

## Vers un contrôle des vins par spectroscopie Raman ?

**Résumé** La spectroscopie Raman a été très peu exploitée pour l'analyse des vins. Des difficultés notables limitent son utilisation car les molécules d'intérêt pour leurs vertus organoleptiques sont en très faible concentration dans un milieu constitué à 95 % d'eau et d'éthanol. Par ailleurs, la fluorescence émise par les vins irradiés par un rayonnement laser dans le visible est très importante, masquant le plus souvent l'émission Raman. Cet article montre que ces difficultés peuvent être contournées en exploitant les phénomènes d'exaltation de la diffusion Raman par effet de résonance électronique. Il discute également brièvement de l'exaltation du signal Raman par résonance plasmonique en présence de nanoparticules d'argent.

**Mots-clés** Spectroscopie Raman de résonance, vins blancs et rouges, acides hydroxycinnamiques, anthocyanes, SERS.

**Abstract** Raman spectroscopy for wine analysis?

Raman spectroscopy has been little used for wine analysis. Notable difficulties limit its use because the molecules of interest for their organoleptic virtues are in very low concentration in a medium composed of 95% water and ethanol. Moreover, the fluorescence emission in wines irradiated by a laser radiation in the visible range is very high, often making it impossible to observe Raman scattering. This article shows that these difficulties can be overcome by exploiting the phenomena of enhancement of Raman scattering by resonance effect. It also briefly discusses the enhancement of the Raman signal by plasmon resonance in the presence of silver nanoparticles.

**Keywords** Resonance Raman spectroscopy, white and red wines, hydroxycinnamic acids, anthocyanins, SERS.

### La spectroscopie optique pour l'analyse des vins

Il existe une très grande variété de techniques analytiques, souvent complémentaires, pour la détermination de la composition, le contrôle de la qualité et l'authentification des vins.

Les méthodes optiques basées sur le phénomène d'absorption de la lumière ont connu des développements importants ces dernières années pour la caractérisation des vins. Il s'agit de la spectroscopie d'absorption dans l'infrarouge moyen (MIR, longueurs d'onde entre 2 et 30  $\mu\text{m}$ ) et le proche infrarouge (NIR, longueurs d'onde entre 0,7 et 3  $\mu\text{m}$ ) pour étudier les vibrations moléculaires fondamentales et leurs harmoniques [1-2], et de la spectroscopie d'absorption dans l'UV et le visible (UV-vis) pour sonder les transitions électroniques [3].

La spectroscopie d'absorption dans l'infrarouge permet d'identifier les molécules à travers leurs vibrations. Du fait de son efficacité, de sa simplicité d'utilisation et du coût modéré de l'équipement, cette technique est aujourd'hui routinière dans les laboratoires d'analyse en chimie. Cependant, pour le cas particulier des vins et plus généralement des solutions aqueuses, la spectroscopie d'absorption infrarouge présente un inconvénient majeur. En effet, le vin est constitué essentiellement (à plus de 95 %) d'eau et d'éthanol. L'absorption des photons par les molécules sera d'autant plus efficace que leurs vibrations engendrent de fortes variations de polarité, ce qui est le cas de l'eau  $\text{H}_2\text{O}$  et des vibrations de l'éthanol  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$  impliquant la liaison O-H. Il en résulte que le spectre d'absorption dans l'infrarouge moyen d'un vin sera dominé par les vibrations des molécules d'eau, les vibrations impliquant des liaisons C-H de l'éthanol conduisant à des raies d'absorption considérablement plus faibles. Les absorptions des quelques % de molécules organiques restantes dans la composition d'un vin seront donc négligeables ; il n'y aura pas de différences nettement visibles entre les spectres de différents vins [4]. C'est pourquoi cette méthode analytique est indissociable de la chimométrie qui consiste à analyser les

infimes différences entre les spectres de différents vins par des méthodes statistiques et de les attribuer par la suite à des compositions chimiques supposées car issues d'un modèle [5].

L'analyse Raman offre potentiellement une alternative. Les prodigieux progrès dans les sources et détecteurs de rayonnement conduisent à une miniaturisation et une chute des coûts des spectromètres lasers et à leur emploi grandissant par les douanes, la police scientifique, les personnels effectuant sur site la recette de produits, ou encore la détection de contrefaçons de spiritueux au travers de leur contenant [6]. Des smartphones sont transformés en spectromètres [7]. De plus, en diffusion Raman, la contribution de l'eau est faible. Des techniques d'excitations spécifiques permettent de détecter de nombreuses molécules, en particulier comportant des cycles carbonés, à des concentrations de  $10^{-6}$  g/L ou encore plus faibles. La mise au point de procédures adaptées pourra faciliter le contrôle qualité et identifier des marqueurs spécifiques d'une production vinicole donnée.

