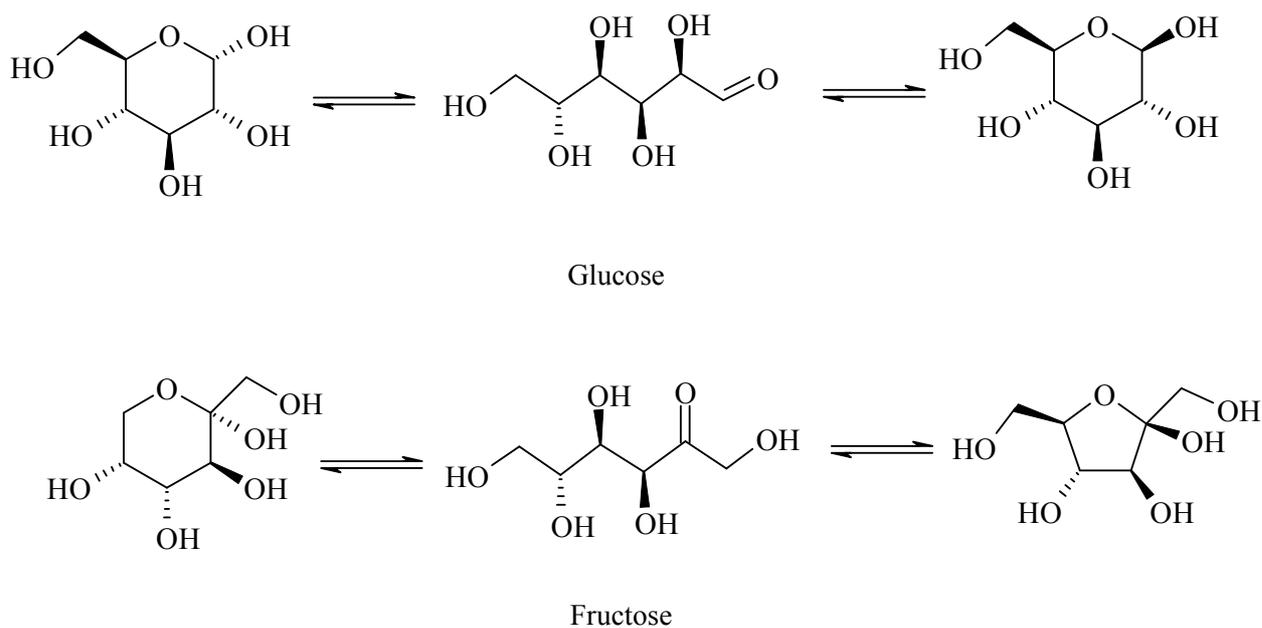


Schéma 36 : Formes ouvertes et fermées du glucose et du fructose

La O-benzylhydroxylamine et la phénylsulfonylhydrazine se sont révélées être les agents d'extraction les plus réactifs. Nous avons donc décidé de reprendre l'extraction d'éthanal et d'acide pyruvique, qui sont les composés les plus abondants en terme de concentration molaires, par ces agents d'extraction en présence de glucose et de fructose.

Les extractions ont été réalisées à température ambiante et en présence d'un large excès d'agent d'extraction (3 équivalents). Les flacons contenant le mélange (solution + agent d'extraction) sont agités à 9 tours.min⁻¹. Les résultats sont reportés dans le tableau 2.

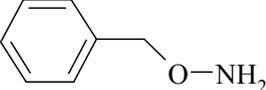
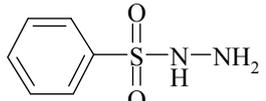
Agent d'extraction	Quantité de dérivé piégé en 30 et 90 minutes			
	Ethanal (%)		Acide pyruvique (%)	
	30 min	90 min	30 min	90 min
	98	100	77	100
	94	97	34	96

Tableau 2 : Taux d'extraction de l'éthanal et de l'acide pyruvique en milieu homogène en présence de glucose et de fructose

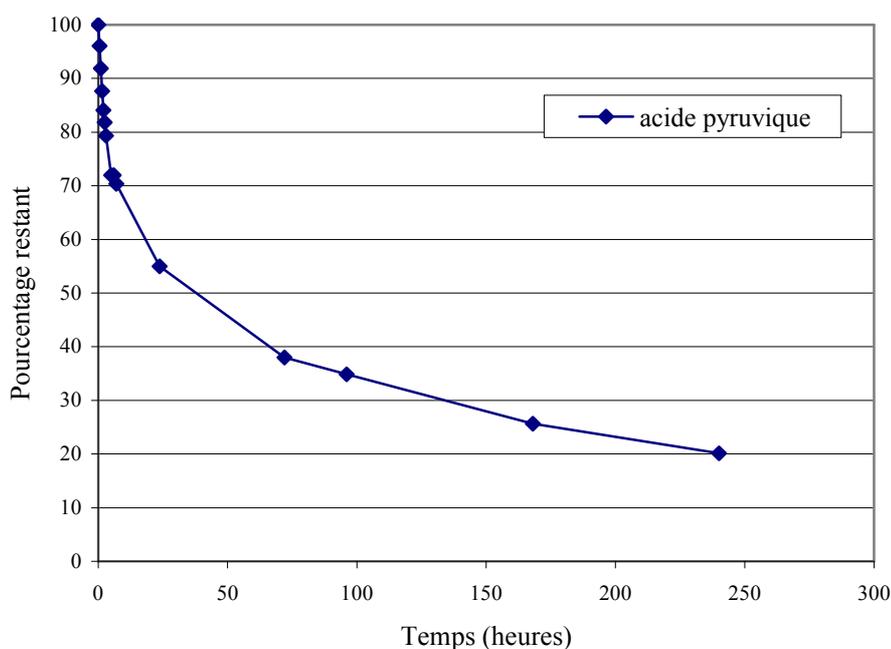
Les valeurs reportées dans le tableau montrent qu'au bout de 90 minutes de mise en présence, l'éthanal et l'acide pyruvique sont totalement extraits par la O-benzylhydroxylamine et à plus de 95 % par la phénylsulfonylhydrazine.

Lorsque l'on compare ces résultats à ceux obtenus en l'absence de sucres, on peut dire que l'ajout du fructose et du glucose dans le milieu n'intervient pas dans la qualité de l'extraction. Celle-ci est sensiblement la même dans les deux expériences. Par contre on observe que la présence des sucres dans le milieu agit sur la vitesse de l'extraction. C'est dans le cas de l'acide pyruvique que cette observation est la plus visible. Alors que, lorsque les extractions se font en l'absence de sucre, les maxima d'extraction étaient atteints au bout de 15 minutes dans ce cas ils ne sont pas encore atteints à 30 minutes. Il faut attendre beaucoup plus longtemps pour arriver à extraire les dérivés carbonylés. Ce ralentissement de l'extraction pourrait signifier qu'il y a une compétition entre les dérivés carbonylés et les sucres présents dans la solution. L'efficacité des extractions, proche de celle obtenue en l'absence de sucres, montre que l'équilibre le plus favorable est celui conduisant au piégeage des dérivés carbonylés.

La phénylsulfonylhydrazine est un agent d'extraction fréquemment utilisé en chimie. Il a déjà été reporté dans la littérature qu'il réagit, faiblement, avec le glucose.⁶⁰ Une phénylsulfonylhydrazine *para* substituée avec la fonction $-NO_2$ réagit également avec le

glucose.⁸⁰ Une expérience a été réalisée afin d'observer si le glucose formait avec la phénylsulfonylhydrazine un composé plus stable que l'acide pyruvique. Ceci devait permettre de vérifier si l'agent d'extraction risquait d'être "saturé" par le glucose et donc inutilisable.

Une solution modèle contenant de l'eau, de l'éthanol, du glucose, du fructose et de l'acide tartrique, ramenée à un pH de 3,5, a été préparée. 199 mg de phénylsulfonylhydrazine ont été ajoutés à 250 ml de cette solution. Cette quantité correspond à quatre équivalents d'acide pyruvique pour une solution à 100 mg.l⁻¹. Le mélange a été placé sur un agitateur rotatif par culbutage tournant à 9 tours.min⁻¹. Après 48 heures d'agitation, 25 mg d'acide pyruvique sont additionnés et l'extraction par la phénylsulfonylhydrazine au cours du temps est mesurée. Les résultats sont présentés sur le graphique 2.



Graphique 2 : Extraction de l'acide pyruvique par la phénylsulfonylhydrazine en présence de sucres

Les résultats montrent que la fonction extractive, même si elle a éventuellement été saturée au préalable par le sucre, réagit bien avec l'acide pyruvique. L'extraction atteint 80 % au bout de deux semaines. C'est un temps assez long, mais si la fonction a effectivement réagi

⁸⁰ Zimmer H., Gross B. H., Gerlach E. H., Fry K., Pronay A. C., Schmank H. Synthesis and antibacterial activity of some 4-substitued benzenesulfonylhydrazones *J. Am. Chem. Soc.*, **1959**, 1667-1673

dans un premier temps avec les sucres, ce temps est nécessaire pour déplacer l'équilibre en faveur de l'acide pyruvique. Ceci montre que l'équilibre formé avec l'acide pyruvique se déplace plus favorablement vers le piégeage de ce composé que celui formé avec les sucres. Même si une petite quantité de sucre réagit, la diminution en sucres sera négligeable et les dérivés carbonyles réagiront de façon prioritaire avec la phénylsulfonylhydrazine.

III.1.3 Bilan sur les agents d'extraction

Quatre nucléophiles avaient été retenus comme agents d'extractions potentiels. Il s'agissait de la O-benzylhydroxylamine, de la phénylsulfonylhydrazine, de l'acide phénylsulfinique et de la polyéthylènimine. Ils étaient susceptibles de réagir avec les dérivés carbonyles suivant les conditions imposées pour cette étude. Seuls les deux premiers agents d'extractions se sont révélés efficaces. L'acide phénylsulfinique et la polyéthylènimine sont donc abandonnés pour la suite de cette étude.

III.2 Cinétiques des extractions avant et après SO₂

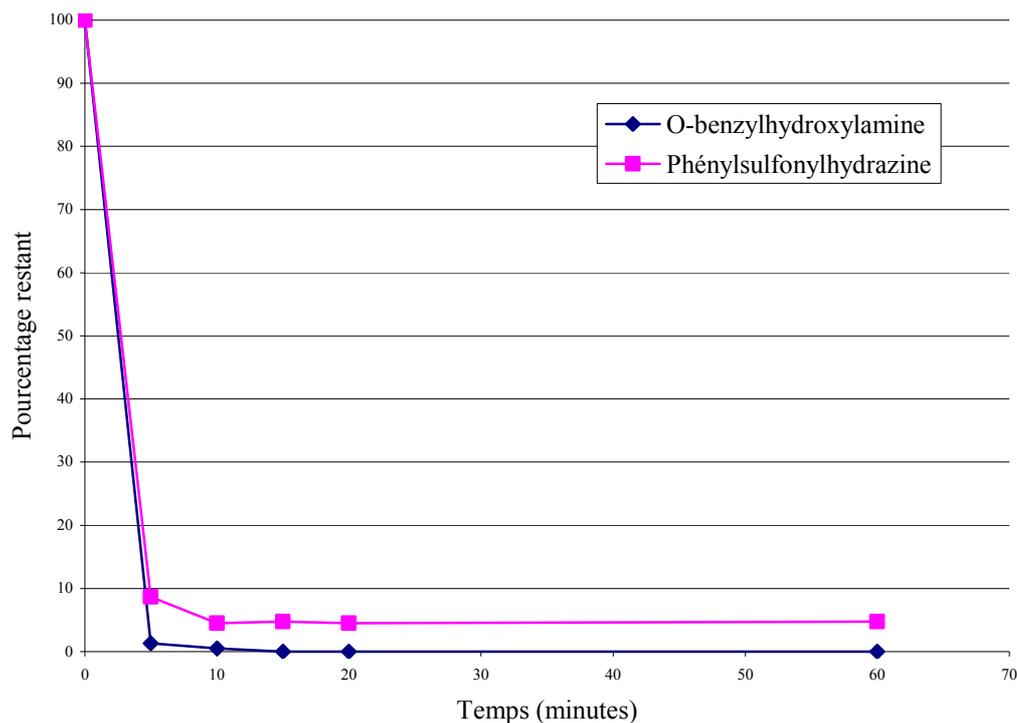
La vérification de l'efficacité des agents d'extraction retenus a été réalisée sur des solutions modèles dans lesquelles plusieurs dérivés carbonyles étaient présents. Les équilibres mis en jeu peuvent présenter une interdépendance. Il paraissait donc intéressant d'étudier le comportement de l'éthanal, de l'acide pyruvique et de l'acide 2-oxoglutarique individuellement vis-à-vis de la O-benzylhydroxylamine et de la phénylsulfonylhydrazine. Par ailleurs, des tests ont été mis en œuvre pour déterminer s'il était possible de déplacer en solution homogène les équilibres formés à partir des dérivés carbonyles et le SO₂. En effet, si ce procédé devait être employé par la suite dans le milieu œnologique, il pourrait s'avérer plus simple de le placer en fin de processus de vinification, c'est-à-dire après ajout de SO₂.

III.2.1 Extraction avant ajout de SO₂

Des solutions modèles ont été préparées comme décrit précédemment. La seule différence tient au fait qu'elles ne comportent chacune qu'un seul dérivé carbonyle.

III.2.1.1 Extraction de l'éthanal avant ajout de SO₂

Une solution d'éthanal à 41 mg.l⁻¹ a été mise en présence de trois équivalents de chaque agent d'extraction dans des flacons différents. Les résultats des mesures sont présentés sur le graphique 3.

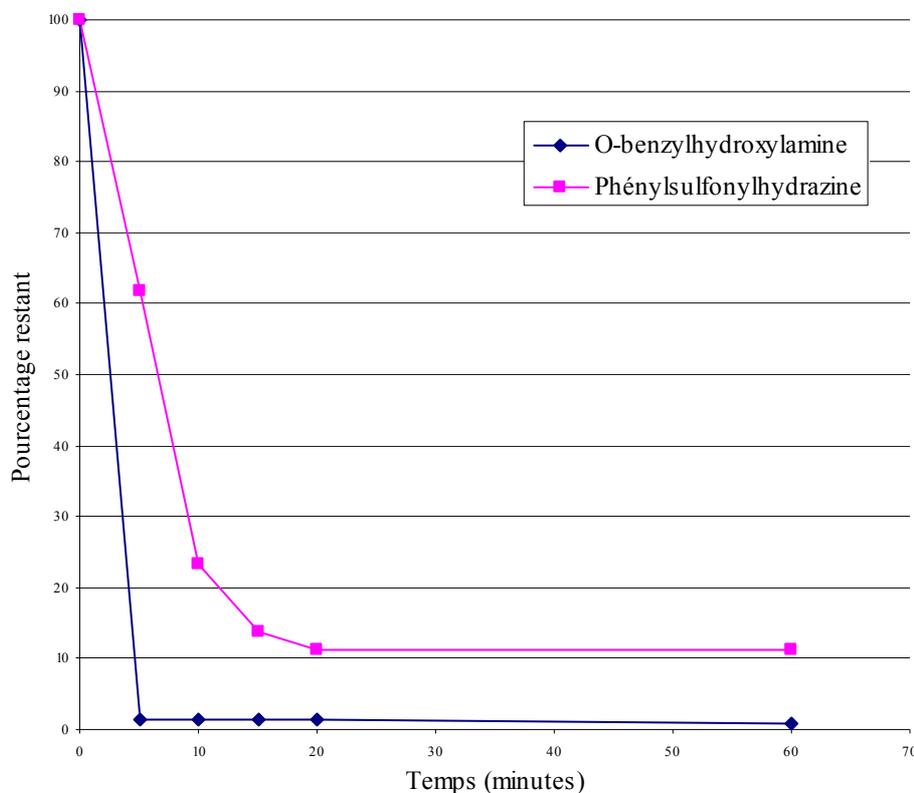


Graphique 3 : Extraction de l'éthanal en milieu homogène en fonction du temps

Ces mesures montrent qu'en solution homogène l'éthanal réagit très vite avec les deux agents d'extraction. Au bout de 5 minutes, il reste moins de 10 % d'éthanal dans le milieu dans les deux cas. La O-benzylhydroxylamine piège totalement l'éthanal présent dans le milieu en 10 minutes. Dans le cas de la phénylsulfonylhydrazine un palier est atteint au bout du même temps à 5 % d'éthanal restant dans le milieu.

III.2.1.2 Extraction de l'acide pyruvique avant ajout de SO₂

Une solution d'acide pyruvique à 108 mg.l⁻¹ a été mise en présence de trois équivalents de chaque agent d'extraction dans des flacons différents. Les résultats des mesures sont présentés sur le graphique 4.

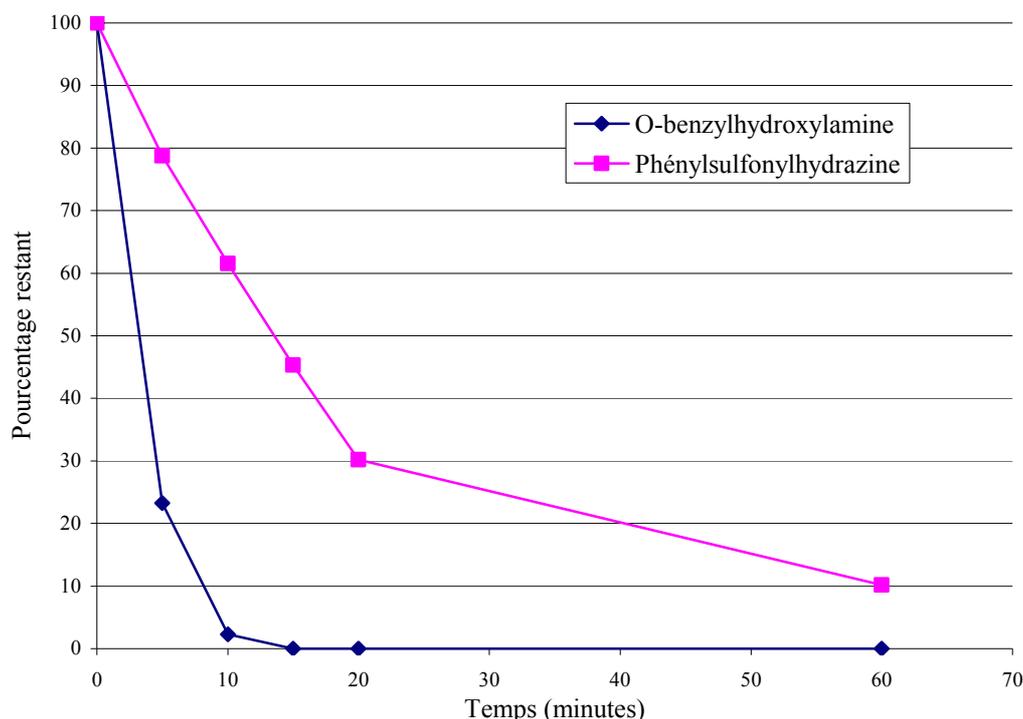


Graphique 4 : Extraction de l'acide pyruvique en milieu homogène en fonction du temps

Ces résultats montrent que les réactions sont plus lentes avec l'acide pyruvique qu'avec l'éthanal. En 5 minutes un palier est atteint à 2 % d'acide pyruvique restant dans le milieu avec la O-benzylhydroxylamine. Dans le cas de la phénylsulfonylhydrazine, le palier est atteint après 20 minutes de mise en contact à un peu plus de 10 % d'acide encore présent dans le milieu.

III.2.1.3 Extraction de l'acide 2-oxoglutarique avant ajout de SO₂

Une solution d'acide 2-oxoglutarique à 103 mg.l⁻¹ a été mise en présence de trois équivalents de chaque agent d'extraction dans des flacons différents. Les résultats des mesures sont présentés sur le graphique 5.



Graphique 5 : Extraction de l'acide 2-oxoglutarique en milieu homogène en fonction du temps

L'extraction de l'acide 2-oxoglutarique par les deux agents d'extraction est encore plus lente que les précédentes. Dans le cas de la O-benzylhydroxylamine, il reste encore 23 % d'acide 2-oxoglutarique dans le milieu au bout de 5 minutes, alors que les deux autres dérivés carbonylés avaient été extraits à plus de 95 % au même temps. L'extraction est totale après 15 minutes de mise en contact. Dans le cas de la phénylsulfonylhydrazine, l'extraction est régulière jusqu'à 20 minutes. Il reste alors 30 % d'acide pyruvique dans le milieu. Le milieu évolue ensuite plus lentement pour atteindre 10 % d'acide restant dans le milieu au bout d'une heure de mise en présence.

III.2.1.4 Bilan des extractions en milieu homogène avant ajout de SO₂

De façon générale, les résultats obtenus pour les solutions ne comportant qu'un seul composé sont assez proches de ceux obtenus en mélange. Après une heure de mise en présence, les dérivés carbonylés ont pratiquement tous disparu. Les extractions se font en plaçant trois équivalents d'agent d'extraction pour un équivalent de dérivé carbonylé présent dans le milieu. On observe une réactivité différente de chaque composé en solution

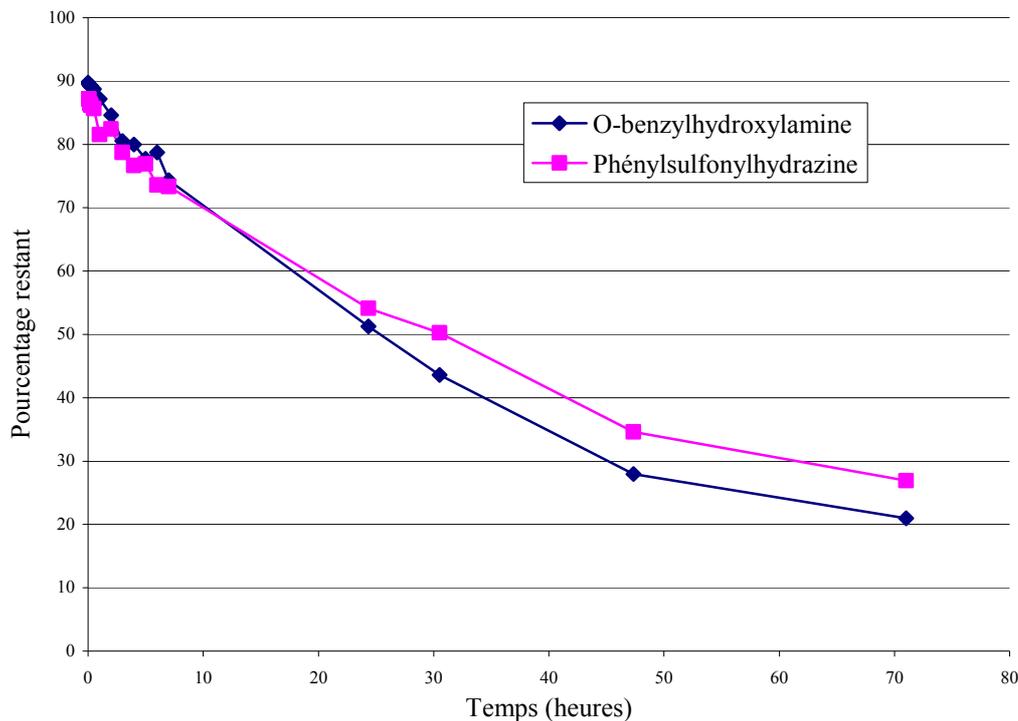
monocomposé vis-à-vis des agents d'extraction. Il est difficile d'extrapoler sur ce qui peut ensuite se passer en mélange. A mesure que les extractions se font sur les dérivés carbonylés les plus réactifs, les proportions d'agent d'extraction encore libre changent pour les autres. Nous avons déjà supposé qu'il faudrait mettre un excès d'agent d'extraction pour que les équilibres soient fortement déplacés vers les formes combinées pour avoir des extractions efficaces. La quantité utilisée avait donc été fixée arbitrairement à trois équivalents. Les mesures montrent que ce choix donne des résultats satisfaisants. Il faut noter maintenant que dans un mélange, les excès relatifs à chaque composé évoluent au cours de la réaction et que cela peut avoir une influence sur la qualité de l'extraction.

III.2.2 Extraction après ajout de SO₂

Toutes les solutions utilisées pour les extractions avant SO₂ ont reçu l'ajout d'une petite quantité d'une solution aqueuse de SO₂ de façon à ce qu'elles présentent une concentration de l'ordre de 100 mg.l⁻¹. Les solutions ont été laissées au repos quelques jours afin d'homogénéiser les milieux et laisser les équilibres s'établir avant de mettre en œuvre les extractions. Les quantités d'agents d'extraction additionnées sont toujours égales à trois équivalents de dérivés carbonylés présents dans le milieu. Avant de réaliser ces extractions, les quantités exactes de dérivés carbonylés présents dans ces solutions ont été vérifiées. De cette façon, il était possible de tenir compte d'une éventuelle évaporation de ces composés et ainsi pouvoir ajuster les quantités d'agents d'extraction ajoutés pour que le rapport entre les deux reste de trois pour un. Cette précaution s'explique par le caractère volatil de certains dérivés carbonylés utilisés. Ces mesures n'ont pas montré d'évolution sensible des solutions.

III.2.2.1 Extraction de l'éthanal après ajout du SO₂

La solution d'éthanal a été mise en présence de trois équivalents de chaque agent d'extraction dans des flacons différents. Les résultats des mesures sont présentés sur le graphique 6.

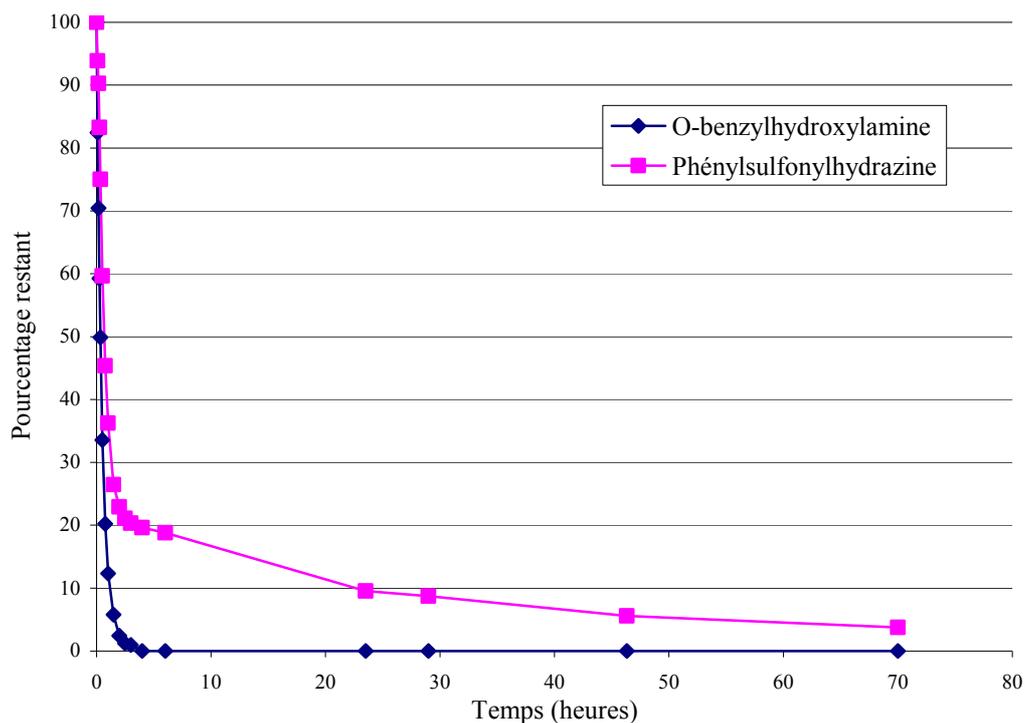


Graphique 6 : Extraction de l'éthanal en milieu homogène en fonction du temps après addition de SO_2

Le résultat le plus important qui apparaît sur ce graphique est que l'extraction de l'éthanal après ajout de SO_2 dans un milieu modèle est possible. Cela signifie que, bien que l'éthanal soit sous forme combiné à plus de 99 %, il est possible de déplacer l'équilibre formé avec le SO_2 pour éliminer ce dérivé carbonyle. L'allure des courbes obtenues montre que la O-benzylhydroxylamine et la phénylsulfonylhydrazine extraient l'éthanal de façons relativement proches. Le temps nécessaire pour que ces extractions se fassent n'est plus du même ordre de grandeur qu'en solution homogène avant ajout de SO_2 : il ne s'agit plus maintenant de minutes mais de jours. Après deux jours de mise en présence, on dose environ 30 % d'éthanal encore présent dans le milieu. Les courbes d'extractions présentent alors un net ralentissement, la mesure après 24 heures supplémentaires ne présentant une amélioration que de 5 %. Les équilibres évoluent plus lentement, mais l'élimination en trois jours de 75 % de l'éthanal présent après addition de SO_2 est un résultat très encourageant pour la suite de l'étude.

III.2.2.2 Extraction de l'acide pyruvique après ajout de SO₂

La solution d'acide pyruvique a été mise en présence de trois équivalents de chaque agent d'extraction dans des flacons différents. Les résultats des mesures sont présentés sur le graphique 7.

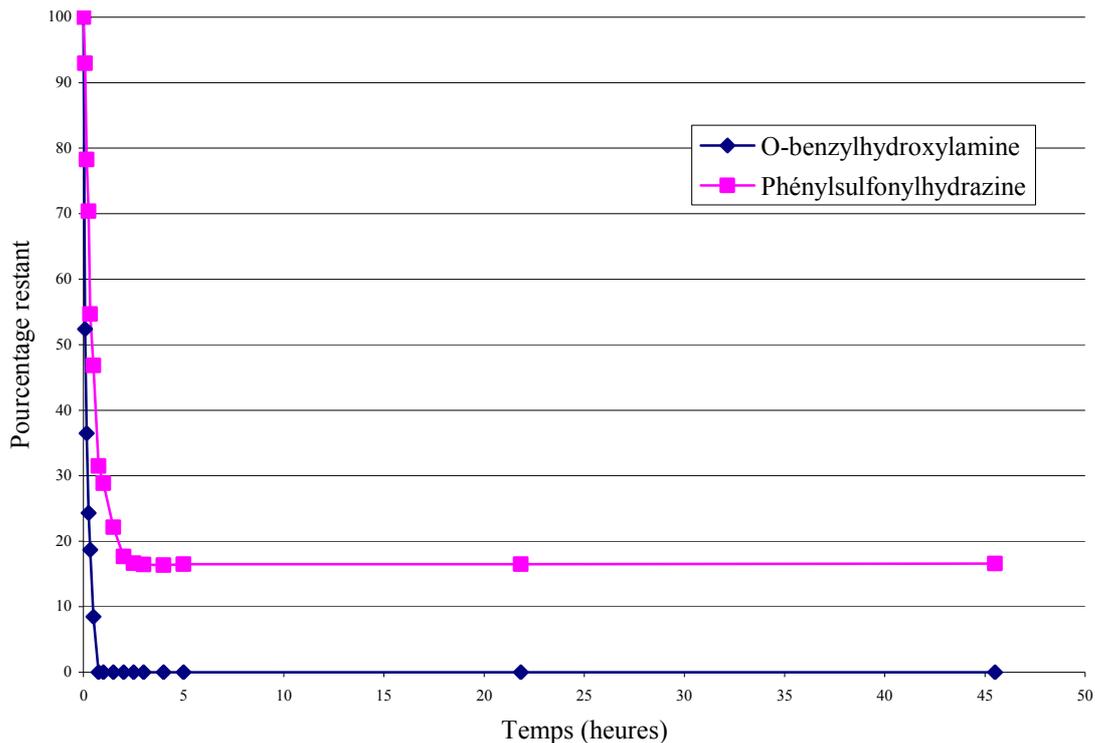


Graphique 7 : Extraction de l'acide pyruvique en milieu homogène en fonction du temps après addition de SO₂

Les résultats montrent que l'extraction est beaucoup plus rapide que dans le cas de l'éthanal. L'acide pyruvique est totalement extrait par la O-benzylhydroxylamine en deux heures. Dans le cas de la phénylsulfonylhydrazine, l'extraction est de l'ordre de 80 % au même temps. L'extraction devient alors plus lente pour finir à 5 % d'acide pyruvique restant dans le milieu au bout de trois jours de mise en présence.

III.2.2.3 Extraction de l'acide 2-oxoglutarique après ajout de SO₂

La solution d'acide 2-oxoglutarique a été mise en présence de trois équivalents de chaque agent d'extraction dans des flacons différents. Les résultats des mesures sont présentés sur le graphique 8.



Graphique 8 : Extraction de l'acide 2-oxoglutarique en milieu homogène en fonction du temps après addition de SO₂

Les résultats montrent que les extractions sont encore plus rapides dans ce cas. La O-benzylhydroxylamine extrait totalement l'acide 2-oxoglutarique après une heure de mise en présence. Dans le cas de la phénylsulfonylhydrazine, un palier est atteint après deux heures. Il reste encore 17 % d'acide 2-oxoglutarique dans le milieu et le système ne présente plus aucune évolution au bout de 2 jours.

III.2.2.4 Bilan des extractions en milieu homogène après ajout de SO₂

Il ressort de ces expériences qu'il est possible de déplacer les équilibres qui s'établissent entre le SO₂ et l'éthanal, l'acide pyruvique et l'acide 2-oxoglutarique pour extraire ces composés d'un milieu modèle. Les temps nécessaires pour que les extractions se réalisent sont plus longs qu'en l'absence de SO₂ dans le milieu. On note également une inversion dans la rapidité des extractions. Avant ajout de SO₂ dans le milieu, l'éthanal est plus vite extrait que l'acide pyruvique, qui lui-même est plus rapide que l'acide 2-oxoglutarique. Après ajout de SO₂ dans le milieu, l'ordre est inversé. L'hypothèse que l'on peut avancer pour expliquer cette observation est que la constante de dissociation a une influence sur les extractions. La constante de dissociation, appelée K_d, est une valeur propre à chaque dérivé carbonyle qui régit l'équilibre qu'il forme avec le SO₂. Plus cette valeur est faible, plus l'équilibre sera fortement déplacé vers la forme combinée. Pour les trois composés considérés ici, l'ordre est le suivant :

$$K_d \text{ éthanal} < K_d \text{ acide pyruvique} < K_d \text{ acide 2-oxoglutarique}$$

On peut donc supposer que plus le composé est fortement lié au SO₂, plus il sera long à extraire du milieu.

III.3 Conclusion

Au terme des recherches bibliographiques, quatre molécules ont été retenues pour cette étude. Il s'agissait de la O-benzylhydroxylamine, de la phénylsulfonylhydrazine, de l'acide phénylsulfonique et de la polyéthylèneimine. Ces quatre molécules ont été retenues pour deux raisons. Elles sont susceptibles de réagir avec les dérivés carbonyles à extraire suivant les conditions imposées. Elles présentent également des fonctions secondaires permettant de les fixer par la suite sur des supports.

L'efficacité de ces fonctions vis-à-vis de l'extraction de dérivés carbonyles a été vérifiée sur des milieux modèles homogènes. Seules la O-benzylhydroxylamine et la phénylsulfonylhydrazine se sont révélées être très efficaces (plus de 90 % des dérivés carbonyles extraits) sur l'éthanal, l'acide pyruvique et l'acide 2-oxoglutarique. L'efficacité de

ces fonctions vis-à-vis du 5-oxofructose n'a pas pu être vérifiée pour des raisons techniques. Leur efficacité s'est confirmée en présence de sucres, qui étaient susceptibles de rentrer en compétition avec les dérivés carbonylés.

Ces deux molécules ont finalement été mises en présence des trois premiers dérivés carbonylés, dans des solutions modèles ne comportant qu'un seul dérivé carbonylé. Ces expériences ont permis de mesurer la cinétique de la réaction de chaque dérivé carbonylé avec chaque agent d'extraction, et ceci avant et après ajout dans la solution de SO₂. L'extraction de l'éthanal, de l'acide pyruvique et de l'acide 2-oxoglutarique après ajout de SO₂ dans le milieu a permis de mettre en évidence la possibilité de déplacer les équilibres formés par les dérivés carbonylés et le SO₂ vers la rupture de la liaison bisulfite.

La O-benzylhydroxylamine et la phénylsulfonylhydrazine sont donc des molécules susceptibles d'établir une liaison covalente avec l'éthanal, l'acide pyruvique et l'acide 2-oxoglutarique, aussi bien en l'absence qu'en présence de SO₂. Les dérivés combinés formés doivent être ôtés du milieu réactionnel afin de finaliser l'extraction. Lorsque les agents de piégeage sont en milieu homogène, il est nécessaire de réaliser une extraction liquide-liquide à l'aide d'un solvant organique. Cette solution n'étant pas envisageable pour le vin, il faut maintenant fixer ces fonctions extractives sur des supports insolubles. Les extractions qui seront réalisées par la suite seront de type liquide-solide et la séparation après extraction se fera par simple décantation.

IV Synthèse des supports fonctionnalisés

L'utilisation de réactifs fixés sur des supports s'est largement développée depuis les années soixante et les premiers travaux de Merrifield sur les peptides.⁸¹ La "chimie supportée" présente un certain nombre d'avantages :^{82,83}

- Le produit est facilement récupérable après réaction par simple filtration
- Les réactifs supportés sont non volatils et donc moins nuisibles d'un point de vue toxicologique et écologique
- Elle offre la possibilité d'utiliser de larges excès de réactifs pour augmenter le rendement et/ou la cinétique de la réaction
- Il est possible dans certains cas de récupérer et de régénérer les réactifs supportés (intérêt économique)

Néanmoins, la fixation sur support d'un réactif entraîne des temps de réaction plus longs qu'en solution, la vitesse de réaction étant contrôlée par la diffusion des réactifs solubles à l'intérieur du support insoluble.

Le support utilisé devra répondre à un certain nombre de critères :

- Inertie chimique vis-à-vis du milieu à extraire pour ne pas générer de réaction parasite et de pollution
- Compatibilité avec le milieu hydroalcoolique, de façon à permettre la mise en contact des fonctions supportées avec les dérivés carbonylés à extraire
- Taille millimétrique pour permettre une filtration simple après réaction

Les fonctions O-benzylhydroxylamine et phénylsulfonylhydrazine se sont révélées être les agents d'extraction les plus efficaces en milieu homogène dans les conditions d'utilisation retenues pour cette étude. Ces fonctions ont donc été fixées sur deux types de supports afin de mettre en œuvre l'extraction liquide-solide : le support polymère organique et le support de silice.

⁸¹ Merrifield R. B. Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, *85*, 2149-2154

⁸² Dorwald F. Z. *Organic synthesis on solid phase*, 2^e édition. Weinheim : Wiley – VCh Verlag GmbH, **2002**, 530 p.

⁸³ Drewry D. H., Coe D. M., Poon S. Solid-supported reagents in organic synthesis, *Med. Res. Rev.*, **1999**, *19*, 97-148

IV.1 Supports polymères

L'obtention des fonctions O-benzylhydroxylamine et phénylsulfonylhydrazine greffées sur supports polymères peut se faire par deux voies. La première est la polymérisation de monomères fonctionnalisés ; la seconde est le greffage de ces fonctions sur des supports préformés. Ces deux méthodes sont réalisables au laboratoire.

IV.1.1 Support polymère organique

Les supports polymère fonctionnalisés peuvent être obtenus de différentes façons.⁸⁴⁻⁸⁷ Les groupes fonctionnels peuvent être introduits dans la chaîne polymérique :

- par polymérisation ou copolymérisation de monomères contenant le groupe fonctionnel désiré,
- par modification chimique d'un polymère préformé (beaucoup de supports commerciaux sont disponibles),
- par une combinaison des deux méthodes en co-polymérisant un précurseur de la fonction voulue.

Un support polymère peut se présenter sous deux formes :

- des chaînes polymères fonctionnalisées solubles dans certains solvants compatibles avec leur nature chimique, se présentant à l'état sec sous forme de poudre. La récupération après réaction s'effectue par précipitation du mélange dans un solvant incompatible avec la nature du polymère.
- des chaînes polymères fonctionnalisées reliées entre elles par un agent de réticulation conduisant à un support tridimensionnel insoluble, se présentant sous forme d'un solide (poudre, billes, blocs). La récupération après réaction du support s'effectue par décantation/filtration du mélange réactionnel.

⁸⁴ Akelah A., Sherrington D. C. Application of functionalized polymers in organic synthesis *Chem. Rev.*, **1981**, *81*, 557-587

⁸⁵ Buchmeiser M. R. *Polymeric Materials in Organic Synthesis and Catalysis*. Weinheim : Wiley-VCH GmbH & Co, **2003**, 559 p.

⁸⁶ Frechet J. M. J., Darling G. D., Itsuno S., Lu P.-Z., Vivas de Meftahi M., Rolls W. A. Jr. Reactive polymers: design considerations, novel preparations and selected applications in organic chemistry *Pure & Appl. Chem.*, **1988**, *60(3)*, 353-364

⁸⁷ Nakahama S., Hirao A. Protection and polymerization of functional monomers: anionic living polymerization of protected monomers *Prog. Polym. Sci.*, **1990**, *15(2)*, 299-335

La nécessité d'un support facilement récupérable après le piégeage nous a conduit à envisager l'utilisation d'un support insoluble. Pour le synthétiser un monomère difonctionnel est utilisé. Il jouera le rôle d'agent de réticulation, permettant d'obtenir un réseau polymérique tridimensionnel (schéma 37).

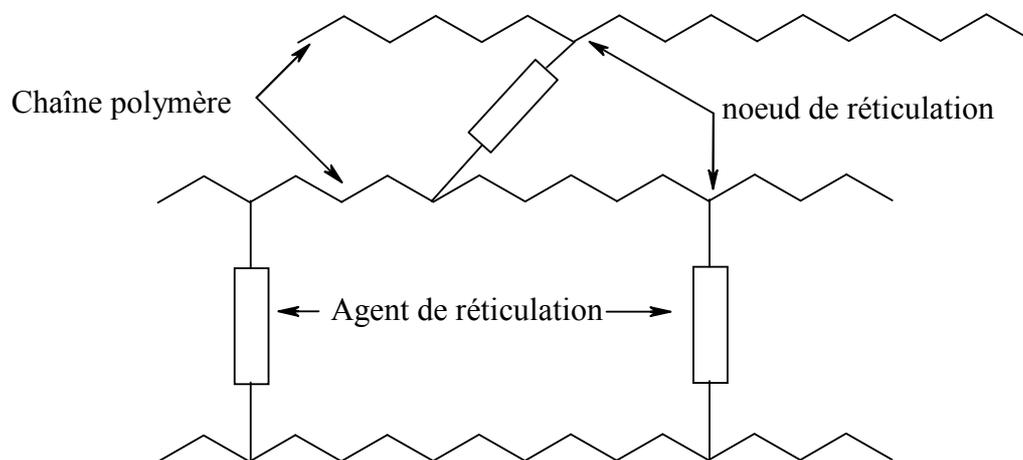


Schéma 37 : Réseau tridimensionnel

Les supports seront utilisés sous forme de billes. Ces supports sont de petite taille, facilement synthétisables et manipulables. Deux possibilités s'offrent alors : les résines de type gel ou les billes macroporeuses.⁸⁸

Les résines de type gel sont des polymères faiblement réticulés (de 1 à 2 % d'agent de réticulation). Ce sont des polymères souples et dont le taux de fonctionnalisation peut aller jusqu'à 100 %. Mais ils ne gonflent, de façon à ce que tous les sites soient accessibles, que dans les bons solvants, c'est-à-dire ceux qui ont une bonne compatibilité avec les chaînes polymère. Là intervient le critère de "mouillabilité". Il faut choisir un polymère dont la composition soit compatible avec le milieu à extraire, de façon à ce qu'il gonfle au maximum pour rendre tous les sites réactionnels accessibles et être ainsi le plus efficace possible. Ces résines ne sont pas toujours faciles à extraire. Elles restent gonflées et peuvent boucher les filtres. De plus, leur gonflement fait qu'en entraînant du solvant, elles peuvent également retenir des composés qu'il ne serait pas souhaitable d'extraire des solutions.

Les billes macroporeuses sont obtenues à partir de polymères beaucoup plus réticulés (en moyenne de 10 à 80 % d'agent de réticulation). Cela permet d'obtenir des structures plus

⁸⁸ Sherrington, D.C. Preparation, structure and morphology of polymer supports *Chem. Commun.*, **1998**, 2275-2286

Chapitre IV : Synthèse des supports fonctionnalisés

rigides, qui ne gonfleront pas de façon notable. Les structures poreuses sont à priori accessibles à tous les solvants, sous réserve d'une certaine compatibilité entre le solvant et le polymère. Ce problème se résout en intercalant dans le support des groupements qui vont augmenter la compatibilité. Ce type de support possède un taux de fonctionnalisation maximal de l'ordre de 45 %, ce qui est inférieur aux résines de type gel. En contrepartie, les billes sont facilement extractibles par une simple filtration. Elles ne retiennent alors ni le solvant, ni d'autres composés présents en solution.

Le taux de fonctionnalisation d'un tel support peut être de l'ordre de 3 à 4 mmol.g⁻¹. L'encombrement et l'accessibilité des sites réactionnels seront des éléments importants dans l'efficacité des supports. Le comportement des résines de type gel ou des billes macroporeuses en milieu hydroalcoolique n'est pas prévisible. Il faudra donc effectuer des essais en solution avant de choisir le type de support. Ces essais permettront également de déterminer la nature chimique du polymère la plus compatible avec le milieu à purifier.

Pour obtenir des supports polymère sous forme de billes, on procède à une polymérisation en suspension aqueuse. Le réacteur à double enveloppe utilisé au laboratoire est présenté sur la photo 1.



Photo 1 : Réacteur à double enveloppe pour polymérisation en suspension

La synthèse des supports, fonctionnalisés ou non, se fait par dispersion d'une phase organique dans une phase aqueuse. La phase aqueuse (ou continue) est constituée d'eau et d'un agent stabilisant. La phase organique (ou dispersée) est constituée des monomères, de l'agent de réticulation, d'un amorceur radicalaire et éventuellement d'un solvant pour solubiliser les monomères. La dispersion de la phase organique est générée par une tige munie d'ailettes reliée à un moteur. L'amorçage de la polymérisation se fera par le chauffage du mélange, grâce à la circulation d'eau provenant d'un bain thermostaté dans la double enveloppe du réacteur.

Les monomères utilisés devront être solubles dans le solvant de polymérisation et insolubles dans la phase continue. Ils devront en outre porter une fonction permettant une polymérisation par voie radicalaire, comme une fonction vinylique.

Pour analyser les fonctions greffées sur des supports organiques, différentes méthodes existent. On peut ainsi avoir recours à la RMN en phase solide, aux analyses élémentaires des

échantillons ou à l'enregistrement de spectres infrarouges. Pour des raisons de disponibilité du matériel, seules les deux dernières méthodes ont été utilisées lors de cette étude.

IV.1.2 Synthèse de réactifs supportés par polymérisation de monomères fonctionnels

Cette voie passe par la synthèse de molécules fonctionnalisées. Ces molécules permettent d'accéder aux fonctions O-benzylhydroxylamine et phénylsulfonylhydrazine. La fonction peut être sous une forme protégée ou directement utilisable. Ces deux agents d'extraction possèdent un noyau aromatique dans leur structure. La synthèse des molécules polymérisables s'est donc axée vers l'obtention de composés styréniques. Ces composés sont polymérisables par la voie radicalaire. Le support polymère obtenu présente une inertie chimique vis-à-vis du milieu réactionnel. Les molécules synthétisées ont été soumises à des essais de polymérisation en solution par voie radicalaire. Ces tests sont destinés à connaître les conditions optimales de polymérisation de ces composés en vue de leur utilisation pour des polymérisations en suspension.

IV.1.2.1 Synthèse de styrènes fonctionnels pour la O-benzylhydroxylamine

Dans le cas de la O-benzylhydroxylamine, une seule méthode a été trouvée dans la littérature pour synthétiser son homologue portant une fonction vinylique polymérisable. La synthèse de ce monomère passe par la formation d'un intermédiaire à partir de la N-hydroxyphthalimide.⁸⁹ Cette voie de synthèse est donc très proche de celle utilisée pour obtenir la O-benzylhydroxylamine nécessaire à l'étude en solution. Cette méthode a été mise en œuvre (schéma 38).

⁸⁹ Zhou W.-J., Wilson M.E., Kurth M.J., Hsieh Y.-L., Krochta J.M., Shoemaker C.F. Synthesis and properties of a novel water-soluble lactose-containing polymer and its cross-linked hydrogel *Macromolecules*, **1997**, 30(23), 7063-7068

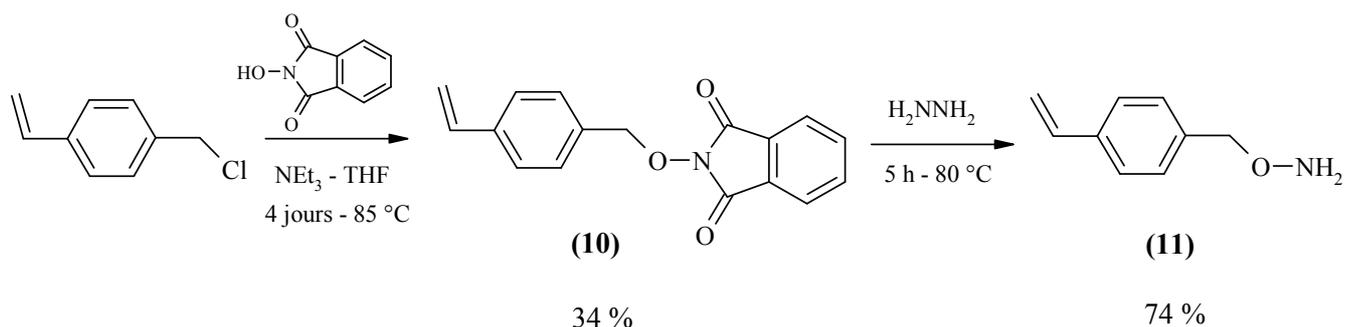


Schéma 38 : Synthèse de la *O*-((*p*-vinyl-benzyl)oxy)amine

Le monomère final a été obtenu avec un rendement global de 25 % par cette méthode. Ce rendement est un peu supérieur à celui obtenu pour le composé sans la fonction vinyle. Dans les deux cas, c'est la formation de l'intermédiaire phthalimide qui est limitante. Cet intermédiaire se présente sous la forme d'un solide brun. Le produit final **(11)** est un liquide jaune, de pureté par RMN du proton de 95 %.

Le composé **(10)** est insoluble dans les solvants d'usage courant. Cette insolubilité ne permet pas de réaliser les tests de polymérisation souhaités.

Le produit **(11)** a été placé en solution dans du toluène avec un amorceur radicalaire, le 2,2'-azobisisobutyronitrile (AIBN). Après 48 heures à 80 °C sous agitation, le produit est récupéré par distillation du solvant sous vide de trompe à eau. L'enregistrement du spectre RMN du produit obtenu, un liquide jaune, montre que le composé **(11)** n'a pas polymérisé. La fonction vinyle (fonction polymérisable) est restée inchangée (schéma 39).

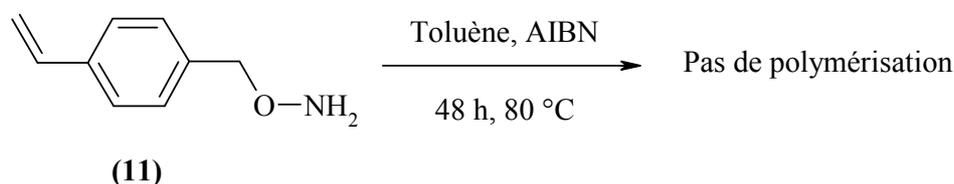


Schéma 39 : Polymérisation de la *O*-((*p*-vinyl-benzyl)oxy)amine

Ce résultat n'est pas surprenant au regard de la littérature. Peu de références existent sur la polymérisation radicalaire de molécules styréniques portant une fonction amine non

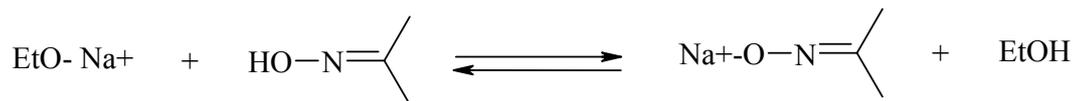


Schéma 41 : Equilibre des sels de sodium

Ce composé représente 10 % du total et les deux produits sont difficilement séparables sur colonne de chromatographie. Ce produit n'engendrant pas de réaction secondaire lors des extractions liquide-solide ultérieures, la purification n'a pas été poussée plus avant. La déprotection de la fonction amine passe par un traitement à l'acide chlorhydrique. Il a donc été envisagé de conserver ce composé sous forme protégée et de ne le déprotéger qu'une fois la polymérisation réalisée, compte tenu des difficultés rencontrées lors de la polymérisation en solution du composé **(11)**.

La polymérisation radicalaire du composé **(12)** en solution a été étudiée. Le composé a été placé en solution dans le toluène en présence d'AIBN (schéma 42). Au bout de 48 heures le produit est récupéré par distillation du solvant sous vide de trompe à eau. L'enregistrement du spectre de RMN du produit obtenu a montré que la polymérisation ne s'était pas faite : le monomère est récupéré inchangé. Il ne semble donc pas possible d'obtenir de support par copolymérisation en suspension à partir du composé **(12)**.

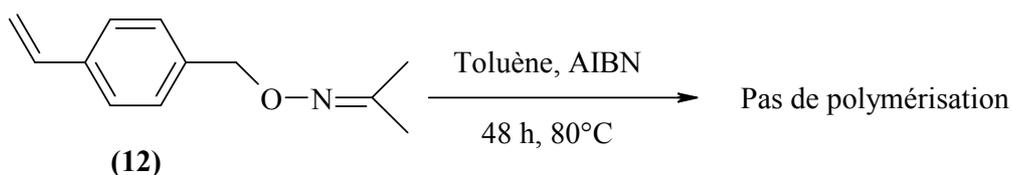


Schéma 42 : Polymérisation en solution de la O-(p-vinyl-benzyl)-acétoxime

IV.1.2.2 Synthèse de styrènes fonctionnels pour la phénylsulfonylhydrazine

Dans le cas de la phénylsulfonylhydrazine, une méthode a été relevée dans la littérature permettant d'accéder à son homologue portant une fonction vinyle polymérisable.

La synthèse du composé en vue d'une polymérisation commence par la synthèse du chlorure de *p*-sulfonyl-styrène (**14**) (schéma 43).^{94,97}

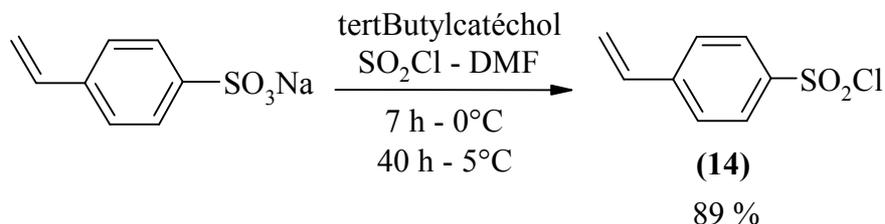


Schéma 43 : Synthèse du chlorure de *p*-sulfonyl-styrène

La synthèse du chlorure de *p*-sulfonyl-styrène (**14**) à partir du sel de sodium de l'acide *p*-sulfonique-styrène commercial s'effectue bien. Le rendement de la réaction est de 89 %, avec une pureté RMN du proton de 95 %.

Ce composé peut également être obtenu en faisant réagir un excès de pentachlorure de phosphore sur du sel de sodium de l'acide *p*-sulfonyl-styrène.^{98,100} Cette voie de synthèse nécessitant une étape de chauffage (60 °C) qui aurait pu altérer la fonction vinyle, elle n'a pas été mise en œuvre. Une dernière méthode permettant d'obtenir la fonction chlorure de sulfonyle à partir de la fonction sulfonate de sodium a été relevée dans la littérature. Elle passe par l'utilisation de $\text{PPh}_3 \cdot \text{Cl}_2$.¹⁰¹ Cette méthode n'a pas été mise en œuvre.

⁹⁴ Kamogawa H., Kitamura T. Polymer reagents derived from sodium *p*-styrenesulfonate: N-methyl-N-nitroso-*p*-styrenesulfonamide and *p*-styrenesulfinic acid polymers *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1989**, 62, 189-192

⁹⁵ Morikawa A., Sone T., Asano T. 5-isoquinolinesulfonamide derivatives. 1. Synthesis and vasodilatory activity of N-(2-guanidinoethyl)-5-isoquinolinesulfonamide derivatives *J. Med. Chem.*, **1989**, 32, 42-46

⁹⁶ Thea S., Cevasco G., Hopkins A., Kashefi-Naini N., Williams A. Sulfoquinones in the hydrolysis of aryl esters of *o*- and *p*-hydroxyarenesulfonic acids in alkaline aqueous solutions of dioxane *J. Org. Chem.*, **1985**, 50, 2158-2165

⁹⁷ Haub G. H., Whaley T. W. Synthesis of 4-(2-hydroxyethylsulfonyl)-1-naphthalenesulfonamide *J. Org. Chem.*, **1978**, 43(23), 4659-4662

⁹⁸ Yoda N., Marvel C. S. Base-catalyzed polymerization of aromatic sulfonamides with an activated double bond *J. Polym. Sci., Part A*, **1965**, 3(6), 2229-2242

⁹⁹ Loev B., Kormendy M. 2-sulfobenzoic acid esters. I. 2-sulfamyl derivatives *J. Am. Chem. Soc.*, **1961**, 27, 1703-1709

¹⁰⁰ King J. K., Baines K. M., Netherton M. R., Dave V. Bis(trimethylsilyl)methanesulfonyl and tris(trimethylsilyl)methane sulfonyl chlorides and their reactions by way of sulfenes *Can. J. Chem.*, **2000**, 78, 1642-1646

¹⁰¹ Kataoka T., Imawa T., Setta T., Takagi A. Preparation of sulfonamides from sodium sulfonates. Ph_3PBr_2 and Ph_3PCl_2 as a mild halogenating reagent for sulfonyl bromides and sulfonyl chlorides *Synthesis*, **1998**, 4, 423-426

S'agissant du précurseur de la fonction voulue, on peut envisager de polymériser directement ce monomère, afin d'obtenir un support pré fonctionnalisé.

La polymérisation du composé **(14)** a été essayée sans succès. Plusieurs méthodes ont été employées, en faisant varier le temps de polymérisation, la nature de l'amorceur et la température. Le monomère n'a pas polymérisé mais il s'est partiellement altéré dans le milieu et n'a pas pu être récupéré, même lors de l'utilisation d'un amorceur radicalaire actif à température ambiante, le V70.¹⁰²

La synthèse du monomère final **(15)** en vue de sa polymérisation a finalement été réalisée (schéma 44).⁵⁶

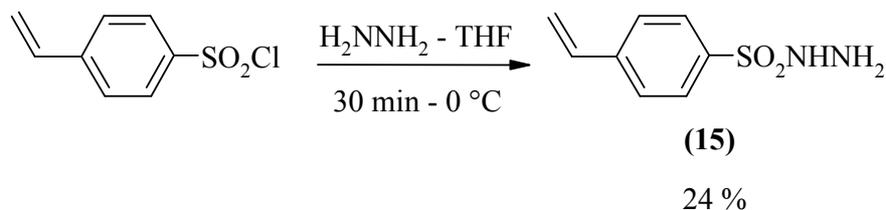


Schéma 44 : Synthèse du *p*-sulfonylhydrazine-styrène

Le monomère attendu **(15)** a bien été obtenu, bien que le rendement ne soit pas très important (24 %). Il se présente sous la forme d'une poudre blanche. Au cours des essais effectués, il s'est révélé insoluble dans les solvants utilisés pour les polymérisations en suspension. Sa polymérisation en solution est bien décrite dans le DMF dans la littérature,⁹⁴ mais les conditions de polymérisation ne sont pas utilisables en polymérisation en suspension aqueuse.

Le monomère final **(15)** n'étant pas utilisable pour la polymérisation en suspension, il est nécessaire de recourir à un intermédiaire polymérisable. Une fois le support synthétisé, une ou plusieurs étapes de modification permettront d'obtenir la fonction phénylesulfonylhydrazine. Le composé **(14)** est un produit sensible qui s'est altéré lors de la polymérisation. Une protection de la fonction chlorure de sulfonyle semble donc nécessaire. La voie envisagée passe par la formation d'un ester polymérisable, la formation de cet ester

¹⁰² Danek S. K., Kelly D. P., Serelis A. K., Steel P. J. A stereospecific synthesis of azo nitriles *J. Org. Chem.*, **1987**, 52(13), 2911-2919

étant réversible.¹⁰³ L'ester de méthyle (16) n'a pas pu être obtenu par réaction directe du composé (14)^{104,105} avec le méthanol ou du sel de sodium de l'acide *p*-sulfonyl-styrène avec le sulfate de diméthyle.¹⁰⁶ Par contre, à partir de méthanolate de sodium formé par addition de sodium métallique dans du méthanol froid et de chlorure de *p*-sulfonyl-styrène l'ester recherché a été obtenu, mais avec un rendement faible (27 %) (schéma 45).

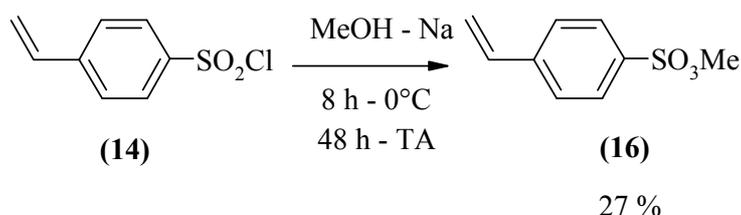


Schéma 45 : Synthèse de l'ester de méthyle et d'acide *p*-sulfonyl-styrène

Cette méthode est une adaptation de la méthode employée pour la O-benzyl-hydroxylamine. Les modifications apportées dans le protocole expérimental (temps de réaction, nombre d'équivalents des réactifs) conduisent à un rendement identique.

Le rendement de cette méthode n'ayant pas pu être amélioré, il était intéressant de voir si une autre voie pour y arriver ne serait pas envisageable. Une autre méthode de synthèse de l'ester s'effectue à partir de l'acide *p*-sulfonyl-styrène.¹⁰⁷ Ce dernier est obtenu à partir d'une solution aqueuse du sel de sodium de l'acide *p*-sulfonyl-styrène et d'une résine échangeuse d'ions, l'Amberlite IR120. L'acide ainsi obtenu réagit avec un alcool (ici le méthanol) en présence d'un catalyseur pour donner l'ester en libérant de l'eau. La réaction se déroule à reflux du solvant. Le catalyseur est la Montmorillonite K10, dopée avec du fer. Ce catalyseur a été préparé au laboratoire suivant les méthodes décrites dans la littérature (schéma 46).^{108,109}

¹⁰³ Wipf P., Aslan D. C., Southwick E. C., Lazo J. S. Sulfonylated aminothiazoles as new small molecule inhibitors of protein phosphatases *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2001**, *11*, 313-317

¹⁰⁴ Csongar C., Weinberg P., Slezak H., Tomaschewski G. Sulfonylierte 2,5-diaryl-2H-tetrazole *J. Prakt. Chem.*, **1988**, *330(4)*, 629-633

¹⁰⁵ Salomone J. C., Watterson A. C., Hsu T. D., Tsai C. C., Mahmud M. C. Polymerization of vinylpyridinium salts. IX. Preparation of monomeric salt pairs *J. Polym. Sci., Polym. Lett. Ed.*, **1977**, *15(8)*, 487-491

¹⁰⁶ Forbes C. P., Psotta K. Esterification of aliphatic sulfonic acids with dimethyl sulfate *Cellul. Chem. Technol.*, **1981**, *15(6)*, 691-693

¹⁰⁷ Choudary B. M., Chowdari N. S., Kantam M. L. Montmorillonite clay catalysed tosylation of alcohols and selective monotosylation of diols with *p*-toluenesulfonic acid: an enviro-economic route *Tetrahedron*, **2000**, *56*, 7291-7298

¹⁰⁸ Laszlo P., Mathy A. 65. Catalysis of Friedel-Crafts alkylation by a montmorillonite doped with transition-metal cations *Helv. Chim. Acta*, **1987**, *70*, 577-586

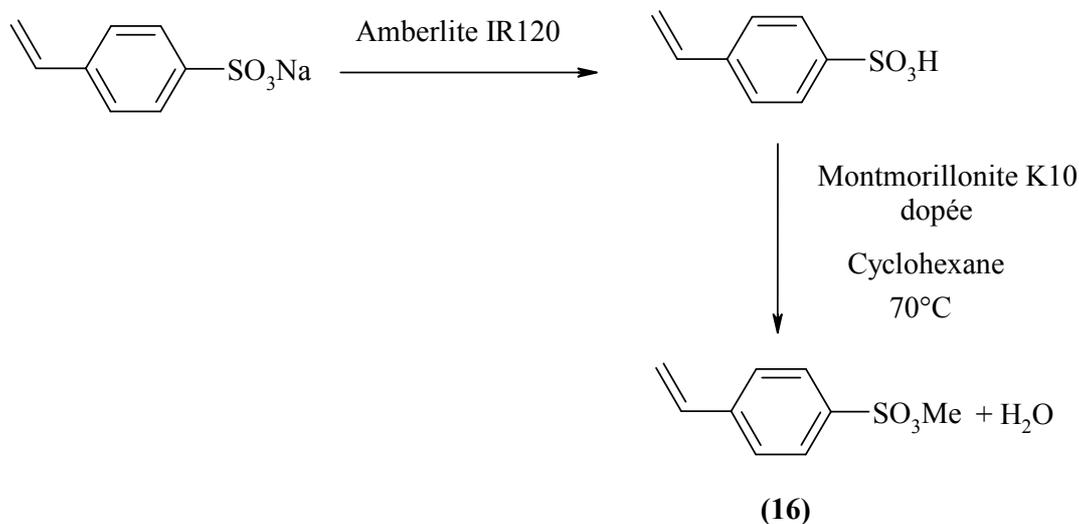


Schéma 46 : Synthèse de l'ester de méthyle et d'acide *p*-sulfonique-styrène par la voie utilisant la Montmorillonite dopée

Malheureusement le chauffage était trop élevé et le produit attendu s'est dégradé. Un résidu solide orange collé au fond du ballon est obtenu. Ce résidu n'est soluble que dans l'acétone et n'a pas pu être identifié.

Les essais de polymérisation de l'ester de méthyle et d'acide *p*-sulfonique-styrène en solution n'ont pas donné de meilleurs résultats (schéma 47). Au bout de 48 heures, le composé s'est dégradé. Il ne reste plus qu'un bloc solide au fond du ballon. La diminution du temps de polymérisation conduit au même résultat. Après 3 heures de chauffage, le produit se dégrade.

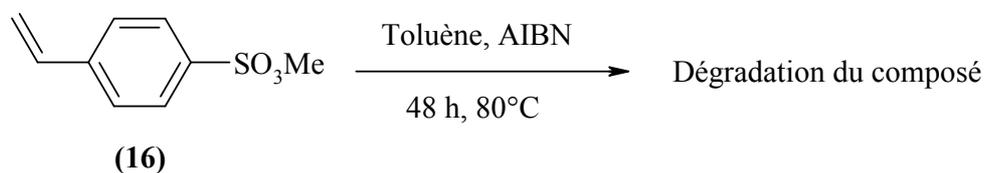


Schéma 47 : Polymérisation en solution de l'ester de méthyle et d'acide *p*-sulfonique-styrène

¹⁰⁹ Vogel A. I. *A text-book of quantitative inorganic analysis including elementary instrumental analysis*, 3^e édition. London : Longmans, **1961**, 1216 p.

IV.1.2.3 Bilan sur la synthèse de supports fonctionnalisés par co-polymérisation en suspension aqueuse

Les synthèses des molécules vinyliques correspondant à la O-benzylhydroxylamine et à la phénylsulfonylhydrazine ne donnent pas de très bons rendements. Leur polymérisation par voie radicalaire en solution s'est révélée être très difficile, voire même impossible dans certains cas. La copolymérisation radicalaire de monomères fonctionnalisés avec des agents de réticulation ne semble pas être une voie possible pour obtenir des supports insolubles porteurs des fonctions O-benzylhydroxylamine et phénylsulfonylhydrazine.

IV.1.3 Synthèse de réactifs supportés par fonctionnalisation de polymères

La seconde voie envisageable passe par la fonctionnalisation de supports réticulés, portant ou non une fonction précurseur.

IV.1.3.1 Synthèse de supports

La plupart des supports disponibles dans le commerce sont réticulés avec le divinylbenzène (DVB). Afin de disposer de supports ayant des propriétés différentes, la synthèse de supports réticulés avec un autre agent de réticulation a été effectuée.