### La spectroscopie Raman des vins

Les vins sont colorés ; ils contiennent dans leur formulation des molécules absorbant dans le visible. Comme l'eau et l'éthanol, qui constituent les vins à plus de 95 %, sont des fluides transparents, la coloration observée ne peut être due qu'à des molécules en très faible concentration absorbant le rayonnement dans le visible. Par exemple, le vin blanc est jaune, c'est-à-dire qu'il absorbe la lumière violette de longueur d'onde de moins de 400 nm. Le vin rouge absorbe la lumière dans une large gamme du visible, sa couleur dominante perçue par l'œil étant liée à l'absorption de la lumière verte vers 530 nm.

### Le choix crucial de la longueur d'onde d'excitation

Ainsi, si on irradie un vin avec une émission laser pouvant être partiellement absorbée, le spectre de fluorescence se

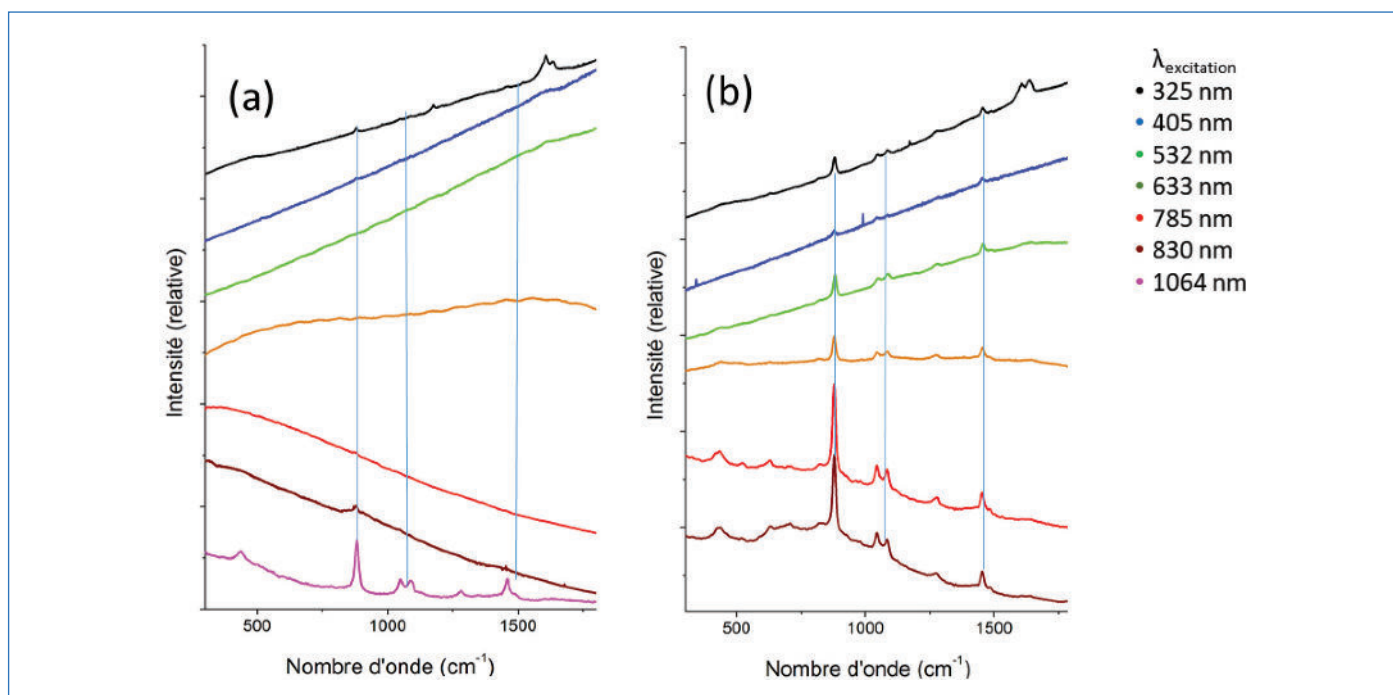


Figure 1 - Spectres d'émission de la lumière (fluorescence et Raman) pour un vin rouge (a) et un vin blanc (b). Les longueurs d'onde d'excitation laser et les couleurs associées aux spectres sont indiquées sur la figure. Les lignes verticales localisent les raies Raman associées à l'éthanol.