IV.1.3.1.1 Agent de réticulation

L'agent retenu pour cette étude est le 1,8-bis(éthénylphényl)-2,7-dioxooctane (BEPOO). Celui-ci a été synthétisé au laboratoire d'après la littérature suivant la méthode décrite sur le schéma 48.¹¹⁰ Le produit (**17**), obtenu avec un rendement de 71 %, est un solide blanc cristallisé.

¹¹⁰ Toy P.H., Reger T.S., Garibay P., Garno J.C., Malikayil J.A., Liu G.-Y., Janda K.D. Polytetrahydrofuran cross-linked polystyrene resins for solid-phase organic synthesis *J. Comb. Chem.*, **2001**, 3, 117-124

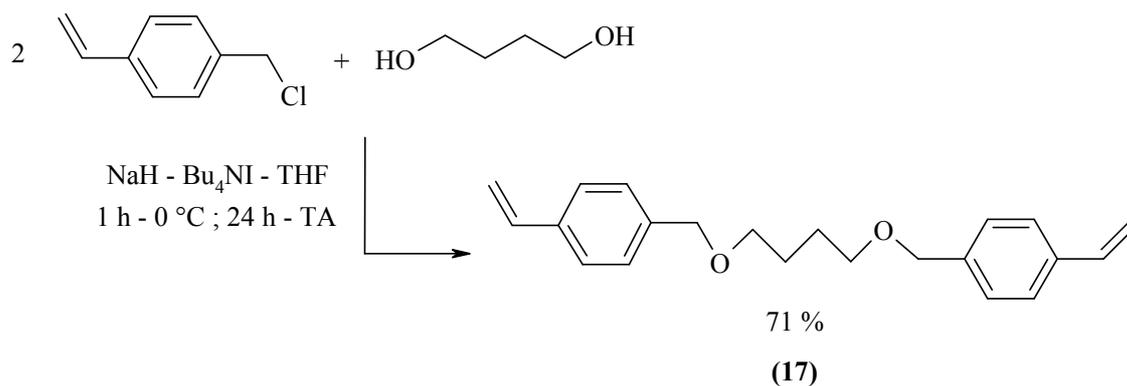


Schéma 48 : 1,8-bis(éthénylphényl)-2,7-dioxooctane

Le choix de cet agent de réticulation a été motivé par plusieurs arguments. La présence d'atomes d'oxygène sur la chaîne permet d'augmenter la compatibilité du support avec le milieu aqueux par rapport à l'emploi d'un agent de réticulation hydrocarboné tel que le DVB. Il s'utilise sans difficulté en copolymérisation tout en assurant l'inertie chimique du support.

IV.1.3.1.2 Polymérisation en suspension

La copolymérisation du chlorométhylstyrène ou du styrène avec du BEPOO en suspension aqueuse a été mise en œuvre.¹¹¹⁻¹¹³

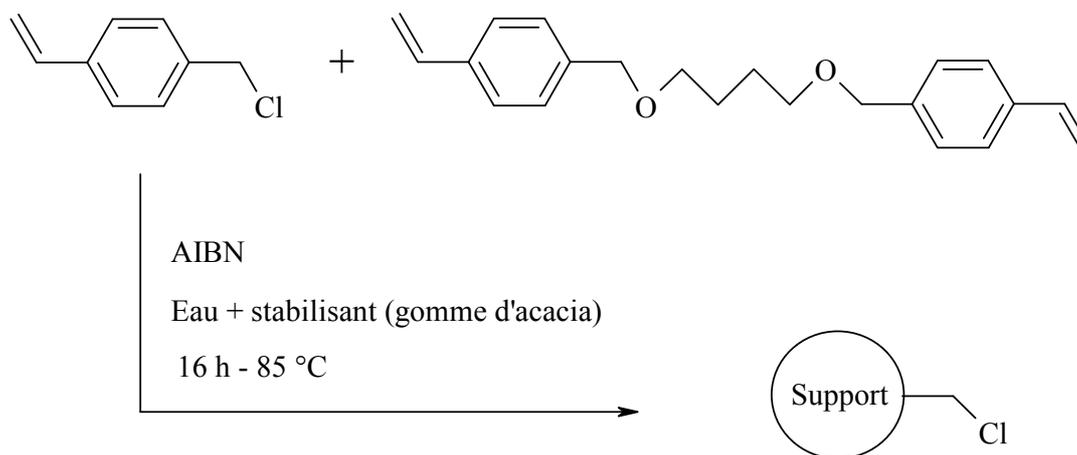


Schéma 49 : Synthèse de supports réticulés chlorométhylés

¹¹¹ Reger T. S., Janda K. D. Parallel suspension polymerisation for high-throughput resin synthesis *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2002**, 12(6), 837-840

¹¹² Alesso S. M., Yu Z., Pears D., Worthington P. A., Luke R. W. A., Bradley M. Synthesis of resins via multiparallel suspension polymerization *J. Comb. Chem.*, **2001**, 3, 631-633

¹¹³ Dowding P. J., Vincent B. Suspension polymerisation to form polymer beads *Colloids and Surfaces A : Physicochem. Eng. Aspects*, **2000**, 161, 259-269

Les pourcentages molaires respectifs de chlorométhylstyrène et de BEPOO sont 98-2 pour le support PO1, 96-4 pour le PO2 et 94-6 pour le PO3. Les résultats des analyses élémentaires sont présentés dans le tableau 3.

Support	Analyses élémentaires (% massique)						Diamètre (mm)
	Calculées			Obtenues			
	C	O	Cl	C	O	Cl	
PO1	71,2	0,4	22,0	75,7	5,2	11,0	0,4 – 0,6
PO2	71,7	0,8	21,4	75,7	5,6	11,8	0,4 – 0,6
PO3	72,1	1,2	20,5	75,4	5,4	11,6	0,4 – 0,6

Tableau 3 : Caractéristiques des supports synthétisés par polymérisation en suspension aqueuse

Ces résultats montrent une substitution des atomes de chlore dans le cas des trois supports PO1, PO2 et PO3. En effet, les analyses élémentaires montrent que le taux de chlore des billes chlorométhylées est de l'ordre de 11 %. Le taux de chlore attendu était de l'ordre de 22 %. Le taux d'oxygène est lui très supérieur à celui attendu (5,5 % contre 1,5). En comparant les deux valeurs, on peut penser que lors de la polymérisation en milieu aqueux, des fonctions hydroxyle se sont substituées à une partie des atomes de chlore. Une étude récente montre que c'est effectivement le cas.¹¹⁴ Il s'agirait d'une hydrolyse des fonctions chlorure de benzyle par un processus de type SN_1 , mécanisme qui entraîne la génération du carbocation correspondant (stabilisé par mésomérie) et suivi de l'attaque nucléophile de l'eau.

Les supports obtenus se présentent sous la forme de petites billes jaunes opaques (photo 2). Les supports obtenus par polymérisation en suspension sont des billes de forme assez régulière qui présentent une faible dispersion de taille.

¹¹⁴ Fontanals N., Cortés J., Galià M., Marcé R. M., Cormack P. A. G., Borrull F., Sherrington D. C. Synthesis of Danakov-type hypercrosslinked resins using different isomer compositions of vinylbenzylchloride monomer, ad application in the solid-phase extraction of polar compounds *J. Polym. Sci.: Part A : Polym. Chem.*, **2005**, *43*, 1718-1728

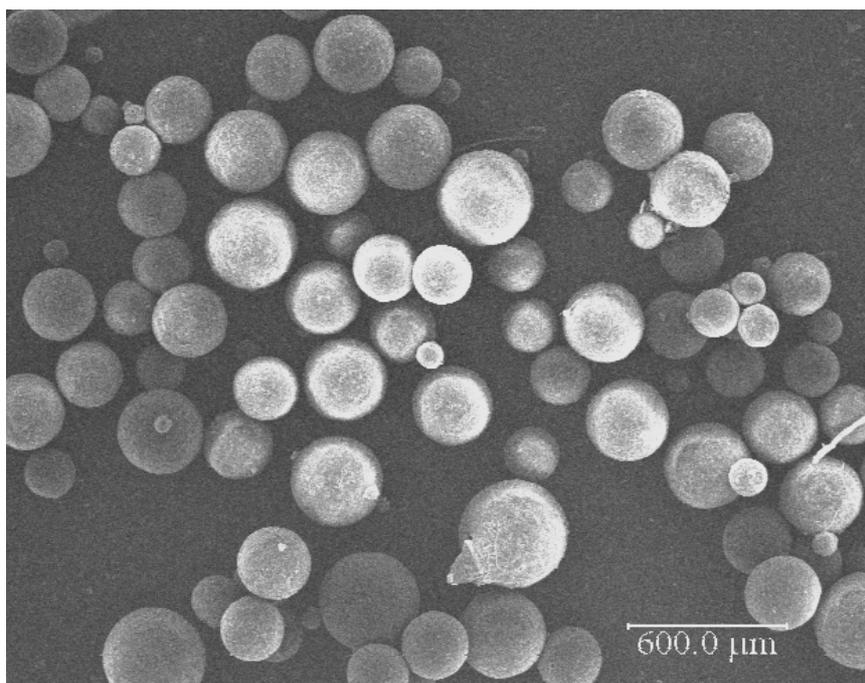


Photo 2 : Support PO1 au microscope électronique à balayage (MEB)

Le tableau 4 montre la dispersion de taille des supports synthétisés par la polymérisation en suspension aqueuse.

Nature du support	Taille Moyenne (μm)	Ecart-type (μm)
PO1	471	356
PO2	464	206
PO3	421	273

Tableau 4 : Résultats statistiques des supports synthétisés par polymérisation en suspension aqueuse

Les valeurs du tableau 4 montrent que la taille moyenne de billes dans le cas des trois supports est dans l'intervalle de taille donné de 400-600 μm de diamètre. Les statistiques montrent que 65 % des supports sont dans la fourchette. Les écart-types de faible amplitude montrent que les 35 % de support à l'extérieur de cette gamme restent de taille très proche.

IV.1.3.2 Greffage de la fonction O-benzylhydroxylamine

L'obtention de la fonction O-benzylhydroxylamine sur support polymère passe par la fonctionnalisation de supports insolubles portant la fonction chlorure de benzyle. Différents

supports synthétisés au laboratoire ou commercialisés ont été utilisés comme polymères de base pour effectuer les fonctionnalisations. Les caractéristiques de ces supports sont rassemblées ci-dessous (tableau 5).

Support	Taux de réticulation (% molaire)	Agent de réticulation	Taux de fonction chlore portée (mmol.g ⁻¹)	Taille des supports (diamètre en mm)
PO1 ⁽¹⁾	2,0	BEPOO	3,2	0,4 – 0,6
PO2 ⁽¹⁾	4,0	BEPOO	3,3	0,4 – 0,6
PO3 ⁽¹⁾	6,0	BEPOO	3,3	0,4 – 0,6
PO4 ⁽²⁾	1,5	DVB	2,0	0,07 - 0,14
PO5 ⁽²⁾	3,5	DVB	5,0	0,20 - 0,63
PO6 ⁽²⁾	5,5	DVB	5,5	0,20 - 0,63

(1) Synthétisés; (2) Commerciaux

Tableau 5 : Caractéristiques des supports chlorométhylés utilisés pour greffer la *O*-benzylhydroxylamine

IV.1.3.2.1 Voie de greffage utilisant la N-hydroxyphthalimide

La première méthode de fonctionnalisation utilisée est celle utilisant la N-hydroxyphthalimide décrite sur le schéma 50.^{115,116}

¹¹⁵ Bauer U., Ho W.-B., Koskinen A. M. P. A novel linkage for the solid-phase synthesis of hydroxamic acids *Tetrahedron Lett.*, **1997**, 38(41), 7233-7236

¹¹⁶ Floyd C. D., Lewis C. N., Patel S. R., Whittaker M. A method for the synthesis of hydroxamic acids on solid-phase *Tetrahedron Lett.*, **1996**, 37(44), 8045-8048

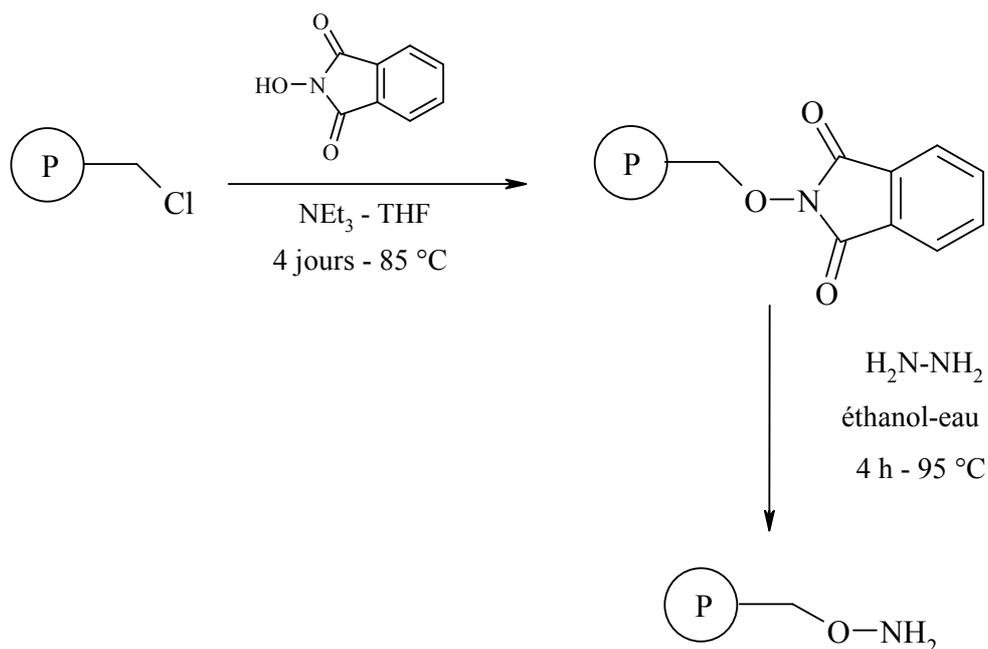


Schéma 50 : Greffage de la fonction *O*-benzylhydroxylamine par la voie utilisant la *N*-hydroxyphthalimide

Les résultats de la fonctionnalisation des différents supports sont rassemblés dans le tableau 6.

Support initial	Support final	Taux de fonction <i>O</i> -benzylhydroxylamine (calculé à partir du taux de N des analyses élémentaires) en mmol.g ⁻¹	Rendement de fonctionnalisation en % (amine/Cl initial)
PO1	PO7	2,4	76
PO2	PO8	3,1	93
PO3	PO9	2,9	90
PO4	PO10	1,6	80
PO5	PO11	4,3	87
PO6	PO12	4,6	83

Tableau 6 : Rendements du greffage de la fonction *O*-benzylhydroxylamine sur les polymères par la voie utilisant la *N*-hydroxyphthalimide

Les résultats montrent une bonne fonctionnalisation des supports (entre 76 % et 93 %), quel que soit l'agent de réticulation du support. Les résultats des analyses élémentaires montrent des taux de chlore résiduel faibles (de l'ordre de 0,06 à 0,15 mmol.g⁻¹). La

fonctionnalisation des supports est satisfaisante. L'analyse IR de ces billes montre l'efficacité de la déprotection par la disparition de la bande caractéristique C=O portée par le groupement phtalimide. Le chauffage des supports pose par contre un problème. Comme on peut le voir sur la photo 3, les supports ressortent expansés des deux étapes de fonctionnalisation. Ils sont fragilisés par le traitement. Leur résistance chimique est inférieure à ce qu'elle était avant traitement. Ceci pourrait induire des pertes de matière lors de l'utilisation de ces supports pour les extractions. Ces morceaux de support fonctionnalisé, trop petits pour être récupérés lors de la séparation, induiraient alors une pollution du milieu.



Photo 3 : Support PO7 à la loupe binoculaire (x100)

Le taux de gonflement des différents supports synthétisés a été mesuré dans plusieurs solvants, choisis pour être représentatifs de toutes les catégories de solvants possibles, et d'usage courant au laboratoire. Les mesures ont donc été faites dans un solvant peu polaire, le dichlorométhane (CH_2Cl_2), dans un solvant moyennement polaire, le tétrahydrofurane (THF), et dans un mélange de deux solvants formant des liaisons hydrogènes, l'eau et l'éthanol (88 % d'eau et 12 % d'éthanol en volume), ce mélange étant le milieu à extraire. Cette mesure s'effectue en plaçant un gramme de support sec dans une burette graduée et en mesurant la différence entre ce volume sec et le volume de cette même quantité de support après 24 heures de mise en présence d'un solvant.

Support	Taux de gonflement (en ml.g ⁻¹ de support)		
	CH ₂ Cl ₂	THF	H ₂ O – EtOH
PO7	1,3	1,7	0,4
PO8	1,0	1,2	0,3
PO9	1,0	1,0	0,3
PO10	2,0	1,7	0,5
PO11	1,1	0,7	0,4
PO12	0,9	0,9	0,5

Tableau 7 : Gonflement des supports fonctionnalisés par la voie utilisant la *N*-hydroxyphthalimide dans différents solvants

Les résultats de ces mesures de gonflement montrent qu'il n'y a pas de différences entre les deux types d'agents de réticulation en ce qui concerne la compatibilité avec la solution hydroalcoolique. Tous les supports ont plutôt tendance à gonfler dans le THF et le CH₂Cl₂, avec des valeurs proches. Le taux de réticulation n'a pas grande influence sur le taux de gonflement. Dans le milieu hydroalcoolique qui est le milieu à extraire, le taux de gonflement est faible (de l'ordre de 0,4 ml.g⁻¹).

IV.1.3.2.2 Voie de greffage utilisant l'acétonoxime

Une autre voie de synthèse envisageable est celle passant par la formation de la *O*-benzylacétoxime. Lors des premiers essais, les billes chlorométhylées préparées au laboratoire ont été traitées par l'acétonoxime en présence de soude.¹¹⁷ Le support PO1 a bien supporté ces conditions expérimentales mais les analyses élémentaires réalisées montrent que les atomes de chlore sont toujours présents sur le support (2 mmol.g⁻¹) et que la quantité d'azote relevée est faible (0,7 mmol.g⁻¹). La modification présentée sur le schéma 51 n'a été que partielle.

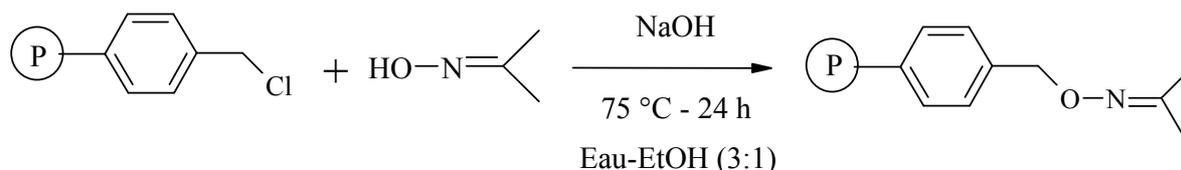


Schéma 51 : Greffage de la fonction *O*-benzylacétoxime sur un support polymère

¹¹⁷ Klein U., bushmann E., Keil M., Gotz N., Harrens A. *US Patent 592351*, 1996

La même réaction a été mise en œuvre en utilisant comme support une résine commerciale PO4. Les analyses élémentaires montrent là aussi un taux de greffage de l'ordre de $0,1 \text{ mmol.g}^{-1}$, donc négligeable. On peut donc dire que l'échec de cette fonctionnalisation n'est pas lié à la nature du support ni à l'agent de réticulation employé.

La substitution de l'atome de chlore demande peut être dans ce cas une activation plus forte que celle apportée par la soude. La méthode de synthèse du composé vinylique (**12**), faisant réagir le sel de sodium de l'acétonoxime, a été transposée sur le support PO1 pour réaliser le greffage de l'hydroxylamine, selon le schéma 52 suivant :

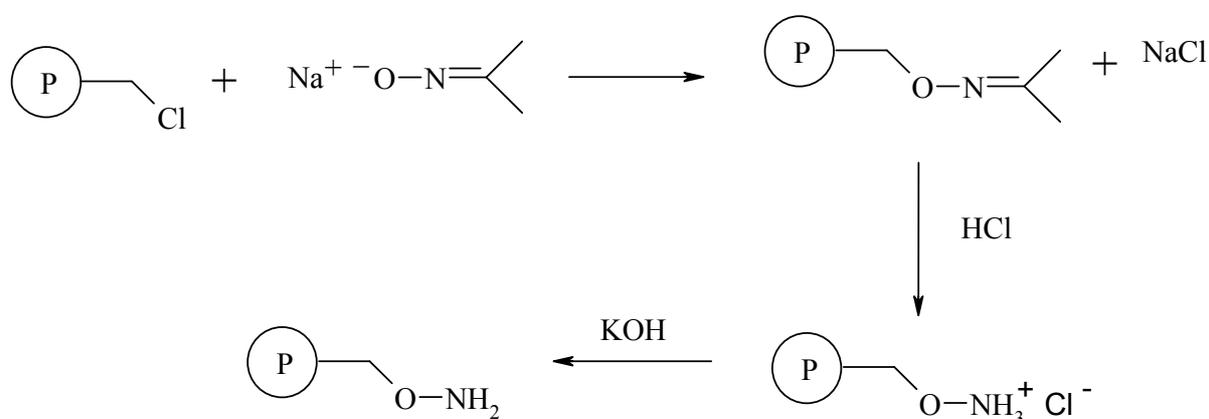


Schéma 52 : Greffage de la fonction O-benzylhydroxylamine sur support polymère par la voie de l'acétonoxime

Les réactions sur supports se révèlent toujours être plus longues qu'en solution homogène. Les supports ont été soumis à différentes conditions opératoires afin de déterminer celles qui conduisaient au meilleur taux de greffage. Les supports PO1 ont été mis en présence d'une solution alcoolique de sel de sodium de l'acétonoxime pendant trois jours. Un premier échantillon a été chauffé à $90 \text{ }^\circ\text{C}$ et le second a été placé dans un appareil permettant une agitation des billes à $45 \text{ }^\circ\text{C}$. Les supports ont ensuite été récupérés et lavés. L'étape suivante consiste à déprotéger la fonction amine par addition d'une solution d'acide chlorhydrique fumant. Les deux lots obtenus précédemment ont été redivisés en deux pour tester des conditions différentes de déprotection. Les billes ont été placées dans du toluène puis dix équivalents d'acide chlorhydrique ont été ajoutés. Deux lots ont été chauffés à $85 \text{ }^\circ\text{C}$ et les deux autres placés dans l'appareil d'agitation à température ambiante. Après 24 heures de mise en contact, les billes ont été filtrées, lavées à l'eau distillée et mises en présence de

15 ml d'une solution de KOH 1 mol.l⁻¹ pendant 16 heures. Ceci permet de libérer les fonctions déprotégées par l'acide chlorhydrique. En effet, la déprotection par HCl donne un chlorhydrate. La mise en contact avec une solution de potasse permet de libérer la fonction NH₂ recherchée. Les résultats obtenus sont récapitulés dans le tableau 8 suivant.

Support final	Traitements		Taux de fonction O-benzylhydroxylamine (calculé à partir du taux de N des analyses élémentaires) en mmol.g ⁻¹	Rendement de fonctionnalisation en % (amine/Cl initial)
	Etape greffage	Etape déprotection		
PO13	Agitation 45 °C	Agitation T. A.	1,4	37
PO14	Agitation 45 °C	Pas d'agitation 85 °C	1	26
PO15	Pas d'agitation 90 °C	Agitation T. A.	1,7	45
PO16	Pas d'agitation 90 °C	Pas d'agitation 85 °C	1,4	37

Tableau 8 : Rendements de greffage de la fonction O-benzylhydroxylamine sur les polymères par la voie utilisant l'acétonoxime

Si l'on considère PO13 et PO15 d'une part et PO14 et PO16 d'autre part, nous voyons que l'on parvient à des taux de fonctionnalisation proches dans chaque famille. Ceci traduit une étape de déprotection plus efficace par agitation à température ambiante que par chauffage à 90 °C, mais aussi des fonctionnalisations équivalentes, quelles que soient les conditions utilisées.

Ceci nous amène au second point qui ressort de ces données. PO14 et PO16 ont été soumis au chauffage lors de l'étape de traitement par HCl. Le taux de chlore observé est de l'ordre de 4 mmol.g⁻¹. Cette valeur est supérieure à celle du support de base, qui était de 3,2 mmol.g⁻¹. Les supports réalisés au laboratoire portent un taux de fonctions hydroxyle de l'ordre de 3 mmol.g⁻¹. Il est décrit dans la littérature⁶⁶ que lors de l'ajout de l'acide chlorhydrique, la déprotection voulue peut-être mise en concurrence avec la rupture de la liaison C-O formée, et peut-être dans ce cas la rupture de la liaison C-OH du support. Le

chauffage du mélange pourrait avoir amplifié ce phénomène et expliquer le fort taux de Cl des supports en fin de traitement.

Cette expérience a donc été renouvelée en modifiant certains points. Des supports PO1 ont été placés dans une solution d'éthanolate de sodium et d'acétonoxime. Après 4 jours d'agitation douce à 37 °C, les billes ont été filtrées, rincées et mises en présence d'une solution de HCl dilué (solution à 2 mol.l⁻¹ – 10 équivalents). Les billes ont été agitées à température ambiante puis traitées avec la solution de potasse. Les résultats des analyses élémentaires donnent des supports portant 1,5 mmol.g⁻¹ de fonction NH₂ et 1,6 mmol.g⁻¹ de fonction Cl. Avec des supports fonctionnalisés au départ à 3,2 mmol.g⁻¹, on observe que le taux de modification par la fonction voulue est raisonnable, même s'il peut être amélioré, et que le taux de chlore résiduel est en accord avec les fonctions de départ. Les supports utilisés présentaient des fonctions hydroxyle. La somme des taux de NH₂ et de Cl correspond au taux de Cl du départ. Ceci signifie que l'utilisation de HCl dilué conduit soit à une rupture de la liaison C-O formée, soit à la simple déprotection voulue, mais il n'induit plus d'attaque des fonctions hydroxyle par l'acide.

La suite de la mise au point de la fonctionnalisation de supports par cette méthode s'est ensuite effectuée sur deux supports PO1 et PO6.

Lors de la synthèse du composé destiné à la polymérisation en suspension (**12**), la formation d'un produit secondaire (**13**) issu de l'addition de l'éthanol avait été observée. Il semble normal de supposer que cette addition s'effectue également sur le support, conduisant à une quantité de fonction O-benzylhydroxylamine plus faible que ce que l'on pourrait attendre. Pour tenter de limiter la réaction secondaire conduisant au greffage de la fonction éthoxyde sur le support, l'éthanol a été remplacé par le tétrahydrofurane (THF). Le protocole expérimental est le même que celui décrit plus haut. Le tableau 9 ci-dessous présente les résultats des analyses élémentaires.

Support initial	Support final	Taux de fonction O-benzylhydroxylamine (calculé à partir du taux de N des analyses élémentaires) en mmol.g ⁻¹	Rendement de fonctionnalisation (amine/Cl initial)
PO1	PO17	1,9	59
PO6	PO18	1,2	22

Tableau 9 : Rendements de greffage de la fonction O-benzylhydroxylamine sur les polymères par la voie utilisant l'acétonoxime dans le THF

On observe que dans le cas du support réalisé au laboratoire (PO17) la fonctionnalisation s'est bien faite. Dans le cas du support PO18, la fonctionnalisation est faible. L'utilisation du THF comme solvant avait deux objectifs. D'une part, il s'agissait de limiter la réaction parasite avec l'éthanolate de sodium. D'autre part, le THF est un meilleur solvant des polystyrènes que l'éthanol et devait permettre un meilleur gonflement des supports. Ceci devrait conduire à une meilleure fonctionnalisation des supports. Les résultats des analyses élémentaires montrent que ce n'est pas le cas (tableau 8). La réaction de greffage se passe en milieu hétérogène. La formation d'un précipité a été observée lors de l'addition des réactifs. Il est possible qu'une mauvaise solubilité des composés explique les faibles taux de greffage. En ce qui concerne le taux de chlore restant sur les supports, on observe que la réaction de coupure avec HCl ne se produit plus lorsque la solution est diluée. Les taux de chlore résiduel sont respectivement de 1,3 et 4,5 mmol.g⁻¹. Le chlore résiduel n'a simplement pas réagi.

Pour allier les caractères de gonflement des supports dans un solvant compatible avec leur nature chimique et de solubilisation des composés de façon à faciliter les réactions, nous avons envisagé d'utiliser un mélange de solvants. L'addition de l'éthanolate de sodium a donc été réalisée dans un mélange THF : éthanol (9 : 1). Aucune précipitation des réactifs n'a été observée. Le traitement s'est poursuivi comme décrit plus haut. Les résultats des analyses élémentaires sont présentés ci-dessous (tableau 10).

Support initial	Support final	Taux de fonction O-benzylhydroxylamine (calculé à partir du taux de N des analyses élémentaires) en mmol.g ⁻¹	Rendement de fonctionnalisation (amine/Cl initial)
PO1	PO19	1,9	59
PO6	PO20	3,0	55

Tableau 10 : Rendements de greffage de la fonction O-benzylhydroxylamine sur les polymères par la voie utilisant l'acétonoxime dans le mélange THF-EtOH

Dans le cas des supports réalisés au laboratoire (PO19), il semblerait que le changement de solvant n'a pas d'influence sur le taux de fonctionnalisation. Dans le cas du support PO20, les dosages montrent que l'on passe d'un taux de greffage faible dans le THF pur (tableau 9) à 3 mmol.g⁻¹ dans le mélange (tableau 10). Il semblerait que cette méthode permette d'accéder à une bonne fonctionnalisation. Les taux de chlore résiduels correspondent aux fonctions qui n'ont pas réagi.

Cette méthode a donc été appliquée sur les supports PO1 à PO6. Les résultats sont rassemblés dans le tableau 11.

Support initial	Support final	Taux de fonction O-benzylhydroxylamine (calculé à partir du taux de N des analyses élémentaires) en mmol.g ⁻¹	Rendement de fonctionnalisation en % (amine/Cl initial)
PO1	PO21	1,9	59
PO2	PO22	1,8	53
PO3	PO23	1,7	51
PO4	PO24	1,1	55
PO5	PO25	2,6	52
PO6	PO26	3,0	55

Tableau 11 : Rendements du greffage de la fonction O-benzylhydroxylamine sur des supports polymères par la voie utilisant l'acétonoxime dans un mélange THF : EtOH

Les résultats montrent une fonctionnalisation moyenne des supports (entre 51 % et 59 %), quel que soit l'agent de réticulation du support. Les supports ne présentent plus l'aspect fragilisé qu'ils avaient lors la fonctionnalisation par la voie utilisant la N-hydroxyphthalimide (photo 4).

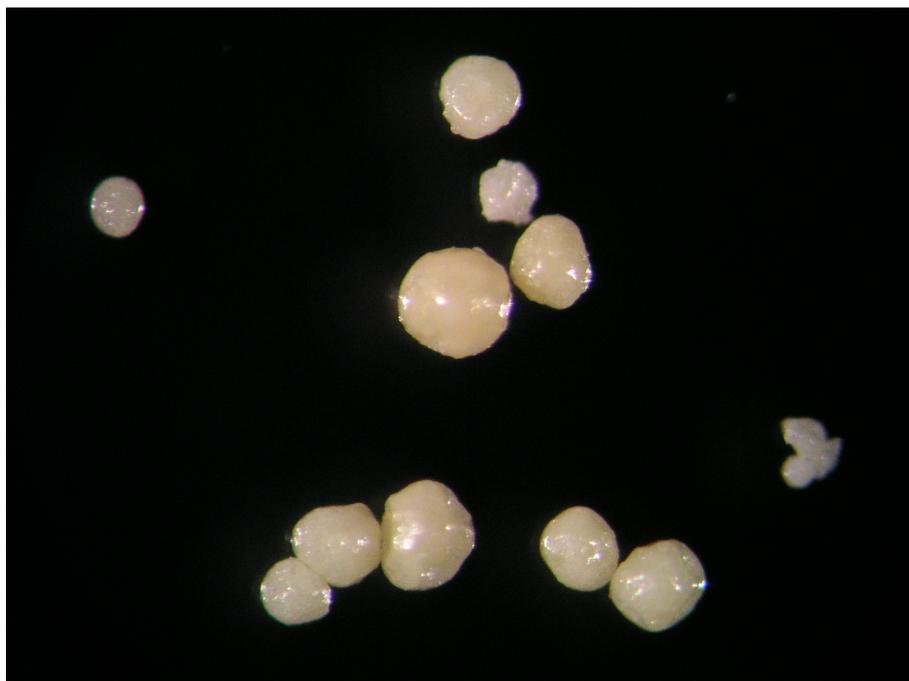


Photo 4 : Support PO22 à la loupe binoculaire (x100)

Les taux de gonflement des supports dans différents solvants ont été mesurés (tableau 12).

Support	Taux de gonflement (en ml.g ⁻¹ de support)		
	CH ₂ Cl ₂	THF	H ₂ O – EtOH
PO21	2,3	2,4	0,5
PO22	1,7	2,0	0,4
PO23	1,6	2,2	0,4
PO24	3,2	3,6	0,6
PO25	1,5	1,5	0,5
PO26	0,8	1,2	0,5

Tableau 12 : Gonflement des supports fonctionnalisés par la voie utilisant l'acétonoxime dans différents solvants

Les résultats obtenus montrent que les supports, moins altérés chimiquement que précédemment, gonflent plus dans le CH₂Cl₂ et le THF que lorsque le greffage utilise la voie N-hydroxyphthalimide. Par contre, le gonflement est toujours très faible dans le milieu hydroalcoolique. Il n'y a pas de grande différence au niveau des gonflements entre les deux agents de réticulation (BEPOO et DVB).

IV.1.3.2.3 Bilan sur le greffage de la fonction O-benzylhydroxylamine

La voie utilisant l'oxime de l'acétone semble préférable à la voie utilisant la N-hydroxyphthalimide. Les supports sont un peu moins fonctionnalisés, mais moins altéré chimiquement comme les photos le montrent. Ils sont donc moins susceptibles de polluer le milieu extrait. A taux de réticulation égal, les gonflements des supports dans les différents solvants sont les mêmes pour les supports synthétisés avec le DVB et avec le BEPOO. Le changement d'agent de réticulation n'améliore pas la compatibilité des supports avec le milieu hydroalcoolique, comme cela était supposé au départ.

IV.1.3.3 Greffage de la fonction phénylsulfonylhydrazine

Le greffage de la fonction phénylsulfonylhydrazine sur un support polymère a été effectué sur des résines sulfoniques de type Dowex® commerciales. Les supports ont été lavés au Soxhlet avec du THF afin d'éliminer les agents de conservation, séchés et le taux de fonctions efficaces a été mesuré.¹¹⁸ Cette mesure s'effectue en mettant une quantité connue de support en présence d'une solution de sulfate de sodium décahydrate. Par dosage retour de la solution avec une solution de HCl, le nombre de fonctions efficaces est déterminé. Les caractéristiques des supports sont rassemblées dans le tableau 13 ci-dessous.

Support	Taux de réticulation (%) ⁽¹⁾	Agent de réticulation	Taux de fonctionnalisation par l'acide sulfonique (mmol.g ⁻¹) ⁽²⁾	Taille des supports (diamètre en mm) ⁽¹⁾
PP1	2	DVB	3,7	0,10 - 0,20
PP2	4	DVB	3,5	0,10 - 0,20
PP3	8	DVB	3,6	0,10 - 0,20

(1) Données fournisseur (2) Mesuré

Tableau 13 : Caractéristiques des supports sulfonés utilisés pour greffer la fonction phénylsulfonylhydrazine

¹¹⁸ Kunin R. *Elements of ion exchange*. New York : Reinhold Publishing Corporation, 1960, 163 p.

Trois méthodes de greffages sont décrites. Toutes se font en deux étapes et seule la première étape diffère, par l'utilisation d'acide chlorosulfonique, de chlorure de thionyle ou de pentachlorophosphate.¹¹⁹ Seules les deux premières voies ont été mises en œuvre.

IV.1.3.3.1 Voie de greffage utilisant l'acide chlorosulfonique

La première méthode utilisée fait appel à la fonctionnalisation des supports par l'utilisation d'acide chlorosulfonique. Cette fonctionnalisation peut se faire sur des supports polystyrène nus¹²⁰⁻¹²³ ou fonctionnalisés par l'acide sulfonique.^{55,60} Les supports utilisés lors de cette étude étaient sulfonés. La fonctionnalisation mise en œuvre est présentée sur le schéma 53.

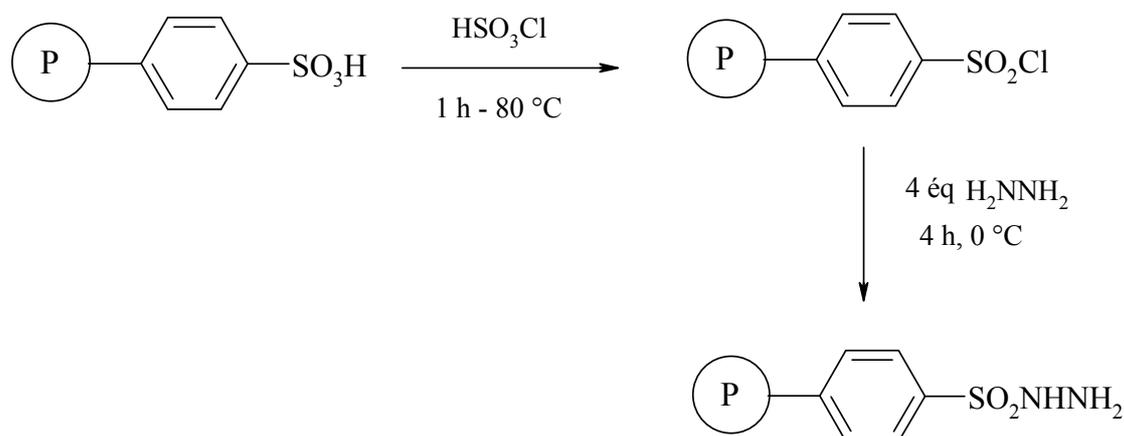


Schéma 53 : Greffage de la fonction phénylsulfonylhydrazine par la voie acide chlorosulfonique

Les résultats des fonctionnalisations effectuées sont rassemblés dans le tableau 14.

¹¹⁹ Zhong H. M., Greco M. N., Maryahoff B. E. Solid-phase synthesis of arginine-containing peptides by guanidine attachment to a sulfonyl linker *J. Org. Chem.*, **1997**, *62*, 9326-9330

¹²⁰ Herweh J. E., Poshkus A. C. *US Patent 3654242*, **1968**

¹²¹ Biçak N., Senkal B. F. Polystyrene sulfonic acid ester as alkylating agents: preparation of unsymmetrical secondary amines *Reactive & Functional Polymers*, **1996**, *29*, 123-128

¹²² Senkal B. F., Biçak N. Grafting on crosslinked polymer beads by ATRP from polymer supported N-chlorosulfonamides *Eur. Polym. J.*, **2003**, *39*, 327-331

¹²³ Razavi Z., McCapra F. Stable and versatile active acridinium ester II *Luminescence*, **2000**, *15*, 245-249

Support initial	Support final	Taux de fonction phénylsulfonylhydrazine (calculé à partir du taux de N des analyses élémentaires) en mmol.g ⁻¹	Rendement de fonctionnalisation en % (hydrazine/Cl initial)
PP1	PP4	1,9	52
PP2	PP5	3,2	91
PP3	PP6	2,3	64

Tableau 14 : Rendement du greffage de la fonction phénylsulfonylhydrazine sur des supports polymères par la voie utilisant l'acide chlorosulfonique

Un seul des trois supports synthétisés présente un très fort taux de fonctionnalisation, les autres étant moyens. Le taux de soufre, supérieur à ce qu'il était à l'origine, indique une surfonctionnalisation des supports par l'acide chlorosulfonique. Les conditions expérimentales sont assez dures et les supports en sont parfois fragilisés. Certains supports présentent une surface parcourue de fissures. D'autres ne se présentent plus sous la forme de billes, mais sous l'aspect de petits bouts de charbon friables. Ils ne sont plus alors utilisables pour les extractions (photo 5).

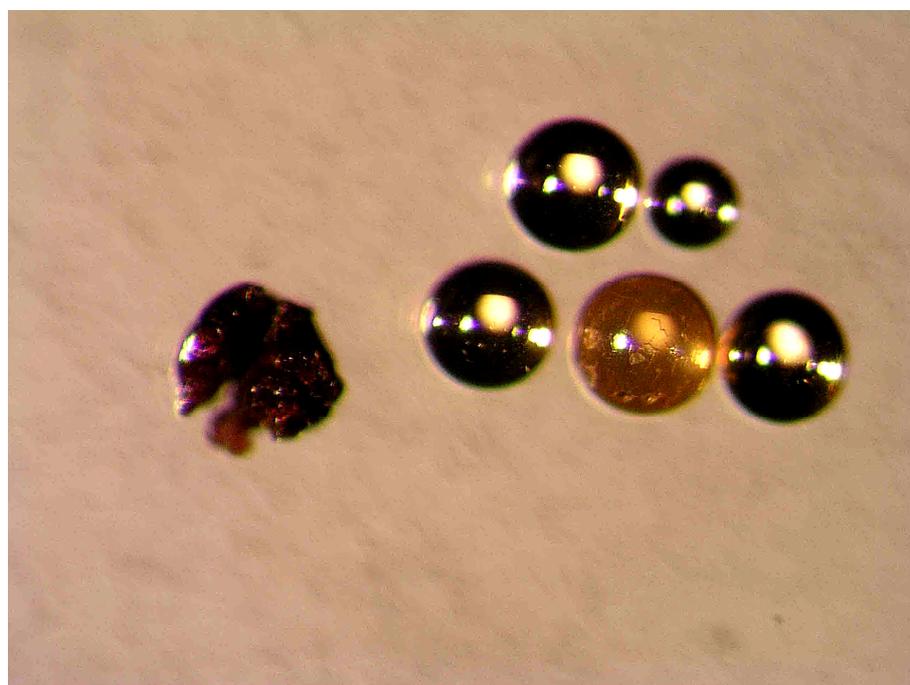


Photo 5 : Support PP4 à la loupe binoculaire (x100)

Le taux de gonflement des supports a été mesuré dans les mêmes solvants que pour la O-benzylhydroxylamine. Les résultats sont rassemblés dans le tableau 15.

Support	Taux de gonflement (en ml.g ⁻¹ de support)		
	CH ₂ Cl ₂	THF	H ₂ O – EtOH
PP4	0	0	0,8
PP5	0	0	0,7
PP6	0	0	0,6

Tableau 15 : Gonflement des supports fonctionnalisés par la voie utilisant l'acide chlorosulfonique dans différents solvants

Les supports présentent un taux de gonflement égal ou proche de zéro dans les trois solvants utilisés. Il y a probablement eu surréticulation des supports lors de l'étape intermédiaire. Lorsque le support est soumis à une température élevée (supérieure à 40 °C), une réaction de type Friedel-Crafts entre le chlorure de sulfonyle et un cycle phényle est susceptible de se produire, conduisant à la formation d'un pont diphenyl sulfone.¹²⁴

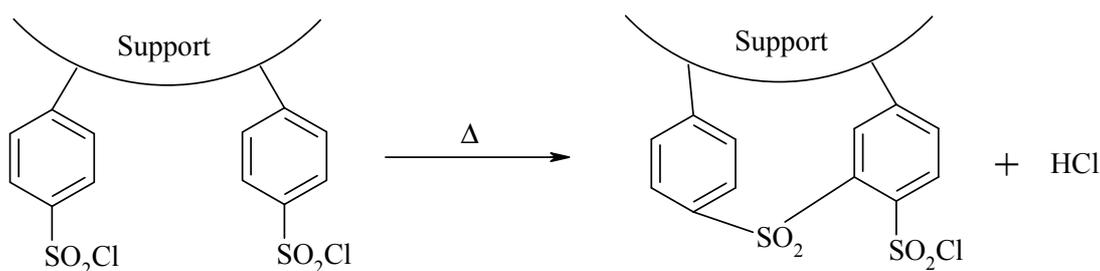


Schéma 54 : Surréticulation des supports chlorosulfonés

Ceci conduit d'une part à la surréticulation du support et entraîne d'autre part une diminution du taux de fonctionnalisation. Les atomes de chlore perdus ne peuvent plus conduire à la fonction sulfonylhydrazine.

IV.1.3.3.2 Voie de greffage utilisant le chlorure de thionyle

La seconde voie utilisée passe par l'utilisation de chlorure de thionyle.¹²⁴ Cette méthode nécessite l'activation de la fonction acide par la pyridine. Ce composé pouvant se révéler un facteur de pollution pour la suite de cette étude, l'expérience a été réalisée en augmentant, sans pyridine, le temps de mise en présence du chlorure de thionyle et en faisant

¹²⁴ Cusak A., Charlesworth C., Jemio-Bedregal K., Ketcha D. M. Comparative assessment of methods for the preparation and characterization of polymer supported sulfonyl chloride resin (Ps-TsCl) *Polymer Preprints*, **2003**, 44(1), 872-273

varier le nombre d'équivalents. Cette fonctionnalisation utilisant le chlorure de thionyle dans le DMF est l'application sur support de la méthode utilisée pour synthétiser le chlorure de *p*-sulfonyl-styrène (**14**). La fonctionnalisation est décrite sur le schéma 55.

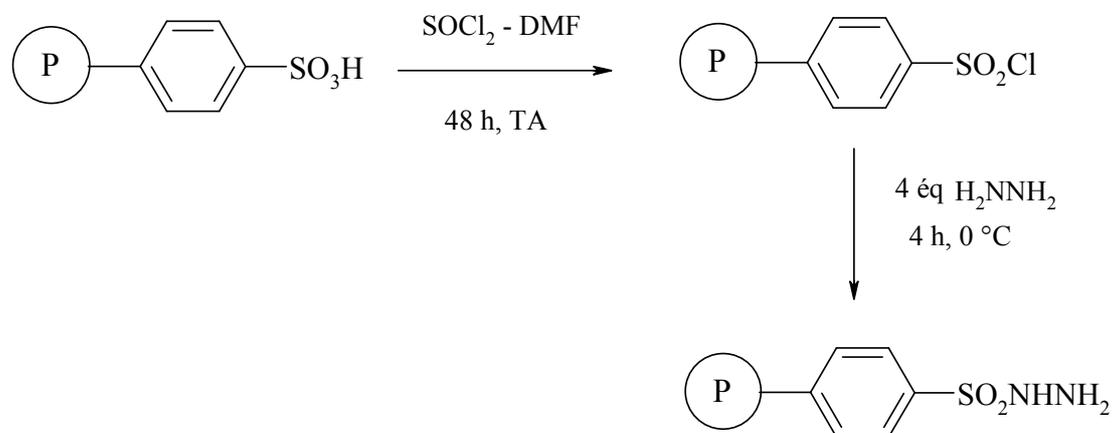


Schéma 55 : Fonctionnalisation par la fonction phénylsulfonylhydrazine par la voie chlorure de thionyle

Les résultats des analyses élémentaires des supports obtenus après fonctionnalisation sont rassemblés dans le tableau 16.

Support initial	Support final	Nombre d'équivalent de SOCl ₂	Taux de fonction phénylesulfonylhydrazine (calculé à partir du taux de N des analyses élémentaires) en mmol.g ⁻¹	Rendement de fonctionnalisation (hydrazine/Cl initial)
PP1	PP7	2	2,5	67
PP2	PP8	2	2,2	64
PP3	PP9	2	1,8	50
PP1	PP10	3	1,7	48
PP2	PP11	3	1,3	38
PP3	PP12	3	1,3	36
PP1	PP13	4	2,5	67
PP2	PP14	4	3,4	97
PP3	PP15	4	2,8	76
PP1	PP16	5	2,9	78
PP2	PP17	5	3,8	"109"
PP3	PP18	5	3,1	86

Tableau 16 : Rendements du greffage de la phénylesulfonylhydrazine sur support polymère par la voie utilisant le chlorure de thionyle

Les résultats du tableau 16 montrent que les taux de fonctionnalisation sont en moyenne du même ordre de grandeur que lorsque l'acide chlorosulfonique est utilisé. Il reste des traces de chlore dans certains cas lorsque l'on utilise 4 ou 5 équivalents de réactif (PP13 : 1,83 mmol.g⁻¹ ; PP14 : 0,48 mmol.g⁻¹ ; PP16 : 1,37 mmol.g⁻¹ ; PP17 : 0,13 mmol.g⁻¹); soit la fonctionnalisation a été incomplète, soit les supports ont été insuffisamment rincés. Les supports obtenus présentent un aspect moins fragile que par l'autre voie de fonctionnalisation (photo 6). Ils ne présentent pas l'aspect dilaté de certains des supports obtenus par la voie acide chlorosulfonique. Tous les supports sont réguliers. Le rendement supérieur à 100 (PP17) doit venir d'une "surfonctionnalisation", comme celle qui avait été observée en utilisant l'acide chlorosulfonique.

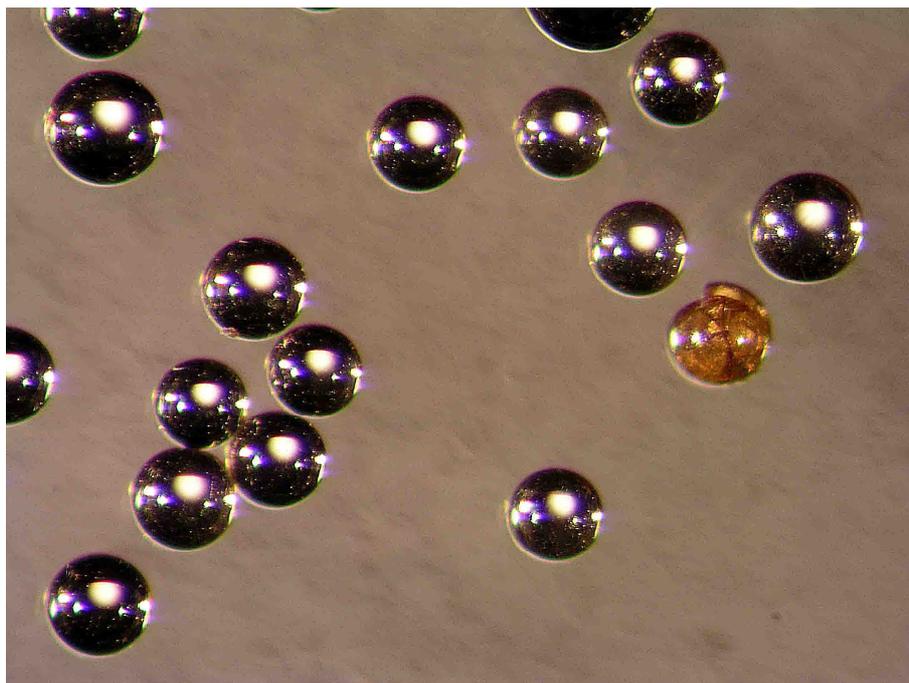


Photo 6 : Support PP7 à la loupe binoculaire (x100)

Les taux de gonflement des supports dans différents solvants a également été mesuré (tableau 17).

Support	Nombre d'équivalent de SOCl ₂	Taux de gonflement (en ml.g ⁻¹ de support)		
		CH ₂ Cl ₂	THF	H ₂ O – EtOH
PP7	2	0	0,1	4,6
PP8	2	0	0,1	1,7
PP9	2	0	0,2	1,7
PP10	3	0	0,1	3,9
PP11	3	0	0,1	1,7
PP12	3	0	0,1	0,7
PP13	4	0	0,1	0,5
PP14	4	0	0	0,9
PP15	4	0	0	1,5
PP16	5	0	0	0,3
PP17	5	0	0	0,4
PP18	5	0	0	0,5

Tableau 17 : Gonflement des supports fonctionnalisés par la voie utilisant le chlorure de thionyle dans différents solvants

Les supports ne présentent pas ou peu de gonflement dans le CH_2Cl_2 et le THF, mais dans le mélange eau-éthanol le gonflement est important. Le gonflement diminue à mesure que le nombre d'équivalents de chlorure de thionyle augmente. Un problème de surréticulation a pu intervenir lors du séchage de l'étape intermédiaire. Il est également possible que l'augmentation du nombre d'équivalents ait favorisé cette surréticulation. La réaction étant exothermique, le contrôle de la température au cœur des mélanges a pu être moins efficace. Ceci explique les pertes de fonctionnalisations et la diminution du rendement. La température doit également être contrôlée lors de l'élimination des solvants avant l'étape d'hydrazination. Si elle est trop élevée, la surréticulation peut aussi intervenir.

IV.1.3.3 Bilan sur les greffages de la fonction phénylesulfonylhydrazine

Les deux voies utilisées conduisent à un taux de fonctionnalisation élevé. La voie utilisant le chlorure de thionyle est moins traumatisante pour les supports et semble être préférable. Le contrôle de la température tout au long de la synthèse est un paramètre qui améliore les rendements de fonctionnalisation. Par cette voie, les supports présentent un gonflement dans le milieu hydroalcoolique sensiblement plus important, qui pourrait favoriser la mise en contact des fonctions extractives avec les dérivés carbonyles et donner de meilleures extractions.

IV.1.3.4 Bilan général sur les greffages sur support polymère

Le greffage sur des supports polymères des fonctions extractives retenues pour cette étude a donné de bons résultats.

Dans le cas de la O-benzylhydroxylamine, la voie utilisant l'acétonoxime donne les meilleurs résultats. Les supports synthétisés portent entre 1 et 3 mmol.g^{-1} de fonction. Les rendements sont en moyenne inférieurs à ceux obtenus par la voie utilisant la N-hydroxyphthalimide, mais les supports sont moins fragilisés par le traitement. Ils seront ainsi moins susceptibles d'être à l'origine de pollutions dans le milieu extrait par désagrégation du support.

Dans le cas de la phénylesulfonylhydrazine, la voie utilisant le chlorure de thionyle semble préférable. Les supports sont moins fragilisés par cette voie de greffage que par celle

utilisant l'acide chlorosulfonique. Les supports portent entre 1,3 et 3,8 mmol.g⁻¹ de fonction réactive.

IV.2 supports à base de silice

IV.2.1 Supports de silice

Le second type de support utilisable pour greffer les fonctions extractives pour cette étude est la silice. Ce support présente la particularité d'être légèrement acide, mais il a l'avantage d'être déjà utilisé dans le domaine de l'œnologie comme agent de floculation.¹²⁵

L'obtention de fonctions sur un tel support peut se faire par deux voies :

- greffage par réaction d'une fonction secondaire avec les fonctions -OH portées par la silice. Le réactif greffé peut être la fonction utilisable ou un précurseur modifiable,
- préparation de silices fonctionnalisées par le procédé sol-gel, en utilisant des monomères portant la fonction extractive ou un précurseur modifiable.

La voie retenue pour cette étude est le greffage sur support de silice. Celui-ci peut se réaliser grâce aux fonctions silanols présentes sur la surface de la silice. La molécule greffée se compose de la fonction qui doit être greffée sur le support, d'un bras espaceur (généralement une chaîne alkyle), d'un atome de silicium et de fonctions secondaires Σ permettant l'attache sur le support (schéma 56).

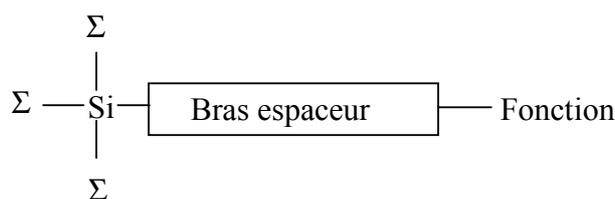


Schéma 56 : Représentation d'un composé destiné au greffage sur un support de silice

¹²⁵ Marchal R., Lallement A., Jeandet P., Establet G. Clarification of muscat musts using wheat proteins and the flotation technique *J. Agric. Food Chem.*, **2003**, 51, 2040-2048

Pour pouvoir se greffer à la silice de façon covalente, l'atome de silicium doit porter un ou plusieurs groupes hydrolysables Σ . Le mécanisme de la réaction est présenté sur le schéma 57.¹²⁶

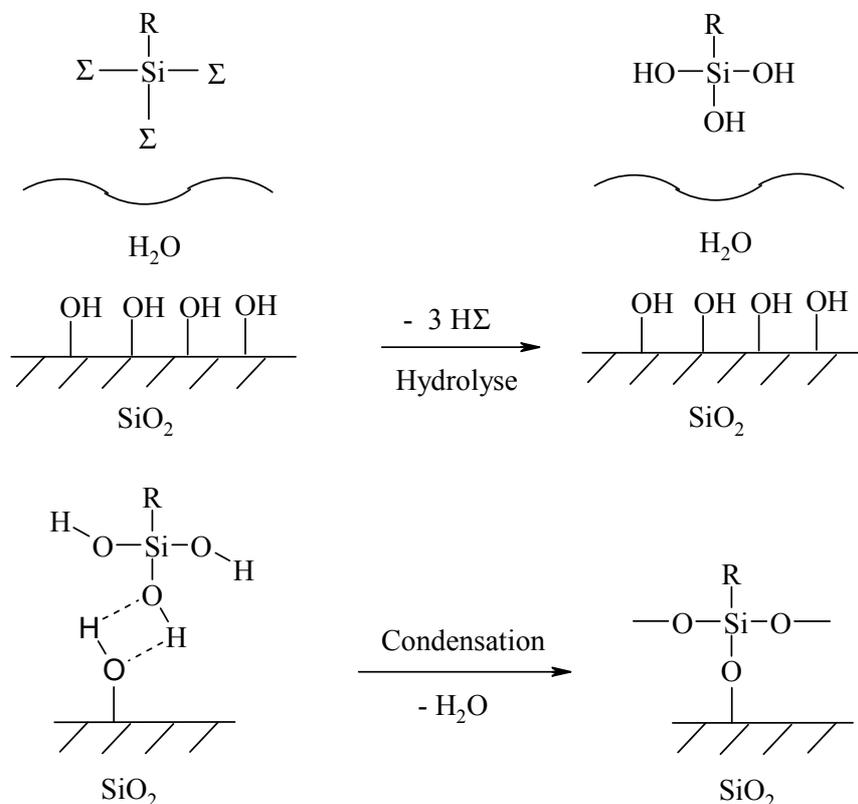


Schéma 57 : Silanisation selon Sagiv

Les silanes commencent par s'adsorber sur la surface hydratée de la silice, ce qui provoque l'hydrolyse des groupes Σ portés par l'atome de silicium. Les molécules se lient ensuite entre elles et à la surface par liaisons hydrogènes impliquant les fonctions hydroxyle. La condensation des silanols lie les composés de façon covalente à la surface.

Il est impossible de déterminer précisément si ce schéma est toujours exact. Suivant la nature des composés greffés et leur concentration sur la surface de silice, plusieurs cas de figures peuvent se présenter :

- ils peuvent être reliés entre eux par des ponts Si-O-Si
- ils peuvent être attachés à la surface par une ou plusieurs liaisons Si-O
- ils peuvent avoir conservé un ou deux groupes hydrolysables

¹²⁶ Sagiv J. Organized Monolayers by adsorption. 1. Formation and structure of oleophobic mixed monolayers on solid surfaces *J. Am. Chem. Soc.*, **1980**, 102(1), 92-98

Les groupes hydrolysables les plus couramment utilisés pour ces greffages sont les halogènes (généralement le chlore) ou des alcoyles (méthoxyle ou éthoxyle) (schéma 59). Les halogènes sont beaucoup plus réactifs que les alcoyles, l'hydrolyse de ces derniers étant plus lente dans les solvants hydrocarbonés. Les composés organosiliciés les plus largement employés sont trifonctionnels.



Schéma 59 : Composés pour les greffages sur la silice

Les réactifs de greffage sont très sensibles à l'eau et s'altèrent très rapidement par réaction avec celle-ci. Les choix des réactifs de greffage s'est porté sur des composés portant la fonction triméthoxysilane comme fonction réactive avec la silice. Ces composés sont moins réactifs que leurs homologues trichlorosilanes, mais ils sont également moins hydrolysables et nécessitent donc des conditions d'utilisation moins contraignantes.

Le taux de fonctionnalisation sur des supports de silice par greffage est moindre que sur les polymères, de l'ordre de 1 mmol.g^{-1} .

Les greffages ont été réalisés deux supports. Le premier est un gel de silice de type Davisil® commercial ; ce support a été séché au dessiccateur. Le second est un gel de silice œnologique que nous a fourni J.-C. BARBE. Après décantation, la silice a été récupérée par filtration et séchée au dessiccateur. La mesure des surfaces BET de ces supports a été réalisée au laboratoire. Ce sont les fonctions hydroxyle portées par la silice qui permettent le greffage. Leur nombre a donc une influence sur l'efficacité potentielle du greffage. Il a été établi qu'on peut considérer la présence de 5 fonctions $-\text{OH}$ par nm^2 .¹²⁷ Les caractéristiques de ces supports sont rassemblées dans le tableau 18.

¹²⁷ Nawrocki J. The silanol group and its role in liquid chromatography *J. Chrom. A*, **1997**, 779, 29-71

Support	Origine	Nombre de fonctions – OH (mmol.g ⁻¹) ⁽²⁾	Surface BET (m ² .g ⁻¹) ⁽²⁾	Taille des supports (µm) ⁽¹⁾
Si1	Davisil®	2,5	300	150-250
Si2	oenologique	1,5	180	-

(1) Données fournisseur (2) Mesuré

Tableau 18 : Caractéristiques des supports de silice utilisés pour les greffages

L'intensité des bandes d'absorption des groupes hydroxyle de la silice ne permet pas d'utiliser l'IR pour vérifier la présence des fonctions (schéma 60). Une exception existe dans le cas du greffage d'une longue chaîne alkyle sur une silice. La différence des spectres enregistrés pour la silice de base et la silice fonctionnalisée permet de voir dans ce cas le greffage. Cette méthode par différence n'est pas applicable dans le cas des fonctions greffées pour cette étude.

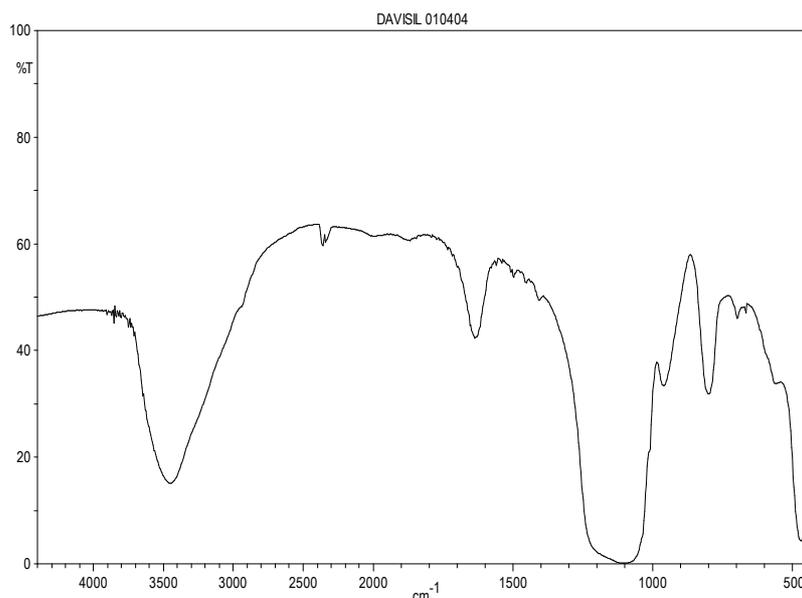


Schéma 60 : Enregistrement du spectre IR du support Si1

Les analyses élémentaires, seules, permettent de déterminer la fonctionnalisation du support de silice.

IV.2.2 Greffage de la O-benzylhydroxylamine

La O-benzylhydroxylamine greffée sur silice n'a pas été trouvée référencée dans le commerce. La description de cette synthèse n'a pas été trouvée dans la littérature. Il a donc été nécessaire d'étudier la réalisation de ce greffage au laboratoire.

IV.2.2.1 Fonctionnalisation du support de base

La première voie utilisée consiste à greffer des silanes sur une silice vierge. L'utilisation d'une silice vierge comme base permet d'avoir une meilleure connaissance des traitements chimiques et thermiques du support. Il est également possible de choisir la taille du support de départ en fonction de l'utilisation envisagée. La méthode de greffage efficace permettrait de pouvoir à terme fonctionnaliser une silice déjà utilisée en œnologie.

IV.2.2.1.1 Synthèse du greffon

Le réactif utilisé pour le greffage est préparé par hydrosilylation de la O-(*p*-vinyl-benzyl)-acétoxime (**12**) déjà synthétisée pour l'obtention de la fonction sur support polymère. La méthode retenue a été mise au point au laboratoire préalablement (schéma 61).¹²⁸

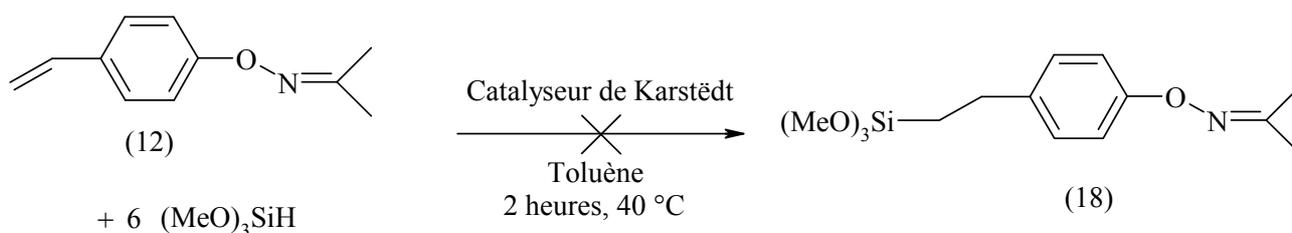


Schéma 61 : Hydrosilylation de la O-(*p*-vinyl-benzyl)-acétoxime

Le produit est récupéré par évaporation du solvant sous pression réduite. L'hydrosilylation présentait un rendement nul au regard de l'enregistrement des spectres de RMN, aucune modification de la fonction vinyle n'étant observée. Des pollutions issues de la synthèse du composé pourraient avoir désactivé le catalyseur et expliqueraient ces mauvais résultats (présence de sel de sodium, résidu de la synthèse).

¹²⁸ Choplin F. Synthèse et greffage d'agents de couplage organosiliciés en vue de l'élaboration de puces à ADN Th : Ch. Org. : Bordeaux I : **2000**, n° 2228, 173 p.

IV.2.2.1.2 Greffage du 2-(4-chlorométhylphényl)éthyltriméthoxysilane

L'échec de cette première approche montre qu'il semble préférable de passer par le même schéma réactionnel que pour le support polymère. Il s'agit tout d'abord de fixer le chlorométhylbenzène sur la silice Si1. Le greffage du 2-(4-chlorométhylphényl)éthyltriméthoxysilane (**19**), permet par la suite, par substitution de l'atome de chlore, d'accéder à la fonction O-benzylhydroxylamine greffée. Les synthèses de ce composé ¹²⁹ et de son homologue trichloré ¹³⁰ sont connues. La réaction mise en œuvre est décrite sur le schéma 62 ci-dessous. ¹³¹

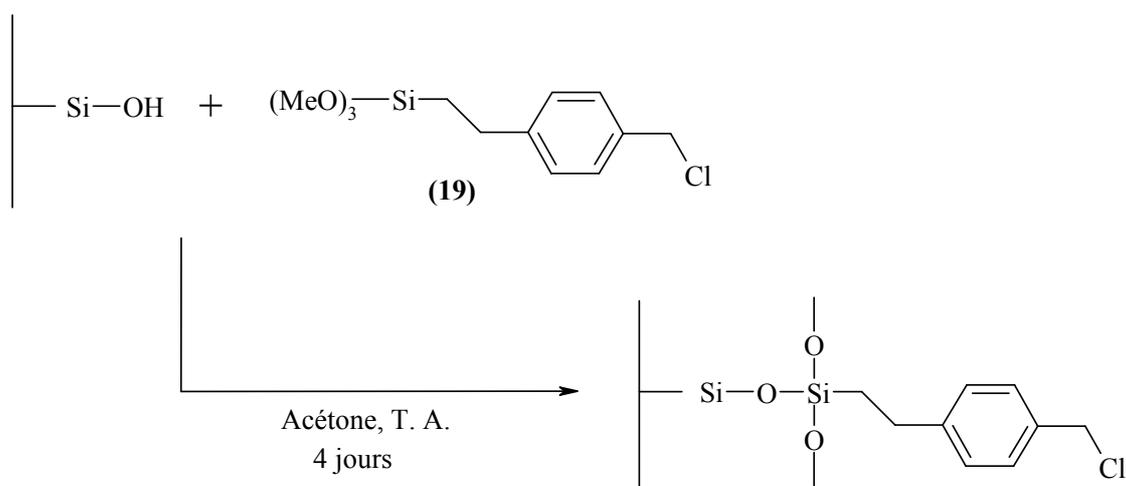


Schéma 62 : Greffage du 2-(4-chlorométhylphényl)éthyltriméthoxysilane sur le support Si1

Les résultats des essais réalisés sont rassemblés dans le tableau 19.