superposera, en le masquant le plus souvent, au spectre de diffusion Raman bien plus faible en intensité. La *figure 1a* présente la superposition de plusieurs spectres Raman d'un vin rouge pour différentes valeurs de la longueur d'onde du rayonnement laser incident, allant du proche infrarouge à 1 064 nm au proche UV à 325 nm. Cette figure illustre très simplement pourquoi la spectroscopie Raman n'a jusqu'ici jamais été considérée comme un outil analytique viable pour les vins, c'est-à-dire qu'aucune raie Raman ne peut être distinguée du fond de fluorescence pour des longueurs d'onde d'excitation « conventionnelles » (c'est-à-dire entre 450 et 785 nm). Il faut noter les deux exceptions que sont les spectres enregistrés aux deux extrêmes de la gamme d'excitation laser, c'est-à-dire dans le proche infrarouge à 1 064 nm et le proche UV à 325 nm. Le spectre à 1 064 nm de la *figure 1a*, avec un fond de fluorescence négligeable, est presque à l'identique celui d'un mélange d'eau et d'éthanol (à 12 % volumique) simulant un vin ordinaire, alors que celui à 325 nm présente de nombreuses raies Raman supplémentaires se superposant à la fluorescence [8]. Mais les molécules en faible concentration sont difficilement détectables.

La même expérience a été réalisée pour un vin blanc sec (*figure 1b*). Les conclusions sont globalement similaires avec une excitation dans le proche infrarouge, c'est-à-dire que nous ne voyons que le mélange eau/éthanol, alors qu'avec une excitation à 325 nm, des raies Raman additionnelles sont intenses (en particulier vers 1 600 cm<sup>-1</sup>). Nous reviendrons plus loin sur ces raies additionnelles.

Ces premiers résultats montrent que le spectre Raman de l'eau est considérablement moins intense qu'en spectroscopie d'absorption infrarouge améliorant le contraste pour l'observation des autres vibrations moléculaires, en particulier celles de l'éthanol. Les spectres obtenus, à l'exception des spectres à 325 nm, restent toutefois très proches de celui d'un simple mélange eau-éthanol de sorte que des méthodes d'analyse statistique restent, comme pour la spectroscopie d'absorption infrarouge, nécessaires.

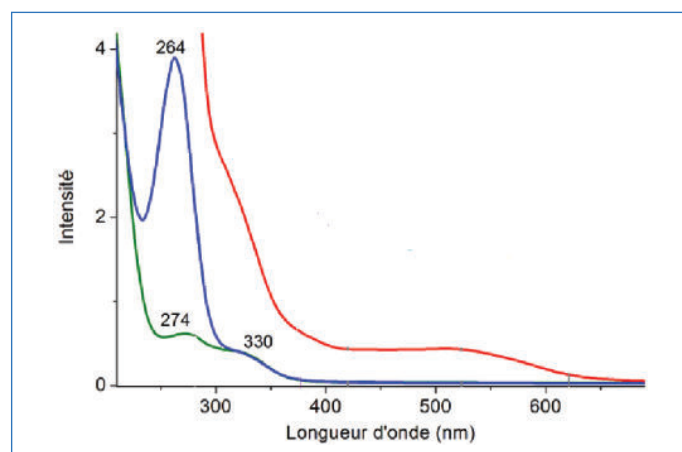


Figure 2 - Spectres d'absorption UV-vis pour un chemin optique de 1 mm des trois vins (rouge : vin rouge ; bleu : vin blanc moelleux ; vert : vin blanc sec).

## La diffusion Raman des vins exaltée par effet de résonance électronique

### Les spectres d'absorption UV-visible des vins

L'absorption des photons dans le visible et la fluorescence qui en découle sont indissociables (voir *encadré*). Nous avons reporté sur la *figure 2* les spectres d'absorption UV-visible entre 200 et 700 nm de deux vins blancs et d'un vin rouge. Pour les vins blancs sec et moelleux, nous observons des maxima d'absorption vers 270 et 330 nm, l'échantillon est donc transparent aux photons de longueur d'onde supérieure à 400 nm. Pour le vin rouge, nous observons des absorptions intenses et surtout un fond d'absorption très large entre 400 et 700 nm. Le spectre d'absorption UV-visible des vins est bien connu [9], les maxima d'absorption vers 260 nm sont attribuables aux acides phénoliques, ceux vers 330 nm aux acides hydroxycinnamiques, et enfin le massif large entre 400 et 700 nm aux anthocyanes (qui n'existent en principe pas dans un vin blanc).