¹²⁹ Jorna A. M. J., Boelrijk A. E. M., Hoorn H. J., Reedijk J. Heterogenization of a ruthenium catalyst on silica and its application in alcohol oxidation and stilbene epoxidation *Reactive & Functional Polymers*, **1996**, 29, 101-114

¹³⁰ Parr W., Grohmann K. Solid-phase peptide synthesis on an inorganic matrix having organic groups on the surface *Angew. Chem. Internat. Ed.*, **1972**, 11(4), 314-315

¹³¹ Mandal T. K., Fleming M. S., Walt D. R. Production of hollow polymeric microspheres by surface-confined radical polymerization on silica templates *Chem. Mater.*, **2000**, 12, 3481-3487

N° essai	Nombre d'équivalent (19)/Si-OH	Taux de fonctionnalisation (calculé à partir du taux de Cl des analyses élémentaires) en mmol.g ⁻¹	Rendement de fonctionnalisation en % (Cl/OH initial)
1	1	0,6	22
2	1	0,2	10
3	2	0,6	22

Tableau 19 : Greffage du (19) sur le support Si1

Les résultats de l'essai 1 ont montré que le greffage était réalisable dans les conditions utilisées. De façon à confirmer ce résultat, l'expérience a été renouvelée, de façon identique (essai 2) puis en modifiant le nombre d'équivalents (essai 3) afin d'observer s'il y avait une amélioration du rendement de fonctionnalisation. Ces améliorations n'ont pas été observées. Ces résultats sont cependant assez encourageants. Les taux de carbone des analyses élémentaires des différents essais montrent une bonne adéquation avec les taux de chlore. Il n'est pas observé de substitution de l'atome de chlore par un hydroxyle comme lors de la synthèse des supports polymère.

Les supports de silice fonctionnalisés disponibles dans le commerce présentent un taux de fonctionnalisation de l'ordre de 1,3 mmol.g⁻¹ de fonction chlorure de benzyle, soit le double de ce qui a été observé. Il est donc possible d'atteindre des taux de fonctionnalisation de cet ordre. L'objectif de cette étude est d'observer l'efficacité de l'extraction liquide-solide. Afin de parvenir plus rapidement à un support finalisé, la suite du greffage s'est effectuée sur ce support.

IV.2.2.2 Modification d'un support

Nous avons réalisé sur un modèle commercial la substitution de la fonction chlore. La silice utilisée porte 1,3 mmol.g⁻¹ de fonction chlorure de benzyle. Les deux voies de greffage utilisées pour les supports polymères ont été mise en œuvre.

IV.2.2.2.1 Voie de greffage utilisant la N-hydroxyphthalimide

Le mode de fonctionnalisation est présenté sur le schéma 63.

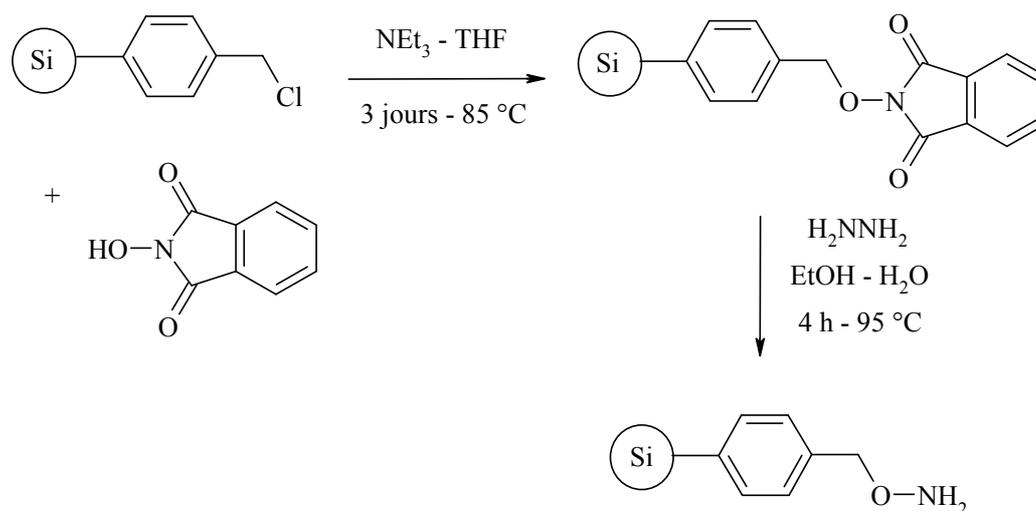


Schéma 63 : Greffage du support de silice chlorométhylé par la voie utilisant la *N*-hydroxyphthalimide

Seules les analyses élémentaires peuvent donner des réponses sur l'efficacité du greffage. Le taux de greffage de la fonction amine est de $0,5 \text{ mmol.g}^{-1}$. La quantité de carbone présente sur le support est de 5,7 % de la masse totale. La molécule finale greffée sur le support de silice porte 7 atomes de carbone. Si on calcule un taux de fonctionnalisation du support à partir de ces deux valeurs, il est de $0,7 \text{ mmol.g}^{-1}$. Cette valeur proche de celle du taux de fonction amine tend à montrer que la déprotection s'est bien faite. Si les atomes de carbone du groupe phthalimide étaient encore présents, le pourcentage massique du carbone serait plus élevé, de l'ordre de 10 %, comme cela est observé pour l'étape intermédiaire. Ces résultats montrent également que le support ne porte plus le même nombre de groupes carboné. Les analyses élémentaires du support initial présentaient un pourcentage massique de carbone de 10,7 %. La moitié des groupes de départ sont donc perdus, lors de la première étape si on tient compte du taux de carbone mesuré pour l'intermédiaire. Ceci pourrait s'expliquer par la libération de HCl dans le milieu réactionnel conduisant à la rupture de la liaison Si-C. Le taux de chlore résiduel est négligeable.

IV.2.2.2.2 Voie de greffage utilisant l'acétonoxime

La seconde voie de fonctionnalisation passe par l'utilisation de l'acétonoxime (schéma 64).

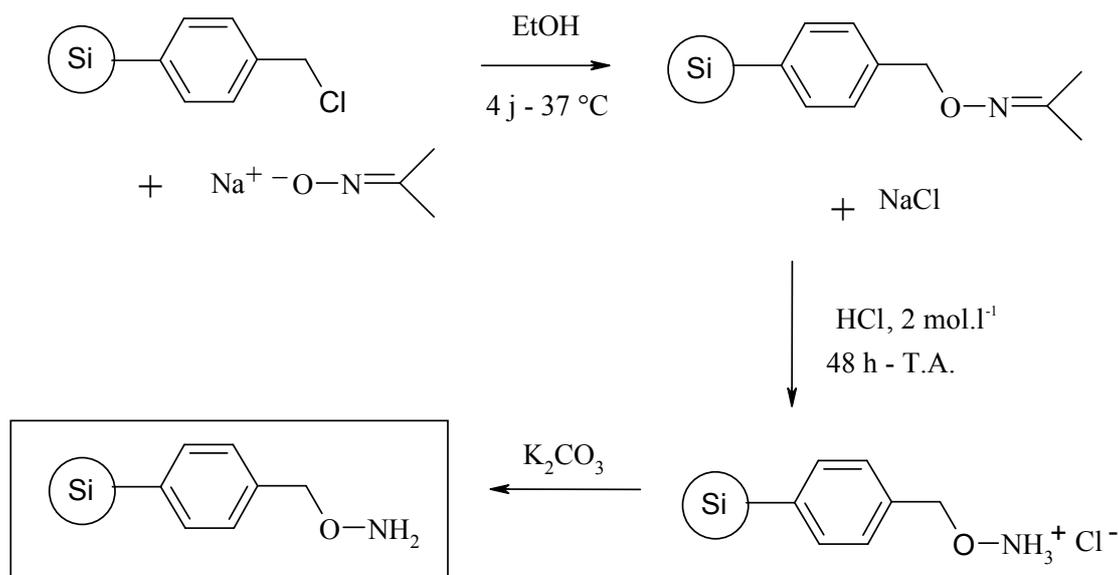


Schéma 64 : Fonctionnalisation de la silice par la voie utilisant l'acétonoxime

Les analyses élémentaires montrent que les résultats de la substitution ne sont pas satisfaisants. Le taux de chlore mesuré est nul et le taux d'azote de $0,08 \text{ mmol.g}^{-1}$ de support. On observe donc une perte du chlore sur le support ($1,3 \text{ mmol.g}^{-1}$ au départ). Celle-ci ne s'accompagne pas de l'augmentation du taux d'azote. Le taux de carbone diminue également. Il est de 3,8 % contre 10,7 % sur le support initial. La présence d'eau en surface du support de silice pourrait être responsable de l'altération de l'éthanolate de sodium, empêchant la réaction de greffage. La soude ainsi formée dans le milieu réactionnel, pourrait expliquer la substitution de l'atome de chlore et la rupture Si-C observées.

IV.2.2.3 Bilan sur le greffage de la fonction O-benzylhydroxylamine

La synthèse de support de silice portant la fonction O-benzylhydroxylamine présente des résultats moyens.

La synthèse du greffon à partir de la O-(*p*-vinyl-benzyl)-acétoxime (**12**) s'est révélée être un échec. Les réactifs utilisés pour des hydrosilylations doivent être parfaitement propres en raison de la sensibilité du catalyseur utilisé. Il est probable que des traces de sels soient responsables de cet échec.

Le greffage sur silice du 2-(4-chlorométhylphényl)-éthyltriméthoxysilane **(19)** commercial a donné quelques résultats encourageants. L'amélioration du taux de greffage sur le support de silice nécessite d'utiliser un composé trichloré plus réactif. Ceci devrait permettre à terme de pouvoir fonctionnaliser une silice œnologique.

La modification d'une silice commerciale portant la fonction chlorure de benzyle pour obtenir la fonction O-benzylhydroxylamine a également donné quelques résultats intéressants, en dépit des pertes de groupes carboné. La modification de la fonction supportée est plus efficace par la voie de greffage utilisant la N-hydroxyphthalimide que celle utilisant l'acétonoxime.

IV.2.3 Greffage de la phénylsulfonylhydrazine

La phénylsulfonylhydrazine greffée sur support de silice est un produit commercial. Les traitements chimiques et thermiques de ce support ne sont pas détaillés par le fournisseur. La surface du support n'est pas connue. Enfin il n'existe pas différentes tailles de supports permettant de choisir le plus compatible avec l'usage envisagé. Le greffage de la fonction a donc été mis en œuvre. La connaissance de la fonctionnalisation des supports permet de connaître les altérations possibles et les pollutions qui pourraient en découler. Le greffage sur un support de base vierge permet également de choisir un support de base ayant les caractéristiques désirées (taille, surface).

IV.2.3.1 Synthèse de greffon

L'hydrosilylation du *p*-sulfonylhydrazine-styrène **(15)** synthétisé au laboratoire⁵⁶ a été mise en œuvre (schéma 65).

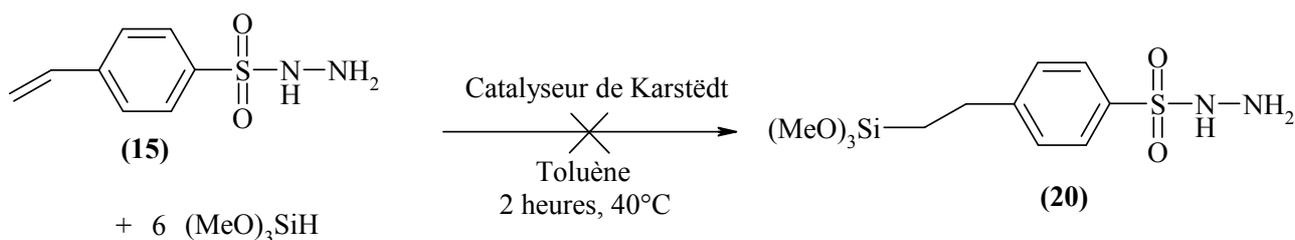


Schéma 65 : Hydrosilylation du *p*-sulfonylhydrazine-styrène

Le composé hydrosilylé a été récupéré par évaporation sous pression réduite du solvant. L'enregistrement du spectre de RMN de ce composé montre que c'est la fonction amine et non la fonction vinyle qui a réagi avec le triméthoxysilane. Les protons correspondant à la fonction vinyle sont toujours présents, alors que ceux correspondant à l'amine ont disparu.

IV.2.3.2 Utilisation du 2-(4-chlorosulfonylphényl)éthyltriméthoxysilane

Le 2-(4-chlorosulfonylphényl)éthyltriméthoxysilane (**21**) est un produit commercial. Cette molécule est l'homologue du composé (**14**). Cette disponibilité nous a permis de passer plus rapidement au greffage pour obtenir des supports finalisés. La réaction de greffage se déroule en deux étapes. Il s'agit de greffer le composé (**21**) sur un support de silice. Après élimination du solvant, le support obtenu est mis en présence d'hydrazine de façon à obtenir la fonction désirée. La réaction est décrite sur le schéma 66.

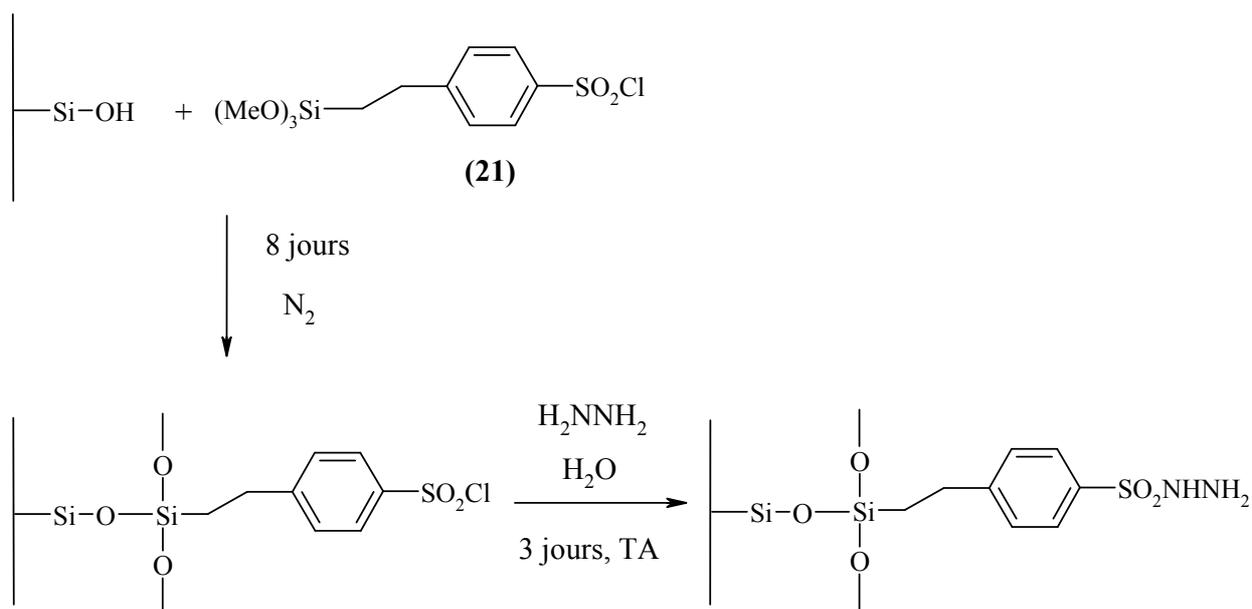


Schéma 66 : Greffage du 2-(4-chlorosulfonylphényl)éthyltriméthoxysilane sur les supports de silice

Les supports Si1 et Si2 ont été traités par cette méthode. Différentes conditions réactionnelles ont été appliquées lors de la première étape du greffage, afin de déterminer celles qui conduiraient au meilleur greffage. Le tableau 20 rassemble les conditions opératoires et les résultats des analyses élémentaires effectuées.

Essai	Nature du support	Conditions opératoires (solvant – t°)	Nombre d'équivalent de (21)	Taux de fonction phénylsulfonylhydrazine (calculé à partir du taux de N des analyses élémentaires) en mmol.g ⁻¹	Taux de fonctionnalisation en % (hydrazine/OH initial)
1	Si2	CH ₂ Cl ₂ – T. A.	1	0,23	15
2	Si1	CH ₂ Cl ₂ – T. A.	1	0,50	20
3	Si1	CH ₂ Cl ₂ – 42 °C	1	0,33	13
4	Si1	CH ₂ Cl ₂ – 42 °C	2	0,37	15
5	Si1	CHCl ₃ – 63 °C	1	0,35	14
6	Si1	CHCl ₃ – 63 °C	2	0,35	14
7	Si1	CH ₂ Cl ₂ – T. A. (long)	1	0,10	7
8	Si1	CH ₂ Cl ₂ – T. A. (long)	2	0,13	9
9	Si1	CH ₂ Cl ₂ – T. A.	4	0,10	7
10	Si1	Aucun – T. A.	4	0,40	16

Tableau 20 : Rendements de fonctionnalisation du support de silice en utilisant le composé **(21)**

Les résultats obtenus montrent que le greffage est difficile quelles que soient les conditions réactionnelles utilisées. L'aspect des supports est modifié par le greffage. Ils présentent une couleur jaune pâle alors qu'ils étaient blancs à l'origine. Les taux de greffages restent faibles malgré les modifications du protocole expérimental.

Le greffage du composé **(21)** sur support de silice a été relevé dans la littérature.^{132,133} Les composés sont mis en présence à température ambiante. L'augmentation du temps de mise en présence des composés de une à deux semaines à température ambiante (essais 2, 7 et 8) n'améliore pas le taux de fonctionnalisation par la phénylsulfonylhydrazine. Les taux de carbone sont de l'ordre de 4 à 5 % en masse pour ces échantillons. Ces faibles rendements pourraient s'expliquer par une altération de la fonction chlorure de sulfonyle au cours du temps, cette fonction étant assez sensible. La même expérience (essai 9) réalisée avec 4 équivalents du composé **(21)** n'a pas permis d'améliorer le taux de greffage (0,1 mmol.g⁻¹). La

¹³² Ejaz M., Ohro K, Tsujii Y., Fukuda T. Controlled grafting of a well-defined glycopolymer on a solid surface by surface-initiated atom transfert radical polymerization *Macromolecules*, **2000**, 33, 2870-2874

¹³³ Melero J. A., Stucky G. D., van Grieken R., Morales G. Direct synthesis of ordered SBA-15 mesoporous materials containing arenesulfonic acid groups *J. Mater. Chem.*, **2002**, 12, 1664-1670

même réaction menée sans solvant pendant une semaine (essai 10) conduit à un greffage un peu supérieur ($0,4 \text{ mmol.g}^{-1}$).¹³⁴ Ces résultats sont toutefois inférieurs à ceux de la littérature (entre $0,5$ et $1,05 \text{ mmol.g}^{-1}$ sans solvant).

Le greffage de molécules voisines portant une fonction triméthoxysilane a été relevé dans la littérature.^{135,136} Les auteurs chauffaient le mélange réactionnel. Cette expérience a été mise en œuvre en utilisant le support Si1, en utilisant deux solvants pour évaluer l'influence de la température (essais 3, 4, 5 et 6). L'influence du nombre d'équivalent de **(21)** sur le greffage a également été observée. Les analyses élémentaires montrent que le chauffage a effectivement amélioré le greffage, le taux de soufre étant légèrement plus élevé (de l'ordre de $0,6 \text{ mmol.g}^{-1}$ pour $0,5 \text{ mmol.g}^{-1}$ sans chauffage). Pourtant les rendements en fin de fonctionnalisation sont moins bons. Le taux de fonctionnalisation calculé à partir de l'azote est en moyenne de $0,35 \text{ mmol.g}^{-1}$. On peut supposer que la fonction $-\text{SO}_2\text{Cl}$ s'est en partie altérée lors de la première étape. Les analyses élémentaires ont en effet montré que le chlore ne restait qu'à l'état de traces ; toutes les fonctions susceptibles de réagir ont donc été modifiées. D'autre part on a observé lors des expériences une mauvaise miscibilité du dérivé silylé dans le chloroforme, sans que cela ait pour autant une grande influence sur le résultat par rapport au dichlorométhane. La variation du nombre d'équivalent du composé **(21)** dans le milieu n'a pas eu d'incidence sur ces résultats.

Le greffage sur la silice œnologique n'a pas été très développé (essai 1). Les premiers essais ont en effet montré des problèmes dus au support. Ce support a été obtenu par séchage du gel, forme sous laquelle il est vendu. Le support ainsi obtenu est granuleux et de faible surface ($180 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$). Les mauvais rendements de greffages obtenus laissent à penser que la silice a été calcinée pour être passivée vis-à-vis du milieu où elle est utilisée. Il faudrait traiter ce support avec de l'acide chlorhydrique pour tenter de le rehydroxyler et observer si ce traitement améliore les greffages.¹²⁷

¹³⁴ Cano-Serrano E., Campos-Martin J. M., Fierro J. L. G. Sulfonic acid-functionalized silica through quantitative oxidation of thiol groups *Chem. Commun.*, **2003**, 246-247

¹³⁵ Timofte R. S., Woodward S. Preparation of silane-grafted pellets: silica bounds reagents in a very convenient form *Tetrahedron letters*, **2004**, 45, 39-42

¹³⁶ Liu P. N., Gu P. M., Wang F., Tu Y. Q. Efficient Heterogeneous asymmetric transfert hydrogenation of ketones using highly recyclable and accessible silica-immobilized Ru-TsDPEN catalysts *Organic letters*, **2003**, 6(2), 169-172

IV.2.3.3 Bilan du greffage de la fonction phénylsulfonylhydrazine

La synthèse du greffon à partir de la *p*-sulfonylhydrazine-styrène (**15**) s'est révélée être un échec. Le groupe triméthoxyle n'a pas réagi avec la fonction vinyle, mais avec la fonction sulfonylhydrazine.

Le greffage du 2-(4-chlorosulfonylphényl)éthyltriméthoxysilane (**21**) commercial a donné quelques résultats encourageants. L'amélioration du taux de greffage sur le support de silice passe par l'utilisation d'un composé trichloré plus réactif. La modification de la fonction chlorure de sulfonyle en sulfonylhydrazine devrait ensuite permettre d'accéder à des supports portant un taux de fonctionnalisation comparable à ceux disponibles dans le commerce.

IV.2.4 Bilan sur les synthèses de silice fonctionnalisées

En conclusion sur les fonctionnalisations des supports de silice, on peut dire que celles-ci sont longues et donnent de faibles rendements.

En ce qui concerne la synthèse de greffons à partir de composés synthétisés au laboratoire, les résultats ne sont pas ceux espérés. Dans le cas de la *O*-benzylhydroxylamine, le composé utilisé pour l'hydrosilylation présentait une impureté qui a empoisonné le catalyseur. Dans le cas de la phénylsulfonylhydrazine, c'est la fonction principale sulfonylhydrazine destinée à l'extraction qui a réagi avec le triméthoxysilane et non la fonction secondaire vinylique. L'obtention de la phénylsulfonylhydrazine sur support de silice nécessite donc la synthèse d'un composé intermédiaire hydrosilylé, comme le chlorure de sulfonyle, qui sera modifié après greffage.

En ce qui concerne le greffage de composés commerciaux, il semblerait plus intéressant d'utiliser des composés halogénés pour améliorer les taux de greffages. Les composés alcoyle sont certes moins sensibles, mais leur réactivité inférieure semble limiter l'amélioration du taux de greffage. Quelles que soient les modifications des conditions expérimentales, les taux de greffages mesurés sont du même ordre de grandeur. Les résultats des modifications de fonctions sur supports sont encourageants. L'augmentation des taux de greffage améliorera le taux de fonctionnalisation final.

IV.3 Conclusion sur la synthèse des supports fonctionnalisés

Les fonctions O-benzylhydroxylamine et phénylsulfonylhydrazine ont été fixées sur des supports polymère et de silice.

Dans le cas des supports polymères, la synthèse de supports fonctionnalisés par copolymérisation en suspension aqueuse de composés fonctionnalisés a été un échec.

Les supports fonctionnalisés ont été obtenus par modification de fonctions portées par des supports. Deux voies ont permis d'accéder à la O-benzylhydroxylamine sur support. La voie utilisant la N-hydroxyphthalimide donne de bons rendements de fonctionnalisation (de l'ordre de 80 %), mais les supports ressortent fragilisés par le traitement. La voie utilisant l'acétonoxime donne des rendements de fonctionnalisation un peu plus faibles (de l'ordre de 55 %), mais les supports semblent moins fragiles, et donc moins susceptibles de polluer le milieu traité. Dans le cas de la phénylsulfonylhydrazine sur support, deux voies proches de fonctionnalisation ont été mises en oeuvre. L'une d'elle passe par l'utilisation d'acide chlorosulfonique et donne des supports fragilisés. L'autre utilise le chlorure de thionyle. Les essais réalisés laissent à penser que cette voie permet d'obtenir des supports plus contrôlés au niveau de la réticulation et moins fragilisés. Le taux moyen de fonctionnalisation est de l'ordre de 50 %.

Dans le cas des supports de silice, les résultats sont assez moyens. Les fonctions O-benzylhydroxylamine et phénylsulfonylhydrazine ont bien été obtenues sur le support Si1 par différentes voies de greffages, mais les rendements restent très faibles.

Les fonctions sur supports ainsi obtenues vont pouvoir être utilisées en milieu hétérogène, de façon à vérifier si ces fonctions O-benzylhydroxylamine et phénylsulfonylhydrazine sont toujours des agents d'extraction efficaces sur support. Les supports retenus pour la suite de cette étude sont ceux synthétisés par la voie de greffage utilisant l'acétonoxime dans le cas de la O-benzylhydroxylamine (PO27, PO28, PO29, PO30). Dans le cas de la phénylsulfonylhydrazine, on retiendra les supports synthétisés par la voie de greffage utilisant le chlorure de thionyle (PP19, PP20, PP21) ainsi qu'un support de silice (Si3 correspondant à l'essai 3).

V Etude des agents d'extraction en milieu hétérogène modèle

En milieu homogène le comportement de l'éthanal, de l'acide pyruvique et de l'acide 2-oxoglutarique pris individuellement vis-à-vis de la O-benzylhydroxylamine et de la phénylsulfonylhydrazine a été étudié. Il a été observé que ces dérivés carbonylés peuvent être extraits de milieux homogènes aussi bien avant qu'après ajout de dioxyde de soufre. Il a également été noté un lien entre la constante de dissociation la combinaison avec le dioxyde de soufre et la vitesse à laquelle le dérivé carbonylé correspondant est susceptible d'être extrait du milieu avant et après ajout de dioxyde de soufre. La constante de dissociation, notée K_d , est une valeur propre à chaque dérivé carbonylé. Elle régit l'équilibre qu'il forme avec le SO_2 . Plus sa valeur est faible, plus l'équilibre sera fortement déplacé vers la forme combinée. Pour les trois composés considérés ici, l'ordre est le suivant :

$$K_d \text{ éthanal} < K_d \text{ acide pyruvique} < K_d \text{ acide 2-oxoglutarique}$$

Dans le cas des extractions en milieu homogène, plus la constante de dissociation est faible, plus le dérivé carbonylé est rapidement extrait du milieu avant ajout de dioxyde de soufre. Après addition dans le milieu de dioxyde de soufre, la tendance s'inverse : plus la constante de dissociation est faible, plus le dérivé carbonylé est lentement extrait du milieu. L'application envisagée étant une extraction de type liquide-solide, les agents d'extractions les plus efficaces en milieu homogène ont été greffés sur des supports insolubles. Pour mesurer l'efficacité du piégeage par les fonctions supportées, les extractions ont été réalisées sur les mêmes solutions modèles que celles utilisées lors de l'étude en milieu homogène.

Les supports utilisés lors de ces extractions sont de plusieurs natures. Quatre supports portent la fonction O-benzylhydroxylamine (PO27, PO28, PO29, PO30). Ces supports ont été fonctionnalisés par greffage suivant la voie utilisant l'acétonoxime. Les cinq autres supports portent la fonction phénylsulfonylhydrazine. Les supports PP19, PP20 et PP21 ont été synthétisés par le greffage utilisant la voie chlorure de thionyle. Les deux derniers supports sont noté Si et Si3. Si est un support commercial de type silice portant la fonction phénylsulfonylhydrazine. Si3 est un support fonctionnalisé au laboratoire. Ce dernier support n'a été testé que dans le cas du 5-oxofructose pour des raisons de disponibilité. Les caractéristiques de ces supports sont rassemblées dans le tableau 21.

Support initial	Support final	Fonction portée	Taux de réticulation (%)	Taux de fonctionnalisation (mmol.g ⁻¹)
PO1	PO27	O-benzylhydroxylamine	2,0	1,35
PO4	PO28	O-benzylhydroxylamine	1,5	0,78
PO5	PO29	O-benzylhydroxylamine	3,5	1,85
PO6	PO30	O-benzylhydroxylamine	5,5	2,10
PP1	PP19	Phénylesulfonylhydrazine	2,0	0,71
PP2	PP20	Phénylesulfonylhydrazine	4,0	1,91
PP3	PP21	Phénylesulfonylhydrazine	8,0	1,89
-	Si	Phénylesulfonylhydrazine	-	1,00
Si1	Si3	Phénylesulfonylhydrazine	-	0,33

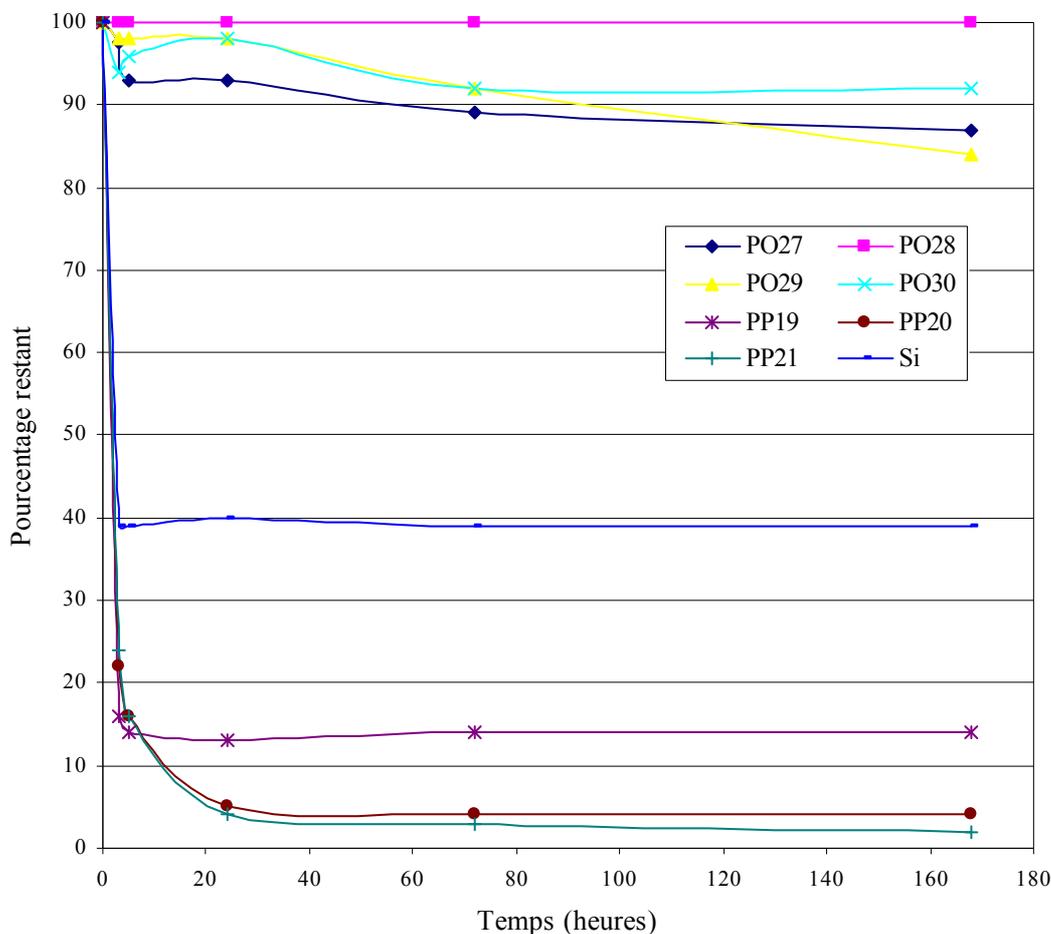
Tableau 21 : Caractéristiques des supports utilisés pour les extractions en milieu hétérogène

Les extractions ont été réalisées en plaçant les flacons contenant les solutions et les supports sur un agitateur rotatif par culbutage tournant à 9 tours.min⁻¹. Les quantités de dérivés carbonylés restants en solutions sont mesurées par les dosages enzymatiques spécifiques décrits précédemment.

V.1 Extractions en milieu hétérogène avant ajout de SO₂

V.1.1 Extraction de l'éthanal avant ajout de SO₂

Une solution d'éthanal à 40 mg.l⁻¹ (0,90 mmol.l⁻¹) a été mise en présence de trois équivalents de chaque agent d'extraction sur support dans des flacons différents. Les résultats des mesures sont présentés sur le graphique 9.



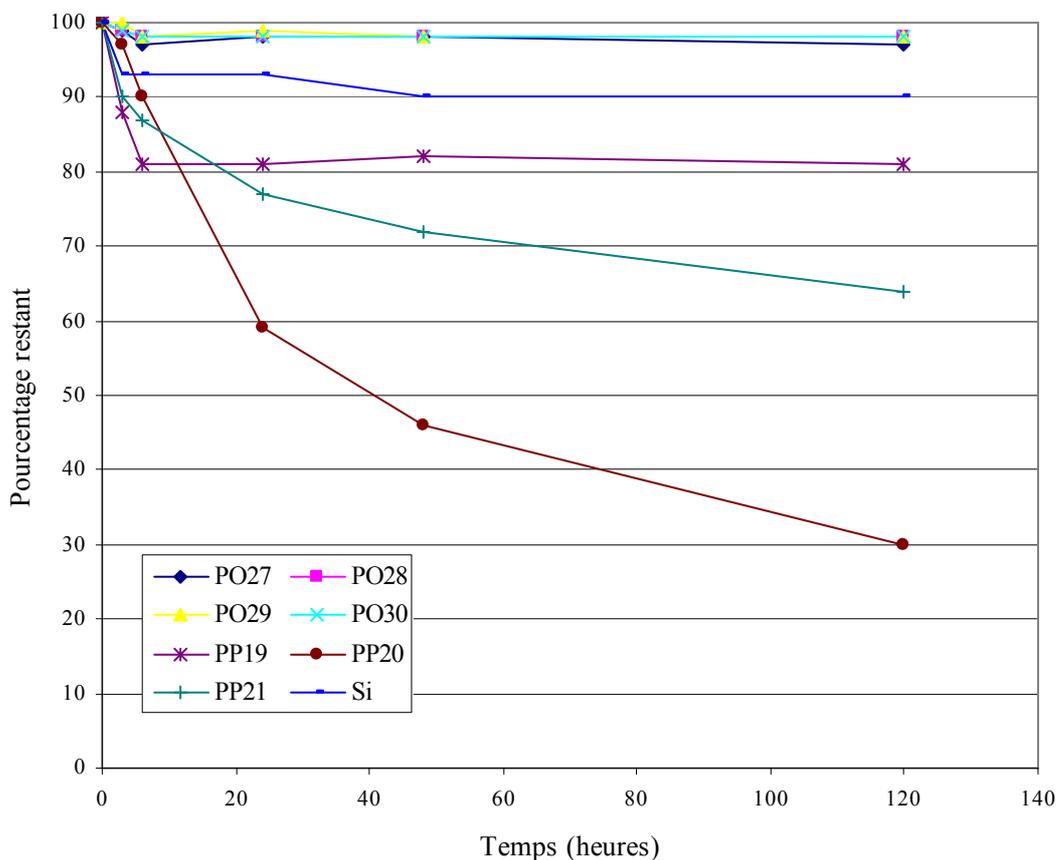
Graphique 9 : Extraction de l'éthanal en milieu hétérogène en fonction du temps avant ajout de SO_2

Ces mesures montrent qu'en milieu hétérogène l'éthanal ne réagit pas de la même façon avec les deux agents d'extraction. Dans le cas de la O-benzylhydroxylamine, les supports sont relativement peu efficaces. Dans le cas de la phénylsulfonylhydrazine, les extractions sont plus efficaces. Lorsque le support est une silice, un palier est très rapidement obtenu (6 heures) et 40 % d'éthanal restent dans le milieu. Lorsque le support est de type polymère, les extractions sont comprises entre 85 % et 95 %. Au bout de 3 heures on observe que les trois supports présentent une efficacité de l'ordre de 85 %. Les fonctions portées par le support PP19 ont établi leur équilibre. Les deux autres supports poursuivent leur extraction pour atteindre un équilibre à 95 % au terme de 24 heures.

Lorsqu'on utilise des fonctions supportées, le comportement du support vis-à-vis du milieu peut avoir une grande influence sur la qualité de l'extraction. Dans le cas présent, les supports ne sont pas restés en surface et ils n'ont pas non plus coulé trop vite. Sous l'effet de la lente rotation des flacons, les supports étaient régulièrement dispersés dans le milieu. Ceci montre une bonne compatibilité des supports avec le milieu hydroalcoolique. Les gonflements mesurés lors des synthèses des supports sont observés ici.

V.1.2 Extraction de l'acide pyruvique avant ajout de SO₂

Une solution d'acide pyruvique à 85 mg.l⁻¹ (0,95 mmol.l⁻¹) a été mise en présence de trois équivalents de chaque agent d'extraction sur support dans des flacons différents. Les résultats des mesures de piégeage sont présentés sur le graphique 10.



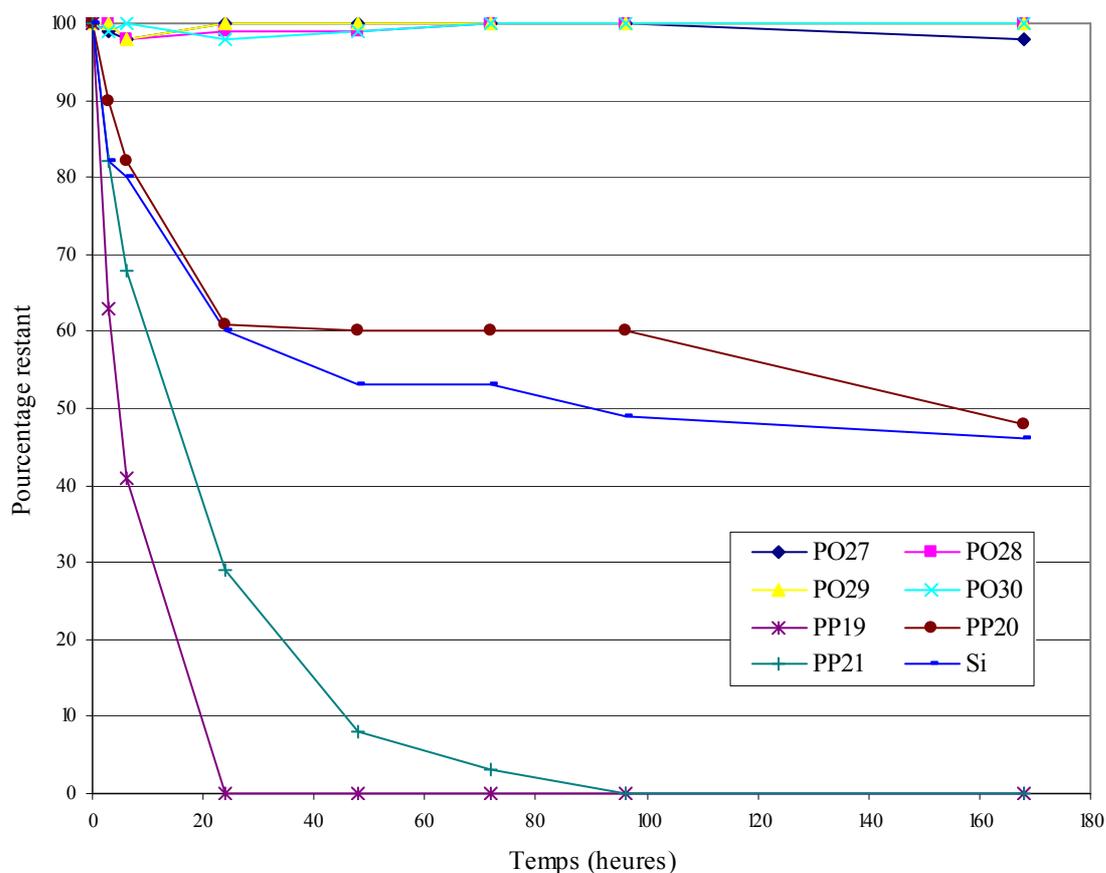
Graphique 10 : Extraction de l'acide pyruvique en milieu hétérogène en fonction du temps avant ajout de SO₂

Ces résultats montrent que la fonction O-benzylhydroxylamine extrait moins de 5 % d'acide pyruvique, quel que soit le support considéré. Cette fonction n'est donc pas efficace

dans ce cas. La fonction phénylsulfonylhydrazine sur support de silice présente un palier à 10 % d'acide pyruvique extrait au bout de 2 jours de mise en contact, l'équilibre établi restant ensuite stable au cours du temps. Les supports de type polymère montrent une plus grande efficacité. Le support PP19 atteint un palier au bout de 6 heures de mise en présence avec 20 % d'acide pyruvique extrait. Les deux autres supports sont beaucoup plus longs à atteindre un palier. Celui-ci se dessine après 5 jours de mise en contact à respectivement 35 % pour le support PP21 et 70 % pour le support PP20.

V.1.3 Extraction de l'acide 2-oxoglutarique avant ajout de SO₂

Une solution d'acide 2-oxoglutarique à 93 mg.l⁻¹ (0,64 mmol.l⁻¹) a été mise en présence de trois équivalents de chaque agent d'extraction sur support dans des flacons différents. Les résultats des mesures sont présentés sur le graphique 11.

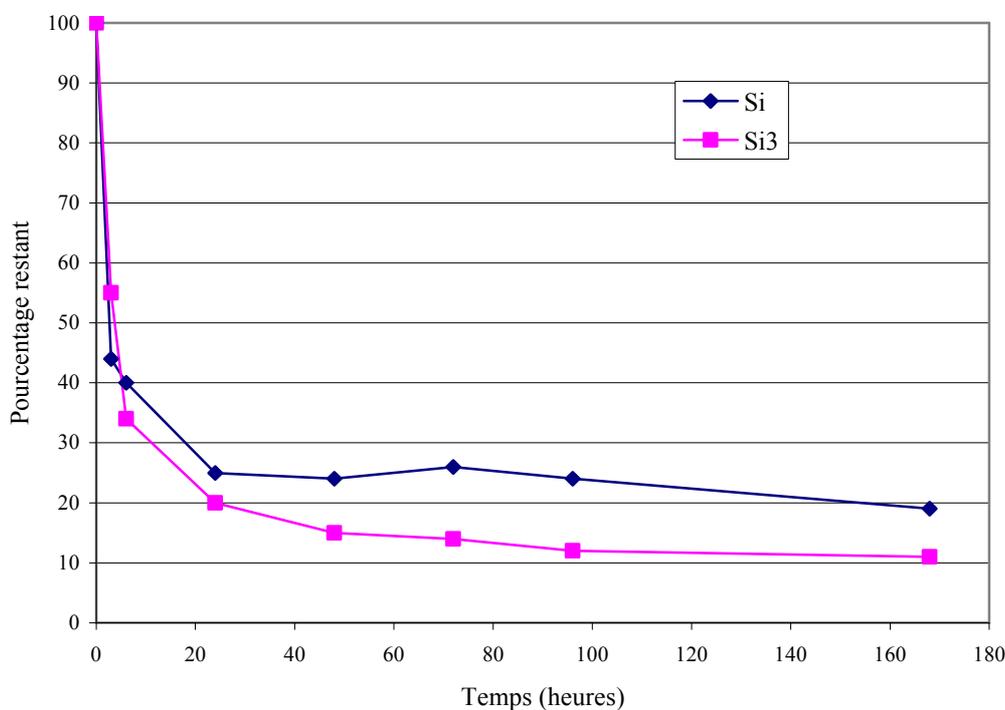


Graphique 11 : Extraction de l'acide 2-oxoglutarique en milieu hétérogène en fonction du temps avant ajout de SO₂

L'extraction de l'acide 2-oxoglutarique est totalement inefficace dans le cas de la O-benzylhydroxylamine, quel que soit le support. Dans le cas de l'extraction par la phénylsulfonylhydrazine, deux supports présentent une efficacité de l'ordre de 50 % de dérivé carbonylé extrait au bout de 7 jours. Il s'agit des supports Si et PP20. Les deux autres supports présentent une efficacité de 100 % au bout de 24 heures dans le cas du support PP19 et au bout de 96 heures pour le support PP21.

V.1.4 Extraction du 5-oxofructose avant ajout de SO₂

Une solution de 5-oxofructose à 145 mg.l⁻¹ (0,81 mmol.l⁻¹) a été mise en présence de trois équivalents de chaque agent d'extraction sur support dans des flacons différents. Des fractions de 2 ml de solution ont été prélevées à des temps donnés et les quantités de 5-oxofructose restant mesurées par la méthode de dérivation en utilisant du PFBOA. Les résultats des mesures sont présentés sur le graphique 12. Pour des raisons de disponibilité des supports et du 5-oxofructose, seuls les supports de silice ont été testés.



Graphique 12 : Extraction du 5-oxofructose en milieu hétérogène en fonction du temps avant ajout de SO₂

Les résultats montrent que le 5-oxofructose est extrait par la phénylsulfonylhydrazine fixée sur support de silice. L'extraction de ce composé n'avait jusqu'ici pas pu être mise en évidence. Le comportement des deux supports est voisin. Le support Si extrait 90 % du 5-oxofructose et le support Si3 en extrait 80 %.

V.1.5 Bilan des extractions avant ajout de SO₂

Les extractions de l'éthanal, de l'acide pyruvique et de l'acide 2-oxoglutarique en solution monocomposé par un agent d'extraction greffé sur support présentent des résultats contrastés. Dans le cas de la O-benzylhydroxylamine sur support, les résultats ne sont pas ceux espérés au regard des extractions obtenues en solution homogène. Les supports porteurs de cette fonction ont montré une faible efficacité dans le cas de l'éthanal et se sont révélés être sans effet pour l'acide pyruvique et l'acide 2-oxoglutarique. Cette molécule (7) présentait une grande efficacité en solution homogène. Ce changement dans la réactivité pourrait s'expliquer de deux façons. Soit la substitution par un groupe carboné sur le noyau phényle qui permet l'attache sur un support de la molécule a un effet négatif sur l'efficacité de la fonction extractive. Soit le faible gonflement du support dans la solution hydroalcoolique empêche l'extraction d'avoir lieu en gênant la rencontre entre les entités.

Dans le cas de la phénylsulfonylhydrazine, les quatre supports utilisés font preuve d'une certaine efficacité dans l'extraction des dérivés carbonylés. Tous les supports ne présentent pas la même efficacité, comme on peut l'observer à partir des résultats décrits dans le tableau 22.

Support	Taux d'éthanal extrait (%)	Taux d'acide pyruvique extrait (%)	Taux d'acide 2-oxoglutarique extrait (%)
PP19	85	20	100
PP20	95	70	50
PP21	95	35	100
Si	60	10	50

Tableau 22 : Bilan des extractions par la phénylsulfonylhydrazine sur support polymère avant ajout de SO₂ dans la solution (120 heures de mise en contact)

On observe que l'éthanal est extrait du milieu quelle que soit la nature du support. Les supports polymères extraient entre 85 et 95 % de l'éthanal et le support Si 60 %. Par contre, l'acide pyruvique et l'acide 2-oxoglutarique sont extraits de façons différentes suivant le support considéré. Le support PP20 extrait 70 % de l'acide pyruvique. Les trois autres supports présentent des extractions beaucoup plus faibles, comprises entre 10 et 35 %. L'acide 2-oxoglutarique est entièrement extrait dans le cas des supports PP19 et PP21 et reste à 50 % dans le cas des supports PP20 et Si. Seul le support PP19 gonfle en solution, mais ce n'est pas le plus efficace dans tous les cas, donc ce n'est pas le seul paramètre à prendre en considération. Les supports ne présentent pas tous le même taux de fonctionnalisation mais, là encore, l'absence d'homogénéité des résultats nous empêche de définir le meilleur support.

Le 5-oxofructose est extrait de manière satisfaisante par la fonction phénylsulfonylhydrazine sur support (à 80 % pour le support Si3 et 90 % pour le support Si).

V.2 Extraction après ajout de SO₂

Toutes les solutions utilisées pour les extractions avant ajout de dioxyde de soufre ont reçu l'ajout d'une petite quantité d'une solution aqueuse de SO₂ de façon à ce qu'elles présentent une concentration de l'ordre de 100 mg.l⁻¹. Les solutions ont été laissées au repos quelques jours afin d'homogénéiser les milieux et laisser les équilibres s'établir avant de mettre en œuvre les extractions. Les quantités d'agents d'extraction sur support additionnées sont toujours égales à trois équivalents de dérivés carbonylés présents dans le milieu. Le principe de cette extraction est basé sur le déplacement d'équilibre (schéma 67).

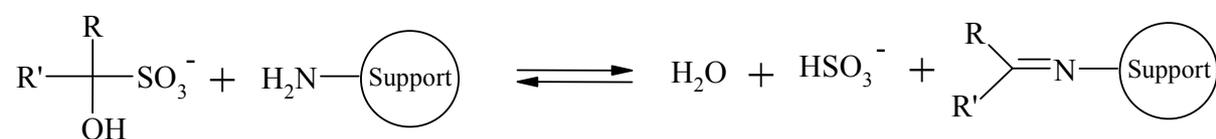
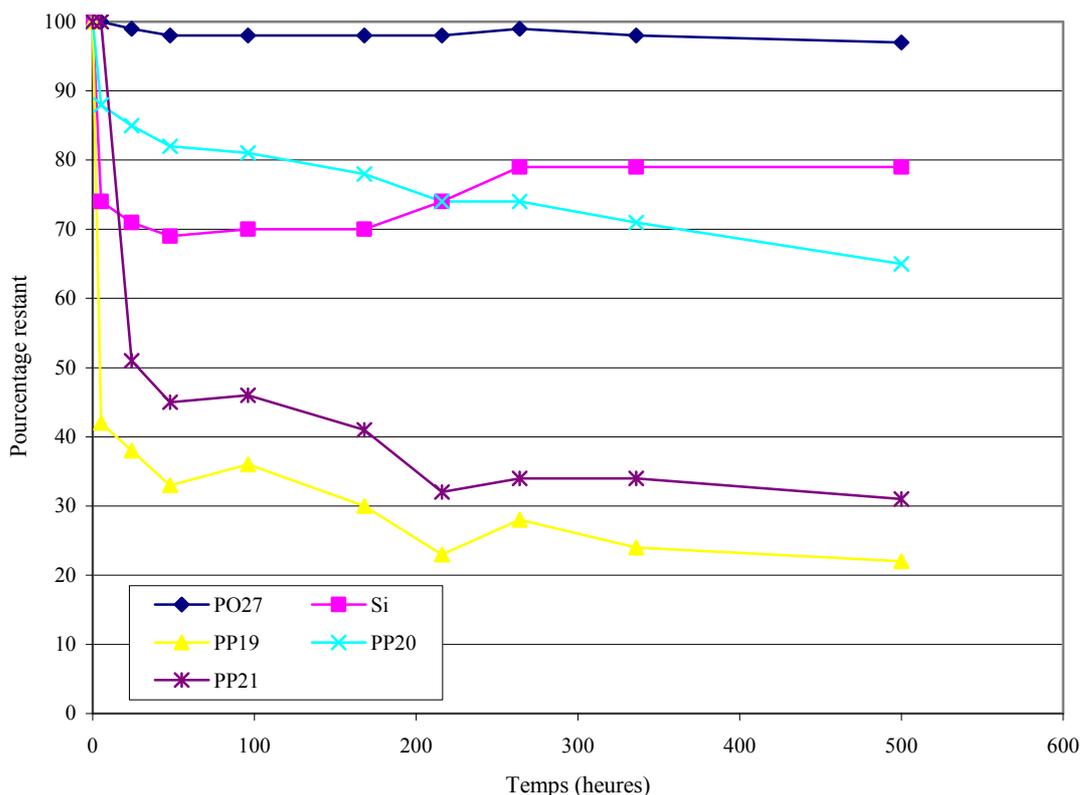


Schéma 67 : Principe de l'extraction des dérivés carbonylés après ajout de SO₂ dans le milieu

Seuls les supports ayant montré une certaine efficacité lors des extractions avant ajout de dioxyde de soufre dans le milieu ont été utilisés pour ces expériences.

V.2.1 Extraction de l'éthanal après ajout de SO₂

Les supports testés sont le support PO27 portant la fonction O-benzylhydroxylamine et les quatre supports portant la fonction phénylesulfonylhydrazine. Les résultats des mesures de l'extraction de l'éthanal sont présentés sur le graphique 13.

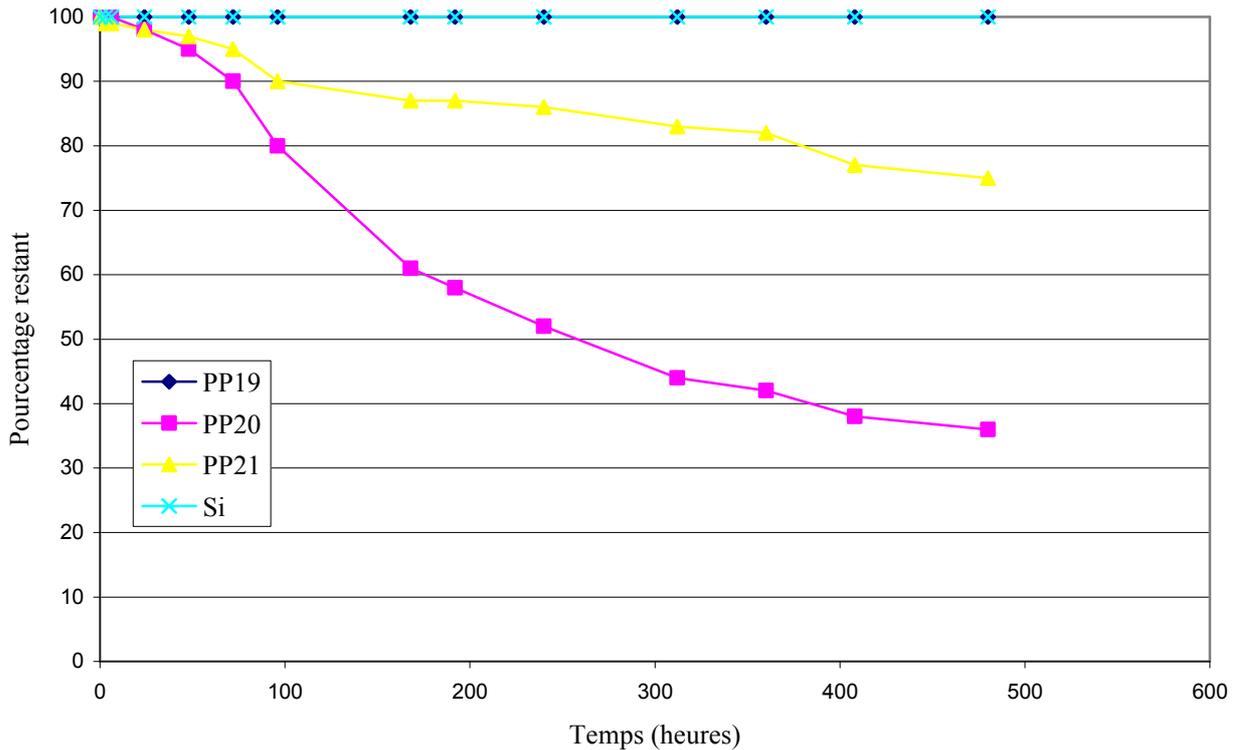


Graphique 13 : Extraction de l'éthanal en milieu hétérogène en fonction du temps après ajout de SO₂

Les résultats montrent que l'extraction de l'éthanal reste efficace après ajout de dioxyde de soufre dans le milieu. Au bout de 24 heures de mise en présence, un palier s'établit dans tous les échantillons. L'efficacité relative des supports vis-à-vis de l'extraction de l'éthanal est comparable à ce que l'on observait avant ajout de dioxyde de soufre. On observe cependant une inversion, le support Si se révélant plus efficace que le support PP20. L'extraction s'améliore très lentement dans le temps.

V.2.2 Extraction de l'acide pyruvique après ajout de SO₂

Les résultats des mesures de l'extraction de l'acide pyruvique sont présentés sur le graphique 14.

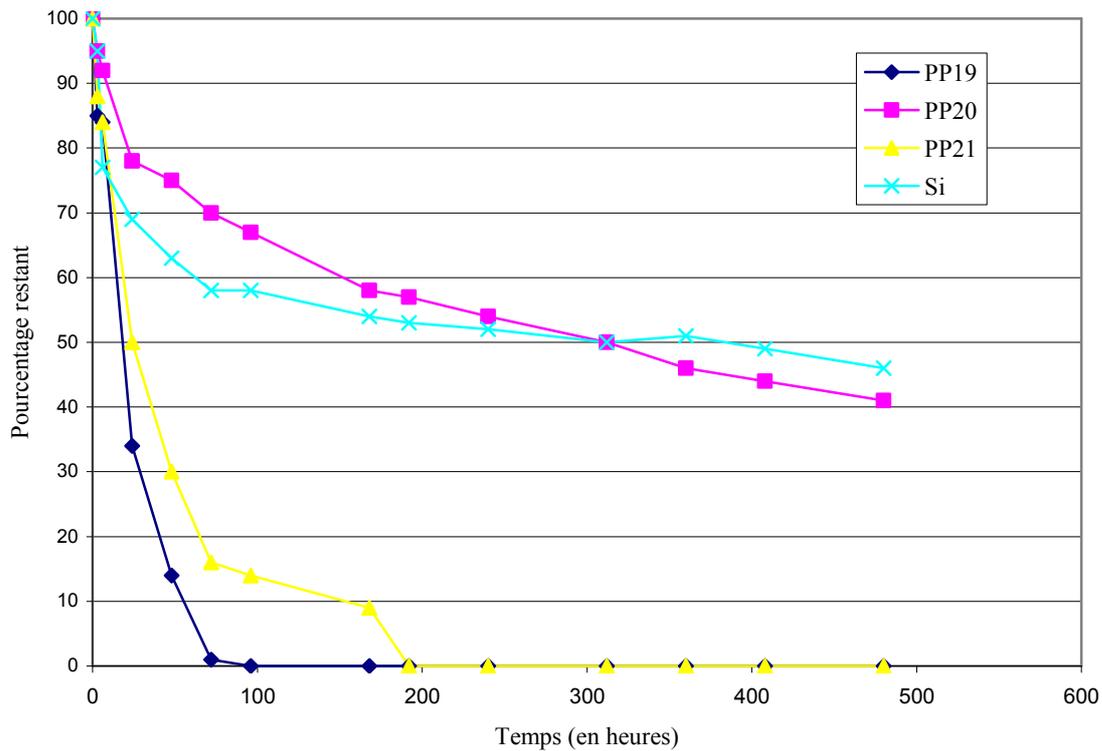


Graphique 14 : Extraction de l'acide pyruvique en milieu hétérogène en fonction du temps après ajout de SO₂

Les résultats montrent que pour les supports PP19 et Si aucune extraction n'est observée. Dans le cas du support PP21, seulement 25 % de l'acide pyruvique présent dans le milieu a été extrait au bout de 21 jours. Le support PP20 a montré une certaine efficacité avec un palier à 65 % d'acide pyruvique extrait qui s'amorce après 21 jours de mise en contact.

V.2.3 Extraction de l'acide 2-oxoglutarique après ajout de SO₂

Les résultats du suivi de l'extraction de l'acide 2-oxoglutarique sont présentés sur le graphique 15.

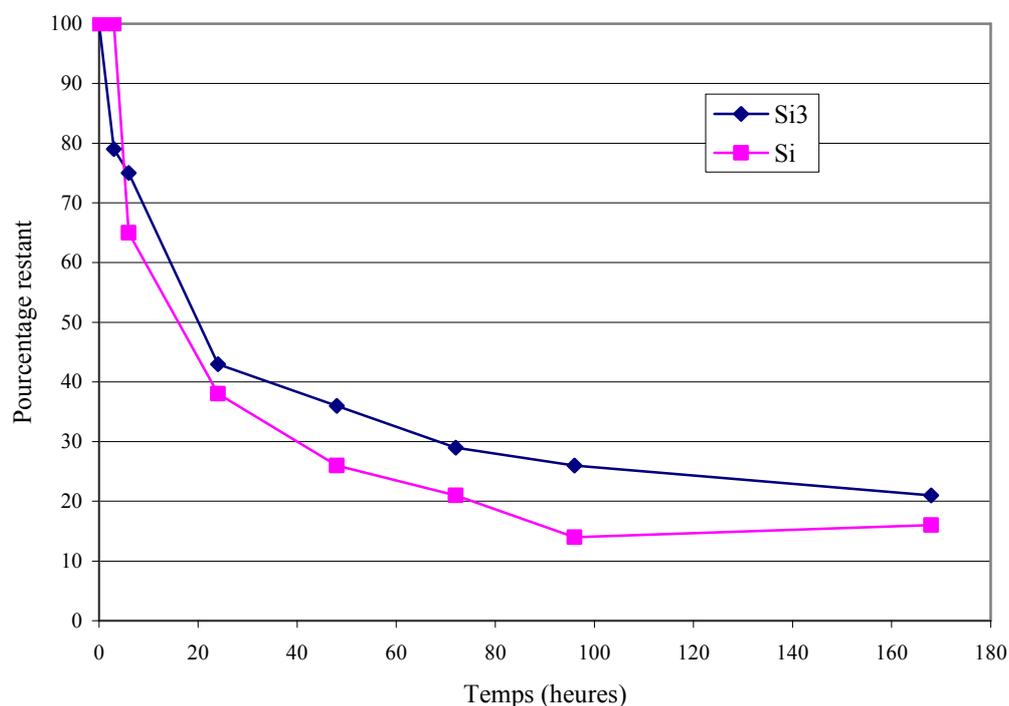


Graphique 15 : Extraction de l'acide 2-oxoglutarique en milieu hétérogène en fonction du temps après ajout de SO_2

Les courbes obtenues ont la même allure que celles observées avant addition de dioxyde de soufre dans le milieu, mais pour des temps très supérieurs. Les supports Si et PP20 présentent une extraction de l'ordre de 50 % au bout de 21 jours de mise en contact (contre 7 avant ajout). Le support PP19 montre une extraction de 100 % après 3 jours et le PP21 au bout de 8 jours. Les temps nécessaires pour obtenir les mêmes résultats qu'avant l'ajout de dioxyde de soufre sont donc respectivement multipliés par 3 et par 2.

V.2.4 Extraction du 5-oxofructose après ajout de SO_2

Les résultats des mesures de l'extraction du 5-oxofructose sont présentés sur le graphique 16.



Graphique 16 : Extraction du 5-oxofructose en milieu hétérogène en fonction du temps après ajout de SO_2

Les résultats du graphique 16 montrent que le 5-oxofructose est extrait du milieu après ajout de dioxyde de soufre, comme les trois autres dérivés carbonylés. La qualité de l'extraction est très proche de ce qu'il y avait avant ajout de dioxyde de soufre

V.2.5 Bilan des extractions après ajout de SO_2

Le résultat important qui ressort de ces expériences est qu'il est possible de déplacer les équilibres qui s'établissent entre le dioxyde de soufre et l'éthanal, l'acide pyruvique et l'acide 2-oxoglutarique pour extraire ces composés d'un milieu modèle en utilisant des fonctions greffées sur support. Les résultats des extractions sont résumés dans le tableau 23.

Support	Taux d'éthanal extrait (%)	Taux d'acide pyruvique extrait (%)	Taux d'acide 2-oxoglutarique extrait (%)
PP19	70	0	100
PP20	20	65	60
PP21	40	25	100
Si	30	0	55

Tableau 23 : Bilan des extractions par la phénylsulfonylhydrazine sur support polymère après ajout de SO₂ dans la solution

Les temps nécessaires pour que les extractions se réalisent sont plus longs qu'en l'absence de dioxyde de soufre dans le milieu. Les allures générales des courbes d'extraction observées avant ajout de dioxyde de soufre dans le milieu sont retrouvées avec des temps de mise en contact beaucoup plus longs. Ces résultats sont également valables en ce qui concerne l'extraction du 5-oxofructose. Les deux supports de silice extraient 80 % du 5-oxofructose après 180 heures de mise en contact.

V.3 Conclusion sur les extractions en milieu hétérogène

L'étude de l'efficacité des extractions en milieu homogène sur des solutions ne comportant qu'un seul dérivé carbonyle et un seul agent d'extraction, avant et après ajout de SO₂ dans le milieu, a permis de démontrer la possibilité d'extraire les dérivés carbonyles indifféremment avant ou après l'étape de "mutage" des vins. Les agents d'extraction efficaces sont la O-benzylhydroxylamine et la phénylsulfonylhydrazine. Ces agents ont été greffés sur différents supports insolubles. Ces supports ont été utilisés pour effectuer des extractions en milieu hétérogène. Il a été observé que :

- La O-benzylhydroxylamine sur support de type polymère n'est pas efficace comme agent d'extraction. Il n'est pas possible pour l'instant de déterminer si la fonction perd son efficacité lors de la mise sur support ou si c'est une gêne due au support qui explique ce résultat.
- Il est possible d'extraire à l'aide de supports fonctionnalisés par la phénylsulfonylhydrazine l'éthanal, l'acide pyruvique et l'acide 2-oxoglutarique de

solutions modèles, aussi bien avant qu'après ajout de SO₂ dans la solution hydroalcoolique. Les équilibres régissant la liaison bisulfite entre le SO₂ et les dérivés carbonylés peuvent être déplacés par l'établissement d'équilibres entre la phénylsulfonylhydrazine et ces mêmes dérivés, conduisant ainsi à l'élimination de tout ou partie de ces dérivés carbonylés. Le bilan des extractions est rassemblé dans le tableau 24.

Nature du support	Extraction avant ajout de SO ₂ (%)			Extraction après ajout de SO ₂ (%)		
	Éthanal	Acide pyruvique	Acide 2-oxoglutarique	Éthanal	Acide pyruvique	Acide 2-oxoglutarique
PP19	85	20	100	70	0	100
PP20	95	70	50	20	65	60
PP21	95	35	100	40	25	100
Si	60	10	50	30	0	55

Tableau 24 : Récapitulatif des extractions en milieu hétérogène par les supports portant la fonction phénylsulfonylhydrazine

Ces résultats montrent qu'il est difficile pour l'instant de définir le meilleur support pour l'extraction. Les résultats les plus intéressants ont été obtenus avec un support réticulé entre 4 et 8 % (donc ne gonflant pas dans un solvant) et portant environ 1,9 mmol de fonctions par gramme de support (supports PP20 et PP21).

Dans le cas du 5-oxofructose, le bilan des extractions par la phénylsulfonylhydrazine sur support de silice est rassemblé dans le tableau 25.

Nature du support	5-oxofructose extrait (%)	
	Extraction avant ajout de SO ₂	Extraction après ajout de SO ₂
Si	80	80
Si3	90	85

Tableau 25 : Récapitulatif des extractions du 5-oxofructose en milieu hétérogène par les supports de silice portant la fonction phénylsulfonylhydrazine

Différents supports portant la fonction O-benzylhydroxylamine (PO27, PO28, PO29, PO30) et la fonction phénylsulfonylhydrazine (PP19, PP20, PP21, Si, Si3) ont été retenus pour cette étude en milieu hétérogène modèle. Ces supports fonctionnalisés ont été testés pour l'extraction de l'éthanal, de l'acide pyruvique, de l'acide 2-oxoglutarique et du 5-oxofructose à partir de solutions modèles ne comportant qu'un seul dérivé carbonylé. Tous les supports n'ont pas eu la même efficacité. Il ressort de cette étude qu'il est possible d'extraire les dérivés carbonylés considérés aussi bien avant qu'après ajout de SO₂ dans la solution. La phénylsulfonylhydrazine se révèle être un agent d'extraction efficace aussi bien sur support polymère que sur silice, pour les quatre dérivés carbonylés considérés. La O-benzylhydroxylamine greffée sur support ne s'est pas révélée être un agent d'extraction efficace.

L'efficacité de la phénylsulfonylhydrazine sur support aussi bien avant qu'après ajout de SO₂ dans le milieu montre qu'il est possible d'envisager la mise en œuvre de cette extraction à n'importe quelle étape du processus de vinification, y compris en fin, après l'étape de "mutage" des vins, ce qui simplifierait l'application du procédé. La suite de cette étude a donc porté sur l'utilisation de ces supports sur un vin blanc liquoreux.

VI Extraction dans un vin blanc liquoreux

Les extractions réalisées en milieu hétérogène montrent que l'extraction de l'éthanal, de l'acide pyruvique, de l'acide 2-oxoglutarique et du 5-oxofructose est envisageable après l'étape de "mutage" des vins. La poursuite de cette étude a donc porté sur la vérification de l'applicabilité de la méthode d'extraction liquide-solide sur un vin en fin de processus de vinification. Cette voie serait la plus simple à mettre en œuvre pour une application dans le domaine de l'œnologie.

Il est nécessaire de faire un rappel sur les équilibres qui se forme entre le SO_2 (sous forme de HSO_3^- dans le milieu hydroalcoolique) et les dérivés carbonylés présents dans le milieu (schéma 68).

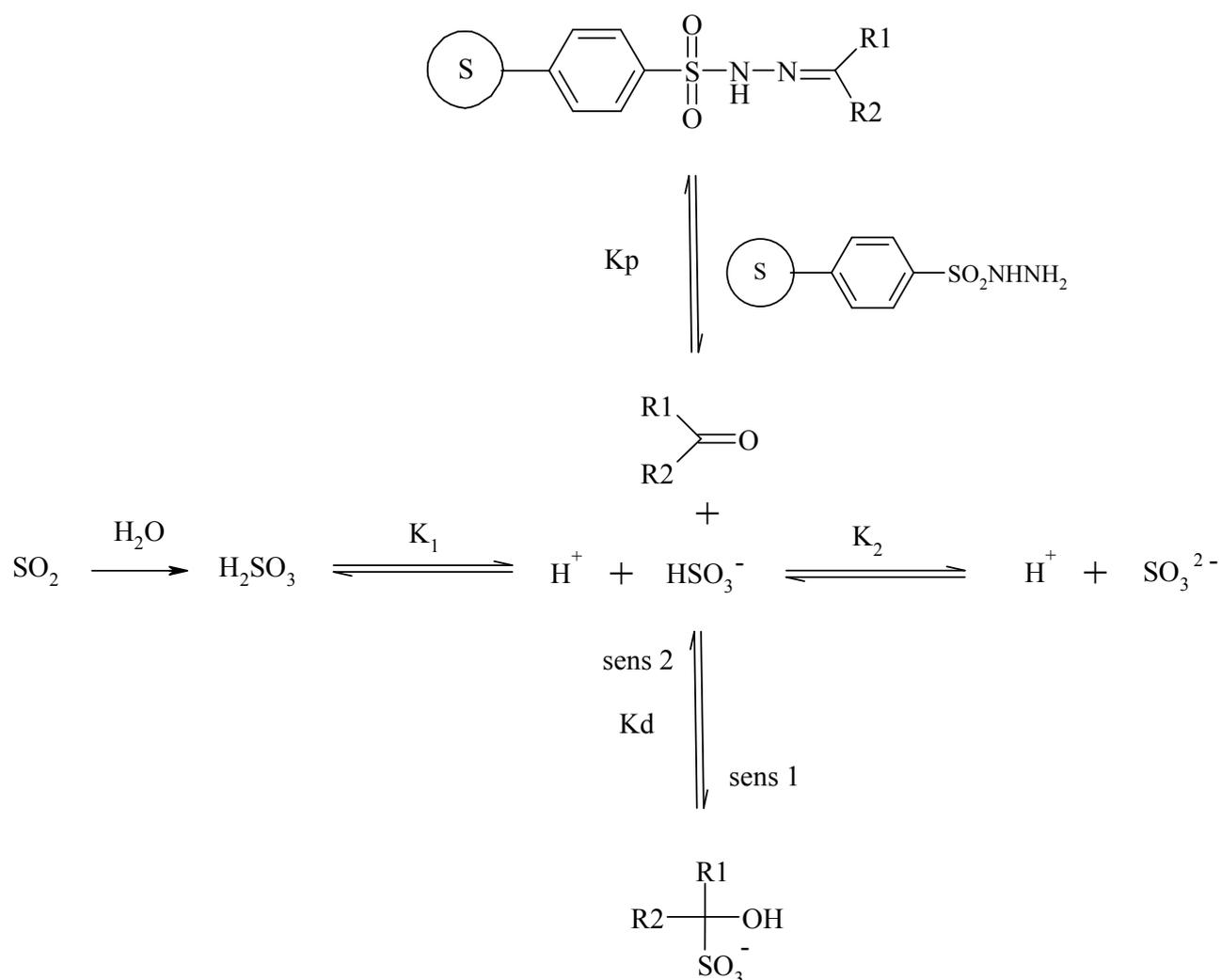


Schéma 68 : Equilibres en compétition

La constante K_d régit l'équilibre entre composé carbonylé libre et combiné. Dans le cas de certaines molécules, l'équilibre peut être fortement déplacé dans le sens 1, voire totalement. Il y a alors peu de dérivés carbonylés libres dans le milieu, susceptibles de réagir avec la fonction extractive. Si ces dérivés sous forme libre sont suffisamment nombreux et réagissent avec l'agent d'extraction, leur disparition du milieu entraîne un déplacement de façon à remettre le système en équilibre. En même temps, la quantité de SO_2 libre va augmenter, de par le déplacement dans le sens 2. Ceci fait la complexité du système. Chaque molécule présente dans le milieu peut être étudiée individuellement afin de connaître ses constantes d'équilibre et ses vitesses de réaction avec les molécules extractives. Mais dans le vin, toutes les molécules étant présentes, il va être nécessaire de prendre en compte des notions de compétition au niveau des vitesses de réaction avec tel ou tel composé et chaque équilibre va subir l'influence des autres équilibres existant dans le milieu.

Afin de vérifier la validité des résultats obtenus sur le modèle, des vins blancs liquoreux ont été soumis à des extractions. Pour poursuivre les essais tels qu'ils avaient été réalisés jusqu'alors sur les solutions modèles, il a été additionné au vin différents équivalents de fonctions extractives par rapport aux dérivés carbonylés estimés présents dans le milieu. Les quatre supports ayant donné les meilleurs résultats lors des extractions en milieu modèle hétérogène ont été utilisés pour ces extractions. Ces quatre supports portent la fonction phénylsulfonylhydrazine. Trois de ces supports sont de type polymère (PP22, PP23 et PP24) et le quatrième est un support de silice commerciale (Si) (tableau 26).

Support initial	Support	Taux de réticulation (%)	Taux de fonctionnalisation ($mmol.g^{-1}$)	Taille du support (diamètre en mm)
PP1	PP22	2	2,26	0,10-0,20
PP2	PP23	4	3,80	0,10-0,20
PP3	PP24	6	3,30	0,10-0,20
-	Si	-	0,80	0,03-0,05

Tableau 26 : Caractéristiques des supports utilisés pour les extractions dans le vin

Les résultats de toutes ces séries d'extractions se sont révélés être assez proches. Pour des raisons de lisibilité des résultats, seuls les résultats concernant le support PP22, qui s'est

révélé être le plus efficace, seront présentés de façon détaillée. Les résultats complets concernant les autres supports sont reportés en annexe.

VI.1 Extraction par le support PP22

Le premier support testé, à base de polystyrène réticulé avec du divinylbenzène, est le support PP22, présentant un taux de gonflement de $3,9 \text{ ml.g}^{-1}$ dans une solution eau-éthanol (pourcentages en volumes : 88-12). Son taux de fonctionnalisation est de $2,6 \text{ mmol.g}^{-1}$.

VI.1.1 Extraction sous agitation

L'étude sur l'influence du temps de mise en contact et du nombre d'équivalent d'agent d'extraction a porté sur un vin de Sauternes 2000 supplémenté en dioxyde de soufre, de façon à présenter un taux de dioxyde de soufre libre de l'ordre de 50 mg.l^{-1} . Quatre séries rigoureusement identiques ont été préparées. Chaque série se compose de 4 flacons contenant chacun 80 ml de vin. Un flacon sert de témoin, pour tenir compte de l'évolution du vin au cours du temps. Les autres flacons reçoivent respectivement 2, 6 et 10 équivalents d'agent d'extraction par rapport à la quantité de dérivés carbonylés présente. Les compositions des séries sont rassemblées sur le tableau 27.

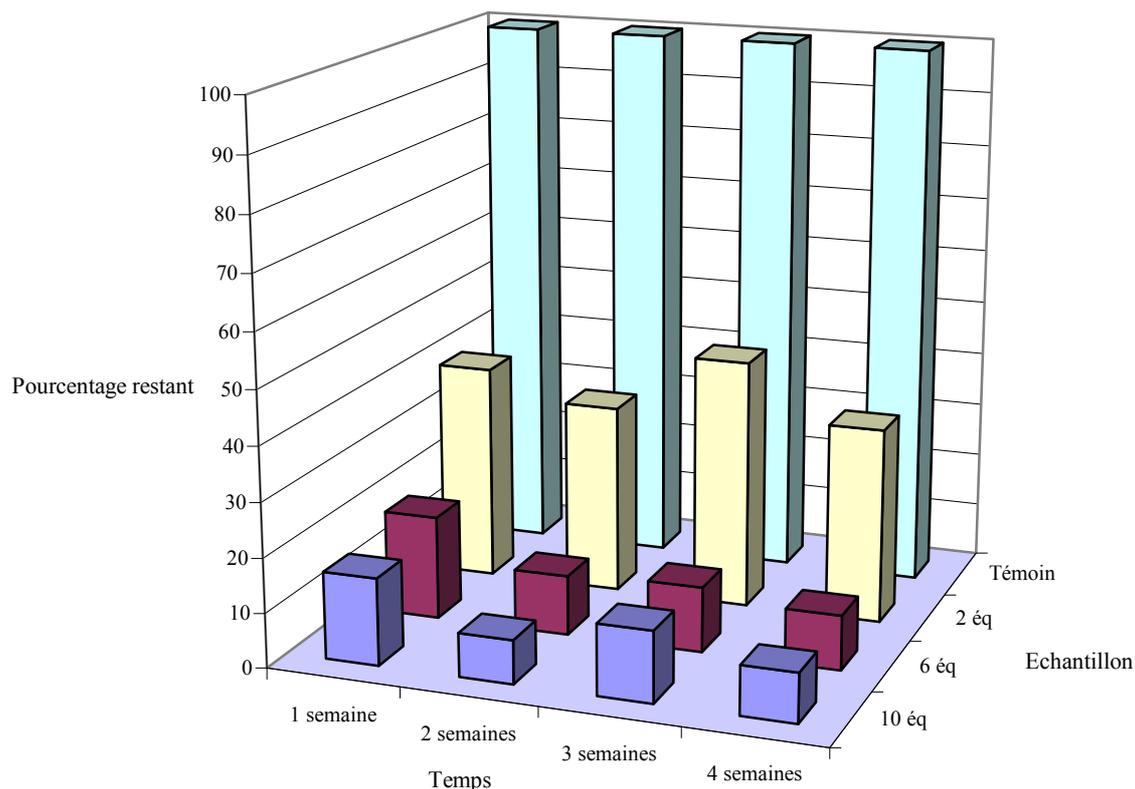
Nature de l'échantillon	SO ₂ Total mesuré (en mg.l^{-1})	Quantité de dérivés carbonylés (en mmol présents dans 80 ml)	Masse de support (en g.l^{-1})	Quantité de fonctions extractives supportées (en mmol pour 80 ml)
Témoin	371	0,5	0	0
2 équivalents d'agent d'extraction	371	0,5	4,4	1
6 équivalents d'agent d'extraction	371	0,5	13,2	3
10 équivalents d'agent d'extraction	371	0,5	22,0	5

Tableau 27 : Quantités de support PP22 placées dans un vin de Sauternes 2000

Les 4 séries sont placées ensemble sur un agitateur rotatif par culbutage tournant à 9 tours.min⁻¹. Au terme de chaque semaine, une série est arrêtée et les quantités de dérivés carbonylés présents sont mesurées.

VI.1.1.1 Extraction de l'éthanal sous agitation

Les mesures réalisées pour l'éthanal sont présentées sur le graphique 17.

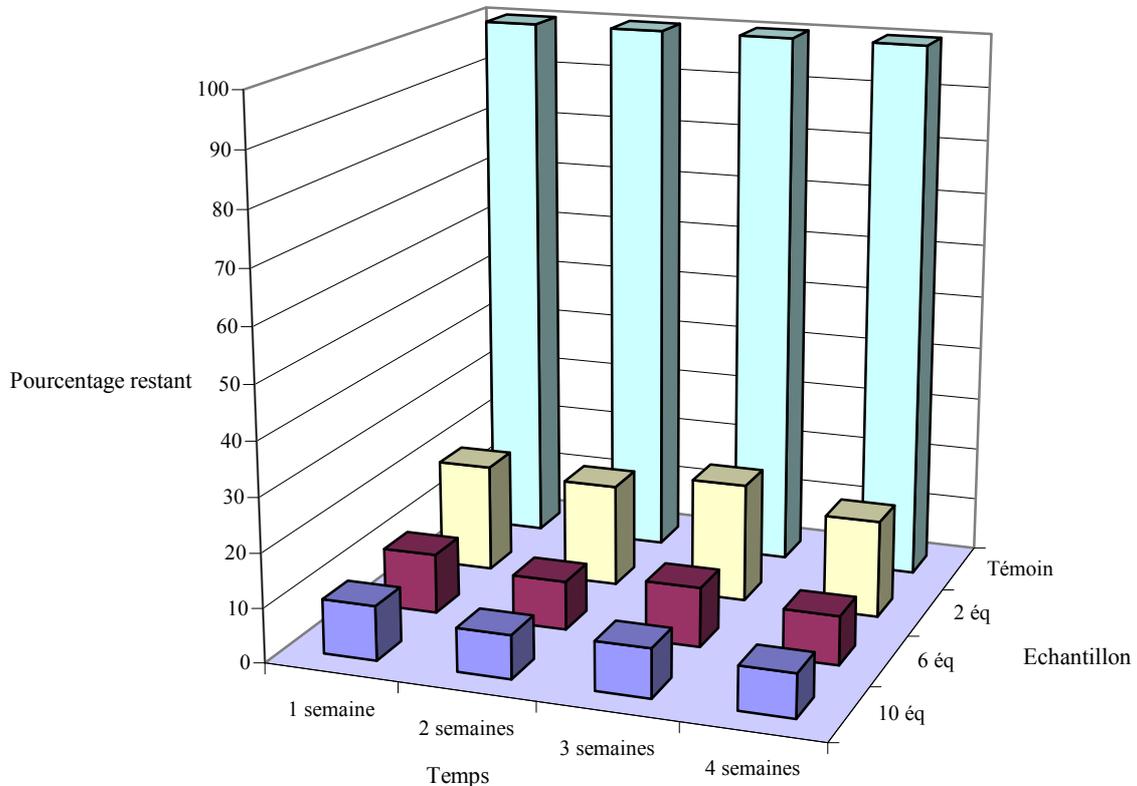


Graphique 17 : Extraction par PP22 sous agitation de l'éthanal dans un vin de Sauternes 2000 en fonction du temps et du nombre d'équivalents

Ces résultats montrent que le temps de mise en contact a peu d'influence sur la qualité de l'extraction. Lorsque l'on place 2 équivalents d'agent d'extraction dans le milieu, environ 60 % de l'éthanal est extrait du milieu. Lors de l'extraction sur la solution modèle avec 3 équivalents d'agent d'extraction, environ 70 % de l'éthanal était extrait du milieu. Ces résultats sont proches. Avec 6 équivalents dans le milieu, 85 % de l'éthanal est extrait du milieu. Il n'est pas observé d'amélioration lorsque 10 équivalents d'agent d'extraction sont placés dans le milieu. Dans ce cas, il est inutile d'ajouter plus de 6 équivalents d'agent d'extraction dans le milieu pour atteindre le maximum de l'extraction.

VI.1.1.2 Extraction de l'acide pyruvique sous agitation

L'extraction de l'acide pyruvique est présentée sur le graphique 18.

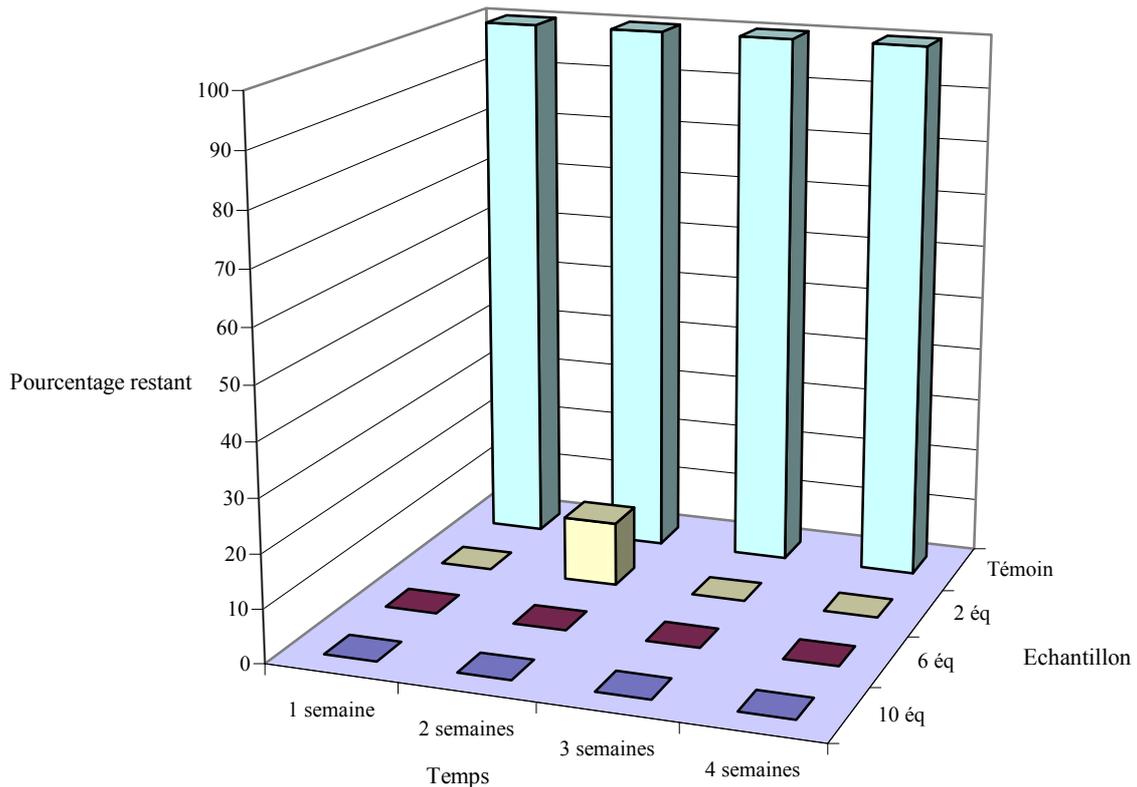


Graphique 18 : Extraction par PP22 sous agitation de l'acide pyruvique dans un vin de Sauternes 2000 en fonction du temps et du nombre d'équivalents

Le graphique 18 montre que lorsqu'il y a 2 équivalents d'agent d'extraction dans le milieu, 80 % de l'acide pyruvique est extrait. En milieu modèle, avec une quantité supérieure d'agent d'extraction, elle s'était révélée nulle. L'addition de 6 équivalents d'agent d'extraction dans le milieu augmente la quantité d'acide pyruvique extrait, qui est alors de 90 %. L'augmentation du nombre d'équivalents à 10 n'apporte pas d'amélioration de l'extraction. L'augmentation du temps de mise en contact n'a pas d'influence sur la qualité de l'extraction.

VI.1.1.3 Extraction de l'acide 2-oxoglutarique sous agitation

Les résultats de l'extraction de l'acide 2-oxoglutarique sont présentés sur le graphique 19.

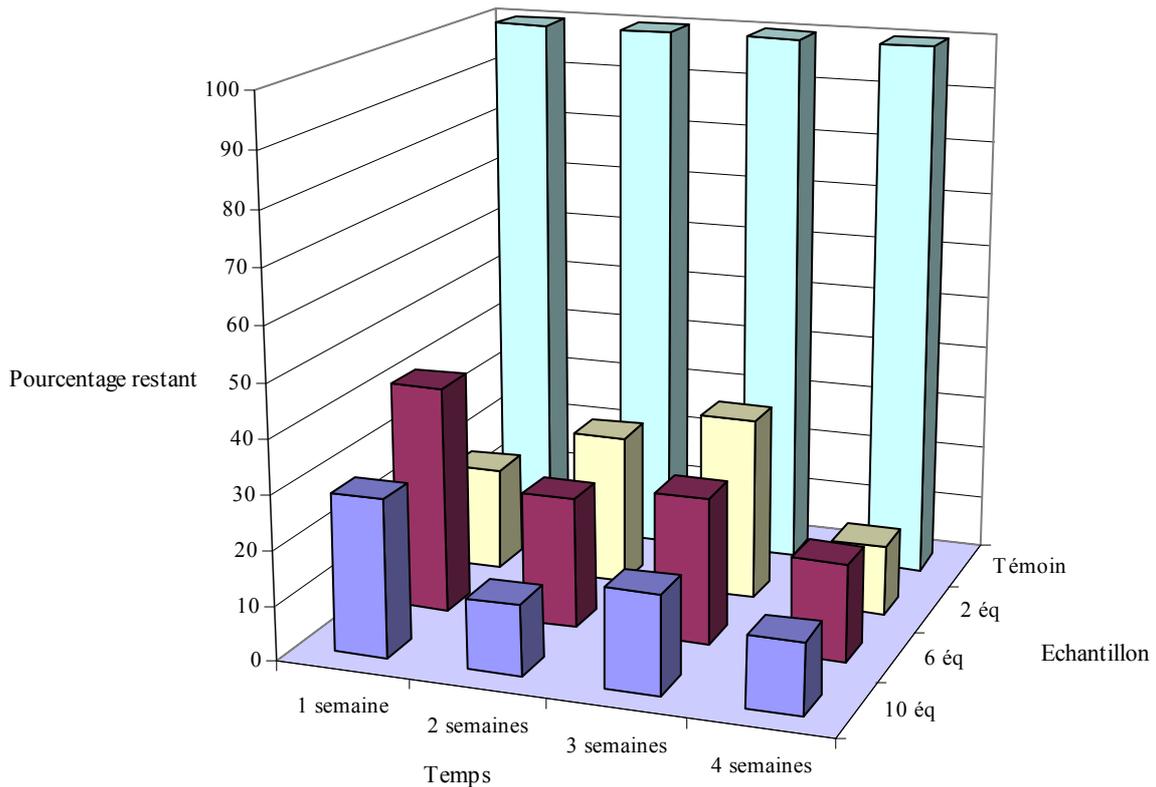


Graphique 19 : Extraction par PP22 sous agitation de l'acide 2-oxoglutarique dans un vin de Sauternes 2000 en fonction du temps et du nombre d'équivalents

Ce graphique montre que le temps n'a aucune influence sur l'extraction. Le nombre d'équivalents d'agent d'extraction dans le milieu n'a pas d'influence non plus. Dès la première semaine, avec 2 équivalents d'agent d'extraction dans le milieu, l'extraction est totale. Un seul point à deux semaines pour 2 équivalents d'agent d'extraction montre une extraction de l'ordre de 90 %. Ce point isolé ne semble pas être significatif, mais plutôt correspondre à un artéfact de manipulation. Ces résultats rejoignent ceux trouvés dans le cas de la solution modèle où l'extraction en présence de 3 équivalents d'agent d'extraction s'était révélée totale au bout de quelques jours de mise en contact.

VI.1.1.4 Extraction du 5-oxofructose sous agitation

Les mesures des quantités de 5-oxofructose restant dans le milieu après l'extraction sont représentées sur le graphique 20.

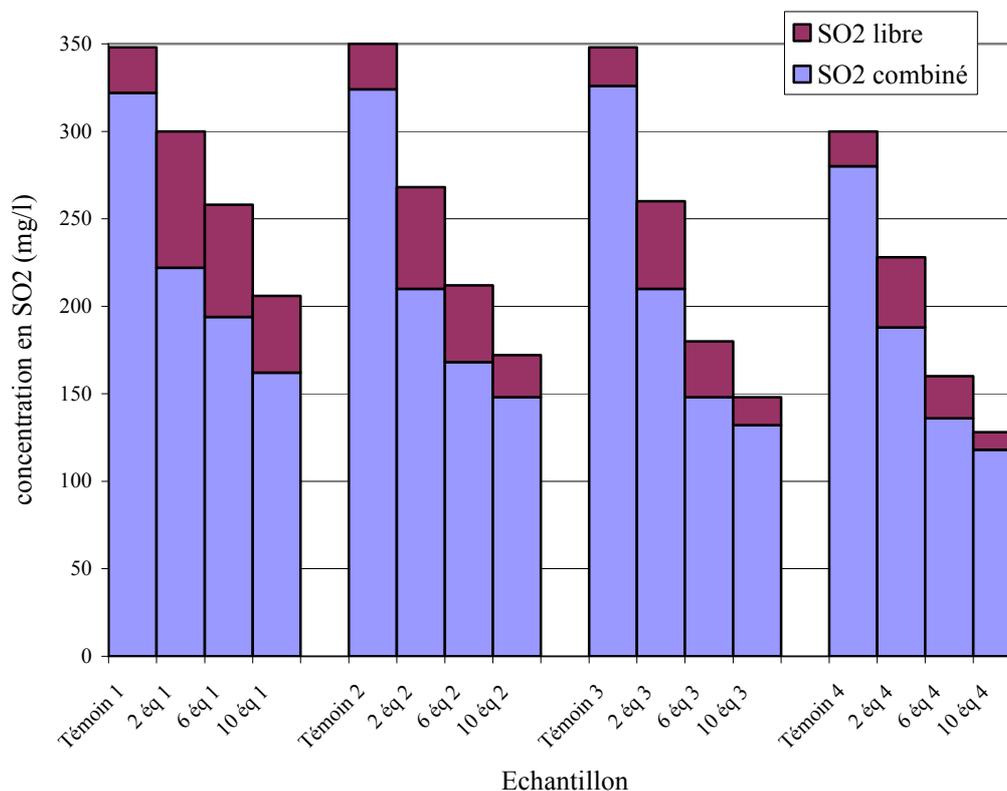


Graphique 20 : Extraction par PP22 sous agitation du 5-oxofructose dans un vin de Sauternes 2000 en fonction du temps et du nombre d'équivalents

Les mesures du graphique 20 montrent que la qualité des extractions s'améliore avec l'augmentation du temps de mise en contact. La qualité des extractions avec 2 et 10 équivalents sont assez proches, passant de 60 et 70 % de 5-oxofructose extrait en une semaine à 88 %, pour les deux quantités de support, après quatre semaines de mise en présence. Pour deux et trois semaines de mise en présence, l'extraction avec 6 équivalents est comprise entre les deux autres quantités d'agent d'extraction (avec 75 % de 5-oxofructose extrait). Pour une et quatre semaines de mise en présence, les valeurs sont supérieures à celles observées pour 2 équivalents (avec tout de même plus de 80 % du 5-oxofructose extrait après quatre semaines). Dans l'ensemble, le temps de mise en contact semble dans ce cas être un facteur plus important que l'augmentation du nombre d'équivalents d'agent d'extraction ; les valeurs à quatre semaines pour 2 et 10 équivalents vont dans ce sens.

VI.1.1.5 Mesure du dioxyde de soufre sous agitation

Les dosages du dioxyde de soufre restant dans le milieu sont effectués par la méthode de Ripper.¹³⁷ Les résultats des mesures sont présentés sur le graphique 21.



Graphique 21 : Evolution des quantités de dioxyde de soufre libre et combiné présentes dans un vin de Sauternes 2000 en fonction du temps et du nombre d'équivalents de PP22

Les résultats correspondant aux quatre semaines d'extraction sont présentés sur ce graphique. Chaque bloc de l'histogramme représente une semaine supplémentaire de mise en contact.

L'analyse des dosages sur l'échantillon témoin de chaque série permet de noter qu'il n'y a pas eu d'évolution irrégulière du vin au cours des trois premières semaines. Les quantités de dioxyde de soufre libre et combiné restent assez constantes d'une semaine à l'autre. Au bout de la quatrième semaine, une diminution de 50 mg.l⁻¹ de la quantité de dioxyde de soufre dans le vin témoin est observée. De manière générale, les quantités de SO₂ totales diminuent par

¹³⁷ Ripper M. Die schweflige Säure im Weine und deren Bestimmung *J. Prakt. Chem.*, **1892**, 46, 428-473

rapport à la quantité initiale (de l'ordre de 400 mg.l^{-1}). Il semblerait qu'une oxydation du vin, de nature chimique ou microbiologique, se soit produite. Les très fortes teneurs en éthanal (environ 150 mg.l^{-1}) vont dans ce sens. D'autre part, l'agitation des flacons a pu entraîner une légère surpression dans l'espace de tête et favoriser un appauvrissement du milieu en SO_2 , les flacons utilisés n'étant pas parfaitement étanches. Les flacons témoins permettent donc de tenir compte de l'évolution du vin.

Lorsqu'il y a 2 équivalents d'agent d'extraction dans le vin, l'augmentation du temps de mise en contact est assez sensible sur les quantités de dioxyde de soufre dans le milieu. Plus le temps augmente, plus la quantité de dioxyde de soufre totale diminue. La fraction de dioxyde de soufre libre diminue aussi à mesure que le temps passe. Lorsque l'on considère les résultats des mesures effectuées avec 6 et 10 équivalents d'agent d'extraction dans le milieu, nous parvenons aux mêmes conclusions.

De façon générale, on observe que, plus la quantité d'agent d'extraction augmente, plus la quantité totale de dioxyde de soufre diminue. La quantité de dioxyde de soufre libre reste dans une large fourchette (entre 20 et 78 mg.l^{-1}), excepté pour l'échantillon traité avec 10 équivalents d'agent d'extraction pendant quatre semaines où la valeur est de 10 mg.l^{-1} , alors que la quantité de dioxyde de soufre combiné est la plus faible. Ceci est observable sur tous les échantillons traités.

VI.1.1.6 Bilan de l'extraction sous agitation

L'influence des équilibres entre eux avait été avancée comme pouvant entraîner des changements de comportement des agents d'extraction sur support par rapport à ce qui avait été observé dans les milieux modèles. Les résultats des extractions faites sur le vin semblent confirmer cette hypothèse. On observe que les extractions ne donnent pas les mêmes résultats en milieu modèle monocomposé et en milieu réel. Les extractions sont plus efficaces dans le vin que dans les solutions modèles.

La diminution au cours du temps du dioxyde de soufre libre alors que les quantités de dérivés carbonylés n'évoluent plus tend à montrer également que c'est la forme libre du dioxyde de soufre qui est piégée par la phénylsulfonylhydrazine. La réactivité du SO_2 avec

l'hydrazine a été très peu étudiée.^{138,139} La formation d'adduits entre le dioxyde de soufre et des hydrazines bisubstituées a été observée, mais dans des conditions expérimentales différentes de celles mises en œuvre pour cette étude.¹⁴⁰ On peut néanmoins supposer qu'une fraction des fonctions portées par le support soit protonée (milieu acide) et qu'il se forme un complexe acide-base de Lewis avec l'ion HSO_3^- .



Schéma 69 : Réaction entre le dioxyde de soufre et la phénylsulfonylhydrazine sur support

La fonction obtenue correspondrait à l'acide sulfinamique $\text{R}-\text{NH}-\text{SO}_2\text{H}$ fixé sur support. Ce composé peut être synthétisé par condensation directe d'une amine et du dioxyde de soufre.^{141,142} Ce corps en présence d'eau doit se transformer en amine et anhydride sulfureux car il présente une faible stabilité. Néanmoins, on peut supposer que le caractère hétérogène du milieu a une influence sur la stabilité du composé ainsi formé.

Le tableau 2 présente un bilan matière comparant après 4 semaines de mise en contact les quantités de dérivés disparues, la quantité de dioxyde de soufre qui a disparu du milieu et les fonctions extractives disponibles sur le support.

¹³⁸ Audrieth L. F., Ogg B. A. *The chemistry of hydrazine*. New York : John Wiley & Sons, Inc., **1951**, 223 p.

¹³⁹ Budkuley J. S. Thermoanalytical properties of hydrazinium sulfite monohydrate *Asian Journal of chemistry*, **1992**, 4(4), 818-822

¹⁴⁰ Kanamueller J. M. Sulfur dioxide adducts of some disubstituted hydrazine *J. Inorg. Nucl. Chem.*, **1971**, 33, 4051-4055

¹⁴¹ Michaelis A., Ruhl J. Ueber anorganische Derivate des Phenylhydrazins *Chem. Ber.*, **1890**, 23, 474-477

¹⁴² Michaelis A., Storbeck O. Die Thionylamine der aliphatischen Reihe *Justus Liebigs, Annalen der Chemie*, **1893**, 274, 187-197

Mesures	Nombre d'équivalents d'agent d'extraction mis en œuvre		
	2 équivalents	6 équivalents	10 équivalents
Dérivés carbonylés extraits (mmol)	0,36	0,43	0,43
Dioxyde de soufre extrait (mmol)	0,09	0,17	0,21
Fonctions disponibles sur le support (mmol)	1	3	5
Fonctions utilisées sur le support (mmol)	0,45	0,60	0,64
Taux d'utilisation du support (%)	45	20	13

Tableau 28 : Bilan de l'efficacité de l'extraction du support PP22 après quatre semaines sous agitation

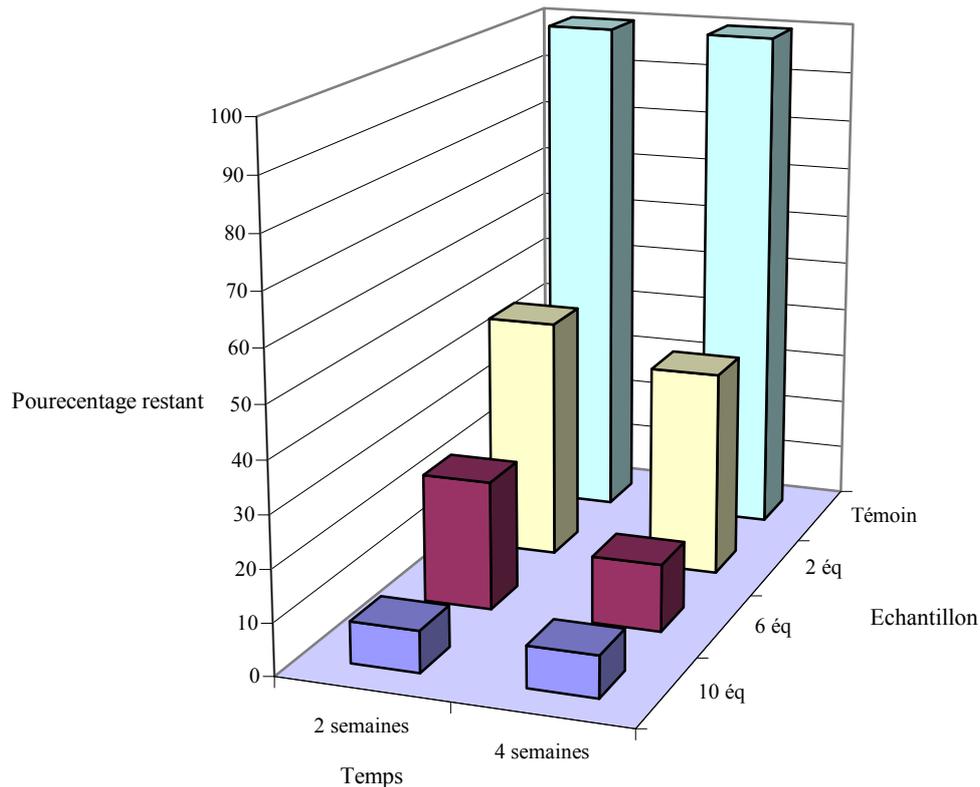
Le tableau 28 montre que 45 % des fonctions supportées sont utilisées lorsqu'il y a 2 équivalents d'agents d'extraction. Ce taux d'utilisation tombe à 20 % lorsqu'il y a 6 équivalents et 13 % lorsqu'il y a 10 équivalents. L'amélioration de l'efficacité du piégeage n'est pas proportionnelle au nombre d'équivalent d'agent d'extraction additionné au vin.

VI.1.2 Extraction sans agitation

Dans l'hypothèse d'une application en œnologie, il semblait intéressant de vérifier si l'extraction pouvait être réalisée en l'absence d'agitation. Quatre flacons ont reçu une quantité de 80 ml de vin de Sauternes 2000 supplémenté en dioxyde de soufre, un flacon servant de témoin et 3 flacons contenant respectivement 2, 6 et 10 équivalents d'agent d'extraction par rapport aux dérivés carbonylés présents. Ces flacons ont été laissés sans agitation durant 4 semaines. Une mesure intermédiaire des dérivés carbonylés restant dans le milieu a été faite au bout de 2 semaines.

VI.1.2.1 Extraction de l'éthanal sans agitation

Les résultats de l'extraction de l'éthanal sont présentés sur le graphique 22.

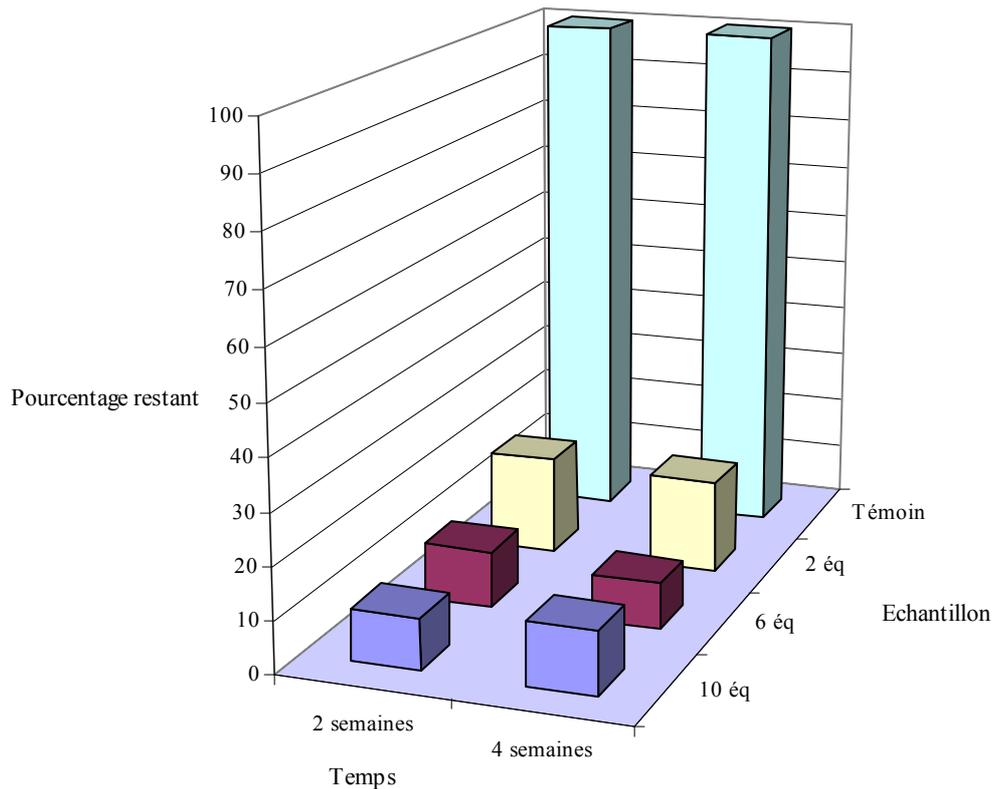


Graphique 22 : Extraction par PP22 sans agitation de l'éthanal dans un vin de Sauternes 2000 en fonction du temps et du nombre d'équivalents

Le graphique montre que le temps a peu d'influence sur la qualité de l'extraction. En présence de 2 équivalents d'agent d'extraction dans le milieu, 45 % de l'éthanal est ôté du vin. Avec 6 équivalents, l'extraction est de l'ordre de 80 % et passe à 90 % pour 10 équivalents d'agent d'extraction. Ces valeurs sont proches de celles observées sous agitation, la valeur mesurée dans le cas de 2 équivalents étant un peu plus faible.

VI.1.2.2 Extraction de l'acide pyruvique sans agitation

Le graphique 23 montre l'extraction de l'acide pyruvique sans agitation.

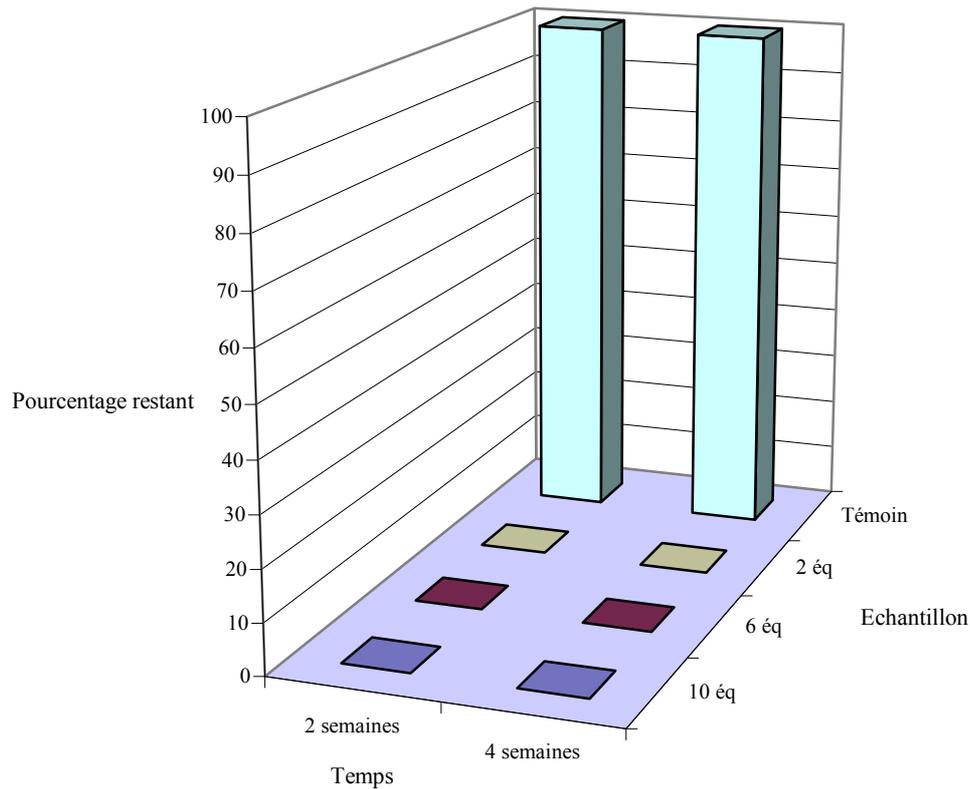


Graphique 23 : Extraction par PP22 sans agitation de l'acide pyruvique dans un vin de Sauternes 2000 en fonction du temps et du nombre d'équivalents

Les mesures montrent que le temps n'a aucune influence sur l'extraction, les deux courbes se confondant pratiquement. Lorsqu'il y a 2 équivalents d'agent d'extraction dans le milieu, 80 % de l'acide pyruvique est extrait. Avec 6 équivalents dans le milieu, l'extraction monte à 90 %, cette valeur restant inchangée lorsque l'on passe à 10 équivalents. Il n'est pas nécessaire dans ce cas d'ajouter plus de 6 équivalents d'agent d'extraction dans le vin. Ces valeurs sont les mêmes que celles obtenues sous agitation.

VI.1.2.3 Extraction de l'acide 2-oxoglutarique sans agitation

Les mesures de l'acide 2-oxoglutarique sont présentées sur le graphique 24.

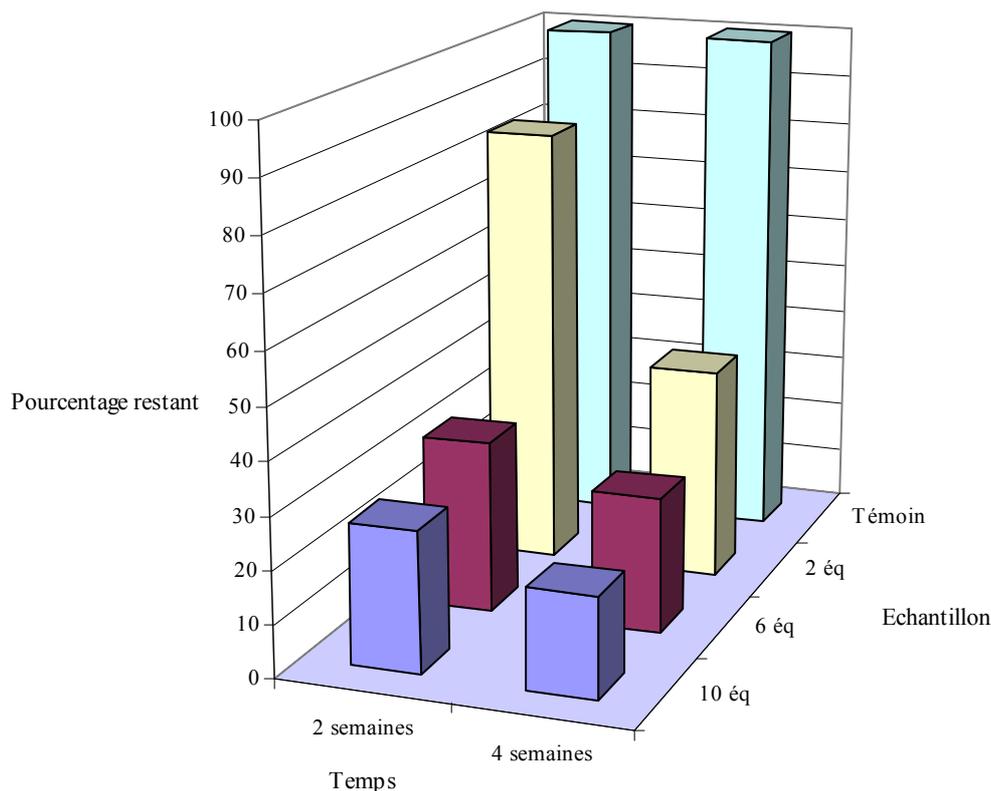


Graphique 24 : Extraction par PP22 sans agitation de l'acide 2-oxoglutarique dans un vin de Sauternes 2000 en fonction du temps et du nombre d'équivalents

Le graphique 24 montre qu'après deux semaines l'extraction est totale dès l'ajout de 2 équivalents d'agent d'extraction dans le milieu, comme lorsque l'extraction se fait sous agitation. L'augmentation du temps de mise en contact ou du nombre d'équivalent n'apporte aucune amélioration. Dans ce cas, l'extraction totale de l'acide 2-oxoglutarique demande peu d'agent d'extraction et une mise en contact très brève, l'extraction se faisant par simple diffusion des composés dans le vin.

VI.1.2.4 Extraction du 5-oxofructose sans agitation

Les mesures des quantités de 5-oxofructose restant dans le milieu après extraction sont présentées sur le graphique 25.

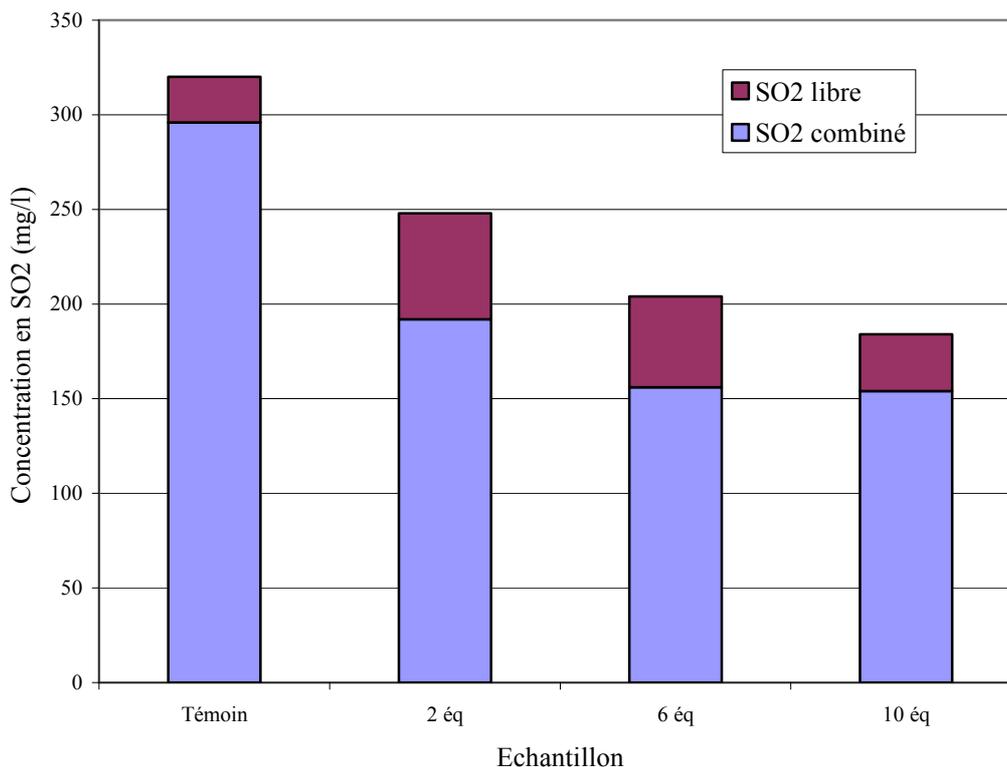


Graphique 25 : Extraction par PP22 sans agitation du 5-oxofructose dans un vin de Sauternes 2000 en fonction du temps et du nombre d'équivalents

Les mesures montrent que dans ce cas, l'augmentation du temps de mise en présence n'est significative que pour 2 équivalents d'agent d'extraction. Entre deux et quatre semaines, l'extraction passe de 15 % à 60 % de 5-oxofructose extrait. Les valeurs pour 6 et 10 équivalents s'améliorent de 5 % environ avec deux semaines de mise en contact supplémentaires, pour atteindre respectivement 75 % et 80 % d'extraction. Ces valeurs sont moins bonnes que lorsque le milieu est agité. On note en l'absence d'agitation une différence de 20 % de la qualité de l'extraction entre 2 et 10 équivalents.

VI.1.2.5 Mesure du dioxyde de soufre sans agitation

Les quantités de vin et d'agent d'extraction à disposition ne nous ont pas permis de faire une mesure intermédiaire du dioxyde de soufre à deux semaines. Les mesures des quantités de dioxyde de soufre libre et combiné restant dans le milieu après quatre semaines de mise en contact sont présentées sur le graphique 26.



Graphique 26 : Evolution des quantités de dioxyde de soufre libre et combiné présentes dans un vin de Sauternes 2000 en fonction du nombre d'équivalents de PP22 après quatre semaines

Les résultats montrent une évolution notable du taux de dioxyde de soufre présent dans le milieu en absence d'agitation. L'utilisation d'un témoin permet d'observer que, comme sous agitation, le milieu subit une forte oxydation au bout de quatre semaines, entraînant une importante diminution de la concentration totale en dioxyde de soufre par rapport à la concentration initiale (320 mg.l^{-1} au lieu de 400 mg.l^{-1} mis au départ). De cette façon il est possible de déterminer la fraction de dioxyde de soufre réellement piégée par l'agent d'extraction. La quantité de dioxyde de soufre libre augmente un peu dans le vin traité par le support par rapport au témoin, passant de 24 mg.l^{-1} à 56 mg.l^{-1} pour 2 équivalents, et diminuant ensuite progressivement à 48 mg.l^{-1} pour 6 équivalents et 30 mg.l^{-1} pour 10 équivalents. La quantité de dioxyde de soufre combiné diminue de 100 mg.l^{-1} entre le témoin et 2 équivalents d'agent d'extraction, atteignant 190 mg.l^{-1} . La quantité de dioxyde de soufre sous forme combinée passe à 155 mg.l^{-1} avec 6 équivalents d'agent d'extraction dans le vin.

Lorsqu'il y a 10 équivalents d'agent d'extraction, il n'y a pas d'évolution significative par rapport à 6 équivalents.

VI.1.2.6 Bilan de l'extraction sans agitation

Les résultats des différentes mesures montrent que l'extraction sans agitation est aussi efficace que lorsque le milieu est agité. Cette extraction sans agitation semble donc être préférable pour la mise en œuvre du procédé. D'une part, ceci permet une utilisation simple de l'agent d'extraction. Le support est placé dans le vin et la réaction se réalise par diffusion dans la solution. D'autre part, l'extraction sans agitation permet de diminuer les risques d'altération des supports : l'agitation peut entraîner une fragilisation des supports par les chocs répétés et serait susceptible d'induire une pollution du vin par la présence de particules perdues par les supports.

Le tableau 29 présente un bilan matière comparant après 4 semaines de mise en contact les quantités de dérivés carbonylés disparues, la quantité de dioxyde de soufre qui a disparu du vin et les fonctions extractives disponibles sur le support.

Mesures	Nombre d'équivalents d'agent d'extraction mis en œuvre		
	2 équivalents	6 équivalents	10 équivalents
Dérivés carbonylés extraits (mmol)	0,35	0,44	0,46
Dioxyde de soufre extrait (mmol)	0,09	0,15	0,17
Fonctions disponibles sur le support (mmol)	1	3	5
Fonctions utilisées sur le support (mmol)	0,44	0,59	0,63
Taux d'utilisation du support (%)	44	20	12

Tableau 29 : Bilan de l'efficacité de l'extraction du support PP22 après quatre semaines sans agitation

Le tableau montre que lorsque 2 équivalents d'agent d'extraction sont présents dans le milieu, le support est utilisé à 44 %, valeur comparable à celle mesurée sous agitation (45 %). Dans les deux autres cas, le support est également utilisé dans les mêmes proportions que lors de l'extraction sous agitation. De façon plus générale, on constate que plus il y a de support dans le milieu, moins son rendement d'utilisation est élevé, comme lorsque les échantillons étaient agités.

VI.1.3 Bilan des extractions en utilisant le support PP22

Le tableau 30 présente un bilan comparé des extractions avec et sans agitation.

Composés mesurés	Concentrations des composés restant dans le vin de Sauternes 2000							
	Mesures sous agitation après 4 semaines (2 semaines)				Mesures sans agitation après 4 semaines (2 semaines)			
	Témoin	2 éq	6 éq	10 éq	Témoin	2 éq	6 éq	10 éq
Ethanal (mg.l ⁻¹)	141(152)	51(53)	14(17)	13(12)	149(150)	60(70)	20(38)	13(13)
Acide pyruvique (mg.l ⁻¹)	104(122)	18(22)	9(11)	8(9)	125(122)	23(23)	12(14)	15(12)
Acide 2-oxoglutarique (mg.l ⁻¹)	90(99)	0(12)	0(0)	0(0)	93(91)	0(0)	0(0)	0(0)
5-oxofructose (mg.l ⁻¹)	133(122)	17(34)	24(29)	17(16)	128(117)	52(99)	33(39)	24(30)
SO ₂ total (mg.l ⁻¹)	300(350)	228(268)	160(212)	128(172)	320	248	204	184
SO ₂ libre (mg.l ⁻¹)	20(26)	40(58)	24(44)	10(24)	24	56	48	30

Tableau 30 : Mesures des quantités de dérivés carbonylés et dioxyde de soufre restant après extractions par le support PP22 dans un vin de Sauternes 2000

Les résultats montrent que l'extraction des dérivés carbonylés présents dans un vin en utilisant le support PP22 se déroule aussi bien sous agitation que sans agitation. L'extraction

sans agitation est donc à préférer pour des raisons de simplicité d'application et de limitation de la pollution de la solution par les supports. Les mesures montrent une diminution significative des dérivés carbonylés et du dioxyde de soufre présents dans le milieu dès l'ajout de 2 équivalents d'agent d'extraction. Il est donc envisageable dans le cas de ce support d'utiliser une faible quantité de support, présentant une efficacité de l'ordre de 45 %.

A partir de la relation (4) du chapitre I, on obtient une formule permettant de calculer la quantité de SO₂ combiné par un dérivé carbonylé en fonction de sa constante de dissociation (K_d). La formule est la suivante :

$$[SO_2 c]_{(A)} = \left(\frac{\frac{[SO_2 l]}{64} * \frac{[A]}{M(A)}}{K_d + \frac{[SO_2 l]}{64}} \right) * 64 \quad (8)$$

Où [A] est la concentration en solution du dérivé carbonylé A, M(A) la masse molaire du dérivé carbonylé A, [SO₂ l] la concentration en SO₂ libre mesurée par la méthode de Ripper, K_d la constante de dissociation (valeur donnée chapitre II) du dérivé carbonylé A et [SO₂ c]_(A) la concentration en SO₂ combiné lié au dérivé carbonylé A.

La concentration en SO₂ total est mesurée par la méthode de Ripper. Connaissant le K_d de chaque dérivé carbonylé, la concentration en SO₂ libre et la concentration de chaque dérivé carbonylé considéré dans le milieu, cette formule permet d'accéder à la concentration du SO₂ combiné à chacun des dérivés carbonylés. Cette formule est appliquée aux quatre dérivés carbonylés que l'on cherche à extraire du vin. La somme de ces quatre valeurs permet d'accéder à la valeur du SO₂ combiné par ces quatre composés (l'éthanal, l'acide pyruvique, l'acide 2-oxoglutarique et le 5-oxofructose). En comparant cette valeur avec celle du SO₂ combiné total, on accède au pourcentage de SO₂ combiné lié à ces quatre composés. Les résultats obtenus pour les différentes extractions sont comparés avec les valeurs initiales, c'est-à-dire avant l'oxydation du milieu. Le SO₂ total est de 400 mg.l⁻¹ et le SO₂ libre de l'ordre de 27 mg.l⁻¹. Les calculs sont rassemblés dans le tableau 31.

SO ₂	Avec agitation				Sans agitation			
	Initial	2 éq	6 éq	10 éq	Initial	2 éq	6 éq	10 éq
Combiné total	373	188	136	118	373	192	156	154
Combiné par les 4 composés extraits	288	86	28	22	288	111	40	30
% combiné par les 4 composés extraits	77	46	20	19	77	58	26	19

Tableau 31 : Dioxyde de soufre combiné dans un vin de Sauternes 2000 après quatre semaines d'extraction par le support PP22

Ces calculs montrent que les quatre dérivés carbonylés considérés dans cette étude sont effectivement majoritairement responsables du SO₂ combiné sur le mélange initial. Ils montrent la justesse de la sélection de ces quatre molécules comme responsables de la plus grande partie de la combinaison du SO₂. Lorsque les quatre dérivés carbonylés sont extraits, la quantité de SO₂ combiné diminue, ce qui était l'objectif de cette étude. La quantité de SO₂ combiné par les autres dérivés carbonylés présents dans le vin reste du même ordre de grandeur à mesure que les quatre dérivés carbonylés sont extraits (entre 81 et 124 mg.l⁻¹), compte tenu des erreurs de mesures dues à la méthode employée. L'oxydation des échantillons peut également avoir une incidence sur les écarts mesurés.

VI.2 Extraction par le support PP23

Le deuxième support testé, à base de polystyrène réticulé avec du divinylbenzène, est le support PP23, présentant un taux de gonflement de 0,4 ml.g⁻¹ dans une solution eau-éthanol (pourcentages en volumes : 88-12). Son taux de fonctionnalisation est de 3,8 mmol.g⁻¹.

VI.2.1 Extraction sous agitation

L'étude sur l'influence du temps de mise en contact et du nombre d'équivalent d'agent d'extraction a porté sur le même vin de Sauternes 2000 supplémenté en dioxyde de soufre. Quatre séries rigoureusement identiques ont été préparées. Chaque série se compose de 4

flacons contenant chacun 80 ml de vin. Un flacon sert de témoin, pour tenir compte d'une éventuelle évolution du vin au cours du temps. Les autres flacons reçoivent respectivement 2, 6 et 10 équivalents d'agent d'extraction par rapport à la quantité de dérivés carbonylés présents. Les compositions des séries sont rassemblées dans le tableau 32.

Nature de l'échantillon	SO ₂ Total mesuré (en mg.l ⁻¹)	Quantité de dérivés carbonylés (en mmol présents dans 80 ml)	Masse de support (en g.l ⁻¹)	Quantité de fonctions extractives supportées (en mmol pour 80 ml)
Témoin	371	0,5	0	0
2 équivalents d'agent d'extraction	371	0,5	3	1
6 équivalents d'agent d'extraction	371	0,5	9	3
10 équivalents d'agent d'extraction	371	0,5	15	5

Tableau 32 : Quantités de support PP23 placés dans un vin de Sauternes 2000

Les 4 séries sont placées ensemble sur un agitateur rotatif par culbutage tournant à 9 tours.min⁻¹. Au terme de chaque semaine, une série est arrêtée et les quantités de dérivés carbonylés présents sont mesurées. Les résultats des extractions sont très proches de ceux obtenus pour le support PP22. Les graphiques sont présentés en annexe 1. On peut noter que les échantillons à l'ouverture des flacons présentent une odeur sulfitée.

Le tableau 33 présente un bilan de matière comparant après 4 semaines de mise en contact les quantités de dérivés carbonylés disparues, et la quantité de dioxyde de soufre qui a disparu du milieu et les fonctions extractives disponibles sur le support.

Mesures	Nombre d'équivalents d'agent d'extraction mis en œuvre		
	2 équivalents	6 équivalents	10 équivalents
Dérivés carbonylés extraits (mmol)	0,12	0,26	0,36
Dioxyde de soufre extrait (mmol)	0,06	0,17	0,23
Fonctions disponibles sur le support (mmol)	1	3	5
Fonctions utilisées sur le support (mmol)	0,18	0,43	0,59
Taux d'utilisation du support (%)	17	14	12

Tableau 33 : Bilan de l'efficacité de l'extraction du support PP23 après quatre semaines sous agitation

Les mesures montrent une faible utilisation du support (environ 17 %), mais celle-ci est régulière, quelque soit le nombre d'équivalent. Ce qui signifie que l'extraction s'améliore progressivement avec le nombre d'équivalent d'agent d'extraction dans la solution.

VI.2.2 Extraction sans agitation

L'extraction en l'absence d'agitation a été faite en utilisant ce support. Quatre flacons ont reçu une quantité de 80 ml de vin de Sauternes 2000 supplémenté en dioxyde de soufre, un flacon servant de témoin et 3 flacons contenant respectivement 2, 6 et 10 équivalents d'agent d'extraction par rapport aux dérivés carbonylés présents. Ces flacons ont été laissés sans agitation durant 4 semaines. Une mesure intermédiaire des dérivés carbonylés restant dans le milieu a été faite au bout de 2 semaines. L'extraction sans agitation en utilisant le support PP23 donne également de bons résultats. L'augmentation du temps de mise en contact améliore la qualité de l'extraction. Les graphiques sont présentés en annexe 1. On note qu'en fin de traitement le vin présente une odeur sulfitée à l'ouverture des flacons.

Le tableau 34 présente un bilan de matière comparant après 4 semaines de mise en contact les quantités de dérivés carbonylés disparues, la quantité de dioxyde de soufre qui a disparu du milieu et les fonctions extractives disponibles sur le support.

Mesures	Nombre d'équivalents d'agent d'extraction mis en œuvre		
	2 équivalents	6 équivalents	10 équivalents
Dérivés carbonylés extraits (mmol)	0,17	0,30	0,36
Dioxyde de soufre extrait (mmol)	0,06	0,14	0,22
Fonctions disponibles sur le support (mmol)	1	3	5
Fonctions utilisées sur le support (mmol)	0,23	0,44	0,58
Taux d'utilisation du support (%)	23	15	11

Tableau 34 : Bilan de l'efficacité de l'extraction du support PP23 après quatre semaines sans agitation

Les mesures montrent que dans le cas de l'extraction sans agitation, le taux d'utilisation du support varie. Lorsqu'il y a 2 équivalents d'agent d'extraction, son utilisation est plus importante sans agitation qu'avec agitation (23 % contre 17 %). Elle diminue faiblement pour 6 équivalents (14 % contre 15 %) et pour 10 équivalents (11 % contre 13 %). La moyenne de l'utilisation du support reste tout de même faible.

VI.2.3 Bilan des extractions utilisant le support PP23

Le tableau 35 présente un bilan comparé des extractions avec et sans agitation.

Composés mesurés	Concentrations des composés restant dans le vin de Sauternes 2000							
	Mesures sous agitation après 4 semaines (2 semaines)				Mesures sans agitation après 4 semaines (2 semaines)			
	Témoin	2 éq	6 éq	10 éq	Témoin	2 éq	6 éq	10 éq
Ethanal (mg.l ⁻¹)	146(154)	135(130)	97(113)	50(74)	149(138)	119(120)	88(88)	63(72)
Acide pyruvique (mg.l ⁻¹)	124(111)	122(109)	44(58)	20(16)	120(88)	113(87)	34(40)	21(25)
Acide 2-oxoglutarique (mg.l ⁻¹)	102(90)	1(0)	0(0)	0(0)	103(96)	0(0)	1(0)	5(0)
5-oxofructose (mg.l ⁻¹)	106(120)	29(40)	30(34)	32(37)	133(108)	37(34)	39(34)	33(29)
SO ₂ total (mg.l ⁻¹)	348(388)	304(316)	216(236)	164(212)	356	312	244	184
SO ₂ libre (mg.l ⁻¹)	24(26)	30(44)	28(44)	30(30)	24	32	42	30

Tableau 35 : Mesures des quantités de dérivés carbonylés et dioxyde de soufre restant après extractions par le support PP23 dans un vin de Sauternes 2000

Les résultats montrent que lorsque l'on utilise le support PP23 comme agent d'extraction, les résultats sont proches avec et sans agitation du milieu. Il est donc possible avec ce support de privilégier également l'utilisation sans agitation du milieu. Pour obtenir une diminution significative des composés présents dans le vin il est nécessaire de placer 6 équivalents d'agent d'extraction dans le milieu (contre 2 équivalents dans le cas du support PP22) et le taux d'efficacité des supports est moindre (entre 23 et 11 % contre une utilisation entre 45 et 12 %).

Les résultats des calculs des quantités de SO₂ combiné sont présentés dans le tableau 36.

SO ₂	Avec agitation				Sans agitation			
	Initial	2 éq	6 éq	10 éq	Initial	2 éq	6 éq	10 éq
Combiné total	373	274	188	134	373	280	202	154
Combiné par les 4 composés extraits	288	255	164	88	288	231	154	106
% combiné par les 4 composés extraits	77	93	87	66	77	82	76	69

Tableau 36 : Dioxyde de soufre combiné dans un vin de Sauternes 2000 après quatre semaines d'extraction par le support PP23

Ces résultats montrent que dans le cas du support PP23, les pourcentages des combinaisons dues à ces quatre molécules restent toujours majoritaires (entre 93 % et 66 %), contrairement au PP22. Ces mesures mettent en évidence le problème de l'oxydation des échantillons et de la perte progressive du dioxyde de soufre qui apparaît très clairement sur le graphique 31 en annexe 1. Les teneurs en SO₂ diminuent moins dans le cas de l'utilisation de ce support PP23.

La fonction phénylsulfonylhydrazine semble être un agent d'extraction moins efficace une fois greffé sur le support PP23 que sur le support PP22.

VI.3 Extraction par le support PP24

Le troisième support testé, à base de polystyrène réticulé avec du divinylbenzène, est le support PP24, présentant un taux de gonflement de 0,7 ml.g⁻¹ dans une solution eau-éthanol (pourcentages en volumes : 88-12). Son taux de fonctionnalisation est de 3,3 mmol.g⁻¹.

VI.3.1 Extraction sous agitation

L'étude sur l'influence du temps de mise en contact et du nombre d'équivalent d'agent d'extraction a porté sur le même vin de Sauternes 2000 supplémenté en dioxyde de soufre.

Quatre séries rigoureusement identiques ont été préparées. Chaque série se compose de 4 flacons contenant chacun 80 ml de vin. Un flacon sert de témoin, pour tenir compte d'une éventuelle évolution du vin au cours du temps. Les autres flacons reçoivent respectivement 2, 6 et 10 équivalents d'agent d'extraction par rapport à la quantité de dérivés carbonylés présents. Les compositions des séries sont rassemblées sur le tableau 37.

Nature de l'échantillon	SO ₂ Total mesuré (en mg.l ⁻¹)	Quantité de dérivés carbonylés (en mmol présents dans 80 ml)	Masse de support (en g.l ⁻¹)	Quantité de fonctions extractives supportées (en mmol pour 80 ml)
Témoin	371	0,5	0	0
2 équivalents d'agent d'extraction	371	0,5	3,3	1
6 équivalents d'agent d'extraction	371	0,5	9,9	3
10 équivalents d'agent d'extraction	371	0,5	16,6	5

Tableau 37 : Quantités de support PP24 placés dans un vin de Sauternes 2000

Les 4 séries sont placées ensemble sur un agitateur rotatif par culbutage tournant à 9 tours par minutes. Au terme de chaque semaine, une série est arrêtée et les quantités de dérivés carbonylés présents sont mesurées. Comme avec les deux autres supports de type polymère, le support PP24 présente une extraction plus efficace dans le vin que dans les solutions modèles monocomposés. Les graphiques correspondant à ces extractions sont présentés en annexe 2. Dans le cas de ce support PP24, les qualités du vin semblent avoir été modifiées par l'extraction. Les échantillons à l'ouverture des flacons présentent une odeur forte sulfitée, qui persiste au cours du temps.