## Encadré

### La diffusion Raman et l'émission de fluorescence

En spectroscopie d'absorption optique, lorsque l'énergie d'un photon correspond à la différence d'énergies entre l'état quantique fondamental d'une molécule et l'un de ses états quantiques excités, un phénomène de résonance (absorption) se produit avec transition de l'état fondamental vers l'état excité. Pour des photons ayant des longueurs d'onde dans l'ultraviolet (UV) ou le visible, les niveaux quantiques impliqués correspondent à des niveaux électroniques. L'excès d'énergie absorbée par la molécule sera dissipé dans le milieu jusqu'à ce qu'elle atteigne le niveau excité de plus basse énergie, puis la molécule irradiée retournera finalement dans son état fondamental en émettant un photon de plus faible énergie que le photon initial. Ce processus d'émission de photon après absorption est la luminescence qui englobe la fluorescence lorsque la « durée de vie » dans l'état électronique excité est relativement brève (quelques dizaines de nanosecondes).

Il y a cependant un autre mécanisme d'interaction lumière-matière provoquant, comme la fluorescence, une émission de photons dans les domaines de l'UV proche, du visible et du proche infrarouge. Ici, les photons incidents (non absorbés) vont forcer les électrons des molécules à osciller autour de leur position d'équilibre et à adopter un état d'énergie supérieur, dit niveau quantique « virtuel », de durée de vie nulle. Le retour à l'état fondamental (instantané) provoque soit la réémission d'un photon de même énergie que le photon incident (diffusion élastique) pour la diffusion Rayleigh, soit la réémission d'un photon d'énergie différente (diffusion inélastique) pour la diffusion Raman. La différence d'énergie entre le photon incident et le photon diffusé inélastiquement (positive pour la diffusion Stokes et négative pour la diffusion anti-Stokes) correspond à la différence d'énergie entre le niveau vibrationnel fondamental et le premier niveau vibrationnel excité. La longueur d'onde du photon émis dépend de la longueur d'onde du rayonnement incident ; en d'autres termes, la différence des longueurs d'onde entre photons incidents et photons émis est constante. Il faut bien distinguer ce mécanisme de diffusion de la lumière de celui de la fluorescence qui nécessite au préalable l'absorption de photons amenant la molécule dans un état électronique excité « réel » et non « virtuel ». Le nombre de photons émis par fluorescence ou par diffusion Rayleigh est très largement supérieur à celui de la diffusion Raman. Pour un milieu coloré, c'est-à-dire intégrant dans sa formulation une fraction de molécules absorbant dans le visible, les deux phénomènes d'émission de la lumière (fluorescence et diffusion inélastique Stokes) peuvent coexister. Lorsque l'intensité de l'émission de fluorescence est modérée, il est possible de la modéliser mathématiquement par une fonction plus ou moins complexe et ainsi de la soustraire du spectre brut.

### Identifier les chromophores des vins blancs à l'origine de la diffusion Raman exaltée par effet de résonance

Pour mieux comprendre l'analyse qui va suivre, nous avons reporté *figure 3* le spectre de diffusion Raman, avec une excitation à 532 nm, d'une solution mère contenant de l'eau, de l'éthanol (à 12 % volumique), 5 g/L d'acide tartrique et quelques gouttes d'une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium dans le but d'ajuster le pH de la solution autour de 3,5 (pH moyen des vins). Cette solution mère, utilisée par la suite pour préparer des solutions modèles, n'absorbe pas la lumière pour des longueurs d'onde supérieures à 200 nm, les spectres Raman de cette solution ne présentent donc aucune fluorescence. Les raies Raman de la solution mère sont, à l'exception des bandes larges vers 3 000-3 500  $\text{cm}^{-1}$  (vibrations d'élongation O-H) et vers 2 250  $\text{cm}^{-1}$  (vibrations de déformation d'angle H-O-H), toutes attribuées à l'éthanol. C'est ce spectre,

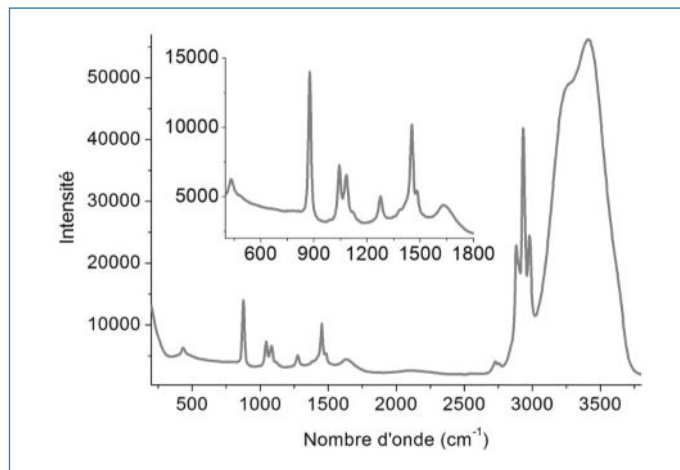


Figure 3 - Spectre de diffusion Raman de la solution mère enregistré avec une excitation laser à 532 nm.