Le tableau 38 présente un bilan de matière comparant après 4 semaines de mise en contact les quantités de dérivés carbonylés disparues, la quantité de dioxyde de soufre disparu du milieu et les fonctions extractives disponibles sur le support.

Mesures	Nombre d'équivalents d'agent d'extraction mis en œuvre		
	2 équivalents	6 équivalents	10 équivalents
Dérivés carbonylés extraits (mmol)	0,32	0,44	0,45
Dioxyde de soufre extrait (mmol)	0,07	0,11	0,13
Fonctions disponibles sur le support (mmol)	1	3	5
Fonctions utilisées sur le support (mmol)	0,39	0,55	0,58
Taux d'utilisation du support (%)	39	18	12

Tableau 38 : Bilan de l'efficacité de l'extraction du support PP24 après quatre semaines sous agitation

Les mesures montrent que lorsque l'on a 2 équivalents d'agent d'extraction, le taux d'utilisation du support atteint 39 %. Il tombe ensuite rapidement pour atteindre 18 % lorsqu'il y a 6 équivalents et 12 % avec 10 équivalents.

Des variations importantes des quantités de dioxyde de soufre libre et combiné dans le vin ont été observées lors de ces mesures. L'oxydation des différents échantillons est très apparente dans ce cas, lorsqu'on observe le graphique 41 en annexe 2. Les échantillons présentaient une odeur suffocante de dérivés soufrés. Il semblerait que sur cette série de mesures, une certaine dégradation du milieu ce soit faite. Les échantillons témoins présentant également une certaine altération, celle-ci n'est pas due à l'utilisation du support fonctionnalisé. Ceci pourrait être au problème de surpression de l'espace de tête déjà évoqué pour le support PP22. La diminution des quantités de SO₂ peut être imputable à une fuite au niveau des bouchons des flacons utilisés.

VI.3.2 Extraction sans agitation

L'extraction sans agitation a également été mise en œuvre en utilisant le support PP24. Quatre flacons ont reçu une quantité de 80 ml de vin de Sauternes 2000 supplémenté en dioxyde de soufre, un flacon servant de témoin et 3 flacons contenant respectivement 2, 6 et

Chapitre VI : Extraction dans un vin blanc liquoreux

10 équivalents d'agent d'extraction par rapport aux dérivés carbonylés présents. Ces flacons ont été laissés sans agitation durant 4 semaines. Une mesure intermédiaire des dérivés carbonylés restant dans le milieu a été faite au bout de 2 semaines. Les graphiques des extractions sont présentés en annexe 2.

Dans le cas de l'extraction des dérivés carbonylés et du dioxyde de soufre en utilisant le support PP24, on observe une influence du temps de mise en présence sur la qualité de l'extraction, contrairement à l'extraction sous agitation. L'extraction se fait plus progressivement. Les résultats au bout des quatre semaines restent tout de même proches de ceux obtenus sous agitation.

Le tableau 39 présente un bilan de matière comparant après 4 semaines de mise en contact les quantités de dérivés carbonylés disparues, la quantité de dioxyde de soufre qui a disparu du milieu et les fonctions extractives disponibles sur le support.

Mesures	Nombre d'équivalents d'agent d'extraction mis en œuvre		
	2 équivalents	6 équivalents	10 équivalents
Dérivés carbonylés extraits (mmol)	0,38	0,45	0,47
Dioxyde de soufre extrait (mmol)	0,08	0,12	0,15
Fonctions disponibles sur le support (mmol)	1	3	5
Fonctions utilisées sur le support (mmol)	0,46	0,57	0,62
Taux d'utilisation du support (%)	46	19	12

Tableau 39 : Bilan de l'efficacité de l'extraction du support PP24 après quatre semaines sans agitation

Les mesures montrent que le taux d'utilisation du support est de l'ordre de 46 % lorsqu'il y a 2 équivalents d'agent d'extraction dans le milieu, ce qui est supérieur à ce que l'on observe sous agitation (37 %). On retrouve ensuite pour 6 et 10 équivalents des taux d'utilisation comparables avec ceux observés sous agitation.

VI.3.3 Bilan des extractions utilisant le support PP24

Le tableau 40 présente un bilan comparé des extractions avec et sans agitation.

Composés mesurés	Concentrations des composés restant dans le vin de Sauternes 2000							
	Mesures sous agitation après 4 semaines (2 semaines)				Mesures sans agitation après 4 semaines (2 semaines)			
	Témoin	2 éq	6 éq	10 éq	Témoin	2 éq	6 éq	10 éq
Ethanal (mg.l ⁻¹)	153(153)	75(67)	14(15)	12(8)	187(116)	73(79)	39(42)	30(23)
Acide pyruvique (mg.l ⁻¹)	105(105)	25(22)	13(14)	11(13)	104(125)	27(26)	14(13)	13(13)
Acide 2-oxoglutarique (mg.l ⁻¹)	95(101)	0(2)	0(0)	0(0)	92(95)	0(13)	0(13)	0(0)
5-oxo-fructose (mg.l ⁻¹)	135(122)	38(30)	38(23)	35(33)	118(125)	36(49)	31(38)	35(35)
SO ₂ total (mg.l ⁻¹)	302(306)	242(240)	212(200)	196(204)	332	264	236	210
SO ₂ libre (mg.l ⁻¹)	16(14)	46(48)	50(56)	48(48)	20	60	58	54

Tableau 40 : Mesures des quantités de dérivés carbonylés et dioxyde de soufre restant après extractions par le support PP24 dans un vin de Sauternes 2000

On observe qu'au terme des quatre semaines, l'extraction est aussi efficace sous agitation que sans agitation du vin. Dès l'addition dans le vin de 2 équivalents d'agent d'extraction la diminution des dérivés carbonylés présents dans le milieu est importante ; la moitié de l'éthanal est extrait, ainsi que les trois-quarts de l'acide pyruvique et la totalité de l'acide 2-oxoglutarique. Le dioxyde de soufre est moins bien extrait dans ce cas, mais ceci est peut-être dû à l'oxydation du milieu que l'on a observé.

Les résultats des calculs des quantités de SO₂ combiné sont présentés dans le tableau 41.

SO ₂	Avec agitation				Sans agitation			
	Initial	2 éq	6 éq	10 éq	Initial	2 éq	6 éq	10 éq
Combiné total	373	196	162	148	373	204	178	154
Combiné par les 4 composés extraits	288	130	36	31	288	129	71	58
% combiné par les 4 composés extraits	77	66	22	21	77	63	40	38

Tableau 41 : Dioxyde de soufre combiné dans un vin de Sauternes 2000 après quatre semaines d'extraction par le support PP24

Les valeurs montrent qu'avec 2 équivalents, le taux de SO₂ combiné à ces quatre dérivés carbonylés tombe à 66 % avec agitation et 63 % sans agitation. Sous agitation elles descendent encore à 22 % et 21 % pour 6 e 10 équivalents. La diminution du SO₂ combiné due à ces dérivés carbonylés est moins importante sans agitation, les valeurs étant de 40 % pour 6 équivalents et 38 % pour 10 équivalents.

VI.4 Extraction par le support Si

Le quatrième support testé, à base de silice, est le support Si fonctionnalisé à 0,8 mmol.g⁻¹.

VI.4.1 Extraction sous agitation

L'étude sur l'influence du temps de mise en contact et du nombre d'équivalent d'agent d'extraction a porté sur un vin de Sauternes 1999 supplémenté en dioxyde de soufre. Quatre séries rigoureusement identiques ont été préparées. Chaque série se compose de 4 flacons contenant chacun 100 ml de vin. Un flacon sert de témoin, pour tenir compte d'une éventuelle évolution du vin au cours du temps. Les autres flacons reçoivent respectivement 2, 6 et 10 équivalents d'agent d'extraction par rapport à la quantité de dérivés carbonylés présents. Les compositions des séries sont rassemblées sur le tableau 42.

Nature de l'échantillon	SO ₂ Total mesuré (en mg.l ⁻¹)	Quantité de dérivés carbonylés (en mmol présents dans 100 ml)	Masse de support (en g.l ⁻¹)	Quantité de fonctions extractives supportées (en mmol pour 100 ml)
Témoin	280	0,45	0	0
2 équivalents d'agent d'extraction	280	0,45	11	0,9
6 équivalents d'agent d'extraction	280	0,45	33	2,7
10 équivalents d'agent d'extraction	280	0,45	55	4,5

Tableau 42 : Quantités de support Si placés dans un vin de Sauternes 1999

Les 4 séries sont placées ensemble sur un agitateur rotatif par culbutage tournant à 9 tours.min⁻¹. Dès l'addition, un dégagement gazeux est observé et les échantillons dégagent une odeur de thiols lorsqu'ils sont ouverts. Le dégagement gazeux est proportionnel à la quantité de support et ne dure que quelques minutes. Au terme de chaque semaine, une série est arrêtée et les quantités de dérivés carbonylés présents sont mesurées.

Les résultats des extractions par la fonction phénylsulfonylhydrazine sur support de silice sont proches de ceux obtenus pour les supports polymères. Les graphiques des extractions sont présentés en annexe 3. On peut noter une légère odeur soufrée à l'ouverture des flacons qui s'estompe à mesure que les échantillons "respirent".

Le tableau 43 présente un bilan matière comparant après 4 semaines de mise en contact la différence de dérivés carbonylés disparus, la quantité de dioxyde de soufre qui a disparu du milieu et les fonctions extractives disponibles sur le support.

Mesures	Nombre d'équivalents d'agent d'extraction mis en œuvre		
	2 équivalents	6 équivalents	10 équivalents
Dérivés carbonylés extraits (mmol)	0,14	0,32	0,39
Dioxyde de soufre extrait (mmol)	0,16	0,29	0,36
Fonctions disponibles sur le support (mmol)	0,9	2,7	4,5
Fonctions utilisées sur le support (mmol)	0,30	0,61	0,75
Taux d'utilisation du support (%)	30	23	15

Tableau 43 : Bilan de l'efficacité de l'extraction du support Si après quatre semaines sous agitation

Le taux d'utilisation des fonctions sur support Si sous agitation est assez faible. Il est de 30 % pour 2 équivalents, 23 % pour 6 équivalents et 15 % pour 10 équivalents. Une grande partie des fonctions restent donc inutilisées sur ce type de support également.

VI.4.2 Extraction sans agitation

L'extraction sans agitation a également été mise en œuvre en utilisant le support Si. Quatre flacons ont reçu une quantité de 100 ml de vin de Sauternes 1999 supplémenté en dioxyde de soufre, un flacon servant de témoin et 3 flacons contenant respectivement 2, 6 et 10 équivalents d'agent d'extraction par rapport aux dérivés carbonylés présents. Ces flacons ont été laissés sans agitation durant 4 semaines. Une mesure intermédiaire des dérivés carbonylés restant dans le milieu a été faite au bout de 2 semaines. Les graphiques correspondants à ces extractions sont rassemblés en annexe 3. On peut néanmoins noter que la faible fonctionnalisation du support contraint à utiliser de grandes quantités de ce dernier. Sans agitation, une partie de la silice est restée inutilisée au fond du flacon. En effet, en fin de réaction la silice au fond du flacon était toujours blanche alors qu'elle jaunissait au cours de la réaction. Les 10 équivalents d'agent d'extraction n'ont donc pas été utilisés dans ce cas. Ceci implique une diminution de l'efficacité de l'extraction par rapport à l'agitation, dans le cas de

la diminution du dioxyde de soufre dans le milieu. L'odeur qui se dégage des flacons à l'ouverture est beaucoup moins forte et s'estompe rapidement.

Le tableau 44 présente un bilan de matière comparant après 4 semaines de mise en contact les quantités de dérivés carbonylés disparues, la quantité de dioxyde de soufre qui a disparu du milieu et les fonctions extractives disponibles sur le support.

Mesures	Nombre d'équivalents d'agent d'extraction mis en œuvre		
	2 équivalents	6 équivalents	10 équivalents
Dérivés carbonylés extraits (mmol)	0,15	0,28	0,36
Dioxyde de soufre extrait (mmol)	0,05	0,23	0,25
Fonctions disponibles sur le support (mmol)	0,87	2,61	4,35
Fonctions utilisées sur le support (mmol)	0,20	0,51	0,61
Taux d'utilisation du support (%)	23	19	14

Tableau 44 : Bilan de l'efficacité de l'extraction du support Si après quatre semaines sans agitation

Comme sous agitation, le taux d'utilisation des supports reste assez faible. Il diminue avec le nombre d'équivalents d'agent d'extraction, passant de 23 % pour 2 équivalents à 14 % pour 10 équivalents. Ces taux sont inférieurs à ceux obtenus sous agitation.

VI.4.3 Bilan des extractions utilisant le support Si

Le tableau 45 présente un bilan comparé des extractions par le support Si portant la fonction phénylsulfonylhydrazine avec et sans agitation.

Composés mesurés	Concentrations des composés restant dans le vin de Sauternes 1999							
	Mesures sous agitation après 4 semaines (2 semaines)				Mesures sans agitation après 4 semaines (2 semaines)			
	Témoin	2 éq	6 éq	10 éq	Témoin	2 éq	6 éq	10 éq
Ethanal (mg.l ⁻¹)	112(113)	100(89)	46(45)	15(30)	118(112)	97 (96)	67 (87)	34 (63)
Acide pyruvique (mg.l ⁻¹)	91(89)	57 (55)	15(14)	10(10)	90(91)	58 (58)	17 (24)	11 (15)
Acide 2-oxoglutarique (mg.l ⁻¹)	36(36)	4(11)	0(0)	0(0)	38(33)	5 (9)	0 (0)	0 (0)
5-oxofructose (mg.l ⁻¹)	113(103)	32(41)	16(20)	15(21)	108(117)	33 (21)	15 (16)	17 (15)
SO ₂ total (mg.l ⁻¹)	324(328)	220(270)	136(154)	92 (92)	314	280	166	154
SO ₂ libre (mg.l ⁻¹)	22(30)	22(36)	20(20)	22(20)	20	28	26	26

Tableau 45 : Mesures des quantités de dérivés carbonylés et dioxyde de soufre restant après extraction par le support Si dans un vin de Sauternes 1999

Dans le cas de la phénylsulfonylhydrazine sur support de silice, on observe que les extractions sont du même ordre de grandeur avec et sans agitation. Il est nécessaire d'ajouter 6 équivalents d'agents d'extraction pour avoir une diminution notable de tous les dérivés carbonylés.

Les résultats des calculs des quantités de SO₂ combiné sont présentés dans le tableau 46.

SO ₂	Avec agitation				Sans agitation			
	Initial	2 éq	6 éq	10 éq	Initial	2 éq	6 éq	10 éq
Combiné total	302	198	116	70	302	252	140	128
Combiné par les 4 composés extraits	220	173	75	28	220	172	106	58
% combiné par les 4 composés extraits	73	87	64	40	73	68	76	45

Tableau 46 : Dioxyde de soufre combiné restant dans un vin de Sauternes 1999 après quatre semaines d'extraction par un support Si

Les valeurs obtenues montrent que le taux de combinaison du SO₂ dû à ces quatre molécules sur le témoin est moins important que sur le Sauternes 2000. De manière générale, le taux de combinaison des vins traités diminue avec le nombre d'équivalent. Les extractions avec la phénylsulfonylhydrazine sur silice sont moins efficaces dans l'ensemble que sur support polymère.

VI.5 Conclusion sur les extractions des vins blancs liquoreux

Les extractions réalisées sur les vins de Sauternes 1999 et 2000 ont été très efficaces. L'éthanal, l'acide pyruvique, l'acide 2-oxoglutarique et le 5-oxofructose sont bien extraits par la phénylsulfonylhydrazine sur support, qu'il soit de type polymère ou silice, dans les conditions imposées pour cette étude. Les extractions sont aussi efficaces sur les vins, milieux complexes, qu'elles l'avaient été sur les solutions modèles comportant un seul dérivé carbonyle après ajout de SO₂ dans le milieu. Dans certains cas, elles sont mêmes meilleures. L'hypothèse avait été avancée que les équilibres n'étaient pas indépendants les uns des autres et que la quantité totale d'agent d'extraction présent dans le milieu devait être considérée. L'interdépendance des équilibres est confirmée. On peut supposer que lorsqu'un composé est totalement éliminé du milieu, plus rapidement que d'autres en raison de sa réactivité, la quantité d'agent d'extraction non utilisé qui lui était destiné et qui reste dans le milieu influence les autres équilibres. Cette étude n'a pas permis de confirmer ou infirmer cette hypothèse.

Cet agent d'extraction permet également d'ôter du milieu réactionnel du SO₂. Si les dérivés carbonylés qui le combinent sont extraits du milieu, ce composé resterait en large excès sous forme libre et serait en partie inutile. L'objectif étant à terme de diminuer les quantités de dioxyde de soufre dans le milieu, son élimination par le support lorsqu'il devient inutile semble être un point intéressant. La réactivité du SO₂ avec l'hydrazine a été très peu étudiée. On peut supposer qu'une fraction des fonctions portées par le support sont protonées (milieu acide) et qu'il se forme un sel hydrogénosulfite d'hydrazinium avec l'ion HSO₃⁻.

On notera également que l'agitation du milieu n'est pas indispensable pour que les extractions s'effectuent. La simple diffusion permet de réaliser des extractions, un peu moins efficaces, mais qui restent du même ordre de grandeur.

VII Compléments à l'étude

VII.1 Tentative d'identification de contaminants

Parmi les critères retenus pour cette étude, la réaction mise en œuvre lors de l'extraction des dérivés carbonylés ne devait pas entraîner l'apparition de nouveaux composés dans le milieu. Afin de voir s'il était possible de vérifier ce critère, une étude de recherche d'éventuels contaminants a été effectuée à l'ENITA en collaboration avec J.-C. BARBE.

Cette étude a porté sur les solutions modèles monocomposés qui avaient été traitées avec différents supports. Ces cinq supports portent la fonction phénylsulfonylhydrazine. Trois sont des supports polymères (PP19, PP20, PP21) et deux des silices, une commerciale (Si) et une fonctionnalisée au laboratoire (Si3). Ces supports ont servi à extraire une ou plusieurs des solutions modèles.

Les solutions modèles ont été séparées en deux fractions de 40 ml. Une série de fractions a été extraite en utilisant du dichlorométhane et l'autre en utilisant de l'acétate d'éthyle. Les extraits ont été concentrés et injectés dans un appareil de chromatographie en phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse (CPG/SM) afin de faire une tentative d'identification des composés. Les résultats des analyses sont rassemblés en annexe 4.

Il en ressort que les contaminants "identifiés" dans les solutions extraites ne semblent pas provenir de réactions secondaires du support fonctionnalisé avec le milieu extrait. L'absence d'oximes dans le milieu laisse également penser que la fonction extractive reste bien attachée sur le support. Les composés apparaissant après la mise en contact des solutions avec les supports fonctionnalisés semblent plutôt être des résidus issus de la synthèse des supports.

Un traitement préalable des supports avant utilisation devrait donc permettre de faire disparaître ces traces du milieu. Il s'agit de nettoyer ces supports avant de les placer dans le milieu à extraire en utilisant un solvant dans lequel les contaminants sont très solubles, puis de les sécher avant utilisation. Les essais ont porté sur le support Si (silice) et sur le support PP20 (polymère qui présentait le plus de contaminants).

Le support Si a été placé au soxhlet avec de l'acétate d'éthyle. Ce support et le support PP20 ont ensuite été placés sur l'agitateur par culbutage dans un mélange eau-éthanol (50 : 50) et agités plusieurs jours dans le mélange régulièrement renouvelé. Après séchage, une extraction d'une solution d'acide pyruvique a été mise en œuvre avec ces supports lavés et avec les mêmes non lavés. Les solutions ont été extraites dans les mêmes conditions que précédemment et injectées dans un appareil CPG/SM. Les résultats sont présentés en annexe 5.

Dans le cas du support polymère PP20, les alcanes et les acides apparaissant sur les spectrogrammes des échantillons non lavés sont toujours présents après lavage, mais en quantités inférieures.

Dans le cas du support de silice Si, les dérivés de type silanols issus de la synthèse (provenant peut-être d'une condensation incomplète) sont en grande partie éliminés par le traitement. L'acétophénone est observée sur les deux types de colonnes. Le traitement entraîne une grande diminution de ce composé. Le lavage du support permet d'éliminer une partie des acides présents. Les alcanes repérés avant lavage ne sont plus identifiés après traitement du support.

Le traitement des supports mis en œuvre permet donc de diminuer les quantités de polluants présents. Ce traitement devra être amélioré de façon à les éliminer totalement. L'augmentation du temps de lavage des supports ou l'utilisation d'un solvant complémentaire devront être envisagées.

VII.2 Tests de dégustation et extraction d'autres vins

L'objectif de cette étude est la diminution du pouvoir de combinaison des vins blancs liquoreux. Pour ce faire, la voie retenue passe par l'extraction sélective de dérivés carbonylés naturellement présents. L'extraction se fait en utilisant une fonction greffée sur support, la phénylsulfonylhydrazine, le support pouvant être de type polymère ou de silice. Le produit après extraction étant destiné au consommateur, il est important de vérifier que la mise en œuvre de l'extraction des dérivés carbonylés n'était pas préjudiciable aux qualités organoleptiques des vins. Trois supports ont été retenus pour vérifier cela. Il s'agit de la silice

commerciale (Si) et du support PP25 préparé au laboratoire. Un support présentant les mêmes caractéristiques que ce dernier commercialisé a été ajouté à l'étude (P). Les trois supports sont présentés dans le tableau 47.

Support	Taux de fonctionnalisation par la phénylsulfonylhydrazine (mmol.g ⁻¹)	Taille des supports (diamètre en mm)
Si	0,90	0,03 – 0,05
PP25	2,80	0,10 – 0,20
P	2,04	0,15 – 0,30

Tableau 47 : Caractéristiques des supports utilisés pour les extractions dans les différents vins

VII.2.1 Vin blanc liquoreux

Un vin blanc de Sauternes 2000 a été traité par les trois supports. Après addition des supports, les bouteilles ont été laissées sans agitation, debout, à l'abri de la lumière, pendant deux semaines. Après élimination des supports par décantation, des analyses ont été faites sur ces échantillons. Les résultats sont présentés dans le tableau 48.

	Echantillon			
	Témoin	Si	PP25	P
Quantité de support (g.l ⁻¹)	0	9,9	4,1	5,7
Degré d'alcool (% vol.)	12,8	12,9	12,6	12,8
Sucres résiduels (g.l ⁻¹)	97	97	97	97
Acidité totale (g.l ⁻¹)	3,7	3,7	3,8	3,5
Acidité volatile (g.l ⁻¹)	0,79	0,75	0,70	0,70
pH	3,7	3,7	3,6	3,8
SO ₂ libre (mg.l ⁻¹)	24	38	38	40
SO ₂ total (mg.l ⁻¹)	224	228	220	204

Tableau 48 : Analyses du vin de Sauternes 2000 soumis au test de dégustation après deux semaines extractions en utilisant la phénylsulfonylhydrazine sur support polymère ou silice

Les résultats montrent que le taux de SO₂ libre a augmenté sur les vins traités, mais que le taux de SO₂ total n'a pas beaucoup évolué. Ceci correspond à ce qui a été observé sur les vins de Sauternes 2000 et 1999 avec ces mêmes supports, pour des quantités équivalentes d'agent d'extraction pendant le même temps de mise en présence. Le degré d'alcool et les sucres résiduels ne sont pas modifiés par le traitement. Une légère modification du pH et des acidités est observée, sans que les valeurs soient excessives.

Une fois débarrassés des supports, les teneurs en dioxyde de soufre libre des vins sont ajustées à la valeur de 40 mg.l⁻¹. Une dégustation est ensuite organisée de manière à déterminer si des différences significatives existent entre les vins. Pour cela trois dégustations triangulaires sont organisées. Un jury de 18 dégustateurs entraînés est réuni pour cela. Les vins sont présentés anonymés (codes de 3 chiffres). Il est demandé à chaque dégustateur d'indiquer, par série de trois verres, quel est l'échantillon différent.

Pour chaque support, deux verres contiennent le vin traité, l'autre étant rempli du vin témoin. Pour le vin traité par le support Si, 13 dégustateurs sur 18 reconnaissent l'échantillon différent alors que pour les vins traités à l'aide des deux supports polymères seuls 6 dégustateurs sur 18 identifient correctement l'échantillon différent.

La distribution des résultats obtenus est comparée à celle régie par une loi binomiale de terme B (18, 1/3).¹⁴³ Il en ressort que le vin traité par la silice est statistiquement différent au seuil de 0,1% du vin témoin alors qu'il n'existe aucune différence significative entre les vins traités à l'aide de polymères et leurs témoins.

VII.2.2 Tests d'extraction sur d'autres vins

Afin de vérifier si le traitement faisant l'objet de ce travail pouvait être appliqué à d'autres types de vins que les vins liquoreux, des essais d'extraction ont été réalisés sur un vin blanc sec (assemblage Colombard-Sauvignon) et sur un vin rouge (Merlot). Les essais ont été effectués uniquement avec les supports Si et PP25. Les extractions se sont déroulées dans les mêmes conditions que pour le vin soumis à la dégustation.

¹⁴³ Martin N., de Revel G. Evaluation sensorielle : bases scientifiques et applications œnologiques. *La dégustation, Hors série J. Int. Sci. Vigne Vin*, **1999**, 85-98

Le tableau 49 rassemble résultats des analyses pour le vin de Sauvignon.

	Echantillon		
	Témoin	Si	PP25
Quantité de support (g.l ⁻¹)	0	9,9	4,1
Degré d'alcool (% vol.)	11,6	11,6	11,6
Sucres résiduels (g.l ⁻¹)	<2	<2	<2
Acidité totale (g.l ⁻¹)	4,2	4,2	4,3
Acidité volatile (g.l ⁻¹)	0,28	0,28	0,29
pH	3,4	3,4	3,3
SO ₂ libre (mg.l ⁻¹)	23	23	23
SO ₂ total (mg.l ⁻¹)	102	85	87
DO 420	0,085	0,069	0,071

Tableau 49 : Analyse du vin blanc sec de Colombar-Sauvignon après deux semaines extractions en utilisant la phénylsulfonylhydrazine sur support polymère ou silice

Les résultats obtenus montrent que le SO₂ total a effectivement diminué et que le SO₂ libre, nécessaire à la conservation, reste constant. La couleur (donnée par le DO 420) est un peu diminuée par l'utilisation d'un support. Le pH et les acidités évoluent très faiblement lorsque le support PP25 est utilisé. Le degré d'alcool n'est pas touché par cette extraction.

Le tableau 50 rassemble les résultats des extractions réalisées sur le vin Merlot.

	Echantillon			
	Témoin	Si	PP25 (1)	PP25 (3)
Quantité de support (g.l ⁻¹)	0	9,9	1,3	4,1
Degré d'alcool (% vol.)	13,2	13,2	13,2	13,2
Sucres résiduels (g.l ⁻¹)	<2	<2	<2	<2
Acidité totale (g.l ⁻¹)	3,2	3,2	3,3	3,4
Acidité volatile (g.l ⁻¹)	0,39	0,38	0,39	0,38
pH	3,6	3,6	3,6	3,5
SO ₂ libre (mg.l ⁻¹)	34	39	36	37
SO ₂ total (mg.l ⁻¹)	75	61	69	64
Indice de Folin	42	41	41	40
DO 420	2,57	2,17	2,55	2,23
DO 520	3,13	2,65	3,25	2,65
DO 620	0,68	0,63	0,79	0,63
IC	5,70	4,82	5,80	4,82
ICM	6,38	5,45	6,59	5,45

Tableau 50 : Analyse du vin rouge de Merlot après deux semaines extractions en utilisant la phénylsulfonylhydrazine sur support polymère ou silice

Les résultats obtenus montrent que pour ce vin, le SO₂ total est diminué comme pour les vins liquoreux ou sec. Le SO₂ libre restant assez constant dans l'ensemble, cela signifie que le pouvoir de combinaison du vin a diminué. Le pouvoir de combinaison des vins rouges n'est pas lié exactement aux mêmes composés que les vins blancs liquoreux. D'autres composés, qui participent également à sa couleur, sont en partie responsables de cette combinaison, comme les dérivés anthocyaniques. Le fait de diminuer ce pouvoir de combinaison sur des vins très différents est donc très intéressant pour les perspectives de cette étude.

VII.3 Conclusion des compléments à l'étude

Le développement de cette méthode d'extraction liquide-solide destinée à diminuer le pouvoir de combinaison des vins blancs liquoreux demande des études complémentaires. Il est important de vérifier l'absence de pollution du milieu par le support et de mettre en place

un protocole y conduisant. De même, l'extension de ce type d'extraction à d'autres vins semble un point économique important. Ces réponses ne pourront être données que dans le cadre d'une étude approfondie, mais il semblait important de poser les premières bases.

La recherche de pollutions dans les milieux modèles après extractions en milieu hétérogène a permis de mettre en avant que des résidus issus de réactions secondaires ne sont pas détectés dans le milieu, avec les outils technologiques disponibles actuellement. Les résidus observés que l'on a tenté d'identifier proviennent de la synthèse des supports. Un traitement adéquat préalable des supports avant utilisation devrait permettre d'éliminer ces résidus. Des essais ont été réalisés. Les conditions de solvant, de temps et de mise en œuvre du lavage restent à améliorer compte tenu des résultats.

Le vin après extraction étant destiné à la consommation, il était nécessaire de vérifier si le traitement ne dénaturait pas les qualités organoleptiques du vin. Soumis à un panel d'experts, le vin de Sauternes 2000 traité par la phénylesulfonylhydrazine sur support n'est pas toujours identifiable. Ceci est surtout vrai dans le cas du support polymère.

Enfin, l'application de cette extraction à d'autres vins (Colombard-Sauvignon, Merlot), permet là encore de diminuer le SO₂ total présent dans les vins, sans modifier de façon trop importante la couleur ou l'acidité qui sont des critères importants pour ces vins.

VIII Conclusion générale

L'objectif de cette étude était la diminution du pouvoir de combinaison du dioxyde de soufre des vins blancs liquoreux. La méthode retenue passe par l'élimination du vin de dérivés carbonylés naturellement présents et responsables de la formation de combinaisons bisulfiteuses.

Les dérivés carbonylés responsables de la plus grande partie du piégeage du dioxyde de soufre sont l'éthanal, l'acide pyruvique, l'acide 2-oxoglutarique et le 5-oxofructose. L'extraction de ces composés doit s'effectuer sans dénaturer les qualités organoleptiques du vin et sans générer l'apparition de nouvelles molécules dans le vin. Pour cela, la méthode retenue a été l'extraction liquide-solide.

Une étude bibliographique portant sur la réactivité des dérivés carbonylés sélectionnés ainsi que sur les réactions auxquelles ils sont susceptibles de participer a été réalisée. Celle-ci a permis de mettre en avant des familles de molécules réagissant avec les dérivés carbonylés suivant les contraintes imposées pour cette étude :

- milieu hydroalcoolique
- température ambiante
- pas d'ajout de catalyseur
- pas de libération dans le milieu de composé absent initialement

Les quatre molécules retenues à l'issue de cette recherche ont été l'acide phénylsulfonique, la O-benzylhydroxylamine, la phénylsulfonylhydrazine et la polyéthylèneimine.

L'efficacité de ces agents d'extraction a été vérifiée en milieu homogène modèle. La O-benzylhydroxylamine et la phénylsulfonylhydrazine ont montré une grande efficacité dans le cas de l'éthanal, de l'acide pyruvique et de l'acide 2-oxoglutarique. L'extraction de ces composés était supérieure à 95 % après une heure de mise en contact. Les deux autres agents d'extraction étudiés n'ont présenté qu'une faible efficacité (inférieure à 10 % après 24 heures). L'efficacité des agents d'extraction n'a pas pu être mise en évidence dans le cas du 5-oxofructose. Aux vues de ces résultats, seules la O-benzylhydroxylamine et la phénylsulfonylhydrazine ont été conservées pour la suite de l'étude. L'efficacité de l'extraction par ces deux agents a été vérifiée en présence de glucose et de fructose. Ces deux sucres,

largement présents dans les vins, présentent en effet une forme ouverte susceptible d'entrer en compétition avec les dérivés carbonylés vis-à-vis des agents d'extractions. L'efficacité des agents d'extraction a été confirmée dans ces conditions. L'étude cinétique de l'extraction de l'éthanal, de l'acide pyruvique et de l'acide 2-oxoglutarique par la O-benzylhydroxylamine et la phénylsulfonylhydrazine a ensuite été réalisée sur des solutions monocomposés. Les extractions ont été réalisées en l'absence, puis en présence de dioxyde de soufre. L'extraction des dérivés carbonylés a pu être faite après l'établissement des équilibres entre le dioxyde de soufre et les dérivés carbonylés. Ceci a permis de mettre en évidence le déplacement possible de la combinaison bisulfite vers la libération du dioxyde de soufre.

La O-benzylhydroxylamine et la phénylsulfonylhydrazine se sont avérées être des molécules capables d'extraire efficacement trois des dérivés carbonylés retenus pour cette étude. L'étape suivante consistait à fixer ces agents d'extractions sur des supports insolubles afin de mettre en œuvre l'extraction liquide-solide.

Deux types de supports ont été retenus pour greffer ces fonctions : le support polymère et le support de silice.

Dans le cas du greffage des agents d'extraction sur support polymère, deux voies ont été envisagées. La première est la copolymérisation en suspension aqueuse de composés styréniques fonctionnels permettant d'accéder à ces fonctions sur supports. La synthèse de ces molécules s'est révélée difficile à mettre en œuvre et les composés obtenus ne permettaient pas d'accéder aux supports voulus. Cette voie a donc été abandonnée. La seconde voie est le greffage sur un support polymère préformé des fonctions désirées.

La O-benzylhydroxylamine a pu être obtenue par greffage en utilisant deux voies. La voie utilisant l'acétonoxime a été préférée à celle utilisant la N-hydroxyphthalimide. L'aspect visuel des supports obtenus ainsi ne semble pas indiquer de pollution potentielle du milieu par ces supports. Les supports synthétisés par cette voie seront utilisés par la suite.

La phénylsulfonylhydrazine sur support polymère peut être obtenue en utilisant l'acide chlorosulfonique ou le chlorure de thionyle. Les supports obtenus par le traitement avec le chlorure de thionyle ne présentent pas de fragilité chimique pouvant conduire à une pollution

du milieu, contrairement à ceux issus de la voie utilisant l'acide chlorosulfonique. Cette voie est donc préférable à mettre en œuvre pour synthétiser les supports.

Dans le cas du support de silice, la méthode retenue pour la fonctionnalisation passe par le greffage de molécules permettant d'accéder aux agents d'extraction par une ou deux étapes de modification. La synthèse de greffons au laboratoire a été un échec. Les supports ont donc été fonctionnalisés en utilisant des composés commerciaux. Les rendements de fonctionnalisation des supports sont faibles. Il semblerait préférable d'utiliser les homologues trichlorosilane de façon à améliorer les taux de greffage. Ceci permettrait d'accéder à des supports présentant un taux de fonctions de l'ordre de 1 mmol.g^{-1} sur des silices choisies pour leur compatibilité avec les critères d'utilisation (taille des supports, traitements chimiques et thermiques).

Différents supports portant les fonctions O-benzylhydroxylamine et phénylsulfonylhydrazine ont été testés en milieu hétérogène. L'étude cinétique des extractions a été faite sur des solutions modèles sans dioxyde de soufre. Ceci a permis de mettre en évidence la validité de la méthode d'extraction liquide-solide retenue. Les extractions réalisées sur des solutions après addition de dioxyde de soufre ont permis de montrer l'applicabilité de cette méthode à n'importe quel moment du processus de vinification, y compris après sulfitage. L'éthanal, l'acide pyruvique, l'acide 2-oxoglutarique et le 5-oxofructose sont extraits du milieu réactionnel. Les quantités extraites sont variables suivant les supports et les agents d'extraction. L'extraction liquide-solide est toutefois un procédé efficace pour les quatre dérivés carbonylés retenus pour cette étude. L'agent d'extraction le plus efficace est la phénylsulfonylhydrazine. Cet agent d'extraction fixé sur support (polymère et silice) est retenu pour la suite de l'étude.

L'extraction des dérivés carbonylés a été mise en œuvre sur un vin blanc liquoreux. Les supports utilisés portaient la fonction phénylsulfonylhydrazine. Les expériences ont montré que les extractions se faisaient aussi bien sous agitation que sans agitation, ce qui serait une méthode d'application plus aisée à mettre en œuvre dans les chais. Les quatre dérivés carbonylés retenus pour cette étude sont extraits de façon satisfaisante des vins (80 % en moyenne). En outre les analyses ont montré que le support fonctionnalisé était également susceptible d'extraire du milieu le dioxyde de soufre en excès.

Chapitre VIII : Conclusion générale

Le produit ainsi traité étant destiné à la consommation, quelques études supplémentaires ont été réalisées.

L'absence de pollution du milieu était un des critères de cette étude. La recherche d'éventuelles pollutions a été réalisée sur les solutions modèles traitées par les supports portant la fonction phénylsulfonylhydrazine (polymère et silice) lors de l'étude de l'extraction en milieu hétérogène. Cette recherche a montré que les composés apparaissant sont liés à la fonctionnalisation du support. Il sera donc nécessaire d'affiner le traitement préliminaire des supports avant de les utiliser. Une procédure a été mise en œuvre, compte tenu des pollutions observées. Les premiers essais ont permis de mettre en avant que le lavage mis en œuvre diminuait les quantités des polluants observés, comme l'acétophénone, voire permettait la disparition totale de certains, comme les alcanes. Ce traitement devra être amélioré de façon à éliminer tous les polluants issus de la synthèse.

Le respect des qualités organoleptiques des vins traités est aussi un paramètre à prendre en considération. Un vin blanc de Sauternes 2000 a donc été traité par différents supports portant la fonction phénylsulfonylhydrazine. Après élimination des supports, ce vin a été soumis à un panel d'experts. Ceci a permis de mettre en évidence que l'utilisation d'un support de type polymère ne confère pas de défaut à un vin traité, contrairement au support de silice. Ces supports ont également été additionnés sur d'autres vins (Colombard-Sauvignon et Merlot). Ceci a permis de mettre en évidence que cette extraction liquide-solide permet également de diminuer le pouvoir de combinaison de ces vins.

Cette étude a donc permis de montrer qu'il est possible de diminuer le pouvoir de combinaison des vins blancs liquoreux en utilisant la méthode d'extraction liquide-solide. L'agent d'extraction le plus efficace est la phénylsulfonylhydrazine. La diminution du pouvoir de combinaison des vins par cette méthode a fait l'objet d'un dépôt de brevet. Des travaux supplémentaires devront être réalisés afin d'optimiser le support polymère, qui présente les meilleurs résultats, mais dont le taux d'utilisation reste faible (45 % au maximum). Ces optimisations passeront par des essais en milieu hétérogène modèle. Le support optimisé devra ensuite être mis au contact des vins afin d'améliorer les conditions d'utilisations permettant de diminuer de façon satisfaisante le pouvoir de combinaison. Enfin, il restera à envisager l'éventuelle régénération de ces supports après extraction, de façon à diminuer les coûts de la mise en application de ces extractions.

IX PARTIE EXPERIMENTALE

IX.1 Appareillage

Les spectres IRTF ont été réalisés en transmission avec un appareil Perkin-Elmer PARAGON 1000. Les liquides ont été analysés sous forme de film entre deux plaques de NaCl et les solides sous forme de pastilles dans du KBr à 1 %. Les maxima des bandes d'absorption sont exprimés en nombre d'onde (cm^{-1}). Les valeurs sont données avec une incertitude de $\pm 4 \text{ cm}^{-1}$.

Les spectres de RMN ont été réalisés en utilisant CDCl_3 comme solvant et à l'aide d'un appareil BRUKER AC 250 fonctionnant à 250 MHz pour les spectres ^1H et à 62,9 MHz pour les spectres ^{13}C et d'un appareil BRUKER Avance 300 fonctionnant à 300 MHz pour les spectres ^1H et à 75,49 MHz pour les spectres ^{13}C . Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm par rapport au TMS (0 ppm).

Les absorbances à une longueur d'onde de 340 nm ont été déterminées sur un spectrophotomètre Spectronic 20 Genesys en utilisant des demi-cuves micro UV.

Les analyses de CPG/SM ont été réalisées sur un appareil Hewlett Packard HP 6890 Series (voir conditions en annexe 4).

Les mesures d'adsorption d'azote ont été réalisées sur un appareil Micromeritics ASAP 2010. Les résultats ont été traités selon la méthode B.E.T. (Brunauer, Emmett and Teller).

Les photographies ont été réalisées en utilisant une loupe binoculaire Olympus de modèle SZX-9 et un appareil photographique numérique Olympus modèle Camedia C-5050.

La détermination de la taille des billes a été réalisée par analyse d'image en utilisant le logiciel Scion.

Les analyses centésimales ont été effectuées par le service central d'analyse élémentaire du CNRS à Vernaison (69). Les dosages sont donnés à $\pm 0,3 \%$ sur C, H, N, O.

Les solvants ont été distillés sur Na et P_2O_5 lorsque cela était nécessaire.

Les enzymes et les kits de dosages sont fournis par R-Biopharm (Boehringer Mannheim) dans le cas de l'éthanal, de l'acide 2-oxoglutarique et du 5-oxofructose et par Sigma Aldrich dans le cas de l'acide pyruvique. Les valeurs sont données avec une incertitude de $\pm 3 \%$.

Les supports de type Merrifield et Dowex® sont fournis par Sigm-Aldrich. La silice fonctionnalisée avec la phénylsulfonylhydrazine est produite par Silicycle®. Le polymère fonctionnalisé avec la phénylsulfonylhydrazine est produit par Polymer Laboratories®.

IX.2 Méthodes de mesures

IX.2.1 Dosages par méthodes enzymatiques

IX.2.1.1 Calcul et expression des résultats

Les dosages des dérivés carbonylés restant en solution sont effectués en utilisant des dosages enzymatiques. La formule générale pour le calcul des concentrations des composés restant est la suivante :

$$C = (V * M * f) / (\epsilon * d * v * 1000) * \Delta A$$

Où

V : volume des tests en ml

v : volume de l'essai en ml

M : masse molaire de la substance à doser

d : épaisseur de la cuve en cm

f : facteur de dilution

ϵ : coefficient d'absorption molaire de la NADH ou NADPH : $6,31 \cdot 10^{-3} \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ à 340 nm

ΔA : différence d'absorbance entre la référence et l'échantillon

Les dosages ont été effectués dans des cuves de 1 cm d'épaisseur à une température comprise entre 18 et 25 °C. Les mesures d'absorbance ont été effectuées à 340 nm.

IX.2.1.2 Dosage enzymatique de l'éthanal

Principe : En présence d'aldéhyde déshydrogénase, l'éthanal est oxydé en acide acétique par le NAD^+ . La quantité de NADH formée durant la réaction est proportionnelle à la quantité d'acétaldéhyde. La réduction du NAD^+ est mesurée par l'augmentation de son absorbance à la longueur d'onde de 340 nm.

Mode opératoire : Les dosages ont été effectués en utilisant les produits fournis par Boehringer Mannheim. Le tampon consiste en une solution de diphosphate de potassium, d'un pH de l'ordre de 9,0, dans laquelle des pastilles de NAD^+ , d'approximativement 0,8 mg, sont dissoutes. Les proportions sont de 1 pastille pour 3 mL de solution. A partir d'acétaldéhyde déshydrogénase (ALDH) lyophilisée, une préparation à $6,6 \text{ U.ml}^{-1}$ est faite par dissolution dans de l'eau milliQ. On procède comme indiqué sur le tableau 51.

Introduire dans les cuves	Témoin	Echantillon
Solution tampon	1,500 ml	1,500 ml
Echantillon	-	0,100 ml
Eau	0,100 ml	-
Agiter et lire l'absorbance après 3 minutes (A)		
Déclancher la réaction par addition de:		
Préparation de ALDH	0,025 ml	0,025 ml
Agiter et lire l'absorbance après 3 à 5 minutes (A')		

Tableau 51 : Mode opératoire mis en œuvre pour le dosage de l'éthanal

IX.2.1.3 Dosage enzymatique de l'acide pyruvique

Principe : En présence de L-lactate déshydrogénase, le pyruvate est réduit en L-lactate par le NADH. La quantité de NAD^+ formée durant la réaction est proportionnelle à la quantité de pyruvate. L'oxydation du NADH est mesurée par la diminution de son absorbance à la longueur d'onde de 340 nm.

Mode opératoire : Les dosages ont été effectués en utilisant les produits fournis par Sigma-Aldrich. La solution de Trizma est une solution de tris(hydroxyméthyl)aminométhane à $1,5 \text{ mol.l}^{-1}$ utilisée sans dilution. La solution de Trizma + NADH est obtenue par dilution de NADH dans le Trizma à une concentration de $0,45 \text{ mg.ml}^{-1}$. La préparation de Lactate

déshydrogénase (LD) en suspension dans une solution de sulfate d'ammonium d'approximativement $1000\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$. On procède comme indiqué sur le tableau 52.

Introduire dans les cuves	Témoin	Echantillon
Eau	1,500 ml	0,750 ml
Echantillon	-	0,250 ml
Solution de Trizma	-	0,250 ml
Agiter		
Solution de Trizma +NADH	-	0,250 ml
Agiter et lire l'absorbance (A)		
Déclancher la réaction par addition de :		
Préparation de LD	-	0,025 ml
Agiter et lire l'absorbance après 2 à 5 minutes (A')		

Tableau 52 : Mode opératoire mis en œuvre pour le dosage de l'acide pyruvique

IX.2.1.4 Dosage enzymatique de l'acide 2-oxoglutarique

Principe : En présence de glutamate déshydrogénase, le 2-oxoglutarate réagit avec le NADH et les ions NH_4^+ pour former du L-glutamate et du NAD^+ . La quantité de NAD^+ formée durant la réaction est proportionnelle à la quantité de 2-oxoglutarate. L'oxydation du NADH est mesurée par la diminution de son absorbance à la longueur d'onde de 340 nm.

Mode opératoire : Les dosages ont été effectués en utilisant les produits fournis par R-Biopharm. Le tampon, dans l'eau milliQ, est composé de 58,4 g de di-sodium hydrogénophosphate dodécahydrate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$), de 3,8 g de potassium dihydrogénophosphate (KH_2PO_4), de 11,5 g de phosphate monoammonique ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$), de 7,4 g d'acide éthylènediaminetétraacétique ($\text{EDTA Na}_2\text{H}_2$) pour un litre de solution ajusté à un pH de 7,6 par addition d'une solution de soude concentrée ($3\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$). La solution de NADH présente une concentration de $2,5 \text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ et est préparée par dilution dans une solution aqueuse de NaHCO_3 à $10 \text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. La préparation de glutamate déshydrogénase (GLDH) est de concentration de $6 \text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ dans une solution aqueuse de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ à $2 \text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. On procède comme indiqué sur le tableau 53.

Introduire dans les cuves	Témoin	Echantillon
Tampon	2,000 ml	2,000 ml
Solution NADH	0,050 ml	0,050 ml
Echantillon	-	0,050 ml
Eau	0,100 ml	0,050 ml
Agiter et lire l'absorbance après 3 minutes (A)		
Déclancher la réaction par addition de :		
Préparation de GLDH	0,050 ml	0,050 ml
Agiter et lire l'absorbance après 10 minutes (A')		

Tableau 53 : Mode opératoire mis en œuvre pour le dosage de l'acide 2-oxoglutarique

IX.2.1.5 Dosage enzymatique de la formation du 5-oxofructose

Principe : Le D-glucose et le D-fructose sont respectivement phosphorylés en D-glucose-6-phosphate et D-fructose-6-phosphate en présence de l'enzyme hexokinase et d'adénosine-5'-triphosphate, avec la formation simultanée d'adénosine-5'-diphosphate. En présence de l'enzyme glucose-6-phosphate déshydrogénase, le D-glucose-6-phosphate est oxydé par le NADP^+ en D-gluconate-6-phosphate. La quantité de NADPH formée durant la réaction est proportionnelle à la quantité de D-glucose. La réduction du NADP^+ est mesurée par la diminution de son absorbance à la longueur d'onde de 340 nm. Le D-fructose-6-phosphate est ensuite converti en D-glucose-6-phosphate par la phosphoglucose isomérase. Le D-glucose-6-phosphate réagit ensuite avec le NADP^+ pour former du D-gluconate-6-phosphate. La quantité de NADPH formée durant la réaction est proportionnelle à la quantité de D-fructose. La réduction du NADP^+ est mesurée par la diminution de son absorbance à la longueur d'onde de 340 nm.

Mode opératoire : Les dosages ont été effectués en utilisant les produits fournis par Boehringer Mannheim. Le tampon est obtenu par dilution dans 27 ml d'eau milliQ de 5 g de poudre comportant 64 mg de NADP^+ , 160 mg d'ATP, du sulfate de magnésium et de la triéthanolamine pour obtenir une solution tamponnée à 7,6 de pH. La préparation de G6P-DH est une suspension de 0,7 ml de volume d'approximativement 200 U d'enzyme hexokinase et 100 U de glucose-6-phosphate déshydrogénase. La préparation de GPI est une suspension de 0,7 ml de volume d'approximativement 490 U de phosphoglucose isomérase. On procède comme indiqué sur le tableau 54.

Introduire dans les cuves	Témoin	Echantillon
Solution tampon	0,500 ml	0,500 ml
Echantillon	-	0,050 ml
Eau	1,000 ml	0,950 ml
Agiter et lire l'absorbance après 3 minutes (A)		
Déclancher la réaction par addition de :		
Préparation de G6P-DH	0,010 ml	0,010 ml
Agiter et lire l'absorbance après 10 à 15 minutes (A')		
Si la réaction se poursuit continuer la lecture toutes les 2 minutes jusqu'à l'arrêt de l'augmentation de l'absorbance		
Additionner:		
Préparation de GPI	0,010 ml	0,010 ml
Agiter et lire l'absorbance après 10 à 15 minutes (A'')		

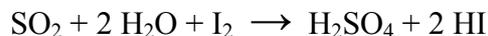
Tableau 54 : Mode opératoire mis en œuvre pour le dosage du 5-oxofructose

XI.2.2 Méthode de dosage du 5-oxofructose par dérivation (PFBOA)

A 100 µl de solution contenant le 5-oxofructose dilués dans 1,9 ml d'eau distillée microfiltrée dont la résistivité est de 18,2 MΩ.cm, est ajoutée une solution hydroalcoolique (1/1, v/v) de lindane (1,2,3,4,5,6-hexachlorocyclohexane) à 270 mg.l⁻¹ (étalon interne) et 5 mg de PFBOA. Le milieu réactionnel est homogénéisé de façon à dissoudre la totalité de l'agent de dérivation. La réaction se déroule à température ambiante pendant une heure. Les oximes produits sont extraits à l'aide de 2 ml d'un mélange éther éthylique/hexane (1/1, v/v), le mélange étant agité pendant 2 minutes à l'aide d'un vortex. La phase organique est recueillie, séchée sur sulfate de sodium anhydre et 2 µl en sont injectés en chromatographie en phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse fonctionnant en mode SIM, l'ion pentafluorotropylium [C₆F₅CH₂]⁺ de m/z = 181 formé par la fragmentation de ces différents oximes étant retenu pour les identifier. Les valeurs sont données avec une incertitude de ± 5 %.

IX.2.3 Détermination du dioxyde de soufre : Méthode iodométrique de Ripper

Il s'agit d'une oxydation par l'iode du dioxyde de soufre en acide sulfurique suivant la réaction suivante :



Dosage du SO₂ libre

Mode opératoire : Dans un erlenmeyer de 250 ml sont placés 25 ml de l'échantillon à doser, 1,3 ml d'acide sulfurique de concentration 9,4 mol.l⁻¹ et 2 ml de thiodène. La solution ainsi obtenue est titrée par une solution aqueuse d'iode 0,015 mol.l⁻¹, préparée le jour même, jusqu'au virage bleu-violet. La couleur doit tenir plus de 30 secondes.

Soit V le volume d'iode versé, en millilitre, pour atteindre le virage. La concentration en dioxyde de soufre dans le milieu, en mg.l⁻¹, avec une incertitude de 2 mg.l⁻¹, est donnée par :

$$[\text{SO}_2] = V * 40$$

Dosage du SO₂ total

Mode opératoire : Dans un erlenmeyer de 250 ml sont placés 25 ml de l'échantillon à doser et 5 ml d'une solution aqueuse de soude à 2 mol.l⁻¹. Après 5 minutes, les combinaisons bisulfiteuses sont rompues. 4 mL d'acide sulfurique de concentration 9,4 mol.l⁻¹ et 2 ml de thiodène sont alors ajoutés. La solution ainsi obtenue est titrée par une solution aqueuse d'iode 0,015 mol.l⁻¹, préparée le jour même, jusqu'au virage bleu-violet. La couleur doit tenir plus de 30 secondes.

Soit V le volume d'iode versé, en millilitre, pour atteindre le virage. La concentration en dioxyde de soufre dans le milieu, en mg.l⁻¹, avec une incertitude de 2 mg.l⁻¹, est donnée par :

$$[\text{SO}_2] = V * 40$$

IX.2.4 Mesure des taux de gonflement des supports

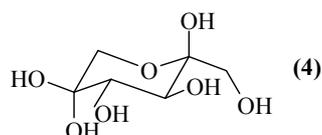
Mode opératoire : 1 g de support, préalablement séché sous vide, est introduit dans une burette graduée de 25 ml munie d'un fritté. Le volume à sec (V₀) est alors mesuré. Les billes sont ensuite imbibées de solvant et agitées à l'aide d'une spatule afin de favoriser la

pénétration du liquide et d'éliminer les bulles d'air. Le système est laissé 12 heures afin de parvenir à stabilisation. Le nouveau volume (V) est alors mesuré. La quantité (V-V₀) représente le taux de gonflement (en ml.g⁻¹) du support dans le solvant considéré.

IX.3 Synthèses de composés organiques

IX.3.1 Composés organiques utilisés lors de l'étude en solution

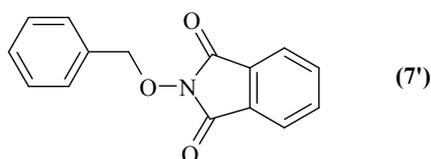
IX.3.1.1 Synthèse du 5-oxofructose (4)



Le mélange de départ est une solution aqueuse contenant 50 mmol.l⁻¹ de KH₂PO₄ et 2 g.l⁻¹ de fructose. A 120 ml de cette solution sont ajoutés 190 mg de fructose déshydrogénase en dispersion dans le triton X100 (Sigma). Le mélange est saturé en 2,6-dichlorophénolindophénol (environ 1g.l⁻¹). Après 28, 94 et 190 h le mélange a été resaturé en co-enzyme de façon à ce que la réaction puisse se poursuivre. Régulièrement 2 ml de cette solution sont prélevés pour réaliser le dosage du fructose. La disparition du fructose est mesurée par dosage enzymatique. Le 5-oxofructose obtenu est conservé dans sa solution de synthèse jusqu'à utilisation au congélateur.

IX.3.1.2 Synthèse de la O-benzylhydroxylamine (7)

IX.3.1.2.1 Synthèse de la benzylhydroxyphthalimide (7')

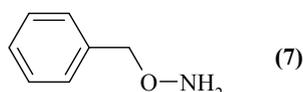


Dans un ballon de 250 ml relié à un réfrigérant à eau et muni d'une agitation magnétique, sont placés du chlorométhylbenzène (8,24 g – 0,065 mol) et de la triéthylamine (6,89 g – 0,068 mol) dans du DMF (100 ml). De la N-hydroxyphthalimide (10,71 g – 0,065 mol) est ajoutée. La solution rouge est portée à 80 °C sous vive agitation (750 tr.min⁻¹) pendant 24 h. La solution obtenue est brune avec des paillettes. Après refroidissement, la solution est filtrée. Les paillettes recueillies sont dissoutes dans du chloroforme (200 ml). La

solution est placée dans une ampoule à décanter et lavée avec d'une solution aqueuse de NaOH à 0,2 mmol.l⁻¹ (3x150 ml), puis de l'eau (2x150 ml). La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et le solvant est éliminé à l'évaporateur rotatif. Le produit est recristallisé dans de l'acétate d'éthyle, pour donner des paillettes blanches de benzylhydroxyphthalimide (**7'**) (4,62 g - 28 % de rendement). F:142°C.

- RMN ¹H : 5,23 (s, 2H), 7,38 (m, 3H), 7,54 (m, 2H), 7,75 (m, 2H), 7,83 (m, 2H).
- RMN ¹³C : 80,25, 123,87, 128,93, 129,25, 129,74, 130,28, 134,06, 134,80.
- Analyse élémentaire. Calculé : N : 5,5, O : 19,0, C : 71,0, H : 4,5. Trouvé : N : 5,6, O : 18,7, C : 70,8, H : 4,4.

IX.3.2.2.2 Synthèse de la O-benzylhydroxylamine (**7**)

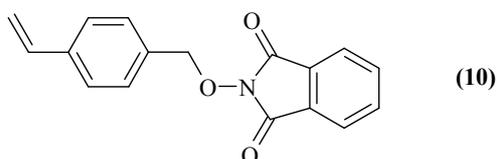


Dans un ballon tricol de 100 ml relié à un réfrigérant à eau et muni d'une agitation magnétique, le composé (**7'**) (1,95 g – 0,007 mol) est placée dans de l'éthanol (30 ml) et agitée une heure à reflux (t = 78 °C) pour dissoudre les cristaux. Du monohydrate d'hydrazine (0,77 g – 0,0154 mol) est ajouté goutte à goutte dans de l'éthanol (2 ml). Le mélange est laissé 4 h à reflux sous forte agitation (1000 tr.min⁻¹), puis filtré et le filtrat évaporé à l'évaporateur rotatif. Les phases solides sont rassemblées et dissoutes dans une solution aqueuse de KOH à 1 mol.l⁻¹ (20 ml). Cette phase aqueuse est extraite avec de l'éther (4x20 ml puis 4x15 ml). Les phases étherées sont rassemblées et lavées avec une solution aqueuse de carbonate de potassium à 2 %, séchées sur carbonate de potassium, filtrées et le solvant est éliminé à l'évaporateur rotatif. Un liquide jaune est obtenu (0,603 g - 64 % de rendement).

- RMN ¹H : 4,71 (s, 2H), 5,41 (m, 2H), 7,37 (m, 5H).
- RMN ¹³C : 78,84, 128,16, 128,84, 129,42, 137,64

IX.3.2 Composés organiques pour la polymérisation en suspension

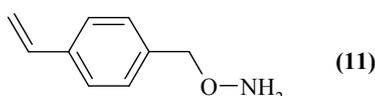
IX.3.2.1 Synthèse de la N-(O-(p-vinyl-benzyl)oxy)phthalimide (**10**)



Dans un ballon de 250 ml relié à un réfrigérant à eau et muni d'une agitation magnétique, du chlorométhylstyrène (10,08 g - 0,065 mol), de la triéthylamine (6,95 g - 0,068 mol) et de la N-hydroxyphtalimide (10,61 g - 0,065 mol) sont placés dans du DMF (100 ml). La solution est vivement agitée (750 tr. min^{-1}) à 80°C pendant 24 h. Le mélange brun obtenu est laissé à refroidir à température ambiante, puis le solvant est éliminé au Kugelrohr. Le mélange pâteux résiduel est dissout dans 110 ml de dichlorométhane. La solution est lavée avec 100 ml d'une solution aqueuse de Na_2CO_3 à 10 %, séchée sur MgSO_4 , filtrée et le solvant est éliminé à l'évaporateur rotatif. Le résidu brun clair est recristallisé dans un mélange acétone-hexane (50 : 50) à chaud. Les cristaux brun clair obtenus sont filtrés et séchés au dessiccateur (6,1 g - 33,6 % de rendement). F: 120°C .

- RMN ^1H : 5,20 (s, 2H), 5,27 (d, 1H, $J=10 \text{ Hz}$), 5,76 (d, 1H, $J = 17,5 \text{ Hz}$), 6,71 (dd, 1H, $J = 10$ et $17,5 \text{ Hz}$), 7,42 (m, 2H), 7,49 (m, 2H), 7,73 (m, 2H), 7,79 (m, 2H).
- RMN ^{13}C : 79,90, 115,12, 123,88, 126,74, 129,25, 130,5, 133,50, 134,80, 136,70, 163,88.

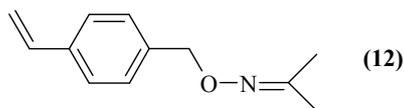
IX.3.2.2 Synthèse de la O-(p-vinyl-benzyl)oxyamine (11)



Dans un ballon tricol de 100 ml relié à un réfrigérant à eau et muni d'une agitation magnétique, de la N-(O-(p-vinyl-benzyl)oxy)phtalimide (**10**) (2,8 g - 0,01 mol) est placée dans 25 ml d'éthanol. La solution est agitée une heure à 80°C . L'hydrazine (0,87 g - 0,02 mol) en solution dans l'éthanol (2 ml) est ajoutée goutte-à-goutte. La solution est portée 4 h à 80°C . Le mélange est ensuite filtré et le filtrat évaporé. Le solide blanc obtenu est dissous dans 17 ml d'une solution de soude à 3 mol.l^{-1} . Le mélange est extrait avec 5 fois 20 ml d'éther. La solution étherée est lavée avec 30 ml d'une solution aqueuse de K_2CO_3 à 1 mol.l^{-1} , séchée sur MgSO_4 et le solvant est éliminé à l'évaporateur rotatif pour donner un liquide jaune (1,1 g - 74 % de rendement).

- RMN ^1H : 4,58 (s, 2H), 5,25 (d, 1H, $J = 10,92$), 5,82 (d, 1H, $J = 17,70$), 6,05 (m, 2H), 6,73 (dd, 1H, $J = 10,92$ et $17,70 \text{ Hz}$), 7,31 (d, 2H, $J = 8,28 \text{ Hz}$), 7,44 (d, 2H, $J = 7,89 \text{ Hz}$).
- RMN ^{13}C : 76,64, 114,01, 125,95(2C), 128,24(2C), 136,35(2C), 137,98.

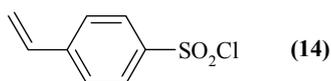
IX.3.2.3 Synthèse de la O-(*p*-vinyl-benzyl)acétoxime (12)



Dans un ballon tricol de 100 ml relié à un réfrigérant à eau et muni d'une agitation magnétique, sont placés de l'éthanol (60 ml) dans un bain à 0 °C glace / eau. Du sodium coupé en petits morceaux (0,8 g – 0,032 mol) est ajouté progressivement. Une fois la suspension blanche formée, de l'oxime d'acétone (2,31 g – 0,0317 mol) et du chlorométhylstyrène (5,38 g -0,0317 mol) sont ajoutés. La solution est agitée une heure à 80 °C, puis versée dans 30 ml d'eau. Le mélange est extrait avec 5 fois 5 ml d'éther. Le solvant est éliminé à l'évaporateur rotatif. L'huile obtenue est placée dans 10 ml d'éther, lavée avec 5 ml d'eau et après séparation la phase étherée est séchée sur MgSO₄. Après élimination du solvant à l'évaporateur rotatif le produit obtenu est un liquide jaune (3,12 g – 60 % de rendement).

- RMN ¹H : 1,78 (d, 6H, J = 4,65 Hz), 4,96 (s, 2H), 5,14 (dd, 1H, J = 0,75 et 11 Hz), 5,65 (dd, 1H, J = 0,75 et 17,3 Hz), 6,62 (dd, 1H, J = 11 et 17,3 Hz), 7,75 (m, 4H).
- RMN ¹³C : 22,17, 22,26, 75,35, 114,14, 126,57, 126,63, 128,30, 128,56, 129,25, 130,16, 137,00, 138,57, 155,95.

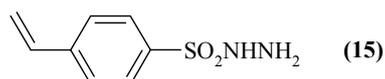
IX.3.2.4 Synthèse du chlorure de *p*-sulfonyl-styrène (14)



Dans un ballon tricol de 250 ml relié à un réfrigérant à eau et muni d'une agitation magnétique, du 4 tert-butylcatéchol (0,156 g - 0,001 mol) et du chlorure de thionyle (25 ml) sont placés dans du DMF (30 ml) dans un bain de glace / eau. Du sel de sodium de l'acide *p*-sulfonyl-styrène (10 g – 0,043 mol) est ajouté à la solution. Le mélange est maintenu à 0 °C sous agitation pendant 7 h avant d'être placé au réfrigérateur pour 40 h. Le mélange est ensuite versé dans 175 ml d'eau glacée sous vive agitation. La solution aqueuse obtenue est extraite avec 2 fois 200 ml de toluène. La phase organique est lavée avec 2 fois 200 ml d'eau, séchée sur MgSO₄ et le solvant est éliminé à l'évaporateur rotatif pour donner un liquide jaune pâle (7,73 g- 89 % de rendement).

- RMN ^1H : 5,91 (d, 1H, J = 11 Hz), 6,33 (d, 1H, J = 17,5 Hz), 7,15 (dd, 1H, J = 11 et 17,5), 7,97 (d, 2H, J = 8,5 Hz), 8,36 (d, 2H, J = 8,5 Hz).
- RMN ^{13}C : 119,85, 126,69, 127,58, 127,83, 128,75, 135,18, 143,27, 144,87.
- IR (CHCl_3) : 1590 (aryl), 1377 (S=O), 989, 928 (vinyl).

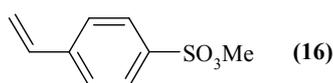
IX.3.2.5 Synthèse du *p*-sulfonylhydrazine-styrène (15)



Dans un ballon tricol de 50 ml relié à un réfrigérant à eau et muni d'une agitation magnétique, du chlorure de *p*-sulfonyl-styrène (14) (3,88 g - 0,019 mol) est placé dans du THF (20 ml) dans un bain de glace / eau. L'hydrazine en solution aqueuse (2 ml) est ajoutée (2,788 g - 0,479 mol). La solution est agitée 30 minutes puis versée dans 200 ml d'eau sous très vive agitation (1000 tr.min⁻¹). Le précipité blanc formé est récupéré par filtration, dissous dans un minimum de THF puis recristallisé dans de l'hexane. Le produit se présente sous la forme d'aiguilles blanches (0,92 g – 24 % de rendement). F : 76,1°C.

- RMN ^1H : 1,80 (m, 1H), 3,42 (m, 2H), 5,40 (d, 1H, J = 11 Hz), 5,84 (d, 1H, J = 17,5 Hz), 6,70 (dd, 1H, J = 11 et 17,5), 7,50 (d, 2H, J = 8,5 Hz), 7,80 (d, 2H, J = 8,5 Hz).
- RMN ^{13}C : 92,43, 118,01, 126,91 (2C), 128,59 (2C), 135,18, 142,81.

IX.3.2.6 Synthèse de l'ester de méthyle et d'acide *p*-sulfonique-styrène (16)



IX.3.2.6.1 Voie utilisant le méthanolate de sodium

Dans un ballon tricol de 250 ml relié à un réfrigérant à eau et muni d'une agitation magnétique, du sodium (0,23 g - 0,010 mol) est placé dans du méthanol (75 ml) dans un bain de glace / eau. Après dissolution du sodium, du chlorure de *p*-sulfonyl-styrène (1,88 g – 0,010 mol) est ajouté. Le mélange est agité 5 h à 0 °C, puis 48 h à température ambiante. Le mélange est versé dans 150 ml d'eau, puis extrait avec 3 fois 40 ml éther. La phase étherée est séchée sur MgSO_4 et après élimination du solvant à l'évaporateur rotatif une huile jaune est obtenue (0,500 g – 27 % de rendement).

- RMN ^1H : 4,11 (s, 2H), 5,83 (d, 1H, $J = 11$ Hz), 6,27 (d, 1H, $J = 17,5$ Hz), 7,11 (dd, 1H, $J = 11$ et 17,5), 7,92 (d, 2H, $J = 8,5$ Hz), 8,20 (d, 2H, $J = 8,5$ Hz).
- RMN ^{13}C : 56,73, 118,58, 127,24 (2C), 128,78 (2C), 134,17, 135,50, 143,43.

IX.3.2.6.2 Voie utilisant le méthanol

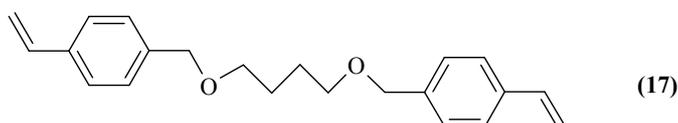
Obtention de l'acide p-sulfonique-styrène : Dans un erlenmeyer de 500 ml est placé du sel de sodium de l'acide p-sulfonique-styrène (10,14 g - 0,049 mol). La masse est complétée à 200 g avec de l'eau. La solution est mise à agiter en présence de billes d'Amberlite IR120 (43,75 g à 2,25 méq/g) pendant 6 h. La solution jaune obtenue est filtrée et le solvant est éliminé à l'évaporateur rotatif pour donner 7,05 g d'un solide blanc-jaune (78 % de rendement).

- RMN ^1H : 5,68 (d, 1H, $J = 10,9$ Hz), 6,20 (d, 1H, $J = 16,7$ Hz), 7,08 (dd, 1H, $J = 10,9$ et 16,7 Hz), 7,86 (d, 2H, $J = 8,2$ Hz), 8,03 (d, 2H, $J = 8,2$ Hz).
- RMN ^{13}C : 72,20, 119,51, 129,50 (2C), 130,56 (2C), 143,42, 151,50.

Dopage de la Montmorillonite K10 : Dans un ballon de 100 ml muni d'une agitation magnétique, 4 g de Montmorillonite K10 sont ajoutés à 50 ml d'une solution aqueuse à 1 mol.l $^{-1}$ de FeCl $_3$. Une forte agitation est maintenue pendant 30 h à température ambiante. Le mélange est séparé par centrifugation. La solution est éliminée et le solide est lavé à l'eau distillée jusqu'à ce que le test AgNO $_3$ relatif à la présence d'ions chlorures dans le milieu soit négatif. Le solide est alors mis à sécher à l'étuve pour la nuit à 120 °C et broyé dans un mortier.

Synthèse de l'ester de méthyle et de l'acide p-sulfonique-styrène : Dans un ballon bicol de 50 ml relié à un montage de Dean et Stark, du méthanol (0,220 g – 0,009 mol), de l'acide p-sulfonique-styrène (1,65 g – 0,009 mol) et de la montmorillonite K10 dopée (0,3 g) sont ajoutés dans 50 ml de cyclohexane. Le mélange est agité trois heures 800 tr.min $^{-1}$ à 90 °C. Après refroidissement, aucun produit n'est récupéré par filtration. Le résidu orange collé au fond du ballon n'est pas soluble dans les solvants courants et n'a pas pu être identifié.

IX.3.2.7 Synthèse du 1,8-bis(éthénylphényl)-2,7-dioxooctane (BEPOO) (17)



Dans un ballon tricol de 250 ml relié à un réfrigérant à eau et muni d'une agitation magnétique, du 1,4-butanediol (3,60 g - 0,040 mol) est placé dans du THF anhydre (150 ml) sous courant d'azote dans un bain de glace / eau. De l'hydrure de sodium (3,67 g - 0,092 mol) est ajouté et le mélange agité une heure. A la solution blanche obtenue sont ajoutés du chlorométhylstyrène (13,7 g - 0,090 mol) et du Bu₄NI (0,74 g - 0,002 mol). Le mélange est agité 24 h à température ambiante. La réaction est ensuite stoppée avec 20 ml d'eau, puis le mélange versé progressivement dans 500 ml d'eau. La solution est extraite avec 3 fois 200 ml d'éther, puis les phases étherées sont rassemblées, lavées avec une solution saturée de NaCl (300 ml), séchées sur MgSO₄, filtrées et le solvant éliminé à l'évaporateur rotatif. Le produit obtenu est purifié sur une colonne chromatographique de gel de silice en utilisant un mélange acétate d'éthyle - hexane comme éluant (de 10 : 90 à 40 : 60) (R_f = 0,6). Après élimination du solvant à l'évaporateur rotatif le produit obtenu est un solide blanc (9,113 g - 71 % de rendement). F : 33°C.

- RMN ¹H : 2,05-2,10 (m, 4H), 3,82-3,87 (m, 4H), 4,85 (s, 4H), 5,59 (d, 2H, J=12,5 Hz), 6,10 (d, 2H, J=17,5 Hz), 7,08 (dd, 2H, J= 12,5 et 17,5), 7,64 (d, 4H, J=10 Hz), 7,75 (d, 4H, J=10 Hz).
- RMN ¹³C : 26,89, 70,47, 72,95, 114,08, 126,58, 128,19, 136,9, 137,24, 138,62.

IX.4 Polymérisations en solution

Mode opératoire : Dans un ballon monocol de 100 ml, relié ensuite à un réfrigérant à eau, le composé à polymériser est placé dans 20 ml de toluène en présence d'un amorceur radicalaire. Après polymérisation, le produit est récupéré par distillation du solvant sous vide de trompe à eau.

De la O-(*p*-vinyl-benzyl)oxy)amine (**11**) (2 g – 0,0134 mol) est mise en présence d'AIBN (0,021 g- 1,3.10⁻⁴ mol) dans le toluène à 80 °C pendant 48 h. L'enregistrement du spectre RMN du produit récupéré montre qu'il s'agit du composé de départ inchangé.

De la O-(*p*-vinyl-benzyl)acétoxime (**12**) (2 g – 0,0106 mol) est mise en présence de peroxyde de benzoyle (0,151 g - 0,00068 mol) dans le toluène à 80 °C pendant 48 h. L'enregistrement du spectre RMN du produit récupéré montre qu'il s'agit du composé de départ inchangé.

De la O-(*p*-vinyl-benzyl)acétoxime (**12**) (1,5 g – 0,0079 mol) est mise en présence d'AIBN (0,013 g – $8 \cdot 10^{-5}$ mmol) dans le toluène pendant 16 h à 60 °C. L'enregistrement du spectre RMN du produit récupéré montre qu'il s'agit du composé de départ inchangé.

Du chlorure de *p*-sulfonyl-styrène (**14**) (2,5 g – 0,0123 mol) est mis en présence de peroxyde de benzoyle (0,03 g - 0,00014 mol) dans du toluène à 80 °C pendant 48 h. L'enregistrement du spectre RMN du produit montre que le composé n'a pas polymérisé et 50 % du réactif de départ est perdu (dégradation).

Du chlorure de *p*-sulfonyl-styrène (**14**) (2 g – 0,0099 mol) est mis en présence de d'AIBN (0,1 g – 0,00061 mol) dans le toluène à 60 °C pendant 16 h. L'enregistrement du spectre RMN du produit montre que le composé n'a pas polymérisé et 50 % du réactif de départ est perdu (dégradation).

Du chlorure *p*-sulfonyl-styrène (**14**) (2 g – 0,0099 mol) est mis en présence de V70 (0,02 g – $8 \cdot 10^{-5}$ mol) dans du toluène à 35 °C pendant 16 h. L'enregistrement du spectre RMN du produit montre que le composé n'a pas polymérisé et 50 % du réactif de départ est perdu (dégradation).

De l'ester de méthyle et d'acide *p*-sulfonique-styrène (**16**) (2,19 g- 0,011 mol) est mis en présence de peroxyde de benzoyle (0,135 g – 0,00056 mol) dans le toluène à 80 °C pendant 48 h. Le produit obtenu se présente sous la forme d'un solide résiduel brun insoluble dans les solvants d'usage courant.

IX.5 Polymérisation en suspension aqueuse

Mode opératoire : Dans un réacteur à double enveloppe relié à un réfrigérant à eau et muni d'une agitation mécanique ($300 \text{ tr} \cdot \text{min}^{-1}$), est placée une solution aqueuse, composée de 12 g de gomme d'acacia, 7,5 g de chlorure de sodium et 300 ml d'eau, est ajoutée progressivement une solution organique composée de chlorométhylstyrène, de BEPOO, de chlorobenzène (13 ml) et de peroxyde de benzoyle (0,19 g - 0,001 mol). Le mélange est maintenu sous agitation à 85 °C pendant 16 h, puis filtré sur un tamis. Les billes sont alors placées au Soxhlet et extraites à l'eau pendant 24 h, puis au THF pendant 48 h et séchées au dessiccateur.

PO1 : Du chlorométhylstyrène (14,94 g - 0,098 mol) et du BEPOO (**17**) (0,64 g - 0,002 mol) fournissent 6,43 g de support (41 % de rendement).

- Analyse élémentaire : Calculé : Cl : 22,0 ; O : 0,4, C : 71,2, H : 6,0. Trouvé : Cl : 11,3, O : 5,5, C : 74,6, H : 6,8. Soit 3,2 mmol d'atomes de Cl par gramme de support.

PO2 : Du chlorométhylstyrène (13,65 g - 0,089 mol) et du BEPOO (**17**) (1,07 g - 0,0035 mol) fournissent 5,30 g de support (36 % de rendement).

- Analyse élémentaire : Calculé : Cl : 21,4, O : 0,8, C : 71,7, H : 6,0. Trouvé : Cl : 11,6, O : 5,6, C : 75,6, H : 7,0. Soit 3,3 mmol d'atomes de Cl par gramme de support.

PO3 : Du chlorométhylstyrène (12,36 g - 0,081 mol) et du BEPOO (**17**) (1,50 g - 0,005 mol) fournissent 6,00 g de support (43 % de rendement).

- Analyse élémentaire : Calculé : Cl : 20,5, O : 1,2, C : 72,1, H : 6,1. Trouvé : Cl : 11,6, O : 5,4, C : 75,6, H : 6,9. Soit 3,3 mmol d'atomes de Cl par gramme de support.

Le tableau 55 rassemble les mesures statistiques sur la taille réalisées sur les supports PO1, PO2 et PO3.

	PO1	PO2	PO3
Moyenne	471,809	464,442	421,276
Erreur-type	23,430	18,702	20,524
Médiane	412	399	371
Mode	290	372	371
Écart-type	356,105	206,578	273,059
Nombre d'échantillons	231	122	177
Niveau de confiance (95.0%)	46,164	37,027	40,505

Tableau 55 : Statistiques sur la taille (μm) des supports chlorométhylés synthétisés

IX.6 Greffages sur supports polymères

IX.6.1 Greffage de la fonction O-benzylhydroxylamine

IX.6.1.1 Voie de greffage utilisant la N-hydroxyphthalimide

Mode opératoire : Dans un ballon tricol de 250 ml relié à un réfrigérant à eau, une certaine quantité de support, de la N-hydroxyphthalimide (1 équivalent) et de la triéthylamine (1,2 équivalent) sont placées dans du THF. Le ballon est placé dans un bain d'huile à 85 °C pendant 3 jours. Les supports sont filtrés sur filtré et rincées avec du THF (2 x 20 ml), un mélange eau-THF (50 : 50) (2 x 25 ml), une solution de NaOH à 0,2 mol.l⁻¹ (3 x 20 ml) et de

l'eau (5 x 30 ml). Après séchage au dessiccateur, les supports sont placés dans de l'éthanol dans un ballon tricol relié à un réfrigérant à eau. La solution est portée à reflux et 2 équivalents d'hydrate d'hydrazine sont ajoutés goutte à goutte. Le mélange est porté à 95 °C pendant 4 h. Les supports sont filtrés, rincés avec de l'éthanol, avec un mélange eau-éthanol (50 : 50), une solution aqueuse de KOH à 1 mol.l⁻¹, une solution aqueuse de K₂CO₃ à 2 % et séchées.

PO7 3,4 g de PO1, de la N-hydroxyphthalimide (3,749g - 0,023 mol) et de la triéthylamine (2,525 g - 0,028 mol) sont placés dans du THF (125 ml). Après récupération, les supports sont placés dans de l'éthanol (60 ml) et l'hydrate d'hydrazine (2,3 g – 0,046 mol) est additionnée. 3,06 g de support sont obtenus en fin de traitement (90 % de rendement).

- IR : 3417, 3012, 2916, 2848, 1634, 1609, 1585, 1012, 814.
- Analyse élémentaire : Calculé. N : 5,0, O : 18,0, Cl : 0. Trouvé. N : 3,4, O : 14,4, Cl : 0,4. Soit 2,42 mmol de fonction par gramme de support.

PO8 1 g de PO2, de la N-hydroxyphthalimide (0,489 g - 0,003 mol) et de la triéthylamine (0,342 g - 0,0038 mol) sont placés dans du THF (40 ml). Après récupération, les supports sont placés dans de l'éthanol (20 ml) et de l'hydrate d'hydrazine (0,3 g – 0,006 mol) est additionnée. 0,33 g de support est obtenu en fin de traitement (33 % de rendement).

- IR : 3384, 2920, 2853, 1718, 1636, 1570, 1511, 1420, 1363, 1015, 818.
- Analyse élémentaire : Calculé. C : 84,1, H : 5,9, N : 4,7, O : 5,3, Cl : 0. Trouvé. C : 75,1, H : 7,5, N : 4,3, O : 11, Cl : 0,2. Soit 3 mmol de fonction par gramme de support.

PO9 1 g de PO3, de la N-hydroxyphthalimide (0,489 g - 0,003 mol) et de la triéthylamine (0,342 g - 0,0038 mol) sont placés dans du THF (40 ml). Après récupération, les supports sont placés dans de l'éthanol (20 ml) et de l'hydrate d'hydrazine (0,3 g – 0,006 mol) est additionnée. 0,41 g de support est obtenu en fin de traitement (41 % de rendement).

- IR : 3420, 2919, 2852, 1701, 1636, 1570, 1511, 1420, 1363, 1015, 817, 710.
- Analyse élémentaire : Calculé. C : 84,1, H : 5,9, N : 4,7, O : 5,3, Cl : 0. Trouvé. C : 75,3, H : 7,4, N : 4,2, O : 11,7, Cl : 0,3. Soit 3 mmol de fonction par gramme de support.

PO10 1 g de PO4, de la N-hydroxyphthalimide (0,326 g - 0,002 mol) et de la triéthylamine (0,228 g - 0,00253 mol) sont placés dans du THF (40 ml). Après récupération, les supports

sont placés dans de l'éthanol (19 ml) et de l'hydrate d'hydrazine (0,2 g – 0,004 mol) est additionnée. 0,17 g de support est obtenu en fin de traitement (17 % de rendement).

- IR : 3422, 2921, 1718, 1654, 1601, 1492, 1451, 1364, 1270, 1027, 758, 698.
- Analyse élémentaire : Calculé. C : 87,9, H : 6,1, N : 2,8, O : 3,2, Cl : 0. Trouvé. C : 85,4, H : 7,4, N : 2,3, O : 2,9, Cl : 0,5. Soit 1,6 mmol de fonction par gramme de support.

PO11 1 g de PO5, de la N-hydroxyphthalimide (0,815 g - 0,005 mol) et de la triéthylamine (0,572 g - 0,00635 mol) sont placés dans du THF (40 ml). Après récupération, les supports sont placés dans de l'éthanol (25 ml) et de l'hydrate d'hydrazine (0,5 g – 0,01 mol) est additionnée. 0,36 g de support est obtenu en fin de traitement (36 % de rendement).

- IR : 3423, 2919, 1718, 1634, 1510, 1450, 1420, 1364, 1283, 1009, 817, 701.
- Analyse élémentaire : Calculé. C : 79,3, H : 5,5, N : 7,1, O : 8,1, Cl : 0. Trouvé. C : 74,2, H : 7,4, N : 6,1, O : 9,5, Cl : 0,2. Soit 4,3 mmol de fonction par gramme de support.

PO12 1 g de PO6, de la N-hydroxyphthalimide (0,897 g - 0,0055 mol) et de la triéthylamine (0,630 g - 0,00698 mol) sont placés dans du THF (40 ml). Après récupération, les supports sont placés dans de l'éthanol (25 ml) et de l'hydrate d'hydrazine (0,55 g – 0,011 mol) est additionnée. 0,55 g de support est obtenu en fin de traitement (55 % de rendement).

- IR : 3420, 2920, 2852, 1718, 1586, 1511, 1420, 1367, 1012, 819, 702.
- Analyse élémentaire : Calculé. C : 77,8, H : 5,4, N : 7,8, O : 9, Cl : 0. Trouvé. C : 73,2, H : 7,4, N : 6,4, O : 10,4, Cl : 0,2. Soit 4,6 mmol de fonction par gramme de support.

IX.6.1.2 Voie de greffage utilisant l'acétonoxime

Mise au point de la méthode de greffage, mode opératoire : Le support est placé dans un ballon bicol de 50 ml en présence de 1,3 équivalent d'éthanolate de sodium et 1,2 équivalent d'acétonoxime. Après 3 jours de mise en contact, le support est filtré sur fritté et rincé avec de l'eau (3 x 30 ml). Le support est ensuite mis au contact avec du toluène (15 ml) et une solution aqueuse de HCl à 10 mol.l⁻¹ (3 ml) pendant 3 jours. Le support est ensuite filtré, rincé à l'eau jusqu'à neutralité et séché au dessiccateur.

PO13 1,75 g de PO1, de l'éthanolate de sodium (0,54 g – 0,0073 mol) et de l'acétonoxime (0,44 g – 0,0067 mol) sont placés dans de l'éthanol (20 ml) dans un ballon bicol de 50 ml à

Chapitre IX : Partie expérimentale

45°C sous faible agitation. Après récupération, le support est placé dans un erlenmeyer à température ambiante sur un agitateur va-et-vient évoluant à 100 mouvement/min. 1,65 g de support est récupéré (94 % de rendement).

- IR : 3421, 2923, 1610, 1509, 1420, 1346, 1264, 1206, 1073, 1016, 817, 669.
- Analyse élémentaire : Calculé. N : 9,0, Cl : 0. Trouvé. N : 1,9, Cl : 9,0. Soit 1,36 mmol de fonction par gramme de support.

PO14 1,75 g de PO1, de l'éthanolate de sodium (0,54 g – 0,0073 mol) et de l'acétonoxime (0,44 g – 0,0067 mol) sont placés dans de l'éthanol (20 ml) dans un ballon bicol de 50 ml à 90 °C sans agitation. Après récupération, le support est placé dans un ballon bicol relié à un réfrigérant à 85 °C. 1,67 g de support est récupéré (95 % de rendement).

- IR : 3420, 2921, 1610, 1510, 1420, 1362, 1265, 1212, 1076, 1017, 820, 673.
- Analyse élémentaire : Calculé. N : 9,0 Cl : 0. Trouvé. N : 1,4, Cl : 14,7. Soit 1 mmol de fonction par gramme de support.

PO15 1,75 g de PO1, de l'éthanolate de sodium (0,54 g – 0,0073 mol) et de l'acétonoxime (0,44 g – 0,0067 mol) sont placés dans de l'éthanol (20 ml) dans un ballon bicol de 50 ml à 45 °C sous faible agitation. Après récupération, le support est placé dans un erlenmeyer à température ambiante sur un agitateur va-et-vient évoluant à 100 mouvement/min. 1,69 g de support est récupéré (96 % de rendement).

- IR : 3406, 2921, 1610, 1511, 1420, 1364, 1266, 1212, 1073, 1015, 818, 674.
- Analyse élémentaire : Calculé. N : 9,0 Cl : 0. Trouvé. N : 2,3, Cl : 6,9. Soit 1,67 mmol de fonction par gramme de support.

PO16 1,75 g de PO1, de l'éthanolate de sodium (0,54 g – 0,0073 mol) et de l'acétonoxime (0,44 g – 0,0067 mol) sont placés dans de l'éthanol (20 ml) dans un ballon bicol de 50 ml à 90 °C sans agitation. Après récupération, le support est placé dans un ballon bicol relié à un réfrigérant à 85 °C. 1,71 g de support est récupéré (97 % de rendement).

- IR : 3421, 2921, 1609, 1509, 1420, 1265, 1073, 1017, 819, 668.
- Analyse élémentaire : Calculé. N : 9,0 Cl : 0. Trouvé. N : 1,9, Cl : 14,2. Soit 1,36 mmol de fonction par gramme de support.

Mode opératoire : Le support est mis en présence de 1,3 équivalent d'éthanolate de sodium et 1,2 équivalent d'acétonoxime dans du THF (20 ml). Après 3 jours de mise en contact, le support est filtré sur fritté et rincé avec de l'eau (3 x 30 ml). Le support est ensuite

mis en présence d'une solution aqueuse de HCl à 2 mol.l⁻¹ (15 ml) pendant 3 jours. Le support est ensuite filtré, rincé à l'eau jusqu'à neutralité et séché au dessiccateur.

PO17 1 g de support PO1, de l'éthanolate de sodium (0,29 g – 0,0041 mol) et de l'acétonoxime (0,28 g – 0,0038 mol) sont placés dans le THF. On récupère 0,92 g de support en fin de traitement (92 % de rendement).

- IR : 3420, 2919, 2852, 1609, 1511, 1420, 1364, 1267, 1211, 1073, 1015, 917, 818, 669.
- Analyse élémentaire : Calculé. N : 4,5, Cl : 4,5, O : 10,5. Trouvé. N : 2,7, Cl : 4,4, O : 8,0. Soit 1,9 mmol de fonction par gramme de support.

PO18 1 g de support PO6, de l'éthanolate de sodium (0,51 g – 0,0071 mol) et de l'acétonoxime (0,49 g – 0,0066 mol) sont placés dans le THF. On récupère 0,95 g de support en fin de traitement (95 % de rendement).

- IR : 3446, 2991, 1909, 1610, 1509, 1420, 1265, 1071, 1017, 914, 825, 673.
- Analyse élémentaire : Calculé. N : 2,0, Cl : 7,0, O : 10,5. Trouvé. N : 2,6, Cl : 16,0, O : 1,6. Soit 1,2 mmol de fonction par gramme de support.

Mode opératoire : Le support est mis en présence de 1,3 équivalent d'éthanolate de sodium et 1,2 équivalent d'acétonoxime dans mélange THF : Ethanol (9 : 1) (20 ml). Après 3 jours de mise en contact, le support est filtré sur fritté et rincé avec de l'eau (3 x 30 ml). Le support est ensuite placé avec une solution aqueuse de HCl à 2 mol.l⁻¹ (15 ml) pendant 3 jours. Le support est ensuite filtré, rincé à l'eau jusqu'à neutralité et séché au dessiccateur.

PO19 1 g de support PO1, de l'éthanolate de sodium (0,29 g – 0,0041 mol) et de l'acétonoxime (0,28 g – 0,0038 mol) sont placés dans le mélange de solvants. On récupère 0,98 g de support en fin de traitement (98 % de rendement).

- IR : 3421, 2919, 2852, 1700, 1654, 1609, 1511, 1420, 1366, 1073, 1015, 817.
- Analyse élémentaire : Calculé. N : 4,0, Cl : 8,0, O : 8,0. Trouvé. N : 2,6, Cl : 1,5, O : 8,4. Soit 1,9 mmol de fonction par gramme de support.

PO20 1 g de support PO6, de l'éthanolate de sodium (0,51 g – 0,0071 mol) et de l'acétonoxime (0,49 g – 0,0066 mol) sont placés dans le mélange de solvants. On récupère 0,96 g de support en fin de traitement (96 % de rendement).

- IR : 3422, 2921, 1701, 1609, 1511, 1421, 1367, 1073, 1016, 825.

- Analyse élémentaire : Calculé. N : 4,0, Cl : 8,0, O : 8,0. Trouvé. N : 4,2, Cl : 6,6, O : 6,0. Soit 3 mmol de fonction par gramme de support.

Mode opératoire final : Un erlenmeyer de 100 ml est placé dans un bain de glace. Une solution THF-EtOH (9 : 1) est versé dans cet erlenmeyer à raison de 6 ml par mmol de fonction sur le support, pour 1 g de support. Par rapport aux fonctions portées par les supports, 1,3 équivalents d'éthanolate de sodium sont placés dans la solution, puis 1,2 équivalents d'acétonoxime. Après dissolution les billes sont ajoutées et le mélange est agité à 37 °C sur un agitateur à mouvement latéral (100 mv.min⁻¹) pendant 4 jours. Les supports sont ensuite filtrés, rincés à l'éthanol (2 x 20 ml), puis à l'eau (4x 20 ml) et placés dans une solution de HCl à 2mol.l⁻¹ (10 équivalents). L'agitation est maintenue 2 jours à température ambiante. Les supports sont filtrés, lavés jusqu'à neutralité puis placés dans une solution de potasse 1 mol.l⁻¹ (2 équivalents). Après 2 jours, les supports sont filtrés, lavés jusqu'à neutralité et séchés au dessiccateur avant d'être envoyés en analyse élémentaire.

PO21 1 g de support PO1, de l'éthanolate de sodium (0,29 g – 0,0041 mol) et de l'acétonoxime (0,28 g – 0,0038 mol) sont placés dans le solvant (20 ml). On récupère 0,98 g de support en fin de traitement (98 % de rendement).

- IR : 3421, 2919, 2852, 1700, 1654, 1609, 1511, 1420, 1366, 1073, 1015, 817.
- Analyse élémentaire : Calculé. N : 4,0, Cl : 8,0, O : 8,0. Trouvé. N : 2,6, Cl : 1,5, O : 8,4. Soit 1,9 mmol de fonction par gramme de support.

PO22 1 g de support PO2, de l'éthanolate de sodium (0,27 g – 0,0043 mol) et de l'acétonoxime (0,26 g – 0,0039 mol) sont placés dans le solvant (20 ml). On récupère 0,91 g de support en fin de traitement (91 % de rendement).

- IR : 3422, 2920, 2853, 1701, 1654, 1609, 1511, 1420, 1365, 1074, 1015, 818, 718, 668, 549.
- Analyse élémentaire : Calculé. N : 2,1, Cl : 5,3, O : 4,8. Trouvé. N : 2,5, Cl : 2,9, O : 9,5. Soit 1,8 mmol de fonction par gramme de support.

PO23 1g de support PO3, de l'éthanolate de sodium (0,27 g – 0,0043 mol) et de l'acétonoxime (0,26 g – 0,0039 mol) sont placés dans le solvant (20 ml). On récupère 0,95 g de support en fin de traitement (95 % de rendement).

- IR : 3421, 2920, 2853, 1700, 1654, 1610, 1511, 1420, 1365, 1074, 1015, 817.

Chapitre IX : Partie expérimentale

- Analyse élémentaire : Calculé. N : 2,1, Cl : 5,3, O : 4,8. Trouvé. N : 2,3, Cl : 2,7, O : 9,2. Soit 1,6 mmol de fonction par gramme de support.

PO24 1 g de support PO4, de l'éthanolate de sodium (0,19 g – 0,0026 mol) et de l'acétonoxime (0,18 g – 0,0024 mol) sont placés dans le solvant (15 ml). On récupère 0,92 g de support en fin de traitement (92 % de rendement).

- IR : 3447, 2923, 2852, 1945, 1871, 1803, 1601, 1492, 1451, 1070, 1028, 905, 757, 696.
- Analyse élémentaire : Calculé. N : 4,0, Cl : 8,0, O : 8,0. Trouvé. N : 1,5, Cl : 2,8, O : 3,4. Soit 1,1 mmol de fonction par gramme de support.

PO25 1 g de support PO5, de l'éthanolate de sodium (0,48 g – 0,0065 mol) et de l'acétonoxime (0,44 g – 0,006 mol) sont placés dans le solvant (30ml). On récupère 0,94 g de support en fin de traitement (94 % de rendement).

- IR : 3420, 2920, 2852, 1700, 1653, 1609, 1511, 1420, 1367, 1072, 1015, 824, 701.
- Analyse élémentaire : Calculé. N : 4,0, Cl : 8,0, O : 8,0. Trouvé. N : 3,6, Cl : 6,8, O : 5,4. Soit 2,6 mmol de fonction par gramme de support.

PO26 1 g de support PO6, de l'éthanolate de sodium (0,51 g – 0,0071 mol) et de l'acétonoxime (0,49 g – 0,0066 mol) sont placés dans le solvant (30 ml). On récupère 0,96 g de support en fin de traitement (96 % de rendement).

- IR : 3422, 2921, 1701, 1609, 1511, 1421, 1367, 1073, 1016, 825.
- Analyse élémentaire : Calculé. N : 4,0, Cl : 8,0, O : 8,0. Trouvé. N : 4,2, Cl : 6,6, O : 6,0. Soit 3 mmol de fonction par gramme de support.

PO27 1 g de support PO1, de l'éthanolate de sodium (0,29 g – 0,0041 mol) et de l'acétonoxime (0,28 g – 0,0038 mol) sont placés dans le solvant (20 ml). On récupère 0,98 g de support en fin de traitement (98% de rendement).

- IR : 3422, 2920, 2853, 1701, 1654, 1609, 1511, 1420, 1365, 1074, 1015, 818, 718, 668, 549.
- Analyse élémentaire : Calculé. N : 9,0, Cl : 0. Trouvé. N : 1,9, Cl : 9,0. Soit 1,35 mmol de fonction par gramme de support.

PO28 1 g de support PO4, de l'éthanolate de sodium (0,19 g – 0,0026 mol) et de l'acétonoxime (0,18 g – 0,0024 mol) sont placés dans le solvant (15ml). On récupère 0,92 g de support en fin de traitement (92 % de rendement).

- IR : 3447, 2923, 2852, 1945, 1871, 1803, 1601, 1492, 1451, 1070, 1028, 905, 757, 696.
- Analyse élémentaire : Calculé. N : 4,0, Cl : 8,0, O : 8,0. Trouvé. N : 1,1, Cl : 3,1, O : 3,0. Soit 0,78 mmol de fonction par gramme de support.

PO29 1 g de support PO5, de l'éthanolate de sodium (0,48 g – 0,0065 mol) et de l'acétonoxime (0,44 g – 0,006 mol) sont placés dans le solvant (30 ml). On récupère 0,97 g de support en fin de traitement (97 % de rendement).

- IR : 3420, 2920, 2852, 1700, 1653, 1609, 1511, 1420, 1367, 1072, 1015, 824, 701.
- Analyse élémentaire : Calculé. N : 4,0, Cl : 8,0, O : 8,0. Trouvé. N : 2,6, Cl : 6,8, O : 9,5. Soit 1,85 mmol de fonction par gramme de support.

PO30 1 g de support PO6, de l'éthanolate de sodium (0,51 g – 0,0071 mol) et de l'acétonoxime (0,49 g – 0,0066 mol) sont placés dans le solvant (30 ml). On récupère 0,97 g de support en fin de traitement (97 % de rendement).

- IR : 3422, 2921, 1701, 1609, 1511, 1421, 1367, 1073, 1016, 825.
- Analyse élémentaire : Calculé. N : 4,0, Cl : 8,0, O : 8,0. Trouvé. N : 3,0, Cl : 8,1, O : 4,7. Soit 2,1 mmol de fonction par gramme de support.

IX.6.2 Greffage de la fonction phénylsulfonylhydrazine

IX.6.2.1 Mesure du taux de fonctions supportées SO₃H

Mode opératoire : Les supports Dowex® sont placés au Soxhlet et extraits au THF pendant 48 heures puis séchés au dessiccateur. 1,5 g de support est placé dans 25 ml d'une solution de sulfate de sodium décahydrate à 0,5 mol.l⁻¹. Après 2 h, la solution est dosée avec une solution aqueuse de soude à 1 mol.l⁻¹. Pour chaque lot de support, l'expérience est renouvelée plusieurs fois afin de moyennner le taux de fonctionnalisation des supports.

PP1 mesuré à 3,7 mmol.g⁻¹

PP2 mesuré à 3,5 mmol.g⁻¹

PP3 mesuré à 3,6 mmol.g⁻¹

IX.6.2.2 Voie de greffage utilisant l'acide chlorosulfonique

Mode opératoire : Dans un ballon tricol de 100 ml relié à un réfrigérant à eau et muni d'une agitation magnétique, les supports Dowex® sont placés dans de l'acide chlorosulfonique et doucement agitées pendant une heure à 80 °C. Les supports sont ensuite filtrés sur fritté, rincés avec du dichlorométhane (4 x 20 ml), un mélange dichlorométhane-THF (80 : 20) (3 x 20ml), un mélange dichlorométhane-THF (60 : 40) (20 ml), du THF (12 ml) et du dichlorométhane (2 x 12 ml). Les supports obtenus sont séchés au dessiccateur jusqu'à une masse stable. Les supports sont progressivement ajoutés à une solution d'hydrate d'hydrazine (4 équivalents) dans de l'eau, dans un bain de glace. Après 5 h les supports sont filtrés sur fritté, rincés avec une solution aqueuse d'acide chlorhydrique à 3 mol.l⁻¹, puis à l'eau jusqu'à l'obtention d'un pH supérieur à 5. Après séchage au dessiccateur, les supports sont envoyés à l'analyse élémentaire.

PP4 5 g de billes PP1 sont placés dans 12 ml d'acide chlorosulfonique. Après séchage, les supports sont placés dans de l'eau (18 ml) et reçoivent l'addition d'hydrate d'hydrazine (3,7 g – 0,074 mol). 3,43 g de support sont récupérés (65 % de rendement).

- IR : 3424, 2926, 1654, 1595, 1496, 1457, 1413, 1330, 1165, 1034, 1007, 833, 775, 668, 579.
- Analyse élémentaire : Calculé. N : 6,0, S : 15,0, Cl : 0. Trouvé. N : 9,0, S : 16,1, Cl : 3,1. Soit 3,2 mmol de fonction par gramme de support.

PP5 5 g de billes PP2 sont placés dans 9,4 ml d'acide chlorosulfonique. Après séchage, les supports sont placés dans de l'eau (14 ml) et reçoivent l'addition d'hydrate d'hydrazine (3,5 g – 0,07 mol). 3,76 g de support sont obtenus (72 % de rendement).

- IR : 3422, 2925, 2852, 1597, 1495, 1451, 1413, 1353, 1165, 1125, 1034, 1006, 833, 775, 673, 578.
- Analyse élémentaire : Calculé. N : 14,0, S : 16,0, Cl : 0. Trouvé. N : 5,3, S : 15,1, Cl : 0,2. Soit 1,9 mmol de fonction par gramme de support.

PP6 5 g de billes PP3 sont placés dans 9 ml d'acide chlorosulfonique. Après séchage, les supports sont placés dans de l'eau (16 ml) et reçoivent l'addition d'hydrate d'hydrazine (3,6 g – 0,072 mol). 4,12 g de support sont obtenus (78 % de rendement).

- IR : 3423, 2924, 2852, 1626, 1596, 1495, 1451, 1413, 1353, 1165, 1125, 1034, 1006, 833, 776, 669, 578.

- Analyse élémentaire : Calculé. N : 6,0, S : 15,0, Cl : 0. Trouvé. N : 6,5, S : 16,0, Cl : 0,5. Soit 2,3 mmol de fonction par gramme de support.

IX.6.2.3 Voie de greffage utilisant le chlorure de thionyle

Mode opératoire : Dans un ballon tricol de 100 ml relié à un réfrigérant à eau, placé dans un bain de glace et muni d'une agitation magnétique, les supports Dowex sont placés en présence de plusieurs équivalents de chlorure de thionyle dans du DMF. Une légère agitation est maintenue pendant 48 h à température ambiante. Les supports sont ensuite filtrés sur fritté, rincés avec du dichlorométhane (4 x 20 ml), puis du THF (4 x 20 ml). Après séchage au dessiccateur, les supports obtenus sont progressivement ajoutés à une solution d'hydrate d'hydrazine (4 équivalents) dans de l'eau, dans un bain de glace. Après 5 h les supports sont filtrés, rincés avec une solution aqueuse d'acide chlorhydrique à 3 mol.l⁻¹, puis à l'eau jusqu'à l'obtention d'un pH supérieur à 5. Après séchage au dessiccateur, les supports sont envoyés en analyse élémentaire.

PP7 4 g de support PP1 sont placés dans du DMF (24 ml) avec 2 équivalents de SOCl₂ (3,52 g). Après séchage, les supports sont placés dans de l'eau (14,5ml) en présence d'hydrate d'hydrazine (2,96 g – 0,0592 mol). 2,88 g de support sont obtenus (72 % de rendement).

- IR : 3447, 2926, 1600, 1496, 1412, 1214, 1173, 1126, 1035, 1007, 833, 774, 672, 579.
- Analyse élémentaire : Calculé. O : 10,9, N : 9,5, S : 10,9, Cl : 0. Trouvé. O : 28,8, N : 7,0, S : 14,2, Cl : <800 ppm. Soit 2,5 mmol de fonction par gramme de support.

PP8 4 g de support PP2 sont placés dans du DMF (24 ml) avec 2 équivalents de SOCl₂ (3,33 g). Après séchage, les supports sont placés dans de l'eau (12 ml) en présence d'hydrate d'hydrazine (2,8 g – 0,056 mol). 3,33 g de support sont obtenus (83 % de rendement).

- IR : 3447, 2920, 1636, 1497, 1412, 1214, 1171, 1126, 1035, 1007, 832, 774, 670, 579.
- Analyse élémentaire : Calculé. O : 9,1, N : 8,0, S : 9,1, Cl : 0. Trouvé. O : 29,8, N : 6,3, S : 14,3, Cl : 300 ppm. Soit 2,25 mmol de fonction par gramme de support.

PP9 4 g de support PP3 sont placés dans du DMF (24 ml) avec 2 équivalents de SOCl₂ (3,42 g). Après séchage, les supports sont placés dans de l'eau (13 ml) en présence d'hydrate d'hydrazine (2,9 g – 0,576 mol). 3,42 g de support sont obtenus (85 % de rendement).

- IR : 3442, 2927, 1600, 1497, 1412, 1214, 1166, 1126, 1034, 1006, 833, 774, 673, 580.

Chapitre IX : Partie expérimentale

- Analyse élémentaire : Calculé. O : 6,3, N : 5,5, S : 6,3, Cl : 0. Trouvé. O : 30,5, N : 5,1, S : 14,1, Cl : 300 ppm. Soit 1,82 mmol de fonction par gramme de support.

PP10 5 g de support PP1 sont placés dans du DMF (30 ml) avec 3 équivalents de SOCl_2 (6,6 g). Après séchage, les supports sont placés dans de l'eau (18 ml) en présence d'hydrate d'hydrazine (3,7 g – 0,074 mol). 4,51 g de support sont obtenus (86 % de rendement).

- IR : 3447, 2930, 1654, 1636, 1412, 1214, 1171, 1126, 1035, 1006, 833, 774, 668, 578.
- Analyse élémentaire : Calculé. O : 7,4, N : 6,5, S : 7,4, Cl : 0. Trouvé. O : 31,9, N : 4,9, S : 13,2, Cl : 200 ppm. Soit 1,76 mmol de fonction par gramme de support.

PP11 5 g de support PP2 sont placés dans du DMF (30 ml) avec 3 équivalents de SOCl_2 (6,25 g). Après séchage, les supports sont placés dans de l'eau (14 ml) en présence d'hydrate d'hydrazine (3,5 g – 0,07 mol). 4,41 g de support sont obtenus (84 % de rendement).

- IR : 3430, 2926, 1600, 1412, 1214, 1164, 1126, 1034, 1006, 832, 774, 671, 579.
- Analyse élémentaire : Calculé. O : 6,1, N : 5,3, S : 6,1, Cl : 0. Trouvé. O : 33,1, N : 3,7, S : 12,7, Cl : 220 ppm. Soit 1,34 mmol de fonction par gramme de support.

PP12 5 g de support PP3 sont placés dans du DMF (30 ml) avec 3 équivalents de SOCl_2 (6,42 g). Après séchage, les supports sont placés dans de l'eau (16 ml) en présence d'hydrate d'hydrazine (3,6 g – 0,072 mol). 4,24 g de support sont obtenus (81 % de rendement).

- IR : 3432, 2926, 1636, 1600, 1412, 1219, 1164, 1126, 1034, 1006, 832, 672, 579.
- Analyse élémentaire : Calculé. O : 5,1, N : 4,5, S : 5,1, Cl : 0. Trouvé. O : 33,6, N : 3,6, S : 13,2, Cl : 200 ppm. Soit 1,3 mmol de fonction par gramme de support.

PP13 4 g de support PP1 sont placés dans du DMF (24 ml) avec 4 équivalents de SOCl_2 (7,05 g). Après séchage, les supports sont placés dans de l'eau (14,5 ml) en présence d'hydrate d'hydrazine (2,96 g – 0,0592 mol). 3,22 g de support sont obtenus (80 % de rendement).

- IR : 3446, 2926, 1654, 1636, 1593, 1413, 1364, 1168, 1035, 1008, 834, 774, 674, 579.
- Analyse élémentaire : Calculé. O : 10,2, N : 8,9, S : 10,2, Cl : 0. Trouvé. O : 20,4, N : 6,9, S : 15,3, Cl : 6,5. Soit 2,46 mmol de fonction par gramme de support.

PP14 4 g de support PP2 sont placés dans du DMF (24 ml) avec 4 équivalents de SOCl_2 (6,66 g). Après séchage, les supports sont placés dans de l'eau (12 ml) en présence d'hydrate d'hydrazine (2,8 g – 0,056 mol). 2,99 g de support sont obtenus (75 % de rendement).

- IR : 3447, 2930, 1654, 1636, 1412, 1327, 1167, 1035, 1007, 832, 775, 670, 579.

Chapitre IX : Partie expérimentale

- Analyse élémentaire : Calculé. O : 12,2, N : 10,7, S : 12,2, Cl : 0. Trouvé. O : 21,8, N : 9,6, S : 14,9, Cl : 1,7. Soit 3,42 mmol de fonction par gramme de support.

PP15 4 g de support PP3 sont placés dans du DMF (24 ml) avec 4 équivalents de SOCl_2 (6,85 g). Après séchage, les supports sont placés dans de l'eau (13 ml) en présence d'hydrate d'hydrazine (2,9 g – 0,0576 mol). 3,21 g de support sont obtenus (80 % de rendement).

- IR : 3446, 2926, 1598, 1496, 1412, 1168, 1127, 1035, 1007, 833, 775, 673, 580.
- Analyse élémentaire : Calculé. O : 9,9, N : 8,7, S : 9,9, Cl : 0. Trouvé. O : 27,2, N : 7,8, S : 14,6, Cl : 515 ppm. Soit 2,78 mmol de fonction par gramme de support.

PP16 5 g de support PP1 sont placés dans du DMF (30 ml) avec 5 équivalents de SOCl_2 (11 g). Après séchage, les supports sont placés dans de l'eau (18 ml) en présence d'hydrate d'hydrazine (3,7 g – 0,074 mol). 4,20 g de support sont obtenus (80 % de rendement).

- IR : 3368, 2920, 1594, 1492, 1456, 1415, 1324, 1165, 1090, 1003, 834,8, 773, 666, 575.
- Analyse élémentaire : Calculé. O : 12,7, N : 11,1, S : 12,7, Cl : 0. Trouvé. O : 20,6, N : 8,1, S : 15,0, Cl : 4,9. Soit 2,89 mmol de fonction par gramme de support.

PP17 5 g de support PP2 sont placés dans du DMF (30 ml) avec 5 équivalents de SOCl_2 (10,42 g). Après séchage, les supports sont placés dans de l'eau (14 ml) en présence d'hydrate d'hydrazine (3,5 g – 0,07 mol). 4,17 g de support sont obtenus (80 % de rendement).

- IR : 3444, 2920, 1594, 1492, 1446, 1412, 1224, 1166, 1127, 1035, 1008, 832, 775, 668, 580.
- Analyse élémentaire : Calculé. O : 10,2, N : 8,9, S : 10,2, Cl : 0. Trouvé. O : 21,0, N : 10,7, S : 14,9, Cl : 0,4. Soit 3,82 mmol de fonction par gramme de support.

PP18 5 g de support PP3 sont placés dans du DMF (30 ml) avec 5 équivalents de SOCl_2 (10,71 g). Après séchage, les supports sont placés dans de l'eau (16 ml) en présence d'hydrate d'hydrazine (3,6 g – 0,072 mol). 4,10 g de support sont obtenus (78 % de rendement).

- IR : 3443, 2926, 1598, 1496, 1412, 1328, 1165, 1127, 1035, 1007, 833, 775, 670, 580.
- Analyse élémentaire : Calculé. O : 10,3, N : 9,0, S : 10,3, Cl : 0. Trouvé. O : 26,1, N : 8,7, S : 13,9, Cl : 660 ppm. Soit 3,10 mmol de fonction par gramme de support.

PP19 5 g de support PP1 sont placés dans du DMF (30 ml) avec 3 équivalents de SOCl_2 (6,6 g). Après séchage, les supports sont placés dans de l'eau (18 ml) en présence d'hydrate d'hydrazine (3,7 g – 0,074 mol). 4,51 g de support sont obtenus (90 % de rendement).

- IR : 3447, 2930, 1654, 1636, 1412, 1214, 1171, 1126, 1035, 1006, 833, 774, 668, 578.
- Analyse élémentaire : Calculé. O : 5,0, N : 4,4, S : 5,0, Cl : 0. Trouvé. O : 37,0, N : 2,0, S : 12,5, Cl : < 200 ppm. Soit 0,71 mmol de fonction par gramme de support.

PP20 5 g de support PP2 sont placés dans du DMF (30 ml) avec 3 équivalents de SOCl_2 (6,25 g). Après séchage, les supports sont placés dans de l'eau (14 ml) en présence d'hydrate d'hydrazine (3,5 g – 0,07 mol). 3,59 g de support sont obtenus (72 % de rendement).

- IR : 3444, 2920, 1594, 1492, 1446, 1412, 1224, 1166, 1127, 1035, 1008, 832, 775, 668, 580.
- Analyse élémentaire : Calculé. O : 4,9, N : 3,4, S : 4,9, Cl : 0. Trouvé. O : 36,5, N : 2,6, S : 12,4, Cl : < 200ppm. Soit 1,91 mmol de fonction par gramme de support.

PP21 5 g de support PP3 sont placés dans du DMF (30 ml) avec 3 équivalents de SOCl_2 (6,43 g). Après séchage, les supports sont placés dans de l'eau (16 ml) en présence d'hydrate d'hydrazine (3,6 g – 0,072 mol). 3,44 g de support sont obtenus (69 % de rendement).

- IR : 3443, 2926, 1598, 1496, 1412, 1328, 1165, 1127, 1035, 1007, 833, 775, 670, 580.
- Analyse élémentaire : Calculé. O : 4,4, N : 12,6, S : 14,4, Cl : 0. Trouvé. O : 32,0, N : 5,3, S : 13,7, Cl : 420 ppm. Soit 1,89 mmol de fonction par gramme de support.

PP22 22,5 g de support PP1 sont placés dans du DMF (135 ml) avec 3 équivalents de SOCl_2 (29,72 g). Après séchage, les supports sont placés dans de l'eau (81 ml) en présence d'hydrate d'hydrazine (16,65 g – 0,333 mol). 19,89 g de support sont obtenus (88 % de rendement).

- IR : 3440, 2920, 1624, 1599, 1497, 1412, 1354, 1211, 1166, 1126, 1035, 1007, 834, 774, 668, 570.
- Analyse élémentaire : Calculé. O : 10,1, N : 8,8, S : 10,1, Cl : 0. Trouvé. O : 28,8, N : 7,4, S : 14,3, Cl : 200 ppm. Soit 2,64 mmol de fonction par gramme de support.

PP23 22,5 g de support PP2 sont placés dans du DMF (135 ml) avec 5 équivalents de SOCl_2 (46,86 g). Après séchage, les supports sont placés dans de l'eau (63 ml) en présence d'hydrate d'hydrazine (15,75 g – 0,315 mol). 18,47 g de support sont obtenus (82 % de rendement).

- IR : 3445, 2925, 1596, 1492, 1450, 1415, 1326, 1166, 1036, 1007, 833, 775, 667, 570.

- Analyse élémentaire : Calculé. O : 10,5, N : 9,1, S : 10,5, Cl : 0. Trouvé. O : 19,8, N : 10,6, S : 15,4, Cl : 1,5. Soit 3,78 mmol de fonction par gramme de support.

PP24 22,5 g de support PP3 sont placés dans du DMF (135 ml) avec 5 équivalents de SOCl_2 (48,2 g). Après séchage, les supports sont placés dans de l'eau (72 ml) en présence d'hydrate d'hydrazine (16,2 g – 0,324 mol). 20,46 g de support sont obtenus (91 % de rendement).

- IR : 3445, 2926, 1624, 1598, 1497, 1451, 1442, 1327, 1211, 1166, 1125, 1035, 1007, 832, 775, 671, 580.
- Analyse élémentaire : Calculé. O : 12,1, N : 10,6, S : 12,1, Cl : 0. Trouvé. O : 25,9, N : 9,8, S : 14,2, Cl : 300 ppm. Soit 3,5 mmol de fonction par gramme de support.

PP25 22,5 g de support PP1 sont placés dans du DMF (135 ml) avec 3 équivalents de SOCl_2 (29,72 g). Après séchage, les supports sont placés dans de l'eau (81 ml) en présence d'hydrate d'hydrazine (16,65 g – 0,333 mol). 19 g de support sont obtenus (84 % de rendement).

- IR : 3446, 2925, 2853, 2687, 1653, 1622, 1596, 1353, 1163, 834.
- Analyse élémentaire : Calculé. O : 28,0, N : 7,0, S : 14,0, Cl : ppm. Trouvé. O : 25,3, N : 8,0, S : 14,5, Cl : <200 ppm. Soit 2,8 mmol de fonction par gramme de support.

IX.7 Greffages sur supports de silice

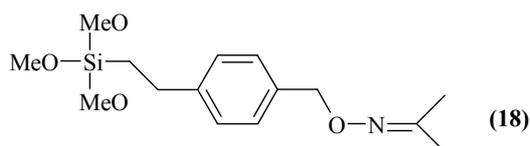
IX.7.1 Mesures des surfaces BET des supports de silice

Si1 : surface BET : 300 m^2/g

Si2 : surface BET : 178 m^2/g

IX.7.2 Greffage de la fonction O-benzylhydroxylamine

IX.7.2.1 Synthèse du 2-(4-acétoximéthylphényl)-éthyltriméthoxysilane (18)



Dans un tube de Schlenk sec, muni d'une agitation magnétique, sous atmosphère inerte, la O-(*p*-vinyl-benzyl)acétoxime (**12**) (1,13 g - 0,006 mol) est introduite. Le triméthoxysilane (4,39 g - 0,036 mol) fraîchement distillé, du toluène anhydre (6 ml), pour

former une solution de concentration 1 mol.l^{-1} en composé insaturé, ainsi qu'une goutte de catalyseur de Karstedt (PCO 72) sont ajoutés. Le milieu réactionnel est alors chauffé à $40 \text{ }^\circ\text{C}$ durant 2 h. Après retour à température ambiante, le toluène et l'excès de triméthoxysilane sont évaporés sous pression réduite à l'aide d'une pompe à palette. Le composé obtenu est stocké sous argon. Le composé est obtenu sous forme d'un liquide jaune. L'enregistrement du spectre RMN montre que le composé isolé est le réactif de départ.

IX.7.2.2 Greffages sur supports

IX.7.2.2.1 Greffage du 2-(4-chlorométhylphényl)éthyltriméthoxysilane

Mode opératoire : Le support séché au dessiccateur est placé dans un erlenmeyer de 100 ml en présence de 2-(4-chlorométhylphényl)-éthyltriméthoxysilane (**19**) et dans de l'acétone (10 ml). Le mélange est placé sous argon. L'agitation à température ambiante est maintenue 4 jours sur un agitateur va-et-vient évoluant à 100 mv.min^{-1} . Le support est ensuite filtré et rincé à l'acétone (4 x 15 ml).

Essai 1 1 g de Si1 est placé avec 1 équivalent de composé (**19**) (0,684 g – 0,0025 mol). On récupère 0,75 g de support (46 % de rendement).

- Analyse élémentaire : Calculé. C : 6,1, Cl : 1,7. Trouvé. C : 7,0, Cl : 2,0. Soit 0,56 mmol de fonction par gramme de support.

Essai 2 1 g de Si1 est placé avec 1 équivalent de composé (**19**) (0,684 g – 0,0025 mol). On récupère 1,08 g de support (67 % de rendement).

- Analyse élémentaire : Calculé. C : 26,9, Cl : 8,8. Trouvé. C : 3,5, Cl : 0,9. Soit 0,25 mmol de fonction par gramme de support.

Essai 3 1 g de Si1 est placé avec 2 équivalents de composé (**19**) (1,370 g – 0,005 mol). On récupère 1,08 g de support (67 % de rendement).

- Analyse élémentaire : Calculé. C : 26,9, Cl : 8,8. Trouvé. C : 4,8, Cl : 2,0. Soit 0,56 mmol de fonction par gramme de support.

IX.7.2.2.2 Substitution de l'atome de chlore par la voie utilisant la N-hydroxy-phtalimide

Dans un ballon tricol de 50 ml relié à un réfrigérant à eau, de la silice fonctionnalisée avec du chlorure de benzyle (1,5 g – 0,00195 mol), de la N-hydroxyphtalimide (0,326 g - 0,002 mol) et de la triéthylamine (0,243 g - 0,0024 mol) sont placées dans du THF (25 ml). Le ballon est placé dans un bain d'huile à 85 °C pendant 4 jours. Le support est filtré sur fritté et rincé avec du THF (2 x 15 ml), un mélange eau-THF (50 : 50) (2 x 20 ml), une solution de NaOH à 0,2 mol.l⁻¹ (3 x 25 ml) et de l'eau (5 x 30 ml). Après séchage au dessiccateur, le support est placée dans un ballon tricol de 50 ml relié à un réfrigérant à eau dans 20 ml d'éthanol. La solution est portée à reflux et de l'hydrate d'hydrazine (0,156 g – 0,00312 mol) est ajoutée goutte à goutte. Le mélange est porté à 95 °C pendant 4 h. Le support est filtré, rincé avec de l'éthanol (20 ml), un mélange eau-éthanol (50 : 50) (20 ml), une solution aqueuse de KOH à 1 mol.l⁻¹ (20 ml), une solution aqueuse de K₂CO₃ à 2 % (20 ml) et séché au dessiccateur. On récupère 1,37 g de support (91 % de rendement).

- Analyse élémentaire : Calculé. N : 1,8, H : 2,6, C : 10,8, Cl : 0. Trouvé. N : 0,7, H: 1,5, C : 6,9 , Cl : 565 ppm. Soit 0,5 mmol de fonction par gramme de support.

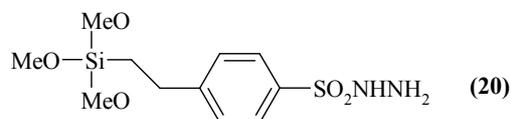
IX.7.2.2.3 Substitution de l'atome de chlore par la voie acétonoxime

Dans un ballon de 50 ml, une silice chlorométhylée (1 g – 0,0013 mol) est placée en présence d'éthanolate de sodium (0,55 g – 0,0078 mol) et d'oxime de l'acétone (0,53 g – 0,00715 mol) dans de l'éthanol (20 ml) dans un bain glace / eau. Le mélange est agité 4 jours à 50°C à 500 tr.min⁻¹. La silice est ensuite filtrée, rincée à l'éthanol, puis à l'eau et placée dans une solution d'acide chlorhydrique 2 mol.l⁻¹ (4 ml - 10 équivalents). L'agitation est maintenue 3 jours à température ambiante. La silice est filtrée, lavée jusqu'à neutralité puis placée dans une solution de K₂CO₃ à 2 mol.l⁻¹ (2 équivalents). Après 2 jours, la silice est filtrée, lavée jusqu'à neutralité et séchée au dessiccateur avant d'être envoyée en analyse élémentaire. On récupère 0,28 g de support (28 % de rendement).

- Analyse élémentaire : Calculé. N : 1,8, H : 2,6, C : 10,8, Cl : 0. Trouvé. N : 0,1, H: 1,2, C : 3,8, Cl : 1550 ppm. Soit 0,08 mmol de fonction par gramme de support.

IX.7.3 Greffage de la fonction phénylsulfonylhydrazine

IX.7.3.1 Synthèse du 2-(4-sulfonylhydrazinephényl)éthyltriméthoxysilane (20)



Dans un tube de Schlenk sec, muni d'une agitation magnétique, sous atmosphère inerte, le *p*-sulfonylhydrazine-styrène (0,593 g - 0,003 mol) est introduite. Le triméthoxysilane (2,196 g - 0,018 mol) fraîchement distillé, du toluène anhydre (3 ml), pour former une solution de concentration 1 mol.l⁻¹ en composé insaturé, ainsi qu'une goutte de catalyseur de Karstedt (PCO 72) sont ajoutés. Le milieu réactionnel est alors chauffé à 40 °C durant 2 h. Après retour à température ambiante, le toluène et l'excès de triméthoxysilane sont évaporés sous pression réduite à l'aide d'une pompe à palette. Le composé obtenu sous forme d'un solide jaune (0,653 g – 67 % de rendement) est stocké sous argon. Les spectres RMN du produit obtenu ont été enregistrés. Ils ne correspondent pas au produit attendu.

- RMN ¹H : 3,77 (s, 3H), 5,49 (d, 1H, J = 10,9 Hz), 5,93 (d, 1H, J = 17,3 Hz), 6,78 (dd, 1H, J = 10,9 et 17,3 Hz), 7,19 (d, 2H, J = 7,5 Hz), 7,26 (d, 2H, J = 7,5 Hz), 7,58 (dd, 2H, J = 1,5 et 6,4 Hz), 7,88 (dd, 2H, J = 1,5 et 6,4 Hz).
- RMN ¹³C : 56,43, 92,45, 118,30, 127,00, 128,30, 134,00, 138,03, 142,21.

IX.7.3.2 Greffages sur support de la phénylsulfonylhydrazine

Mode opératoire : Le support de silice est placé dans un erlenmeyer de 100 ml. Un (ou plusieurs) équivalent(s) de 2-(4-chlorosulfonylphényl)éthyltriméthoxysilane (21) (par rapport au nombre de fonctions hydroxyles supposées sur le support) à 50 % dans du dichlorométhane et du dichlorométhane (ou du chloroforme) sont ajoutés sous argon. Après un certain temps d'agitation sur un agitateur va-et-vient à température ambiante, la solution est filtrée et le support rincé au dichlorométhane (4 x 15 ml). Dans un erlenmeyer de 100 ml, la silice est progressivement additionnée à 4 équivalents d'hydrate d'hydrazine placés dans de l'eau, dans un bain de glace. Le mélange est agité 3 jours sur l'agitateur va-et-vient à température ambiante. Le support est filtré, rincé avec une solution aqueuse d'acide chlorhydrique à 3 mol.l⁻¹, puis à l'eau jusqu'à l'obtention d'un pH supérieur à 5.

Essai 1 2 g de Si2 sont placés avec 1 équivalent de composé **(21)** (1,2 ml – 0,003 mol) dans du CH₂Cl₂ (20 ml) à température ambiante pendant 8 jours. Après élimination du solvant, de l'hydrate d'hydrazine (0,6 g – 0,012 mol) est additionnée dans de l'eau (7 ml). On récupère 2,15 g de support (65 % de rendement).

- Analyse élémentaire : Calculé. N : 4,0, S : 2,0, C : 5,0, Cl : 0. Trouvé. N : 1,4, S : 1,7, C : 5,6, Cl : <250 ppm. Soit 0,5 mmol de fonction par gramme de support.

Essai 2 2 g de Si1 sont placés avec 1 équivalent de composé **(21)** (2,2 ml – 0,005 mol) dans du CH₂Cl₂ (20 ml) à température ambiante pendant 8 jours. Après élimination du solvant, de l'hydrate d'hydrazine (1 g – 0,02 mol) est additionnée dans de l'eau (7 ml). On récupère 1,75 g de support (63 % de rendement).

- Analyse élémentaire : Calculé. N : 3,5, S : 1,5, C : 4,5, Cl : 0. Trouvé. N : 0,6, S : 0,7, C : 2,1, Cl : <250 ppm. Soit 0,2 mmol de fonction par gramme de support.

Essai 3 2 g de Si1 sont placés avec 1 équivalent de composé **(21)** (2,2 ml – 0,005 mol) dans du CH₂Cl₂ (20 ml) à reflux pendant 8 jours. Après élimination du solvant, de l'hydrate d'hydrazine (1 g – 0,005 mol) est additionnée dans de l'eau (7 ml). On récupère 2,31 g de support (70 % de rendement).

- Analyse élémentaire : Calculé. N : 1,9, S : 2,1, C : 6,5, Cl : 0. Trouvé. N : 0,9, S : 1,8, C : 5,1, Cl : <0,2. Soit 0,3 mmol de fonction par gramme de support.

Essai 4 1 g de Si1 est placé avec 2 équivalents de composé **(21)** (2,2 ml – 0,005 mol) dans du CH₂Cl₂ (20 ml) à reflux pendant 8 jours. Après élimination du solvant, de l'hydrate d'hydrazine (0,5 g – 0,01 mol) est additionnée dans de l'eau (3,5 ml). On récupère 0,96 g de support (58 % de rendement).

- Analyse élémentaire : Calculé. N : 2,3, S : 2,6, C : 7,8, Cl : 0. Trouvé. N : 1,0, S : 2,0, C : 6,0, Cl : <0,2. Soit 0,37 mmol de fonction par gramme de support.

Essai 5 2 g de Si1 sont placés avec 1 équivalent de composé **(21)** (2,2 ml – 0,005 mol) dans du CHCl₃ (28 ml) à reflux pendant 8 jours. Après élimination du solvant, de l'hydrate d'hydrazine (1 g – 0,02 mol) est additionnée dans de l'eau (7 ml). On récupère 2,28 g de support (69 % de rendement).

- Analyse élémentaire : Calculé. N : 2,4, S : 2,8, C : 8,4, Cl : 0. Trouvé. N : 1,0, S : 1,8, C : 6,8, Cl : <200 ppm. Soit 0,35 mmol de fonction par gramme de support.

Essai 6 1 g de Si1 est placé avec 2 équivalents de composé **(21)** (2,2 ml – 0,005 mol) dans du CHCl_3 (28 ml) à reflux pendant 8 jours. Après élimination du solvant, de l'hydrate d'hydrazine (0,5 g – 0,01 mol) est additionnée dans de l'eau (3,5 ml). On récupère 1,16 g de support (71 % de rendement).

- Analyse élémentaire : Calculé. N : 3,5, S : 4,0, C : 12,0, Cl : 0. Trouvé. N : 1,0, S : 2,1, C : 7,3, Cl : 260 ppm. Soit 0,35 mmol de fonction par gramme de support.

Essai 7 2 g de Si1 sont placés avec 1 équivalent de composé **(21)** (2,2 ml – 0,005 mol) dans du CH_2Cl_2 (20 ml) à température ambiante pendant 14 jours. Après élimination du solvant, de l'hydrate d'hydrazine (1 g – 0,02 mol) est additionnée dans de l'eau (7 ml). On récupère 3,2 g de support (93 % de rendement).

- Analyse élémentaire : Calculé. N : 0,9, S : 1,0, C : 2,9, Cl : 0. Trouvé. N : 0,1, S : 1,2, C : 3,8, Cl : <200 ppm. Soit 0,1 mmol de fonction par gramme de support.

Essai 8 1 g de Si1 est placé avec 2 équivalents de composé **(21)** (2,2 ml – 0,005 mol) dans du CH_2Cl_2 (20 ml) à température ambiante pendant 14 jours. Après élimination du solvant, de l'hydrate d'hydrazine (0,5 g – 0,01 mol) est additionnée dans de l'eau (3,5 ml). On récupère 1,32 g de support (77 % de rendement).

- Analyse élémentaire : Calculé. N : 0,9, S : 1,0, C : 2,9, Cl : 0. Trouvé. N : 0,2, S : 1,5, C : 5,0, Cl : <200 ppm. Soit 0,1 mmol de fonction par gramme de support.

Essai 9 1 g de Si1 est placé avec 4 équivalents de composé **(21)** (4,4 ml – 0,01 mol) dans du CH_2Cl_2 (20 ml) à température ambiante pendant 8 jours. Après élimination du solvant, de l'hydrate d'hydrazine (0,5 g – 0,01 mol) est additionnée dans de l'eau (3,5 ml). On récupère 1,04 g de support (61 % de rendement).

- Analyse élémentaire : Calculé. N : 1,9, S : 2,2, C : 6,5, Cl : 0. Trouvé. N : 0,2, S : 0,9, C : 3,5, Cl : 0,1. Soit 0,13 mmol de fonction par gramme de support.

Essai 10 1 g de Si1 est placé avec 4 équivalents de composé **(21)** (4,4 ml – 0,01 mol) pendant 8 jours à température ambiante sans solvant. Après rinçage et élimination du solvant, de l'hydrate d'hydrazine (0,5 g – 0,01 mol) est additionnée dans de l'eau (3,5 ml). On récupère 1,06 g de support (62 % de rendement).

- Analyse élémentaire : Calculé. N : 1,1, S : 1,3, C : 3,9, Cl : 0. Trouvé. N : 0,3, S : 1,3, C : 4,0, Cl : 200 ppm. Soit 0,1 mmol de fonction par gramme de support.

IX.8 Extractions

IX.8.1 Extractions en milieu homogène modèle

IX.8.1.1 Extraction de l'éthanal, de l'acide pyruvique et de l'acide 2-oxoglutarique

La solution modèle est composée d'éthanal (0,025 g - 0,000568 mol), d'acide pyruvique (0,05 g - 0,000568 mol), d'acide 2-oxoglutarique (0,05 g - 0,000347 mol) et d'acide tartrique (2g - 0,013 mol) dans une solution éthanol-eau (12 : 88) (500 ml), ramenée à un pH de 3,5 par ajout d'une solution de soude à 2 mol.l⁻¹. Chaque flacon de 100 ml reçoit une quantité d'agent d'extraction correspondant à trois équivalents des dérivés carbonylés présents dans la solution. Les flacons sont placés sur un agitateur rotatif par culbutage évoluant à 9 tours.min⁻¹.

O-benzylhydroxylamine : 0,123 g - 0,001 mol Acide phénylsulfinique : 0,142 g - 0,001 mol
Phénylsulfonylhydrazine : 0,172 g - 0,001 mol Polyéthylènimine : 0,075 g - 0,001 mol

IX.8.1.2 Extraction du 5-oxofructose

La solution de 5-oxofructose à 550 mg.l⁻¹ (94 ml) est ramenée à une concentration de 123 mg/L par dilution (addition de 50,5 ml d'éthanol et 275,5 ml d'eau). De l'acide tartrique (1,68 g - 0,0011 mol) est ajouté dans la solution éthanol-eau (12 : 88) (420 ml), ramenée à un pH de 3,5 par ajout d'une solution de soude à 2 mol.l⁻¹. Chaque flacon de 100 ml reçoit une quantité d'agent d'extraction correspondant à trois équivalents des dérivés carbonylés présents dans la solution. Les flacons sont placés sur un agitateur rotatif par culbutage évoluant à 9 tours.min⁻¹.

O-benzylhydroxylamine: 0,026 g - 0,0002 mol Acide phénylsulfinique: 0,030 g - 0,0002mol
Phénylsulfonylhydrazine: 0,036 g - 0,0002 mol Polyéthylènimine : 0,015 g - 0,0002 mol

IX.8.1.3 Extraction en présence de sucres

Extraction en présence de sucres : La solution modèle est composée d'éthanal (0,025 g - 0,000568 mol), d'acide pyruvique (0,05 g - 0,000568 mol), d'acide 2-oxoglutarique (0,05 g - 0,000347 mol), d'acide tartrique (2 g - 0,0013 mol), de fructose (37,5 g - 0,208 mol) et de glucose (12,5 g - 0,0694 mol) dans une solution éthanol-eau (12 : 88) (500 ml), ramenée à un pH de 3,5 par ajout d'une solution de soude à 2 mol.l⁻¹. Chaque flacon de 100 ml reçoit une

quantité d'agent d'extraction correspondant à trois équivalents des dérivés carbonyles présents dans la solution. Les flacons sont placés sur un agitateur rotatif par culbutage évoluant à 9 tours.min⁻¹.

O-benzylhydroxylamine : 0,123 g – 0,001 mol

Phénylsulfonylhydrazine : 0,172 g – 0,001 mol

Extraction après mise en présence de sucres : La solution modèle est composée d'acide tartrique (1 g – 0,0066 mol), de fructose (18,75 g – 0,104 mol) et de glucose (6,25 g – 0,0347 mol) dans une solution éthanol-eau (12 : 88) (250 ml), ramenée à un pH de 3,5 par ajout d'une solution de soude à 2 mol.l⁻¹. La solution reçoit de la phénylsulfonylhydrazine (0,199 g – 0,00116 mol). Après 48 h de mise en contact sur un agitateur rotatif par culbutage évoluant à 9 tours.min⁻¹, la solution reçoit de l'acide pyruvique (0,025 g – 0,00028mol). L'extraction de l'acide pyruvique par la phénylsulfonylhydrazine est suivie par dosage enzymatique.

IX.8.1.4 Etude cinétique des extractions en milieu homogène

Préparation des solutions : De l'acide tartrique (4 g – 0,0265 mol) est ajouté à une solution éthanol-eau (12 : 88) (1 L). Une quantité connue d'un dérivé carbonyle est ajoutée. La solution est ensuite ramenée à un pH de 3,5 par ajout d'une solution de soude à 2 mol.l⁻¹.

Ethanal : 0,041 g – 0,00093 mol pour 1L

Acide pyruvique : 0,108 g – 0,0012 mol pour 1L

Acide 2-oxoglutarique : 0,103 g – 0,00071 mol pour 1L

Avant ajout de SO₂ : A une fraction de 100 ml de solution sont ajoutés 3 équivalents d'agent d'extraction. Les quantités sont rassemblées dans le tableau 56. Les flacons sont placés sur un agitateur par culbutage tournant à 9 tours.min⁻¹. Des prélèvements sont régulièrement fait de façon à mesurer la disparition des dérivés carbonyles par dosages enzymatiques.

Solution modèle monocomposé	Quantité d'agent d'extraction pour 100 ml	
	O-benzylhydroxylamine	Phénylsulfonylhydrazine
Ethanal	0,035 g – 0,00028 mol	0,048 g – 0,00028 mol
Acide pyruvique	0,045 g – 0,00036 mol	0,063 g – 0,00036 mol
Acide 2-oxoglutarique	0,026 g – 0,00021 mol	0,036 g – 0,00021 mol

Tableau 56 : Quantités d'agent d'extraction utilisées lors des extractions en solution homogène pour le suivi de la cinétique

Après ajout de SO₂ : Une solution de SO₂ à 5 % (600 µL) est ajoutée à 300 ml de chacune des solutions précédentes, pour obtenir une concentration de 100 mg.l⁻¹. Les solutions sont laissées de côté 72 h afin d'homogénéiser le système. Les extractions sont ensuite réalisées comme avant l'ajout de SO₂.

IX.8.2 Extractions en milieu hétérogène modèle

Les solutions utilisées sont préparées de la même façon que lors des extractions en milieu homogène.

Avant ajout de SO₂ : A une fraction de 100 ml de solution sont ajoutés 3 équivalents d'agent d'extraction. Les quantités sont rassemblées dans le tableau 57. Les flacons sont placés sur un agitateur par culbutage tournant à 9 tours.min⁻¹. Des prélèvements sont régulièrement fait de façon à mesurer la disparition des dérivés carbonylés par dosages enzymatiques.

Support	Quantité de support ajouté dans la solution monocomposé (g)			
	Ethanal	Acide pyruvique	Acide 2-oxoglutarique	5-oxofructose
PO27	0,148	0,180	0,152	-
PO28	0,254	0,310	0,263	-
PO29	0,107	0,131	0,110	-
PO30	0,092	0,112	0,098	-
PP19	0,394	0,480	0,288	-
PP20	0,146	0,177	0,107	-
PP21	0,148	0,180	0,108	-
Si	0,280	0,340	0,205	0,196
Si3	-	-	-	0,590

Tableau 57 : Quantités de supports additionnées aux solutions modèles pour l'étude cinétique de l'extraction en milieu hétérogène

Après ajout de SO₂ : Du métabisulfite de potassium (0,1 g – 0,00052 mol) est ajouté à 500 ml de chacune des solutions précédentes, pour obtenir une concentration en SO₂ de 100 mg.l⁻¹. Les solutions sont laissées de côté 72 h afin d'homogénéiser le système. Les extractions sont ensuite réalisées comme avant l'ajout de SO₂.

IX.8.3 Extraction dans le vin

Les vins utilisés lors des extractions sont des vins blancs liquoreux de Sauternes 2000 et 1999, issus de Sémillon botrytisé.

IX.8.3.1 Extraction sous agitation

Procédure générale : Dans une fraction de 80 ml (100 ml dans le cas du support Si) de vin est ajouté la quantité de support nécessaire pour l'extraction (tableau 58). Les flacons sont placés de une à quatre semaines à agiter à 9 tours.min⁻¹ sur un agitateur rotatif par culbutage. Les solutions sont ensuite toutes filtrées pour éliminer les supports du milieu. Le SO₂ libre est mesuré par la méthode de Ripper. L'éthanal, l'acide pyruvique et l'acide 2-oxoglutarique restant sont déterminés par dosages enzymatiques. Le 5-oxofructose restant est déterminé par la méthode de dérivation utilisant le PFBOA.

Echantillon	Quantité de support dans le vin (en g)			
	PP22	PP23	PP24	Si
Témoin	0	0	0	0
1 éq	0,35	0,24	0,27	1,10
3 éq	1,06	0,73	0,80	3,30
5 éq	1,77	1,22	1,33	5,50

Tableau 58 : Quantités de support additionnées pour l'étude de l'extraction dans un vin

IX.8.3.2 Extraction sans agitation

Procédure générale : Dans une fraction de 80 ml (100 ml dans le cas du support Si) de vin est ajouté la quantité de support nécessaire à l'extraction (tableau 58). Les flacons sont laissés quatre semaines sans agitation. Un prélèvement est effectué après deux semaines afin de mesurer les quantités de dérivés carbonylés restant dans le vin. Les solutions sont ensuite toutes filtrées pour éliminer les supports du milieu. Le SO₂ libre est mesuré par la méthode de Ripper. L'éthanal, l'acide pyruvique et l'acide 2-oxoglutarique restant sont déterminés par dosages enzymatiques. Le 5-oxofructose restant est déterminé par la méthode de dérivation utilisant le PFBOA. Les quantités de support utilisées sont les mêmes que lors de l'extraction sous agitation.

IX.9 Etudes complémentaires

IX.9.1 Recherche des contaminants

Toutes les solutions modèles monocomposés ayant reçu l'ajout de SO₂ ont été extraites après traitement par les différents supports. Tous les échantillons ont été traités suivant la même procédure.

Mode opératoire : Une fraction de 40 ml de la solution modèle est extraite avec 3 x 5 ml de solvant (dichlorométhane ou acétate d'éthyle). La phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée et concentrée à l'évaporateur rotatif jusqu'à un volume de 1 ml. Les résultats des analyses CPG/SM sont présentés en annexe 4.

Lavage des supports : Le support (1 g) est placé dans d'un mélange eau-éthanol (50 : 50) (500 ml) dans une bouteille. Le mélange est placé sur un agitateur rotatif par culbutage évoluant à 12 tours.min⁻¹ pendant 24 h. Le solvant est remplacé 3 fois, l'agitation étant maintenue par période de 24 h.

Supports traités : Si et PP20.

La solution modèle est composée d'acide pyruvique (0,05 g – 0,000568 mol) et d'acide tartrique (2 g – 0,0013 mol) dans une solution éthanol-eau (12 : 88) (500 ml), ramenée à un pH de 3,5 par ajout d'une solution de soude à 2 mol.l⁻¹. Quatre flacons de 100 ml de solution reçoivent une quantité d'agent d'extraction correspondant à trois équivalents des dérivés carbonylés présents dans la solution (0,00034 mol). Le cinquième flacon de 100 ml est conservé comme témoin.

Si lavé : 0,34 g de support

PP20 lavé : 0,178 g de support

Si non lavé : 0,34 g de support

PP20 non lavé : 0,178 g de support

Les flacons sont placés sur un agitateur rotatif par culbutage tournant à 9 tours.min⁻¹ pendant une semaine. Les solutions sont ensuite filtrées pour éliminer les supports. Les solutions sont extraites avec un solvant organique suivant la procédure décrite ci-dessous.

Mode opératoire : Une fraction de 40 ml de la solution est extraite avec 3 x 5 ml de solvant (dichlorométhane ou acétate d'éthyle). La phase organique est séchée sur MgSO₄,

filtrée et concentrée à l'évaporateur rotatif jusqu'à un volume de 1 ml. Les résultats des analyses CPG/SM sont présentés en annexe 5.

IX.9.2 Extraction sur d'autres vins

Les extractions sont réalisées sans agitation. Après deux semaines de mise en contact du support avec le vin, le support est éliminé du mélange par décantation et transvasement du vin dans un second flacon.

Extraction dans le vin de Sauternes 2000 : Vin blanc liquoreux de Sauternes 2000, issus de Sémillon botrytisé. Une bouteille de 750 ml de vin est conservée comme témoin. Les autres reçoivent l'addition d'un support.

Support Si : 7,40 g pour 750 ml de vin

Support PP25 : 3,10 g pour 750 ml de vin

Support P : 4,30 g pour 750 ml de vin

Pour la dégustation, les vins sont ajustés en dioxyde de soufre avec du métabisulfite de potassium de façon à présenter une valeur en SO₂ libre de 38 mg/L.

Extraction dans un vin de Colombard-Sauvignon : Vin blanc sec, vin de pays des côtes de Gascogne, assemblage Colombard-Sauvignon. Une bouteille de 750 ml de vin est conservée comme témoin. Les autres reçoivent l'addition d'un support.

Support Si : 7,45 g pour 750 ml de vin

Support PP25 : 3,10 g pour 750 ml de vin

Extraction dans un vin de Merlot : Vin rouge de Merlot, vin de pays d'Oc. Une bouteille de 750 ml de vin est conservée comme témoin. Les autres reçoivent l'addition d'un support.

Support Si : 7,45 g pour 750 ml de vin

Support PP25(3) : 3,10 g pour 750 ml de vin

Support PP25(1) : 1,00 g pour 750 ml de vin

Bibliographie

- 1 Pouzalques N., Masson G., Guitard A. Comprendre et maîtriser l'état de combinaison du SO₂ dans les vins rosés, *Forum Aredvi 26 juin 2003*, Chambre Régionale d'Agriculture d'Aix-en-Provence, 34-38
- 2 Vinsonneau E., Anneraud M., Benesteau F., Chretien P. Utilisation de la microfiltration tangentielle au mutage sur vins moelleux et liquoreux : synthèse de trois années d'essais *www.matevi-france.com*, 15 p.
- 3 Thurman E. M., Mills M. S. Solid-phase extraction, principles and practice. New York: Wiley, **1998**, 344 p.
- 4 Flynn D. L., Crich J. Z., Devraj R. V., Hockerman S. L., Parlow J. J., South M. S., Woodard S. Chemical library purification strategies based on principles of complementary molecular reactivity and molecular recognition *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, *119*(21), 4874-4881
- 5 Kaldor S. W., Siegel M. G., Fritz J. E., Dressman B. A., Hahn P. J. Use of solid supported nucleophiles and electrophiles the purification of non-peptide small molecule libraries, *Tetrahedron Lett.*, **1996**, *37*(40), 7193-7196
- 6 Ley S. V., Baxendale I. R., Bream R. N., Jackson P. S., Leach A. G., Longbottom D. A., Nesi M., Scott-Storer I., Taylor S. J. Multi-step organic synthesis using solid-supported reagents and scavengers : a new paradigm in chemical library generation *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **2000**, 3815-4195
- 7 Ribéreau-Gayon J., Peynaud E., Ribéreau-Gayon P., Sudraud P. *Traité d'œnologie : Sciences et techniques du vin, tome 4 : Clarification et stabilisation. Matériels et installations*, 2^o édition. Paris : Dunod, **1977**, 643 p.
- 8 Ribéreau-Gayon P., Dubourdiou D., Donèche B., Lonvaud A. *Traité d'œnologie 1 – Microbiologie du vin. Vinifications*, 5^o édition. Paris : Dunod, **2004**, 641 p.
- 9 Ingram M. The germicidal effect of free and combined sulfur dioxide *J. Soc. Chem. Ind., Lond., Trans. Commun.*, **1948**, *67*, 18-21
- 10 Lanteaume M. T., Ramel P., Jaulmes P., Manin D. Détermination et comparaison des DL50 du métabisulfite de potassium de l'éthanal et de leur combinaison (hydroxy-éthane-sulfonate de potassium) par voie orale sur le rat de souche wistar *Ann. Falsif. Exp. Chim.*, **1969**, *62*, 231-241
- 11 Ramel P., Lanteaume M. T., Jaulmes P. Quelques recherches sur la toxicité de l'anhydride sulfureux libre et combiné *Berichte Internationale Fruchtsaft-Union, Wissenschaftlich-Technische Kommission*, **1972**, *12*, 177-187
- 12 Jaulmes P., Bres J. Cinétique de l'action de l'anhydride sulfureux sur la thiamine et la cocarboxylase : possibilité d'action des sulfites sur la thiamine pendant la digestion *Bull. O. I. V.*, **1973**, *46*, 507-515
- 13 Pascal P. *Nouveau traité de chimie minérale. Tome XIII, 2^o fascicule*. Paris : Masson, **1961**, 1236-1243

Bibliographie

- 14 Usseglio-Tomasset L. *Chimie oenologique*, 2^o édition française. Paris, Londres, New York : Lavoisier Technique & Documentation, **1995**, 387 p.
- 15 Grignard V., Dupont G., Locquin R., Baud P. *Traité de chimie organique, tome VII*. Paris : Masson, **1950**, 769-770
- 16 Burroughs L. F., Sparks A. H. Sulfite-binding power of wines and ciders. II. Theoretical consideration and calculation of sulfite-binding equilibria *J. Sci. Food Agric.*, **1973**, *24*, 199-206
- 17 Navarre C. *L'œnologie*, 2^o édition. Londres, Paris, New York : Lavoisier-Technique & Documentation, **1991**, 324 p.
- 18 Burroughs L. F., Sparks A. H. Sulfite-binding power of wines and ciders I. Equilibrium constants for the dissociation of carbonyl bisulfite compounds *J. Sci. Food Agric.*, **1973**, *24*, 187-198
- 19 Ribéreau-Gayon J., Peynaud E., Sudraud P., Ribéreau-Gayon P. *Traité d'œnologie. Sciences et techniques du vin, tome 1 – analyse et contrôle des vins*, 2^o édition. Paris : Dunod, **1982**, 645 p.
- 20 Blouin J. *Contribution à l'étude des combinaisons de l'anhydride sulfureux dans les moûts et les vins*. Th.: Bordeaux II: **1965**: n°117: 177 p.
- 21 Barbe J.-C. La combinaison du dioxyde de soufre dans les moûts et les vins issus de raisins botrytisés. Th.: Sc. Biol. et Méd.: Bordeaux II: **2000**, n° 745, 165 p.
- 22 Gallezot P. Metal catalysis in the conversion of biosustainable resources *Catalysis by metals*, Ed. A. J. Renouprez, H. Jobic. Les Ulis : Springer, **1997**, 201-221
- 23 Whiting G. C., Cogging R. A. Formation of 2,5-D-threo-diketose *Chem. Ind.*, **1963**, 1925-1926
- 24 Heinen A. W., Peters J. A., van Bekkum H. The oxidation of fructose on Pt/C catalysts. The formation of D-threo-hexo-2,5-diulose and the effect of additives *Carbohydrate Research*, **1997**, *304*, 155-164
- 25 Danneel H.-J., Rössner E., Zeck A., Giffhorn F. Purification and characterization of a pyranose oxidase from the basidiomycete *Peniophora gigantea* and chemical analyses of its reaction products *Eur. J. Biochem.*, **1993**, *214*, 795-802
- 26 Boller T., Meier C., Menzler S. Eupergit oxirane acrylic beads: how to make enzymes fit for biocatalysis *Organic Process Research & Development*, **2002**, *6(4)*, 509-519
- 27 Huwig A., Danneel H.-J., Giffhorn F. Laboratory procedures for producing 2-keto-D-glucose, 2-keto-D-xylose and 5-keto-D-fructose from D-glucose, D-xylose and L-sorbose with immobilized pyranose oxidase of *Peniophora gigantea* *J. Biotechnol.*, **1994**, *32*, 309-315
- 28 Freimund S., Huwig A., Giffhorn F., Köpper S. Rare keto-aldoses from enzymatic oxidation: substrates and oxidation products of pyranose 2-oxidase *Chem. Eur. J.*, **1998**, *4(12)*, 2442-2455

Bibliographie

- 29 Barbe J.-C., de Revel G., Joyeux A., Lonvaud-Funel A., Bertrand A. Role of carbonyl compounds in SO₂ binding phenomena in musts and wines from botrytized grapes *J. Agric. Food Chem.*, **2000**, *48*, 3413-3419
- 30 Yamada Y., Aida K., Uemura T. Enzymatic studies on the oxydation of sugar and sugar alcohol *J. Biochem.*, **1967**, *61*(5), 636-646
- 31 Ameyama M., Shinigawa E., Matsushita K., Adachi O. D-fructose dehydrogenase of *Gluconobacter industrius*: purification, characterization, and application to enzymatic microdetermination of D-fructose *J. Bacteriol.*, **1981**, *145*(2), 814-823
- 32 Voet D., Voet J. G. *Biochimie*, 2^o édition. Bruxelles : DeBoeck Université, **2005**, 444-483
- 33 Vollhardt K. P. C., Schore N. E. *Traité de chimie organique*, 2^o édition. Bruxelles : DeBoeck Université, **1995**, 629-674
- 34 Patai S. *The chemistry of the carbonyl group*. London-New York-Sidney: Interscience Publishers, a division of John Wiley & Sons, **1966**, 1027 p.
- 35 Guillou-Largeteau I. Etude de substances de faible poids moléculaire combinant le dioxyde de soufre dans les vins blancs issus de vendange botrytisée. Mise en évidence du rôle de l'hydroxypropanedial. Th : Sc. Biol. et Med. : Bordeaux II : **1996**, n° 425, 196 p.
- 36 Berké B. Le devenir du dioxyde de soufre dans les vins de Bordeaux. Th: Sc. Biol. et Med.: Bordeaux II: **1998**, n° PSB1, 232 p.
- 37 Ashly E. C., Laemmle J., Neumann H. M. Organometallic reaction mechanism. VIII. Detailed description of the mechanism of methylmagnesium bromide addition to 2-methylbenzophenone *J. Am. Chem. Soc.*, **1972**, *94*, 5421-5434
- 38 Prelog V., Kobelt H. Uber die Abhängigkeit der Dissoziationskonstanten der ringhomologen Cyclanon-cyanhydrine von der Ringgrösse *Helv. Chim. Acta*, **1949**, *32*, 1187-1192
- 39 Kocienski P.J. *Protecting groups*. New York : Thieme, **1994**, 155-184
- 40 Carey F. A., Sundberg R. J. *Chimie Organique Avancée, tome 1, Structure moléculaire et mécanismes réactionnels*, 3^o édition. Paris, Bruxelles : DeBoeck Université, **1996**, 802 p.
- 41 McCormack W. B., Lawes B. C. Sulfuric and sulfurous esters *Encyclopedia of Chemical Technology* / ed. Kirk R. E., Othmer D. F., Kroschwitz J., Howe-Grant M., 4^o édition. New York-London-Sydney-Paris : Wiley-Interscience Publication, **1997**, vol 23, 409-428
- 42 Hong G., Takeushi E.S. (Wilson Greatbatch Limited, USA) Eur. Pat. Appl. EP 1022799, **2000**
- 43 Oae S., Kunieda N. *Organic chemistry of sulfur*. New York : **1977**, Plenum Press, 713 p.

Bibliographie

- 44 Filby W.G., Günther K., Penzhorn R.D. Improved method for the synthesis of aliphatic sulfinic acids *J. Org. Chem.*, **1973**, 38(23), 4070-4071
- 45 Vercauteren J., Berké B., Soulet S., Cheze C. Brevet FR 2 851 250 – A1, **2003**
- 46 Zoller T., Breuilles P., Klein S., Uguen D., De Cian A., Fischer J. Fine tuning of the [2+2] vs [4+2] selectivity of 1,1-substituted dienes in cycloaddition reactions *Tetrahedron Lett.*, **1999**, 40(51), 9015-9018
- 47 Kohler E. P., Reimer M. Some addition-reaction of sulfinic acids, *Chem. Ber.*, **1904**, 31, 163-185
- 48 Andersen K. K. *Comprehensive Organic Chemistry. The synthesis and reactions of organic compounds*. Oxford: Pergamon Press, **1979**, vol. 3, 317-329
- 49 Truce W. E., Murphy A. M. The preparation of sulfuric acids *Chem. Rev.*, **1951**, 48(1), 69-124
- 50 De Revel G., Bertrand A. A method for the detection of carbonyl compounds in wine: glyoxal and methylglyoxal *J. Sci. Food Agric.*, **1993**, 61, 267-272
- 51 Yamada H., Somiya I. The determination of carbonyl compounds in ozonated water by the PFBOA method, *Ozone science & engineering*, **1989**, vol. 11, pp 127-141, printed in the USA
- 52 Bryant W. M. D., Smith D. M. Improved hydroxylamine method for the determination of aldehydes and ketones. Displacement of oxime equilibria by means of pyridine *J. Am. Chem. Soc.*, **1935**, 57, 57-61
- 53 Cancilla D.A., Que Hee S.S. O-(2,3,4,5,6-pentafluorophenyl)methylhydroxylamine hydrochloride: a versatile reagent for the determination of carbonyl-containing compounds *J. Chromatogr.*, **1992**, 627, 1-16
- 54 Youngdale G. A. New compounds: synthesis of O-(pentafluorobenzyl)hydroxylamine hydrochloride *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **1976**, 65(4), 625-626
- 55 Galioglu O., Akar A. Polymer-bound sulfonyl hydrazine and reaction with cycloketones *Eur. Polym. J.*, **1989**, 25(3), 313-316
- 56 Kamogawa H., Kanzawa A., Kadoya M., Naito T., Nanasawa M. Conversions of carbonyl compounds via their polymeric sulfonylhydrazones into alkenes, alkanes and nitriles *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1983**, 56(3), 762-765
- 57 Singh R.P., Subbarao H.N., Dev S. Organic reactions in a solid matrix – VI Silica-gel supported reagents for the isolation of aldehydes and ketones *Tetrahedron*, **1981**, 37, 843-846
- 58 Breckenridge S.M., Yin X., Rosenfeld J.M., Yu Y.H. Analytical derivatizations of volatile and hydrophilic carbonyls from aqueous matrix onto a solid phase of a polystyrene-divinylbenzene macroreticular resin *J. Chromatogr. B*, **1997**, 694, 289-296
- 59 Critchfields F.E. *Organic functional group analysis*. Oxford, New York: Pergamon Press, **1963**, vol. 8, 60-80

Bibliographie

- 60 Emerson D.W., Emerson R.R., Joshi S.C., Sorensen E.M., Turek J.E. Polymer-bound sulfonylhydrazine functionality. Preparation, characterization and reactions of copoly(styrene-divinylbenzenesulfonylhydrazine) *J. Org. Chem.*, **1979**, *44*(25), 4634-4639
- 61 Handley R.S., Stern A. J., Schaap A. P. Effects of heteroatom substituents on the properties of 1,2-dioxetanes *Tetrahedron Lett.*, **1985**, *26*(27), 3183-3186
- 62 Biçak N., Soydan A. B., Senkal B. F., Koza G., Yener M. 1,2-diaminoethane-containing epoxy resins for separation of aldehydes *React. Funct. Polym.*, **1999**, *39*(3), 197-205
- 63 Zhou W.-J., Hsieh Y.-L., Pratt L. M., Patten T. E. Experimental and computational studies of bulk polymerization of styrene in the presence of N-(O-(1-phenylmethoxy)oxy)phthalimide or cyclohexanone-O-(1-phenylmethyloxime) *Polymer Bulletin*, **2001**, *46*, 43-50
- 64 McKay A. F., Garmaise D. L., Paris G. Y., Gelblum S. Bacteriostats III. Oxyamines and their derivatives *Can. J. Chem.*, **1960**, *38*, 343-358
- 65 Klein U., Bushmann E., Keil M., Gotz N., Harreus A. US Patent 592351, **1996**
- 66 Knox G. R., Pason P. L., Willison D. Ferrocene derivatives. 23. Isocyanoferrocene and isothiocyanatoferrocene *Organometallics*, **1990**, *9*, 301-306
- 67 Mooradian A. The rearrangement of substituted O-aryl oximes to 5- and 7-substituted benzofurans *Tetrahedron Lett.*, **1967**, *8*(5), 407-408
- 68 Kashima C., Yoshiwara N., Omote Y. Alkylation of aminohydroxy anion, dissociated species of hydroxylamine *Tetrahedron Lett.*, **1982**, *23*(29), 2955-2956
- 69 Wallach J. *Les enzymes*. Paris : Nathan, **1997**, 128 p.
- 70 Weil J.-H. *Biochimie générale*, 7^o édition. Paris : Masson, **1994**, 566 p.
- 71 Voet D., Voet J. G. *Biochimie*, 2^o édition. Bruxelles : DeBoeck Université, **2005**, 332-344
- 72 Bergmeyer H.-U. *Methodes of enzymatic catalysis*. New York and London: Verlag Chemie New York, Academic Press, **1963**, 1064 p.
- 73 Dickinson F. M. Aldehyde dehydrogenase: kinetics and mechanism *Biochem. Soc. Trans.*, **1989**, *17*(2), 299-300
- 74 Hempel J., Perozich J., Chapman T., Rose J., Boesch J. S., Liu Z.-J., Lindahl R., Wang B.-C. Aldehyde dehydrogenase catalytic mechanism. *Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism 7* /Ed by Weiner et al. New York : Kluwer Academic/Plenum Publishers, **1999**, 53-59
- 75 Sinnott M. *Comprehensive Biological Catalysis A mechanistic reference, volume III. Radical reactions and oxidation/reduction*. London : Academic Press, **1998**, 1-82
- 76 Blouin J. Application des méthodes enzymatiques optiques au dosage de certains constituants des boissons *Chimie Anal.*, **1964**, *46*(10), 513-523

Bibliographie

- 77 Guillou I., Bertrand A., de Revel G., Barbe J.-C. Occurrence of hydroxypropanedial in certain musts and wines *J. Agric. Food Chem.*, **1997**, *45*, 3382-3386
- 78 Flamini R. Some advances in the knowledge of grape, wine and distillates chemistry as achieved by mass spectrometry *J. Mass Spectr.*, **2005**, *40*, 705-713
- 79 Binker R. W. *Modern Carbohydrate chemistry*. New York: Marcel Dekker Inc., **1988**, 343 p.
- 80 Zimmer H., Gross B. H., Gerlach E. H., Fry K., Pronay A. C., Schmank H. Synthesis and antibacterial activity of some 4-substitued benzenesulfonylhydrazones *J. Am. Chem. Soc.*, **1959**, 1667-1673
- 81 Merrifield R. B. Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, *85*, 2149-2154
- 82 Dorwald F. Z. *Organic synthesis on solid phase*, 2^o édition. Weinheim : Wiley – VCh Verlag GmbH, **2002**, 530 p.
- 83 Drewry D. H., Coe D. M., Poon S. Solid-supported reagents in organic synthesis, *Med. Res. Rev.*, **1999**, *19*, 97-148
- 84 Akelah A., Sherrington D. C. Application of functionalized polymers in organic synthesis *Chem. Rev.*, **1981**, *81*, 557-587
- 85 Buchmeiser M. R. *Polymeric Materials in Organic Synthesis and Catalysis*. Weinheim : Wiley-VCH GmbH & Co, **2003**, 559 p.
- 86 Frechet J. M. J., Darling G. D., Itsuno S., Lu P.-Z., Vivas de Meftahi M., Rolls W. A. Jr. Reactive polymers: design considerations, novel preparations and selected applications in organic chemistry *Pure & Appl. Chem.*, **1988**, *60*(3), 353-364
- 87 Nakahama S., Hirao A. Protection and polymerization of functional monomers: anionic living polymerization of protected monomers *Prog. Polym. Sci.*, **1990**, *15*(2), 299-335
- 88 Sherrington, D.C. Preparation, structure and morphology of polymer supports *Chem. Commun.*, **1998**, 2275-2286
- 89 Zhou W.-J., Wilson M.E., Kurth M.J., Hsieh Y.-L., Krochta J.M., Shoemaker C.F. Synthesis and properties of a novel water-soluble lactose-containing polymer and its cross-linked hydrogel *Macromolecules*, **1997**, *30*(23), 7063-7068
- 90 Brandrup J., Immergut E. H., Grulke E. A. *Polymer Handbook*, 4^o édition. New York : John Wiley & Sons Inc., **1999**, pagination multiple
- 91 Donya A. P., Karpov O. N., Pakter M. K. Radical homopolymerization of nitro- and aminostyrenes, *Ukrainskii Khimicheskii Zhurnal*, **1990**, *56*(9), 984-990
- 92 Suzuki K., Yamaguchi K., Hirao A., Nakahama S. Protection and polymerization of functional monomers. 12. Synthesis of well-defined poly(4-aminostyrene) by means of anionic living polymerization of 4-(N,N-bis(trimethylsilyl)amino)styrene *Macromolecules*, **1989**, *22*, 2607-2611

Bibliographie

- 93 Wyss H., Mettler H. P., Previdoli F. *US Patent 4981996*, **1991**
- 94 Kamogawa H., Kitamura T. Polymer reagents derived from sodium *p*-styrenesulfonate: N-methyl-N-nitroso-*p*-styrenesulfonamide and *p*-styrenesulfinic acid polymers *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1989**, *62*, 189-192
- 95 Morikawa A., Sone T., Asano T. 5-isoquinolinesulfonamide derivatives. 1. Synthesis and vasodilatory activity of N-(2-guanidinoethyl)-5-isoquinolinesulfonamide derivatives *J. Med. Chem.*, **1989**, *32*, 42-46
- 96 Thea S., Cevasco G., Hopkins A., Kashefi-Naini N., Williams A. Sulfoquinones in the hydrolysis of aryl esters of *o*- and *p*-hydroxyarenesulfonic acids in alkaline aqueous solutions of dioxane *J. Org. Chem.*, **1985**, *50*, 2158-2165
- 97 Haub G. H., Whaley T. W. Synthesis of 4-(2-hydroxyethylsulfonyl)-1-naphthalenesulfonamide *J. Org. Chem.*, **1978**, *43*(23), 4659-4662
- 98 Yoda N., Marvel C. S. Base-catalyzed polymerization of aromatic sulfonamides with an activated double bond *J. Polym. Sci., Part A*, **1965**, *3*(6), 2229-2242
- 99 Loev B., Kormendy M. 2-sulfobenzoic acid esters. I. 2-sulfamyl derivatives *J. Am. Chem. Soc.*, **1961**, *27*, 1703-1709
- 100 King J. K., Baines K. M., Netherton M. R., Dave V. Bis(trimethylsilyl)methanesulfonyl and tris(trimethylsilyl)methane sulfonyl chlorides and their reactions by way of sulfenes *Can. J. Chem.*, **2000**, *78*, 1642-1646
- 101 Kataoka T., Imawa T., Setta T., Takagi A. Preparation of sulfonamides from sodium sulfonates. Ph₃PBr₂ and Ph₃PCl₂ as a mild halogenating reagent for sulfonyl bromides and sulfonyl chlorides *Synthesis*, **1998**, *4*, 423-426
- 102 Danek S. K., Kelly D. P., Serelis A. K., Steel P. J. A stereospecific synthesis of azo nitriles *J. Org. Chem.*, **1987**, *52*(13), 2911-2919
- 103 Wipf P., Aslan D. C., Southwick E. C., Lazo J. S. Sulfonylated aminothiazoles as new small molecule inhibitors of protein phosphatases *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2001**, *11*, 313-317
- 104 Csongar C., Weinberg P., Slezak H., Tomaschewski G. Sulfonierte 2,5-diaryl-2H-tetrazole *J. Prakt. Chem.*, **1988**, *330*(4), 629-633
- 105 Salomone J. C., Watterson A. C., Hsu T. D., Tsai C. C., Mahmud M. C. Polymerization of vinylpyridinium salts. IX. Preparation of monomeric salt pairs *J. Polym. Sci., Polym. Lett. Ed.*, **1977**, *15*(8), 487-491
- 106 Forbes C. P., Psotta K. Esterification of aliphatic sulfonic acids with dimethyl sulfate *Cellul. Chem. Technol.*, **1981**, *15*(6), 691-693
- 107 Choudary B. M., Chowdari N. S., Kantam M. L. Montmorillonite clay catalysed tosylation of alcohols and selective monotosylation of diols with *p*-toluenesulfonic acid: an enviro-economic route *Tetrahedron*, **2000**, *56*, 7291-7298

Bibliographie

- 108 Laszlo P., Mathy A. 65. Catalysis of Friedel-Crafts alkylation by a montmorillonite doped with transition-metal cations *Helv. Chim. Acta*, **1987**, *70*, 577-586
- 109 Vogel A. I. *A text-book of quantitative inorganic analysis including elementary instrumental analysis*, 3^o édition. London : Longmans, **1961**, 1216 p.
- 110 Toy P.H., Reger T.S., Garibay P., Garno J.C., Malikayil J.A., Liu G.-Y., Janda K.D. Polytetrahydrofuran cross-linked polystyrene resins for solid-phase organic synthesis *J. Comb. Chem.*, **2001**, *3*, 117-124
- 111 Reger T. S., Janda K. D. Parallel suspension polymerisation for high-throughput resin synthesis *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2002**, *12(6)*, 837-840
- 112 Alesso S. M., Yu Z., Pears D., Worthington P. A., Luke R. W. A., Bradley M. Synthesis of resins via multiparallel suspension polymerization *J. Comb. Chem.*, **2001**, *3*, 631-633
- 113 Dowding P. J., Vincent B. Suspension polymerisation to form polymer beads *Colloids and Surfaces A : Physicochem. Eng. Aspects*, **2000**, *161*, 259-269
- 114 Fontanals N., Cortés J., Galià M., Marcé R. M., Cormack P. A. G., Borrull F., Sherrington D. C. Synthesis of Danakov-type hypercrosslinked resins using different isomer compositions of vinylbenzylchloride monomer, ad application in the solid-phase extraction of polar compounds *J. Polym. Sci.: Part A : Polym. Chem.*, **2005**, *43*, 1718-1728
- 115 Bauer U., Ho W.-B., Koskinen A. M. P. A novel linkage for the solid-phase synthesis of hydroxamic acids *Tetrahedron Lett.*, **1997**, *38(41)*, 7233-7236
- 116 Floyd C. D., Lewis C. N., Patel S. R., Whittaker M. A method for the synthesis of hydroxamic acids on solid-phase *Tetrahedron Lett.*, **1996**, *37(44)*, 8045-8048
- 117 Klein U., bushmann E., Keil M., Gotz N., Harrens A. *US Patent 592351*, **1996**
- 118 Kunin R. *Elements of ion exchange*. New York : Reinhold Publishing Corporation, **1960**, 163 p.
- 119 Zhong H. M., Greco M. N., Maryahoff B. E. Solid-phase synthesis of arginine-containing peptides by guanidine attachment to a sulfonyl linker *J. Org. Chem.*, **1997**, *62*, 9326-9330
- 120 Herweh J. E., Poshkus A. C. *US Patent 3654242*, **1968**
- 121 Biçak N., Senkal B. F. Polystyrene sulfonic acid ester as alkylating agents: preparation of unsymmetrical secondary amines *Reactive & Functional Polymers*, **1996**, *29*, 123-128
- 122 Senkal B. F, Biçak N. Grafting on crosslinked polymer beads by ATRP from polymer supported N-chlorosulfonamides *Eur. Polym. J.*, **2003**, *39*, 327-331
- 123 Razavi Z., McCapra F. Stable and versatile active acridinium ester II *Luminescence*, **2000**, *15*, 245-249

Bibliographie

- 124 Cusak A., Charlesworth C., Jemio-Bedregal K., Ketcha D. M. Comparative assessment of methods for the preparation and characterization of polymer supported sulfonyl chloride resin (Ps-TsCl) *Polymer Preprints*, **2003**, 44(1), 872-273
- 125 Marchal R., Lallement A., Jeandet P., Establet G. Clarification of muscat musts using wheat proteins and the flotation technique *J. Agric. Food Chem.*, **2003**, 51, 2040-2048
- 126 Sagiv J. Organized Monolayers by adsorption. 1. Formation and structure of oleophobic mixed monolayers on solid surfaces *J. Am. Chem. Soc.*, **1980**, 102(1), 92-98
- 127 Nawrocki J. The silanol group and its role in liquid chromatography *J. Chrom. A*, **1997**, 779, 29-71
- 128 Choplin F. Synthèse et greffage d'agents de couplage organosiliciés en vue de l'élaboration de puces à ADN Th : Ch. Org. : Bordeaux I : **2000**, n° 2228, 173 p.
- 129 Jorna A. M. J., Boelrijk A. E. M., Hoorn H. J., Reedijk J. Heterogenization of a ruthenium catalyst on silica and its application in alcohol oxidation and stilbene epoxidation *Reactive & Functional Polymers*, **1996**, 29, 101-114
- 130 Parr W., Grohmann K. Solid-phase peptide synthesis on an inorganic matrix having organic groups on the surface *Angew. Chem. Internat. Ed.*, **1972**, 11(4), 314-315
- 131 Mandal T. K., Fleming M. S., Walt D. R. Production of hollow polymeric microspheres by surface-confined radical polymerization on silica templates *Chem. Mater.*, **2000**, 12, 3481-3487
- 132 Ejaz M., Ohro K., Tsujii Y., Fukuda T. Controlled grafting of a well-defined glycopolymers on a solid surface by surface-initiated atom transfer radical polymerization *Macromolecules*, **2000**, 33, 2870-2874
- 133 Melero J. A., Stucky G. D., van Grieken R., Morales G. Direct synthesis of ordered SBA-15 mesoporous materials containing arenesulfonic acid groups *J. Mater. Chem.*, **2002**, 12, 1664-1670
- 134 Cano-Serrano E., Campos-Martin J. M., Fierro J. L. G. Sulfonic acid-functionalized silica through quantitative oxidation of thiol groups *Chem. Commun.*, **2003**, 246-247
- 135 Timofte R. S., Woodward S. Preparation of silane-grafted pellets: silica bounds reagents in a very convenient form *Tetrahedron letters*, **2004**, 45, 39-42
- 136 Liu P. N., Gu P. M., Wang F., Tu Y. Q. Efficient Heterogeneous asymmetric transfer hydrogenation of ketones using highly recyclable and accessible silica-immobilized Ru-TsDPEN catalysts *Organic letters*, **2003**, 6(2), 169-172
- 137 Ripper M. Die schweflige Säure im Weine und deren Bestimmung *J. Prakt. Chem.*, **1892**, 46, 428-473
- 138 Audrieth L. F., Ogg B. A. *The chemistry of hydrazine*. New York : John Wiley & Sons, Inc., **1951**, 223 p.
- 139 Budkuley J. S. Thermoanalytical properties of hydrazinium sulfite monohydrate *Asian Journal of chemistry*, **1992**, 4(4), 818-822

Bibliographie

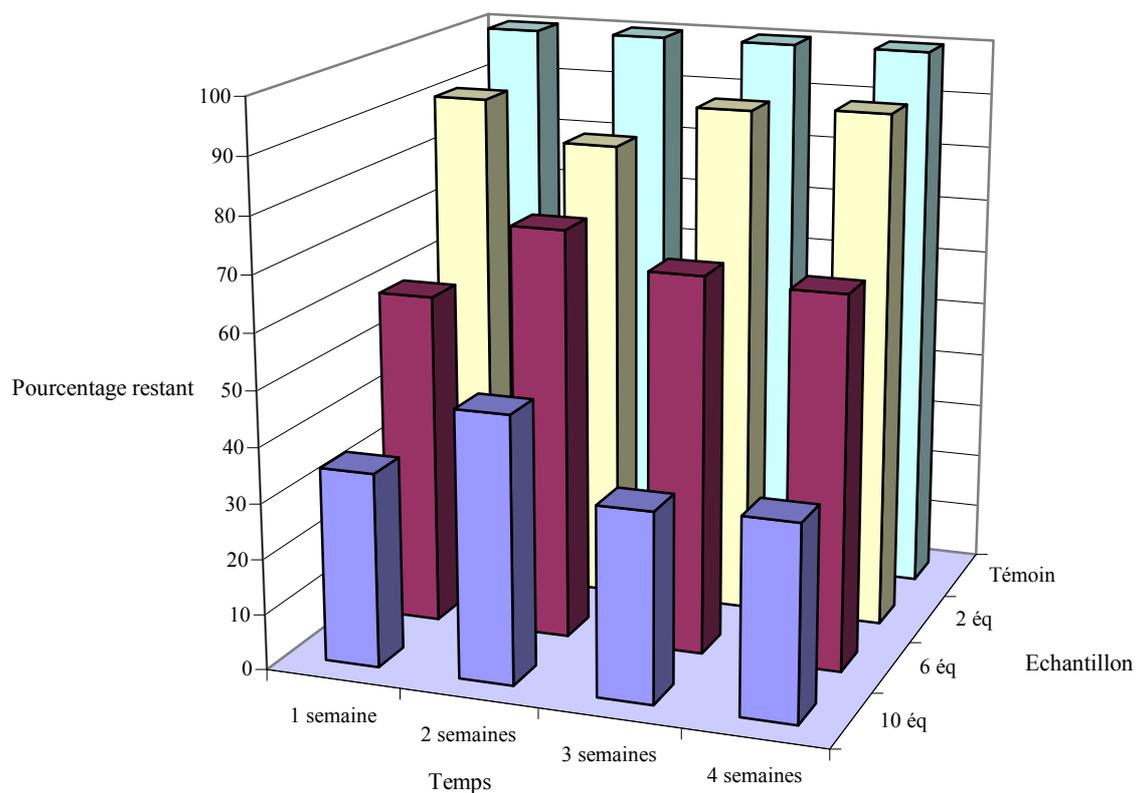
140 Kanamueller J. M. Sulfur dioxide adducts of some disubstituted hydrazine *J. Inorg. Nucl. Chem.*, **1971**, 33, 4051-4055

141 Michaelis A., Ruhl J. Ueber anorganische Derivate des Phenylhydrazins *Chem. Ber.*, **1890**, 23, 474-477

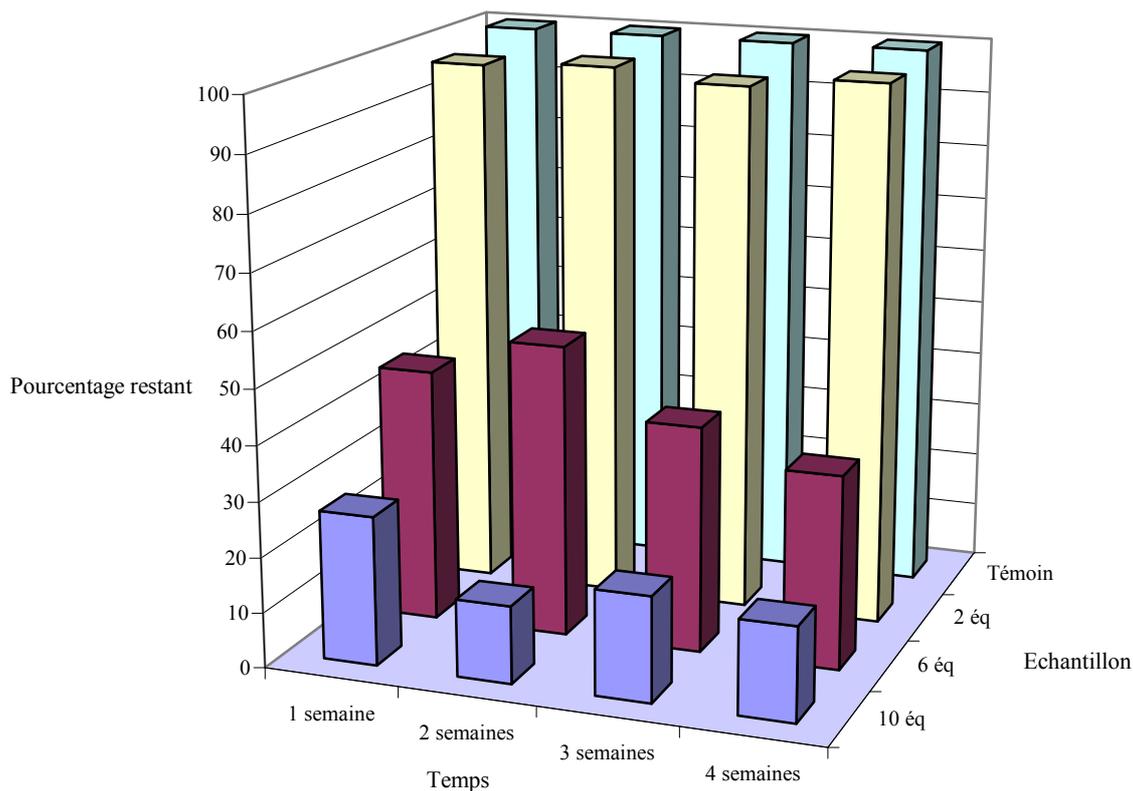
142 Michaelis A., Storbeck O. Die Thionylamine der aliphatischen Reihe *Justus Liebigs, Annalen der Chemie*, **1893**, 274, 187-197

Annexe 1 : Extraction par le support PP23

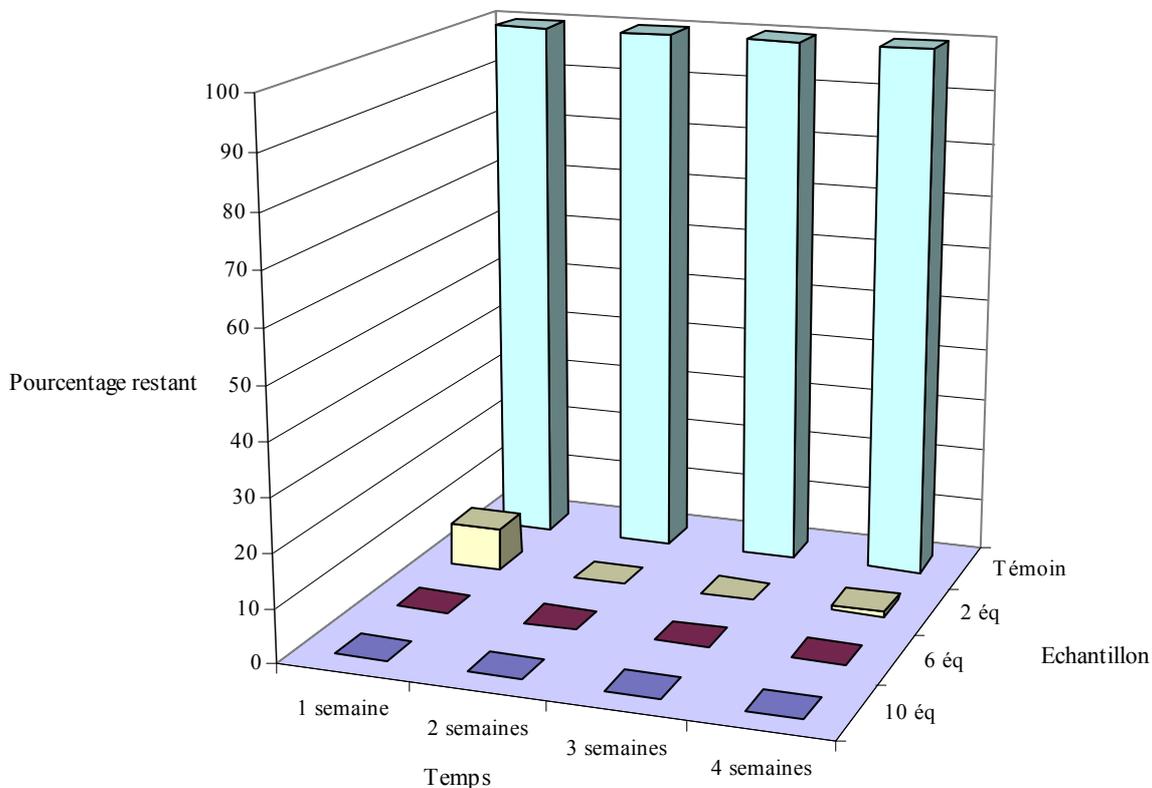
Extraction sous agitation



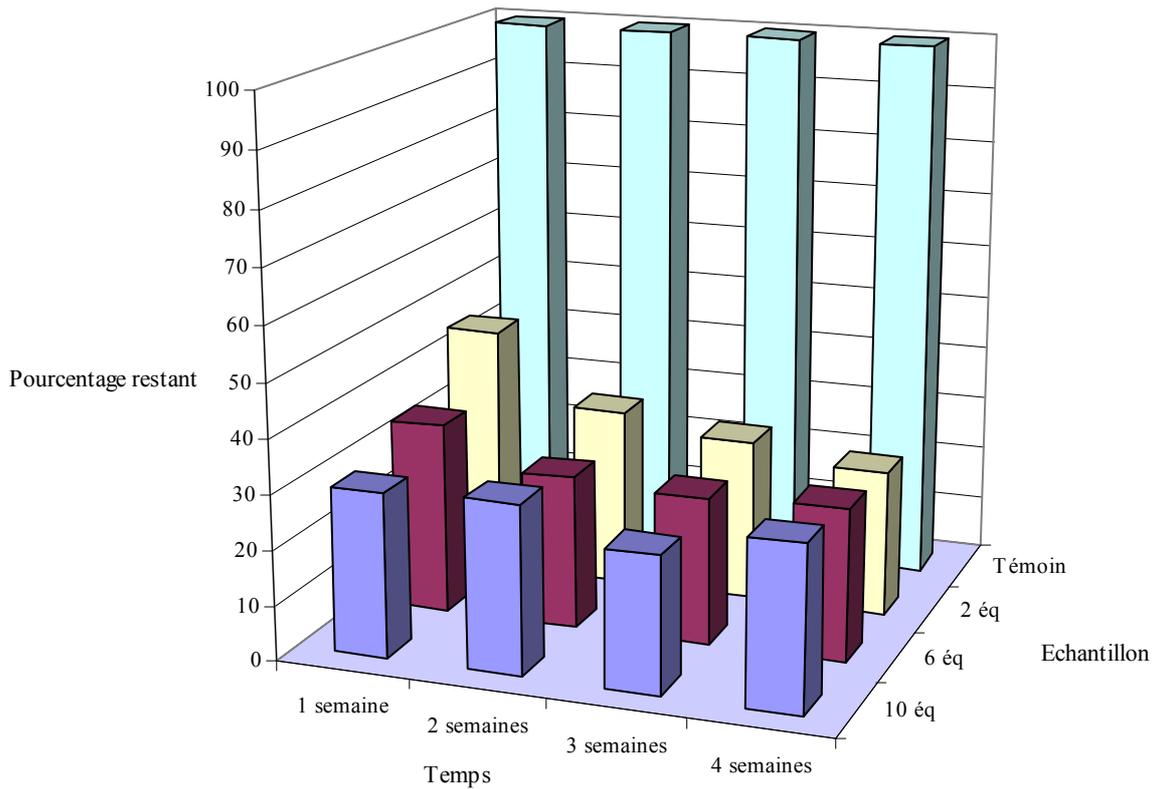
Graphique 27 : Extraction sous agitation de l'éthanal dans un vin de Sauternes 2000 en fonction du temps et du nombre d'équivalents



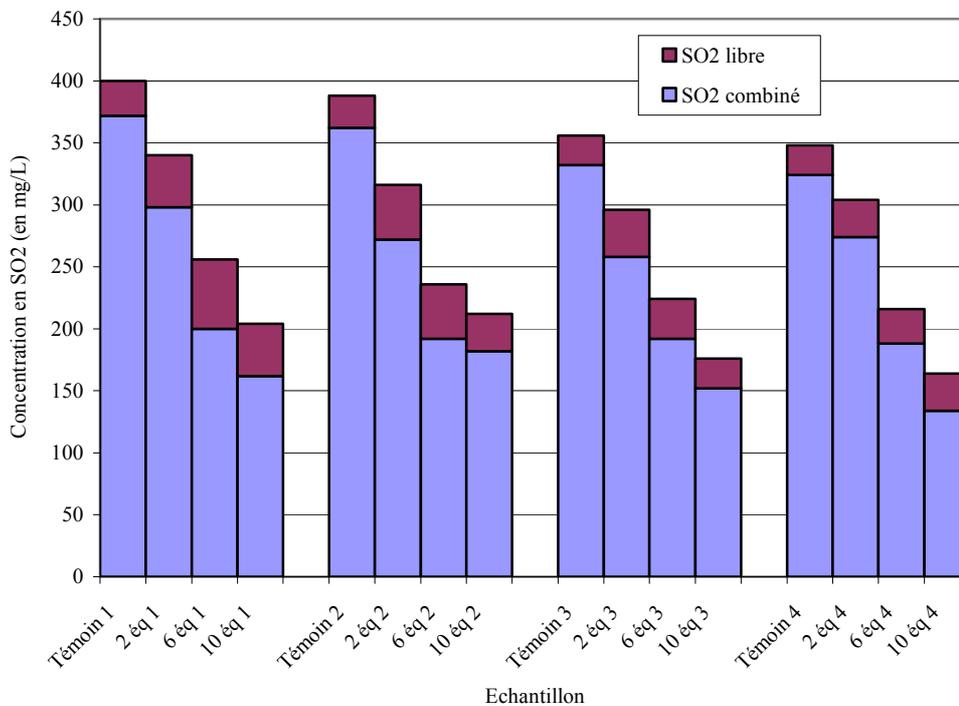
Graphique 28 : Extraction sous agitation de l'acide pyruvique dans un vin de Sauternes 2000 en fonction du temps et du nombre d'équivalents



Graphique 29 : Extraction sous agitation de l'acide 2-oxoglutarique dans un vin de Sauternes 2000 en fonction du temps et du nombre d'équivalents

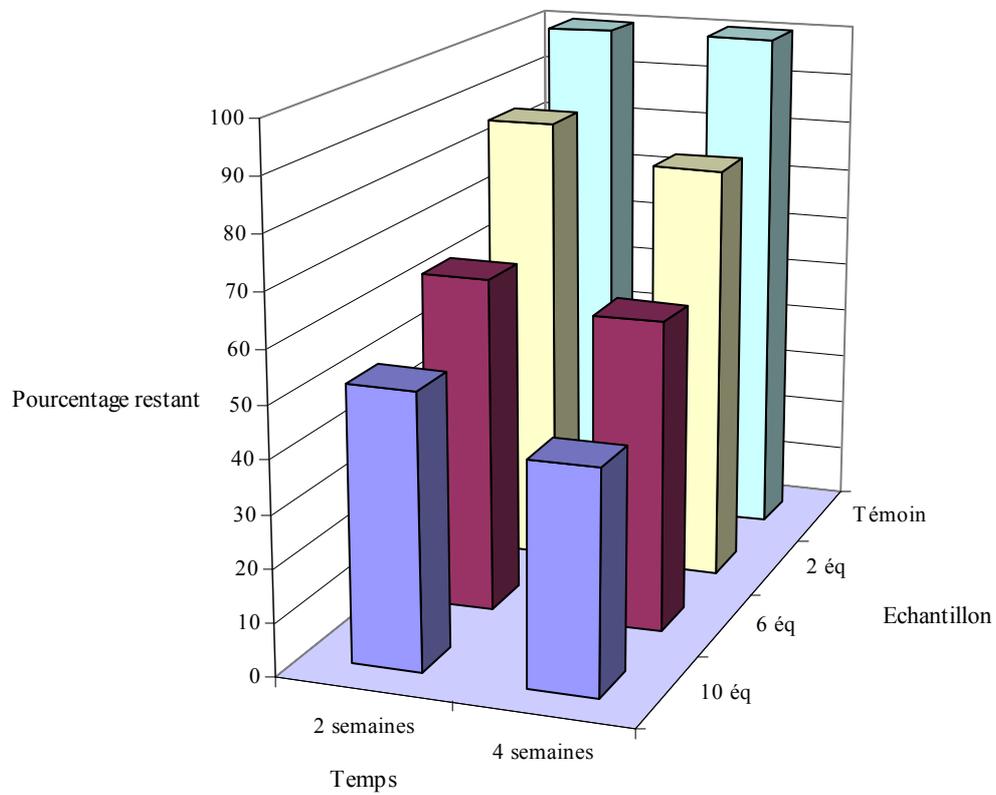


Graphique 30 : Extraction sous agitation du 5-oxo-fructose dans un vin de Sauternes 2000 en fonction du temps et du nombre d'équivalents

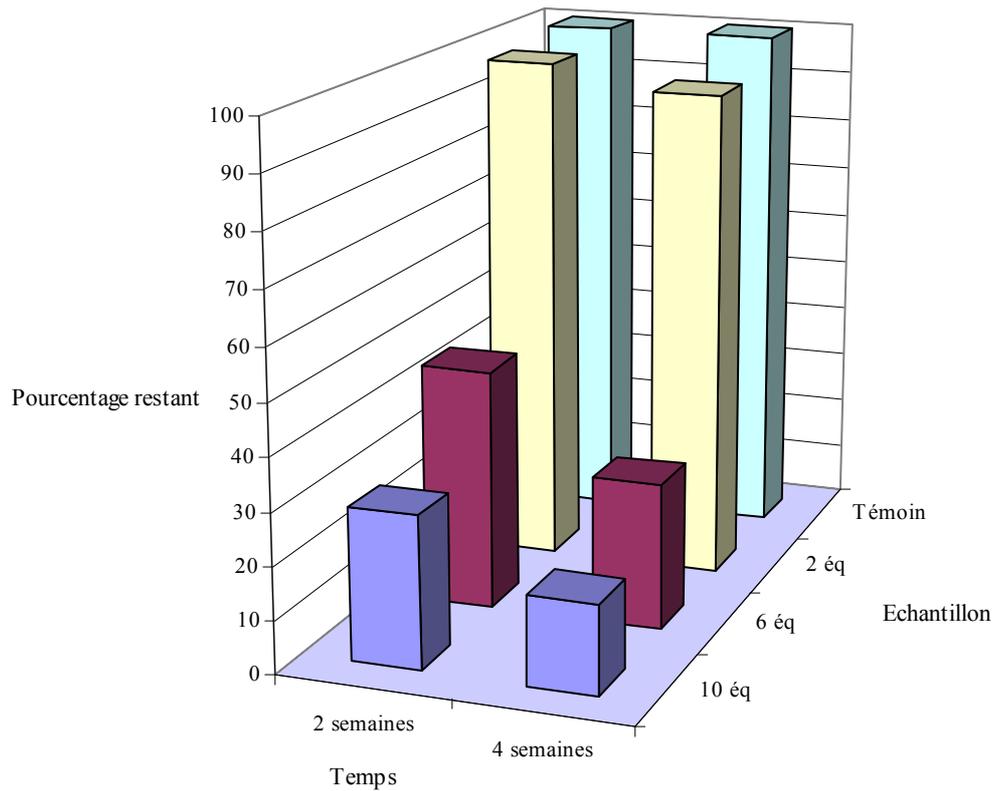


Graphique 31 : Evolution des quantités de dioxyde de soufre libre et combiné présentes dans un vin de Sauternes 2000 en fonction du temps et du nombre d'équivalents

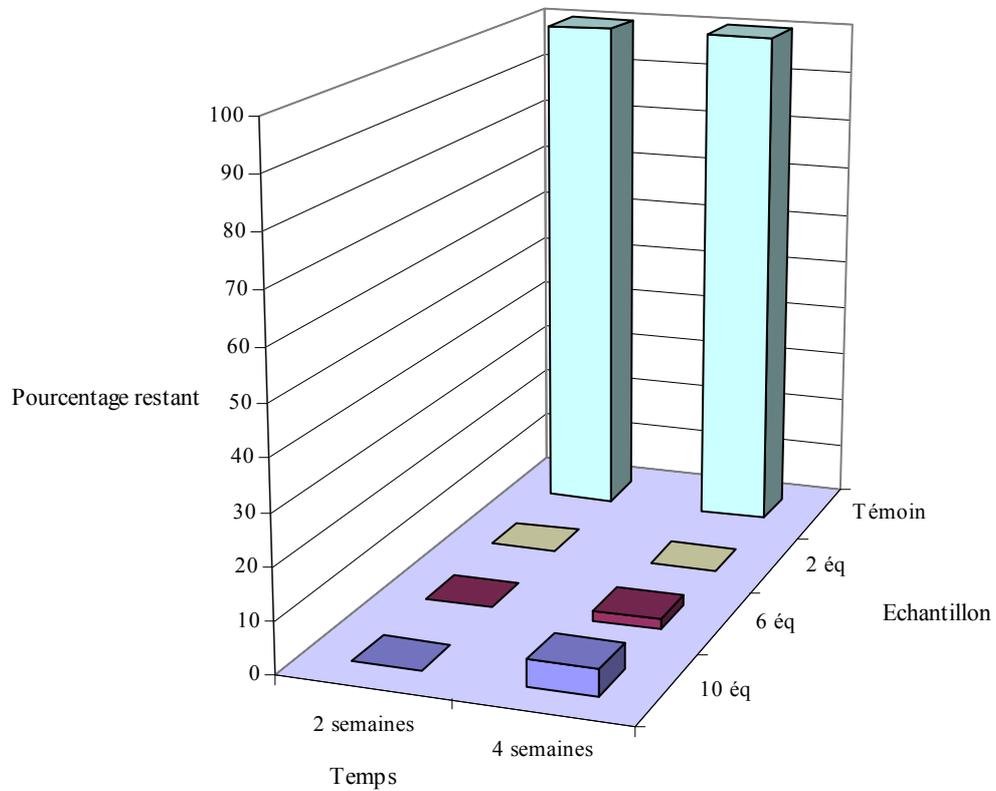
Extraction sans agitation



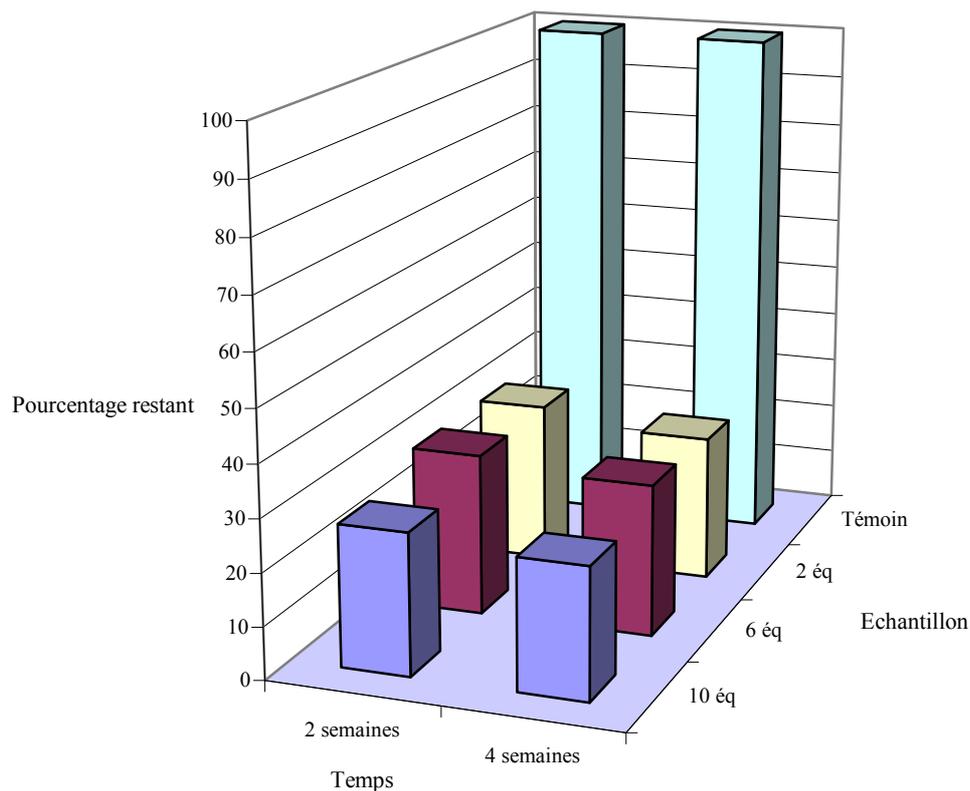
Graphique 32 : Extraction sans agitation de l'éthanal dans un vin de Sauternes 2000 en fonction du temps et du nombre d'équivalents



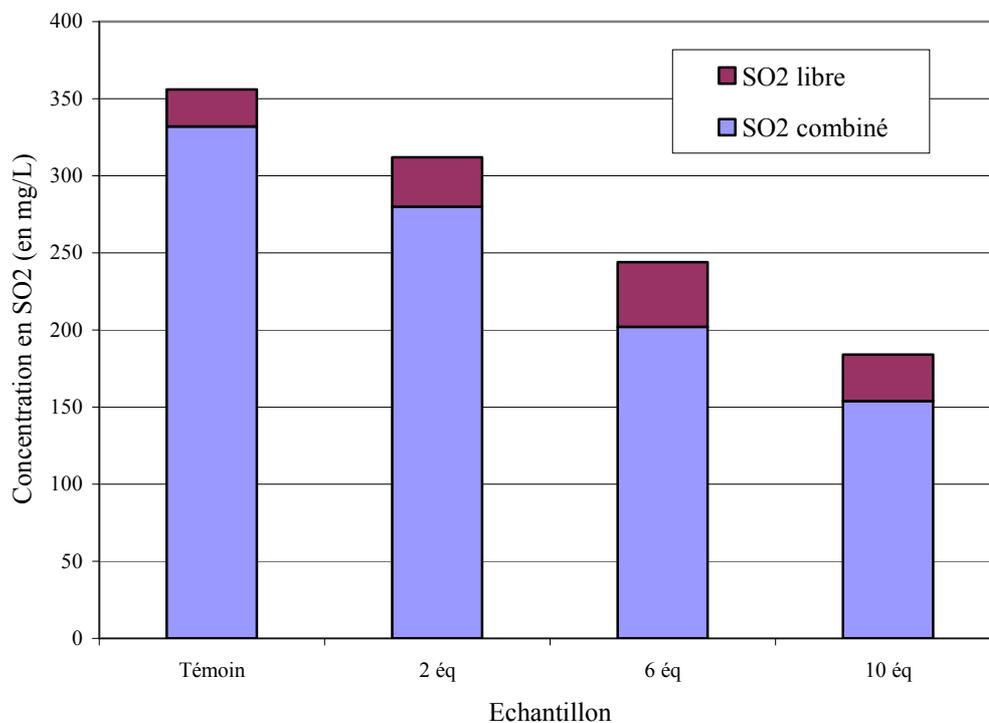
Graphique 33 : Extraction sans agitation de l'acide pyruvique dans un vin de Sauternes 2000 en fonction du temps et du nombre d'équivalents



Graphique 34 : Extraction sans agitation de l'acide 2-oxoglutarique dans un vin de Sauternes 2000 en fonction du temps et du nombre d'équivalents



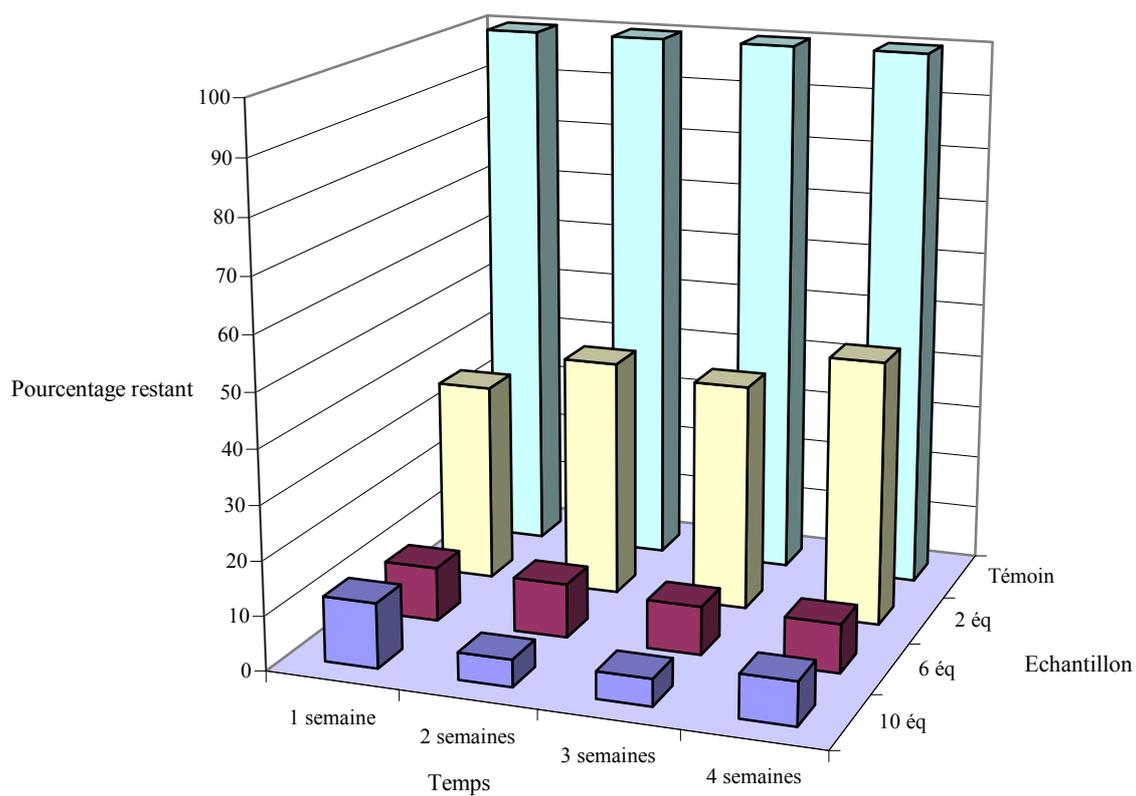
Graphique 35 : Extraction sous agitation du 5-oxofructose dans un vin de Sauternes 2000 en fonction du temps et du nombre d'équivalents



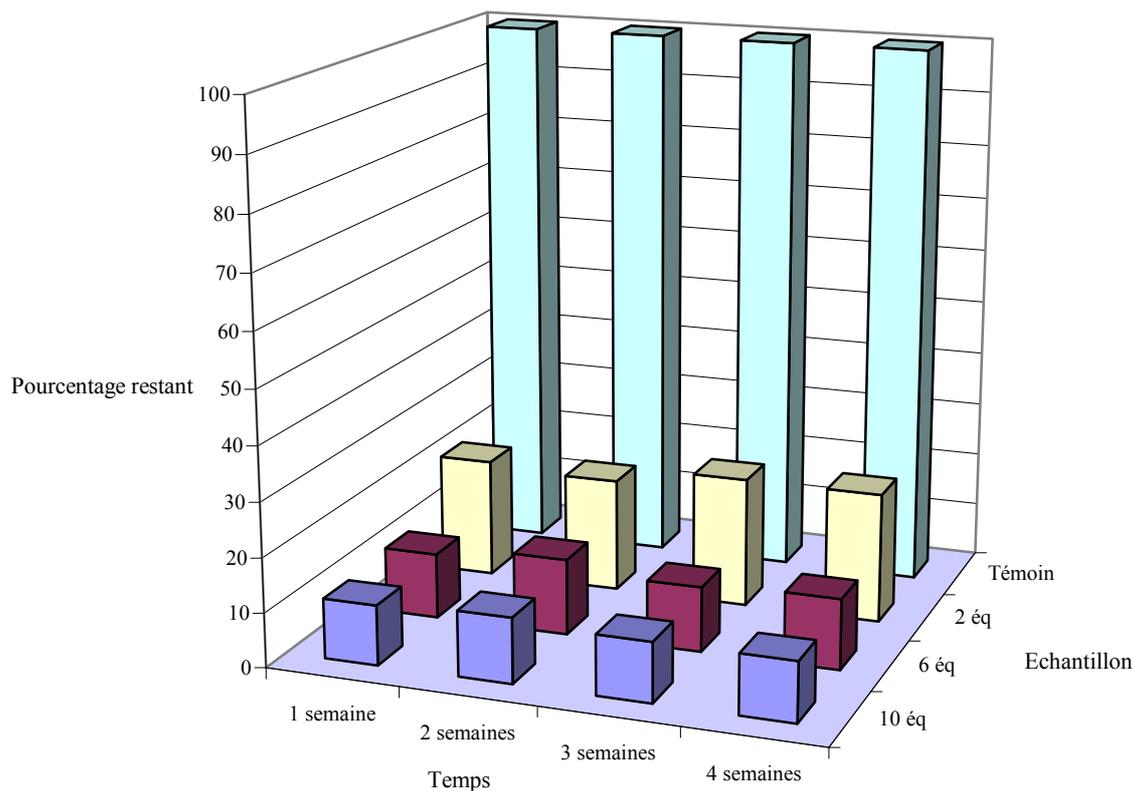
Graphique 36 : Evolution des quantités de dioxyde de soufre libre et combiné présentes dans un vin de Sauternes 2000 en fonction du nombre d'équivalents

Annexe 2 : Extraction par le support PP24

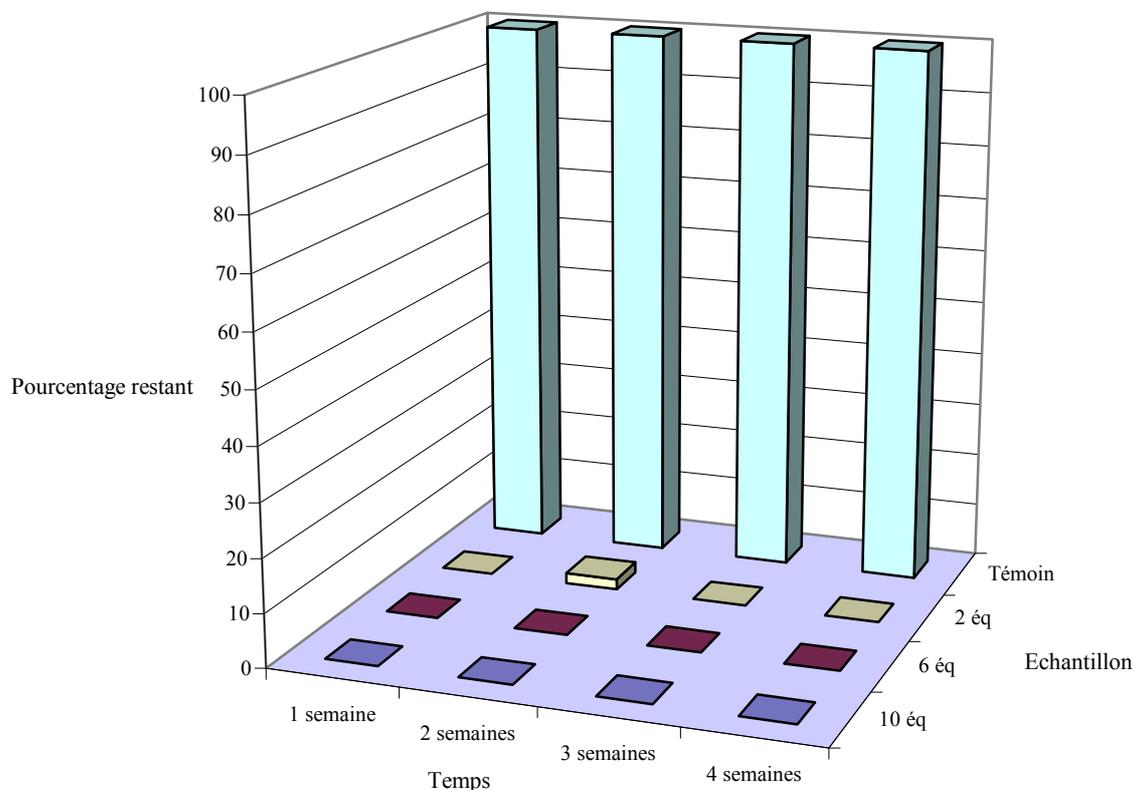
Extraction sous agitation



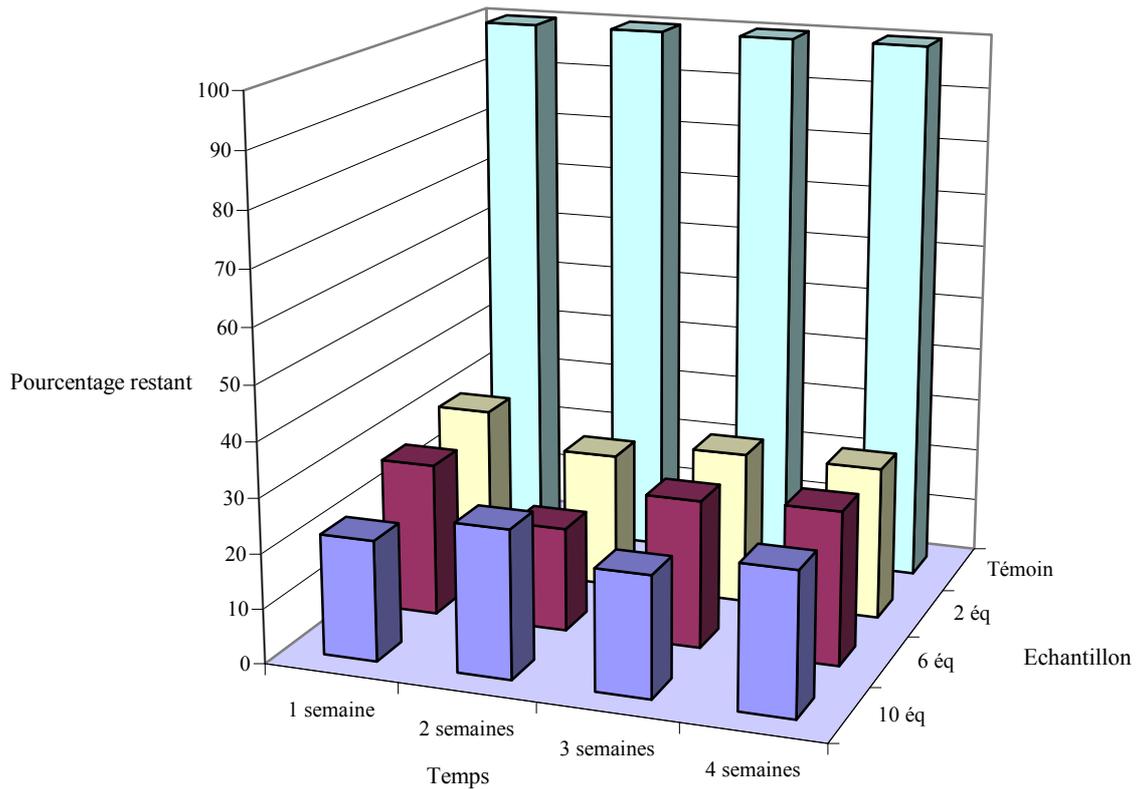
Graphique 37 : Extraction sous agitation de l'éthanal dans un vin de Sauternes 2000 en fonction du temps et du nombre d'équivalents



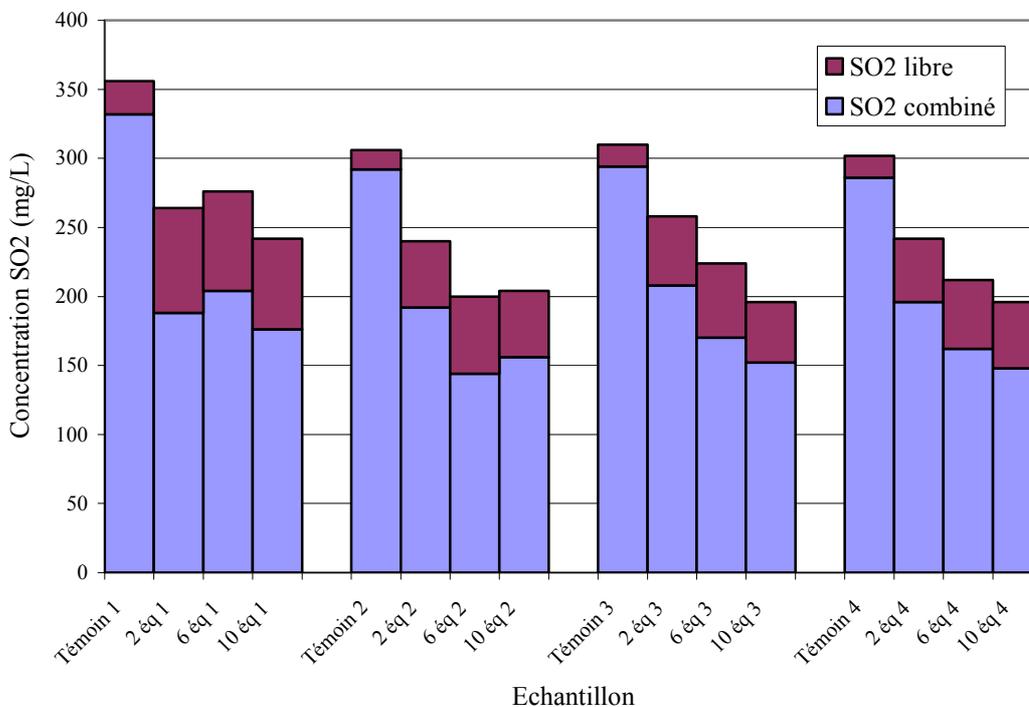
Graphique 38 : Extraction sous agitation de l'acide pyruvique dans un vin de Sauternes 2000 en fonction du temps et du nombre d'équivalents



Graphique 39 : Extraction sous agitation de l'acide 2-oxoglutarique dans un vin de Sauternes 2000 en fonction du temps et du nombre d'équivalents

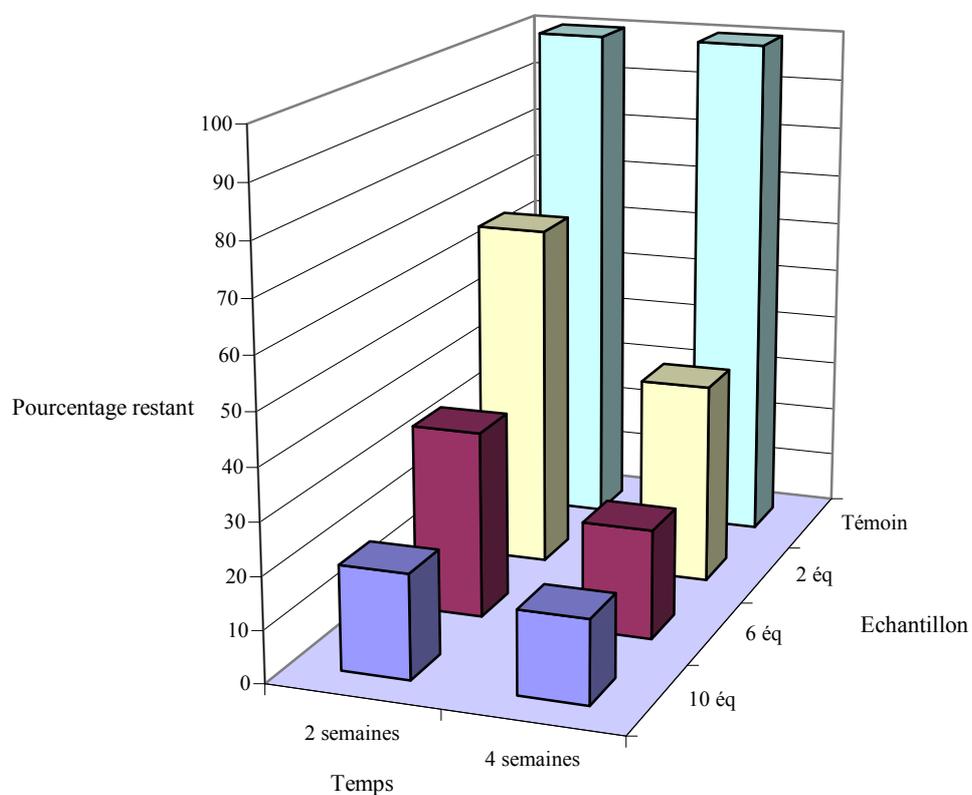


Graphique 40 : Extraction sous agitation du 5-oxofructose dans un vin de Sauternes 2000 en fonction du temps et du nombre d'équivalents

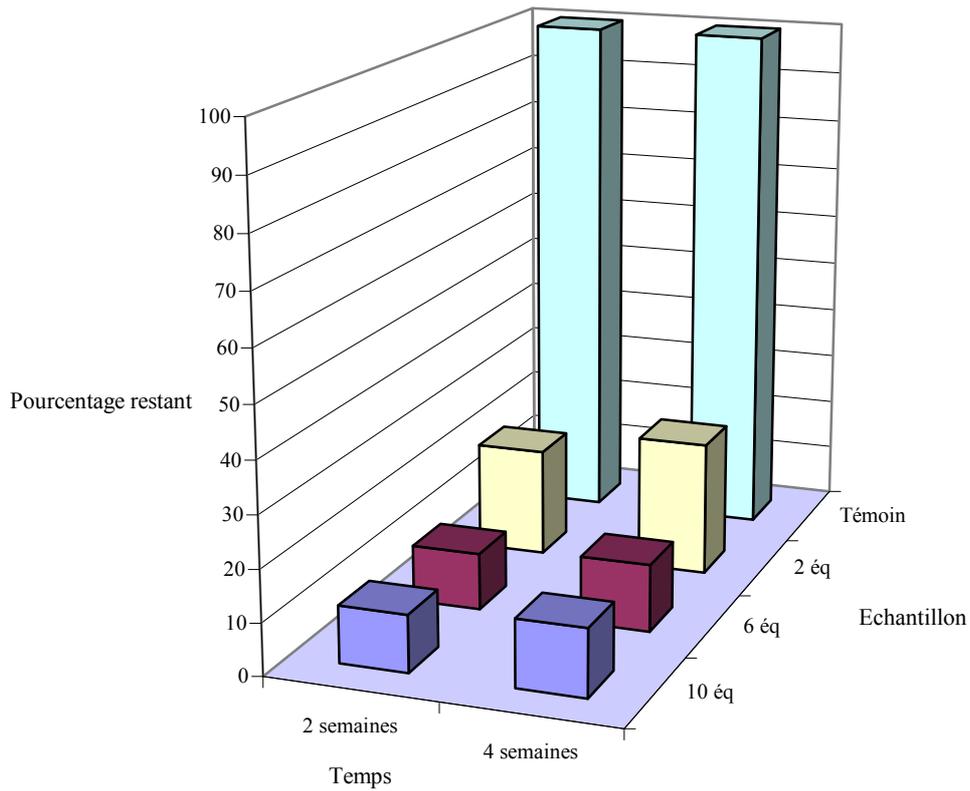


Graphique 41 : Evolution des quantités de dioxyde de soufre libre et combiné présentes dans un vin de Sauternes 2000 en fonction du temps et du nombre d'équivalents

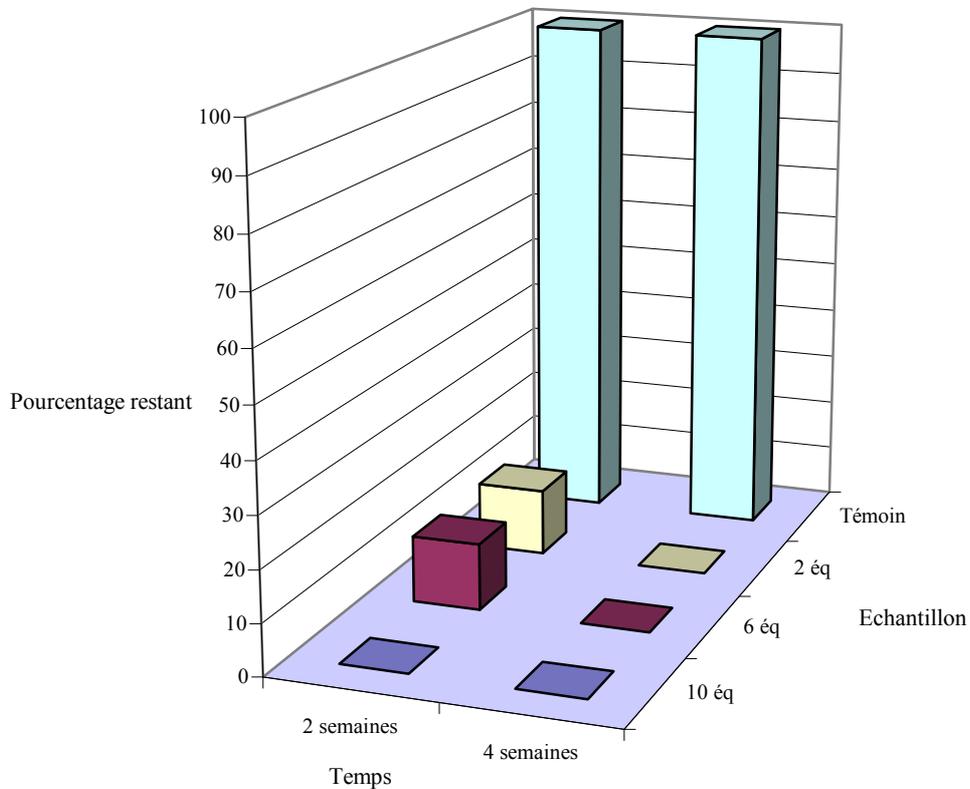
Extraction sans agitation



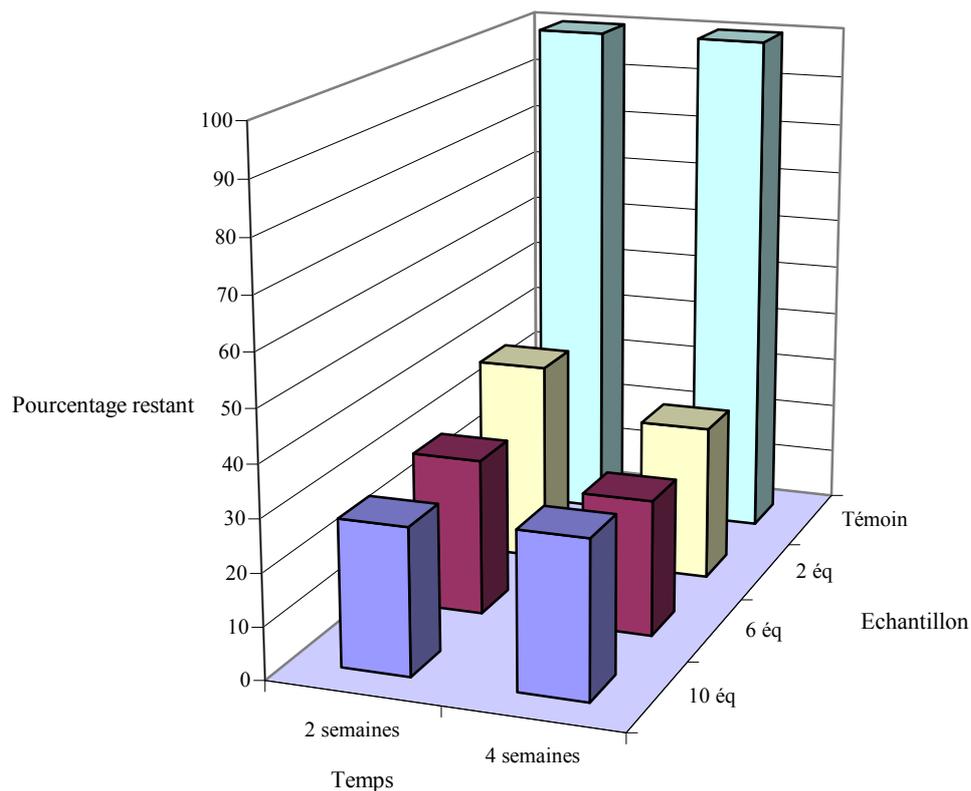
Graphique 42 : Extraction sans agitation de l'éthanal dans un vin de Sauternes 2000 en fonction du temps et du nombre d'équivalents



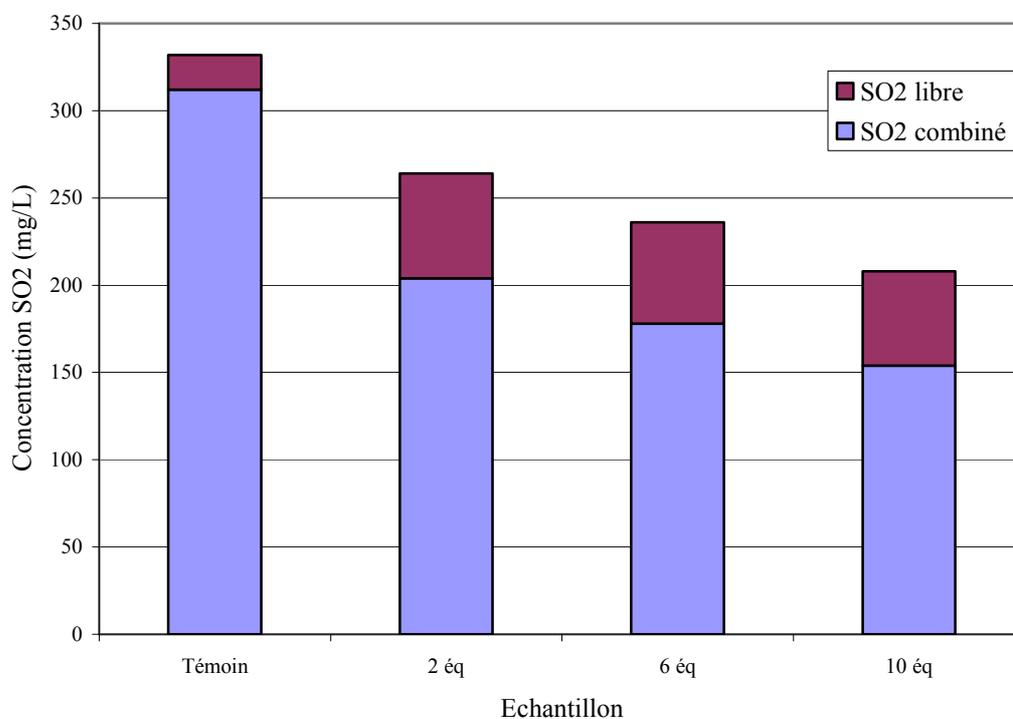
Graphique 43 : Extraction sans agitation de l'acide pyruvique d'un vin de Sauternes 2000 en fonction du temps et du nombre d'équivalents



Graphique 44 : Extraction sans agitation de l'acide 2-oxoglutarique dans un vin de Sauternes 2000 en fonction du temps et du nombre d'équivalents



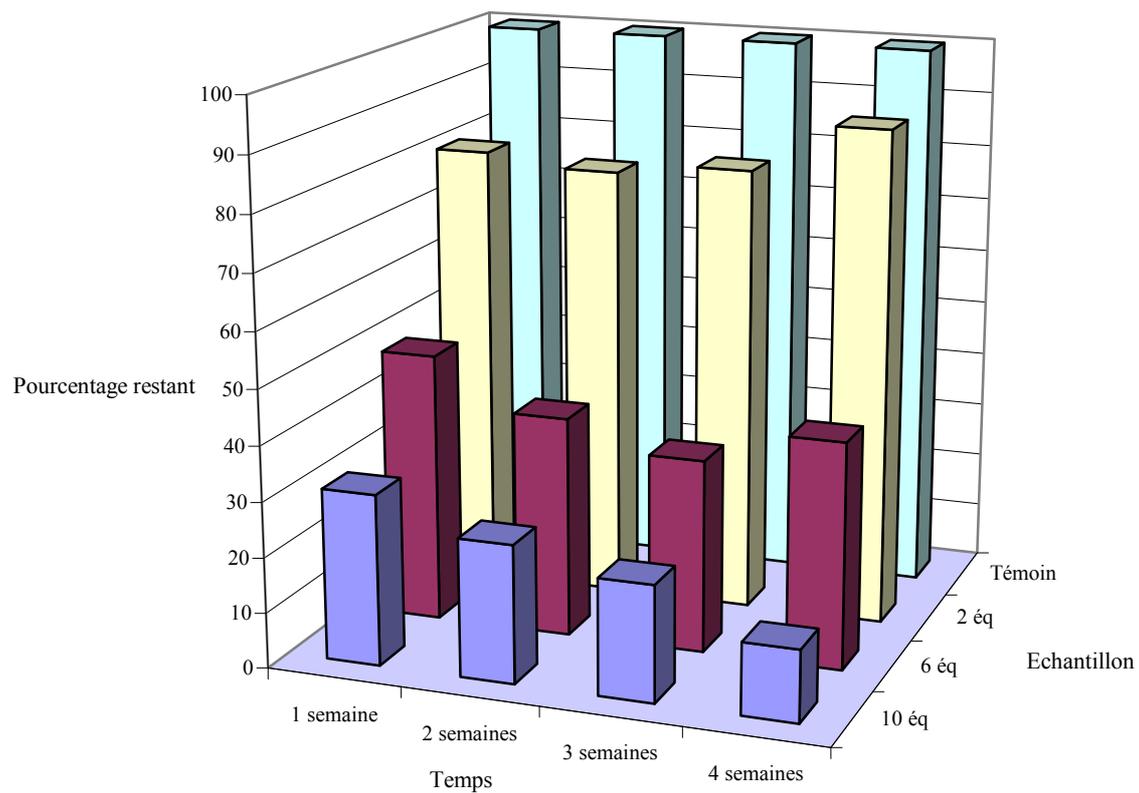
Graphique 45 : Extraction sans agitation du 5-oxofructose dans un vin de Sauternes 2000 en fonction du temps et du nombre d'équivalents



Graphique 46 : Evolution des quantités de dioxyde de soufre libre et combiné présentes dans un vin de Sauternes 2000 en fonction du nombre d'équivalents

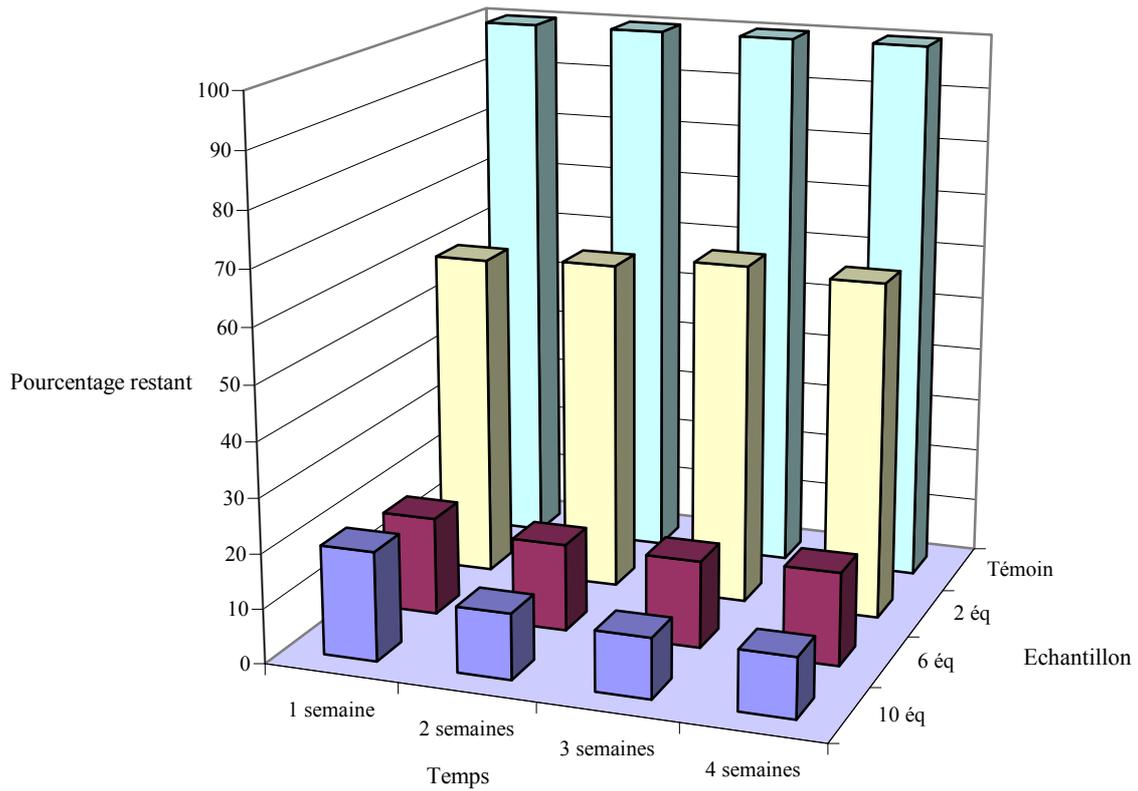
Annexe 3 : Extraction par le support Si

Extraction sous agitation

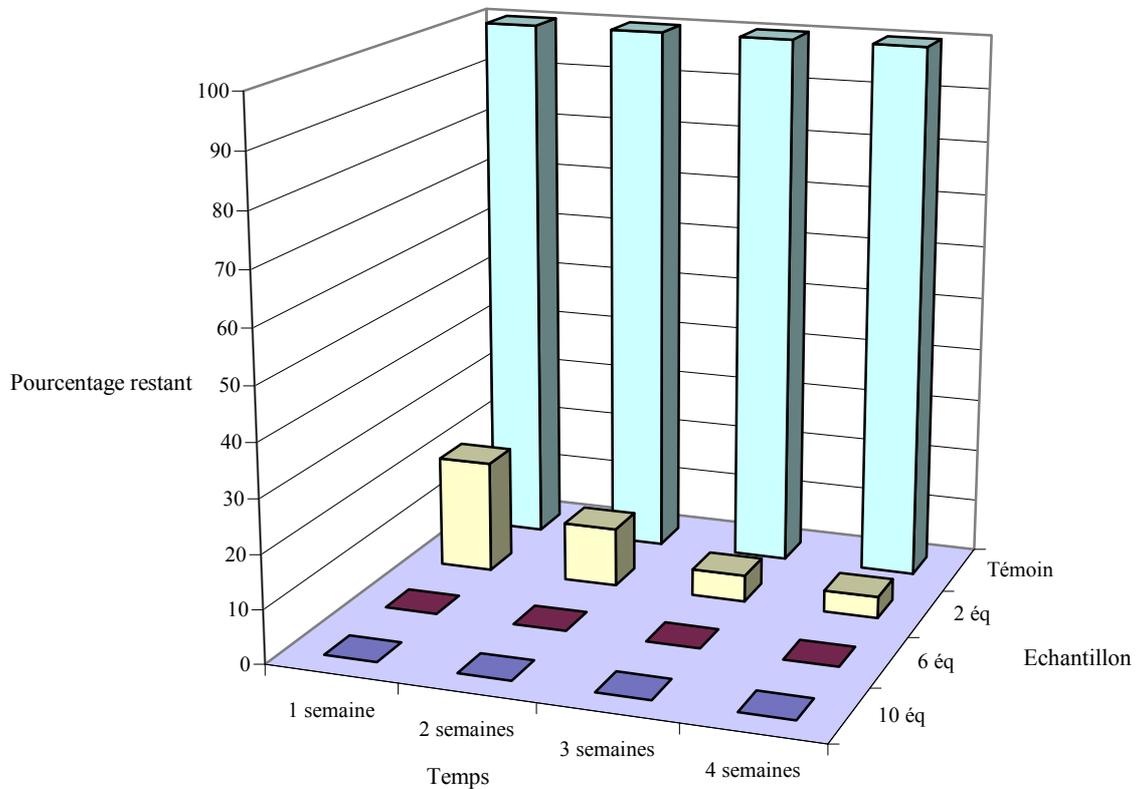


Graphique 47 : Extraction sous agitation de l'éthanal dans un vin de Sauternes 1999 en fonction du temps et du nombre d'équivalents

Annexe 3 : Extraction par le support Si

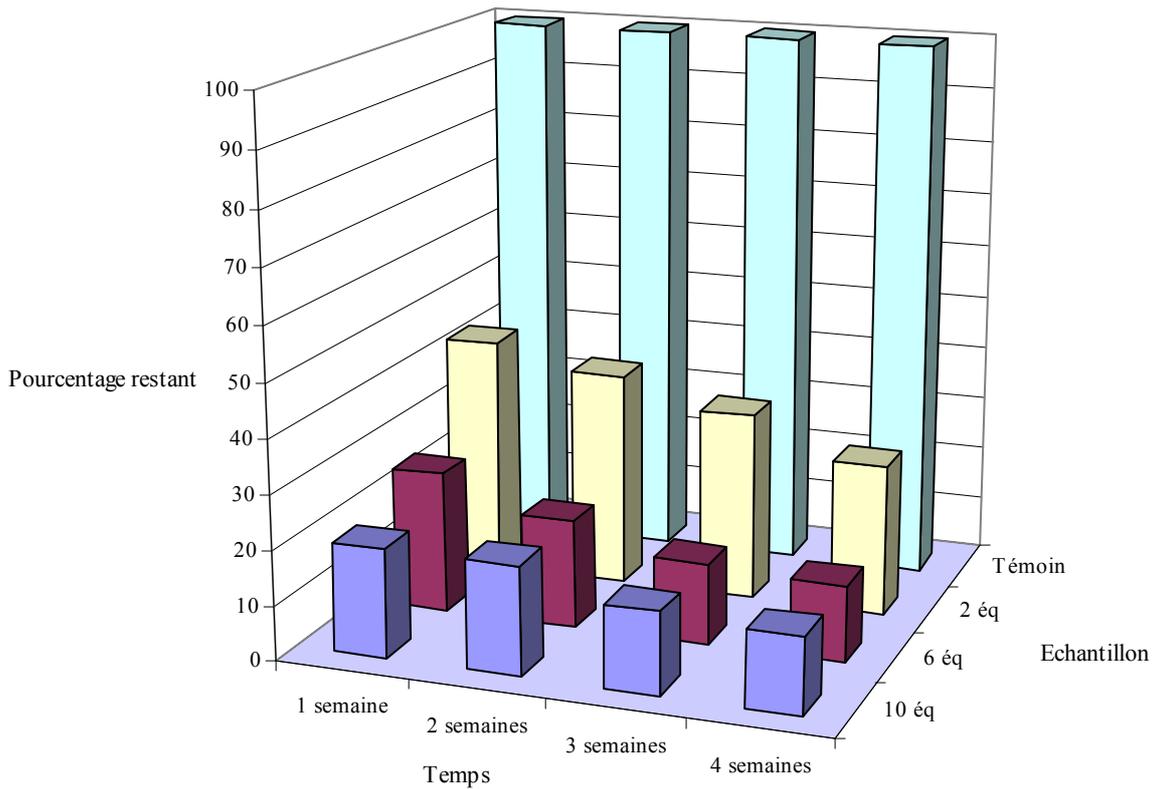


Graphique 48 : Extraction sous agitation de l'acide pyruvique dans un vin de Sauternes 1999 en fonction du temps et du nombre d'équivalents

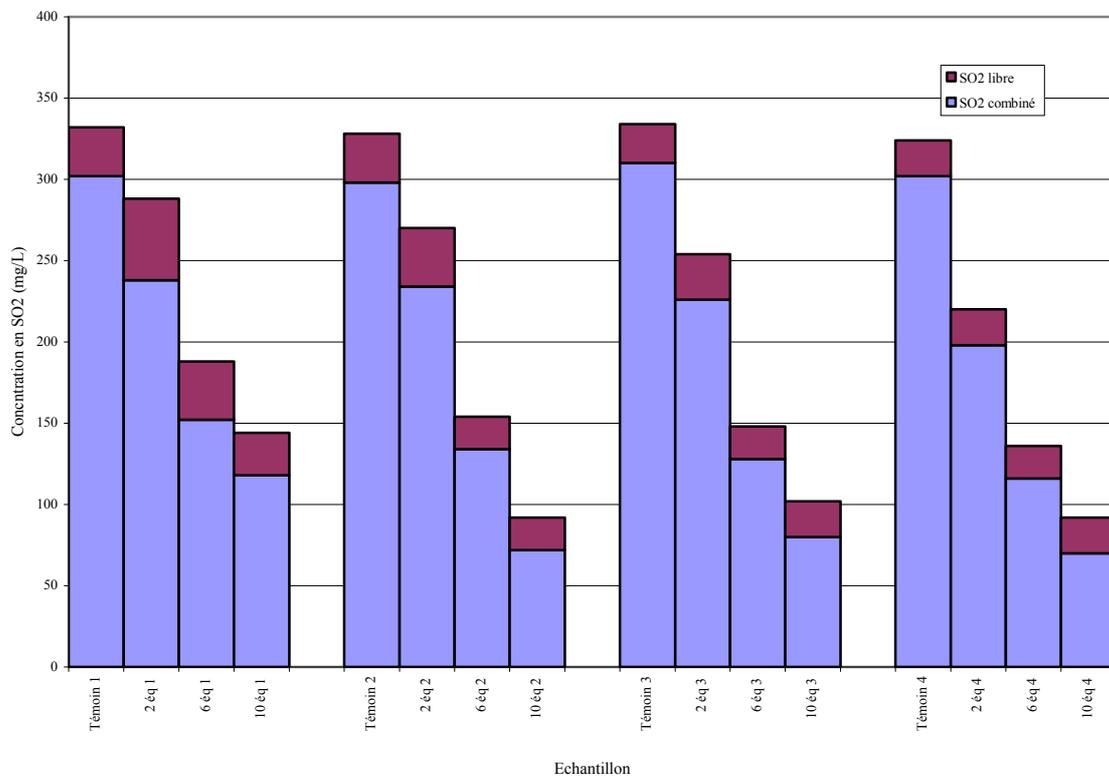


Graphique 49 : Extraction sous agitation de l'acide 2-oxoglutarique dans un vin de Sauternes 1999 en fonction du temps et du nombre d'équivalents

Annexe 3 : Extraction par le support Si

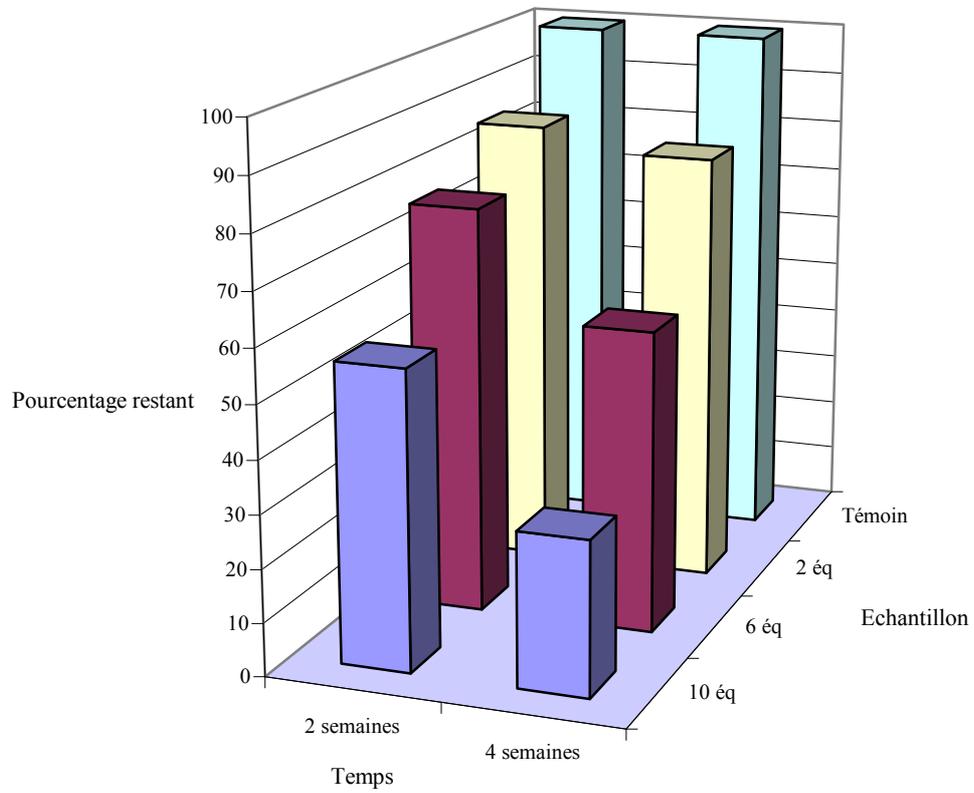


Graphique 50 : Extraction sous agitation du 5-oxofructose dans un vin de Sauternes 1999 en fonction du temps et du nombre d'équivalents



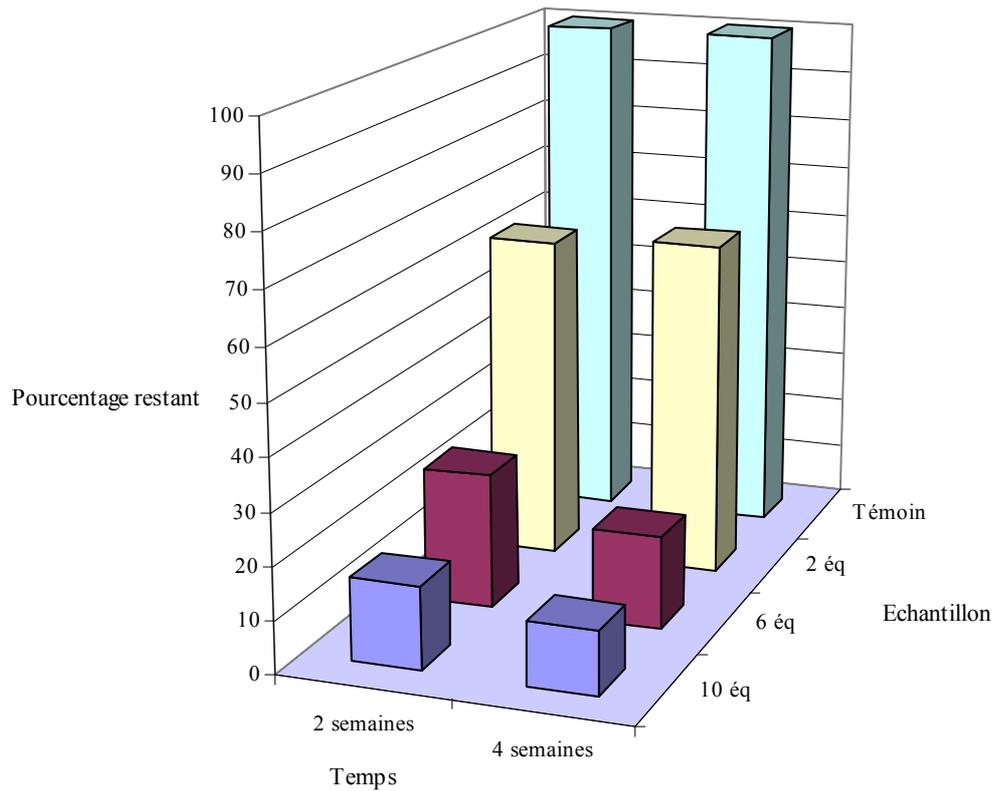
Graphique 51 : Evolution des quantités de dioxyde de soufre libre et combiné présentes dans le vin de Sauternes 1999 en fonction du temps et du nombre d'équivalents

Extraction sans agitation

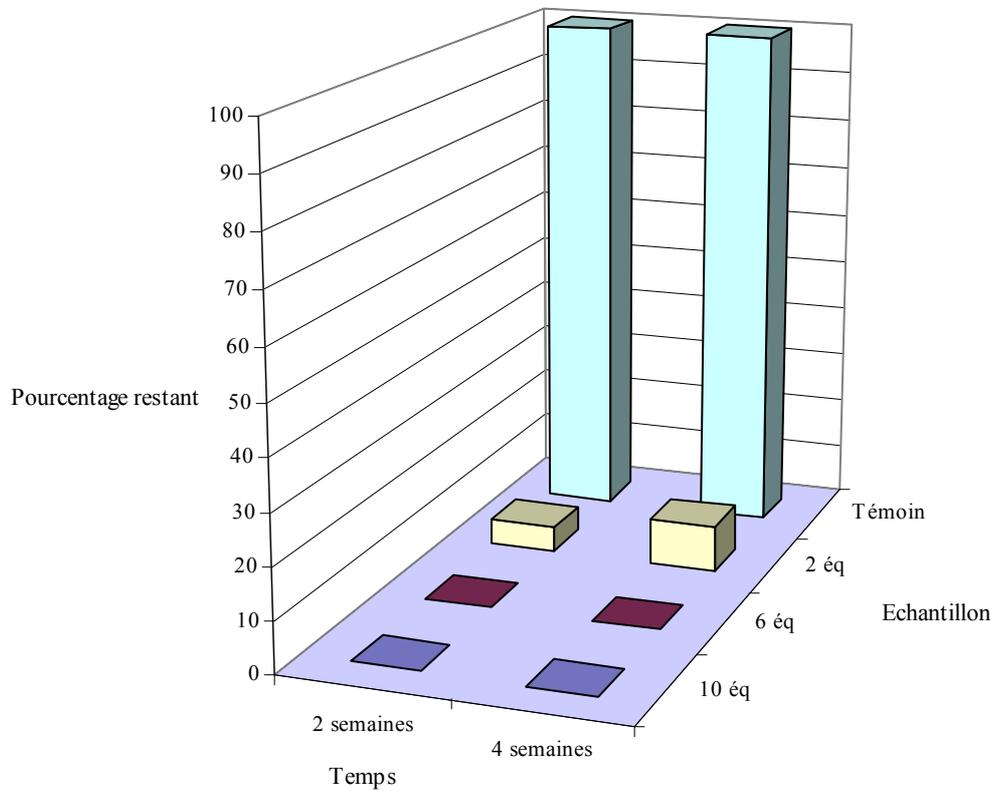


Graphique 52 : Extraction sans agitation de l'éthanal dans un vin de Sauternes 1999 en fonction du temps et du nombre d'équivalents

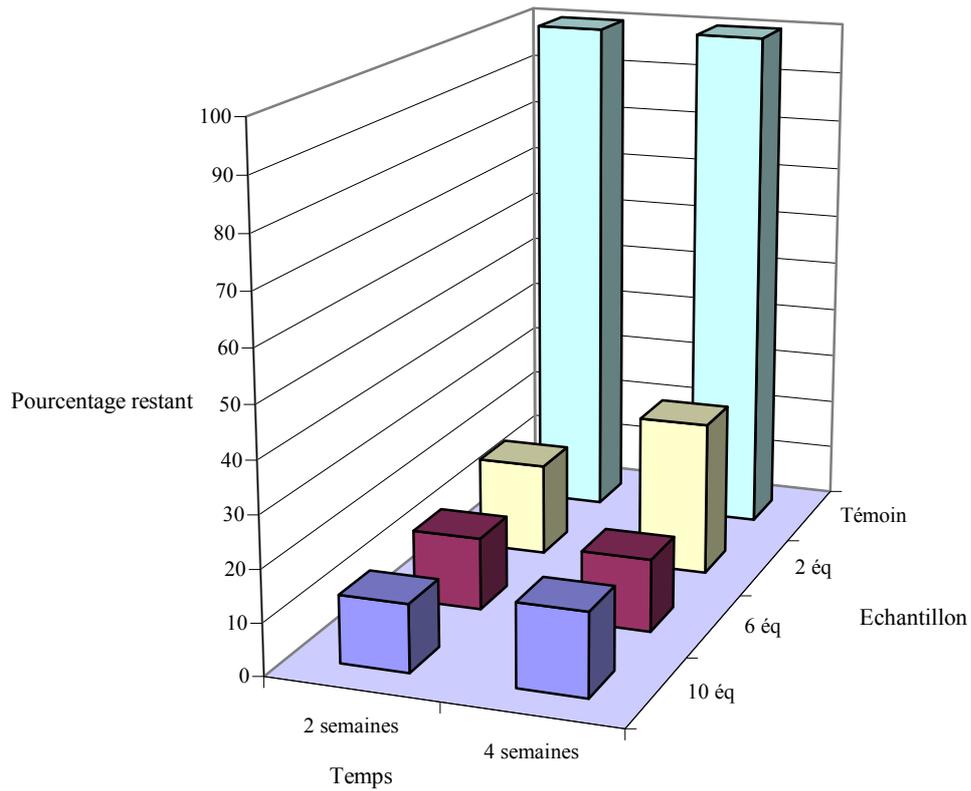
Annexe 3 : Extraction par le support Si



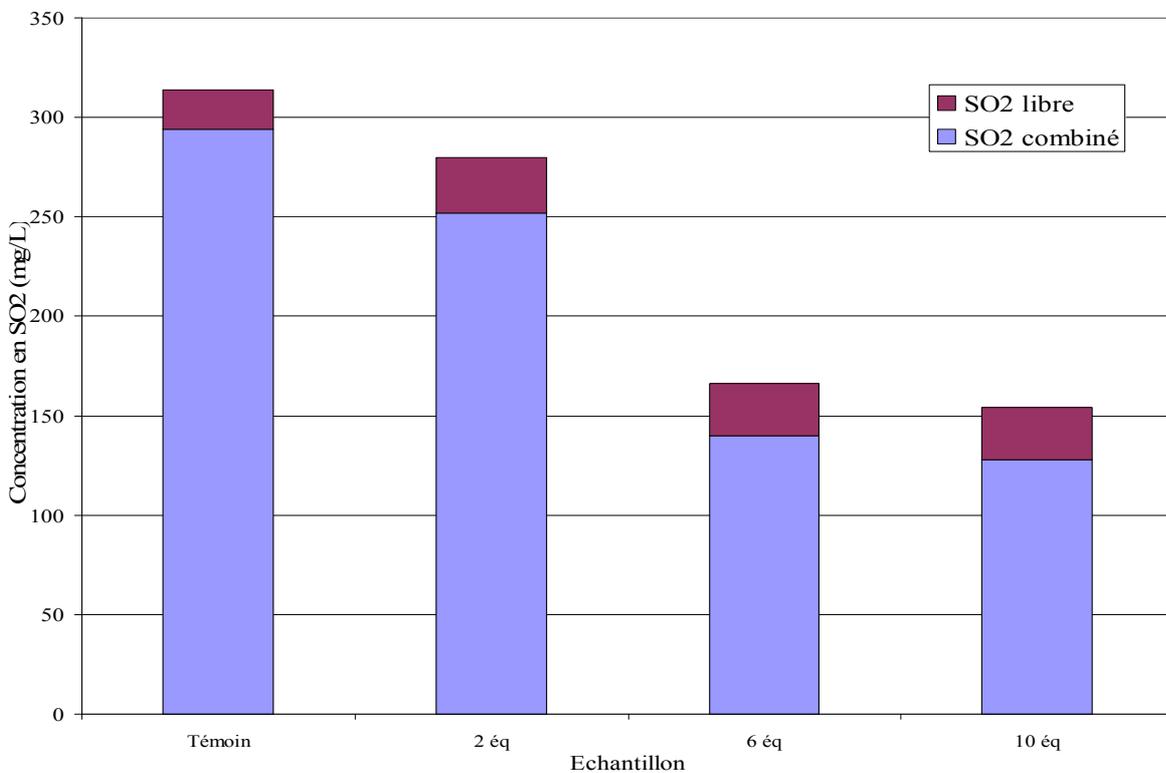
Graphique 53 : Extraction sans agitation de l'acide pyruvique dans un vin de Sauternes 1999 en fonction du temps et du nombre d'équivalents



Graphique 54 : Extraction sans agitation de l'acide 2-oxoglutarique dans un vin de Sauternes 1999 en fonction du temps et du nombre d'équivalents



Graphique 55 : Extraction sans agitation du 5-oxofructose dans un vin de Sauternes 1999 en fonction du temps et du nombre d'équivalents



Graphique 56 : Evolution des quantités de dioxyde de soufre libre et combiné présentes dans le vin de Sauternes 1999 en fonction du nombre d'équivalents après 4 semaines

Annexe 4 : Analyse des contaminants

Conditions chromatographiques colonne apolaire :

Appareil : Hewlett Packard HP 6890 Series

Colonne :

Type : capillaire
Désignation : HP 5 MS ®
Longueur : 30 m
Diamètre interne: 0,25 mm
Epaisseur du film: 0,25 µm

Injecteur :

Mode : splitless/split
Température : 250 °C
Division : 60 ml/min
Temps de splitless : 0,5min
Volume d'injection : 2 µl

Gaz vecteur : Hélium Alphagaz 2 (Air Liquide) à 10 psi
Température : programmation de 40°C (1 min)
à 240 °C à raison de 4°C/min, palier isotherme
final à 240 °C (30 minutes)

Détecteur :

Spectromètre de masse HP 5973i
Température interface : 280 °C
Température quadropole : 150 °C
Température source : 230 °C
Energie de bombardement : 70 eV
Multiplicateur d'électrons : 1059 V
Mode Impact Electronique
Total Ion Chromatogram (SCAN)

Conditions chromatographiques colonne polaire :

Appareil : Hewlett Packard HP 6890 Series

Colonne :

Type : capillaire
Désignation : SGE BP21 ®
Longueur : 50 m
Diamètre interne: 0,32 mm
Epaisseur du film: 0,25 µm

Injecteur :

Mode : splitless/split
Température : 240 °C
Division : 60 ml/min
Temps de splitless : 0,5min
Volume d'injection : 2 µl

Gaz vecteur : Hélium Alphagaz 2 (Air Liquide) à 10 psi
Température : programmation de 40°C (1 min)
à 220 °C à raison de 4°C/min, palier isotherme
final à 220 °C (30 minutes)

Détecteur :

Spectromètre de masse HP 5973i
Température interface : 280 °C
Température quadropole : 150 °C
Température source : 230 °C
Energie de bombardement : 70 eV
Multiplicateur d'électrons : 1059 V
Mode Impact Electronique
Total Ion Chromatogram (SCAN)

Le temps de rétention est donné en minutes.

L'identification des produits est donnée lorsqu'ils sont apparus dans la base de données ou leur famille.

Les valeurs quantitatives sont données à titre indicatif, en "équivalent" d'octan-3-ol, par rapport à des solutions injectées dans les mêmes conditions. Les valeurs sont exprimées en µg.l⁻¹.

Annexe 4 : Analyse des contaminants

Colonne polaire BP21 dans dichlorométhane

Support	Dérivé carbonylé extrait					
	Acétaldéhyde			Acide pyruvique		
	Temps	Identification	Quantitatif	Temps	Identification	Quantitatif
PP19	18,79	butyrolactone	15	18,82	butyrolactone	30
				26,48	acide 2-hexenoïque	35
				31,2	polluant 24	44
				31,6	polluant 25	54
PP20	8,53	1-chloro-4-éthoxy-butane	24	11,04	1,4-dichloro-butane	190
	11,06	1,4-dichloro-butane	178	18,81	butyrolactone	171
	18,79	butyrolactone	52	19,56	4-chloro-1-butanol	247
	19,57	4-chloro-1-butanol	50	25,31	1,1'-oxybis-4-chloro-butane	295
	20,35	polluant 1	48	31,33	polluant 2	475
	23,6	3-methyl-1H-pyrazole	57	42,24	polluant 2'	190
	25,34	1,1'-oxybis-4-chloro-butane	55			
PP21	20,35	polluant 1	178	9,13	styrène	48
	23,6	3-methyl-1H-pyrazole	53			
	25,12	2,6-di-tert-butyl-4-méthylphénol	41			
	28,06	polluant 4	25			
	28,57	polluant 21	34			
	29	2+3-tert-butyl-4-méthoxyphénol	103			
	49,67	polluant 22	85			
Si	6,51	1-butanol	76	11,97	4,5-dihydro-3,5,5-triméthyl-1H-pyrazole	25
	13,73	ester d'éthyle et d'acide octanoïque	68	19,19	acétophénone	135
	19,2	acétophénone	315	36,33	polluant 28	147
				37,57	polluant 31	117
Si3						

Support	Dérivé carbonylé extrait					
	Acide 2-oxoglutarique			5-oxofructose		
	Temps	Identification	Quantitatif	Temps	Identification	Quantitatif
PP19		rien				
PP20	11,05	1,4-dichloro-butane	67			
	18,81	butyrolactone	57			
	19,53	4-chloro-1-butanol	76			
	25,32	1,1'-oxybis-4-chloro-butane	95			
	31,33	polluant 2	162			
PP21	20,29	polluant 1	69			
Si	10,96	4,5-dihydro-3,5,5-triméthyl-1H-pyrazole	20			
	19,2	acétophénone	133			
	21,81	polluant 15	33			
	28,04	polluant 4	213			
	33,36	polluant 27	80			
Si3				19,2	acétophénone	93
				21,2	azulène ou naphtalène	111

Annexe 4 : Analyse des contaminants

Colonne polaire BP21 dans acétate d'éthyle

Support	Dérivé carbonylé extrait					
	Acétaldéhyde			Acide pyruvique		
	Temps	Identification	Quantitatif	Temps	Identification	Quantitatif
PP19	rien			33,7	5-méthyl-2-furancarboxaldéhyde	109
PP20	11,13	1,4-dichloro-butane	190	11,13	1,4-dichloro-butane	92
	19,54	4-chloro-1-butanol	57	19,54	4-chloro-1-butanol	84
	23,66	3-méthyl-1H-pyrazole	95	25,31	1,1'-oxybis-4-chloro-butane	118
	25,29	1,1'-oxybis-4-chloro-butane	57	31,32	polluant 2	123
	31,31	polluant 2	67			
	31,6	polluant 5 TMS	29			
PP21	21,53	polluant 5' TMS	29	9,29	styrène	48
	31,6	polluant 5 TMS	19	33,7	5-méthyl-2-furancarboxaldéhyde	64
Si	13,67	ester d'éthyle et d'acide octanoïque	21	19,18	acétophénone	98
	19,18	acétophénone	104	42	hexatriacontate	28
				44,87	hénéicosane	28
Si3						

Support	Dérivé carbonylé extrait					
	Acide 2-oxoglutarique			5-oxofructose		
	Temps	Identification	Quantitatif	Temps	Identification	Quantitatif
PP19	30,17	cyclopentane-1,2-dione (dégr)	363			
	44,47	polluant 29	73			
	46,1	polluant 3	145			
	51,12	polluant 30	48			
PP20	11,14	1,4-dichloro-butane	55			
	19,54	4-chloro-1-butanol	36			
	25,31	1,1'-oxybis-4-chloro-butane	53			
	31,32	polluant 2	230			
PP21	30,17	cyclopentane-1,2-dione (dégr)	82			
	46,1	polluant 3	61			
Si	28,02	polluant 4	116	19,18	acétophénone	98
	30,18	cyclopentane-1,2-dione (dégr)	50	27,84	polluant 6	42
	46,1	polluant 3'	25			
Si3				17,66	4,5-dihydro-5,5-diméthyl-4-isopropylidène-1H-pyrazole ou 3,5,5-triméthyl-2-cyclohexénone	48
				21,21	azulène ou naphthalène	119
				27,34	polluant 6	119
				32,08	phénol (DCIP)	71

Annexe 4 : Analyse des contaminants

Colonne apolaire HP5MS dans dichlorométhane

Support	Dérivé carbonylé extrait					
	Acétaldéhyde			Acide pyruvique		
	Temps	Identification	Quantitatif	Temps	Identification	Quantitatif
PP19	rien			26,15	polluant 10	22
PP20	6,99	1,4-dichloro-butane	160	6,99	1,4-dichloro-butane	158
	7,12	butyrolactone	41	7,12	butyrolactone	136
	7,15	3-méthyl-1H-pyrazole	30	21,58	1,1'-oxybis-4-chloro-butane	198
	7,63	4-chloro-1-butanol	13			
	8	1-chloro-4-éthoxy-butane	12			
	25,31	1,1'-oxybis-4-chloro-butane	35			
PP21	rien			6,53	styrène	36
	rien			7,13	1,1,2,2-tétrachloroéthane	29
	rien			26,16	polluant 10 famille p8 TMS	12
Si	11,69	acétophénone	207	7,12	éthane substitué	18
	15,73	ester d'éthyle et d'acide octanoïque	40	11,69	acétophénone	118
	rien			23,57	éthanone substituée	30
	rien			24,34	éthanone substituée	19
Si3	rien			rien		

Support	Dérivé carbonylé extrait					
	Acide 2-oxoglutarique			5-oxofructose		
	Temps	Identification	Quantitatif	Temps	Identification	Quantitatif
PP19	25,07	polluant 14	67	rien		
PP20	6,99	1,4-dichloro-butane	56	rien		
	7,12	butyrolactone	41	rien		
	21,58	1,1'-oxybis-4-chloro-butane	61	rien		
	23	diméthylphthalate	16	rien		
PP21	rien			rien		
Si	11,69	acétophénone	120	26,03	phénol chloré (DCIP)	120
	18,48	polluant 15	27	rien		
Si3	rien			45,24	polluant 16	27
	rien			57,68	1,2-bis-(2,4-dichlorophenoxy)éthane	93

Annexe 4 : Analyse des contaminants

Colonne apolaire HP5MS dans acétate d'éthyle

Support	Dérivé carbonylé extrait					
	Acétaldéhyde			Acide pyruvique		
	Temps	Identification	Quantitatif	Temps	Identification	Quantitatif
PP19	22,18	polluant TMS	21	15,28	polluant 12	57
	22,32	polluant 17	17	15,33	5-méthyl-2-furancarboxaldéhyde	22
	23,36	polluant 18	35			
PP20	7,32	1,4-dichloro-butane	185	6,92	styrène	23
				7,33	1,4-dichloro-butane	101
				7,44	butyrolactone	32
				13,39	polluant 7	32
				15,29	polluant 12	28
				15,39	5-méthyl-2-furancarboxaldéhyde	17
				16,19	polluant 8	128
				21,56	1,1'-oxybis-4-chloro-butane	95
PP21	rien			6,92	styrène	44
				13,39	polluant 7	37
				16,18	polluant 8	111
				19,57	siloxane	46
				26,18	polluant 8 TMS	46
Si	6,14	triméthyl-2-méthylbutoxysilane	202	6,16	triméthyl-2-méthylbutoxysilane	230
	6,18	triméthyl-2-méthylbutoxysilane	665	6,2	triméthyl-2-méthylbutoxysilane	680
	6,73	octatriméthyltrisiloxane	112	6,99	ester de triméthylsilyle et d'acide 2-méthylpropanoïque	580
	6,93	styrène fonctionnalisé	163			
	6,99	triméthyl(2-méthylbutoxy)silane	295	11,74	acétophénone	115
	7,22	polluant 11	103			
	11,63	polluant 19	35			
	11,74	acétophénone	109			
Si3						

Support	Dérivé carbonylé extrait								
	Acide 2-oxoglutarique			5-oxofructose					
	Temps	Identification	Quantitatif	Temps	Identification	Quantitatif			
PP19	19,57	dodécaméthylcyclohexasiloxane	159						
	21,88	polluant TMS	176						
	26,4	polluant 9	374						
PP20	7,33	1,4-dichloro-butane	52						
PP21	9,68	polluant 32	24						
	25,48	polluant 9	101						
Si	6,17	triméthyl-3-méthylbutoxysilane	46				6,16	triméthyl-2-méthylbutoxysilane	52
	6,73	octatriméthyltrisiloxane	52				6,21	triéthyl-3-méthylbutoxysilane	131
	6,92	styrène fonctionnalisé	28				11,38	triméthylphénoxy-silane	27
	6,99	ester de triméthylsilyle et d'acide 2-méthylpropanoïque	79				11,73	acétophénone	12
	7,21	polluant 11	88						
	11,73	acétophénone	88						
	25,13	polluant 9	79						
Si3	rien								

Annexe 5 : Analyse de l'évolution des contaminants après lavage des supports

Les conditions chromatographiques sont identiques à celles de l'annexe 4.

Colonne polaire BP21 dans dichlorométhane

Support	Temps (min)	Identification	Avant lavage	Après lavage
Si	11,36	triméthylsilanol	4690	234
	30,15	acétophénone	135	67
PP20	16,56	polluant 1	27	9
	20,67	2-butanamine	13	0

Colonne polaire BP21 dans acétate d'éthyle

Support	Temps (min)	Identification	Avant lavage	Après lavage
Si	12,21	diméthyl(1,1,2-triméthylpropyl)silanol	3225	0
PP20	16,64	1-chloropentane	22	0

Colonne apolaire HP5MS dans dichlorométhane

Support	Temps (min)	Identification	Avant lavage	Après lavage
Si	6,99	1,4-dichloro-butane	118	0
	11,57	acétophénone	1907	668
	26,01	polluant 2	393	196
	34,52	acide phtalique	2065	1032
	38,78	ester de butyle et d'acide hexanoïque	2655	0
	39,01	alcane	373	0
	39,2	ester d'octadécyle et d'acide acétique	1475	0
	42,68	alcane	472	0
	44,97	alcane	216	0
47,83	alcane	196	0	
PP20	6,69	nonane	17	10
	20,35	acide nonanoïque	10	6
	25,46	acide	9	3
	46,37	bis(2-éthylhexyl)phtalate	15	9

Annexe 5 : Analyse de l'évolution des contaminants après lavage des supports

Colonne apolaire HP5MS dans acétate d'éthyle

Support	Temps (min)	Identification	Avant lavage	Après lavage
Si	6,16	triméthyl(2-méthylbutoxy)silane	230	29
	6,2	triméthyl(2-méthylbutoxy)silane	680	113
	6,99	ester de triméthylsilyle et d'acide propanoïque	48	10
	11,6	acétophénone	115	7
	22,4	2-hydroxyphényl-éthan-1-one	19	0
PP20	6,92	styrène	23	18
	7,33	1,4-dichloro-butane	101	11
	15,49	5-méthyl-2-furancarboxaldéhyde	17	13

Annexe 6 : Recherche de la phénylsulfonylhydrazine

Conditions chromatographiques colonne apolaire :

Appareil : Hewlett Packard HP 6890 Series

Colonne :

Type : capillaire
Désignation : HP 5 MS ®
Longueur : 30 m
Diamètre interne : 0,25 mm
Epaisseur du film : 0,25 µm

Injecteur :

Mode : pulsed splitless (PTU)
Pulsed pression : 25 psi
Pulsed time : 1 min
Température : 265 °C
Division : 60 ml/min
Temps de splitless : 1 min
Volume d'injection : 1 µl

Gaz vecteur : Hélium 6.0 (linde gaz) (1cm³/min)
Température : programmation de 85 °C (3 min)
à 200 °C à raison de 3 °C/min, palier isotherme
final à 200 °C (2 minutes)

Détecteur :

Spectromètre de masse HP 5973Network
Température interface : 280 °C
Température quadropole : 150 °C
Température source : 230 °C
Energie de bombardement : 70 eV
Multiplicateur d'électrons : 1670 V
Mode Impact Electronique
Total Ion Chromatogram (SIM)

Seuil de détection de la phénylsulfonylhydrazine dans du dichlorométhane qualité HPLC : 1,62 ng/µl.

Solutions modèles extraites au dichlorométhane et non reconcentrées : composé non détecté.

Echantillons de vin traités avec 10 équivalents d'agent d'extraction sous agitation pour les supports PP22, PP23, PP24 et Si et extraits au dichlorométhane dans les mêmes conditions que pour les solutions modèles : composé non détecté.

Conclusion : La phénylsulfonylhydrazine n'est pas présente ou présente en dessous de son seuil de détection après traitement par le support fonctionnalisé.