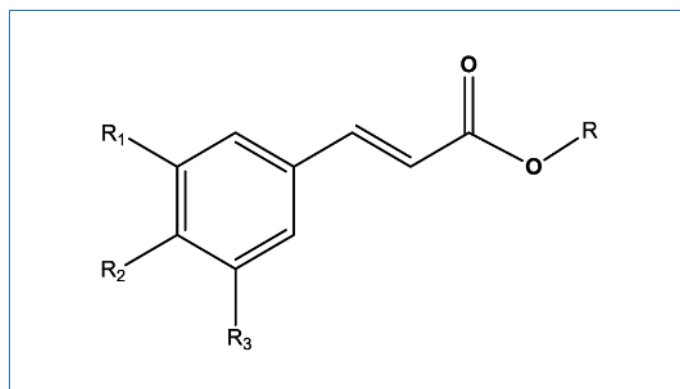


Figure 4 - Acides hydroxycinnamiques.

superposé le plus souvent à un fond de fluorescence, que nous observons qualitativement sur les spectres Raman de la *figure 1* des vins blancs pour des excitations de longueur d'onde supérieures à 400 nm et pour le vin rouge avec une excitation à 1 064 nm. Les spectres Raman des vins enregistrés avec des excitations ne correspondant pas à des raies d'absorption du spectre UV-visible, diffusion Raman que nous qualifierons de « normale », sont donc très proches du spectre de la solution mère ne contenant que de l'éthanol et de l'eau.

À la longueur d'onde d'excitation de 325 nm, qui correspond à l'absorption électronique des acides hydroxycinnamiques [10], nous observons des raies Raman supplémentaires que l'on peut attribuer à de la diffusion Raman de résonance. Il s'agit ici du cas où le niveau quantique « virtuel » se situe au voisinage de niveaux « réels » de l'état électronique excité. Les chromophores impliqués dans les processus d'absorption, de fluorescence et donc dans celui de la diffusion Raman résonante, dont la famille est schématisée sur la *figure 4*, ont été identifiés théoriquement à l'aide de calculs de chimie quantique TD-DFT (« time dependent density functional theory ») et expérimentalement sur la base de solutions modèles des différentes espèces majoritaires d'acides hydroxycinnamiques libres (acide caféique par exemple) ou liés (acide caftarique par exemple) observées dans les vins [10-11]. L'absorption UV-visible ainsi que l'émission de fluorescence sont dues essentiellement aux acides hydroxycinnamiques et plus précisément à la conjugaison du groupement styrène et du groupement benzoïque.

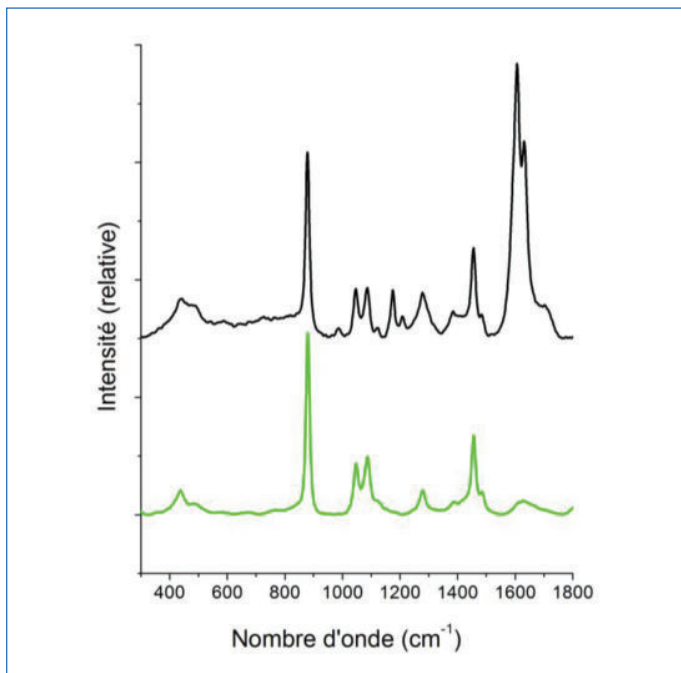


Figure 5 - Spectres Raman après soustraction du fond de fluorescence du vin blanc sec pour les longueurs d'onde 325 nm (noir) et 532 nm (vert).

Les spectres Raman des vins et des solutions modèles montrent que les vibrations intensifiées par effet de résonance ne concernent que les groupements fonctionnels impliqués dans le mécanisme d'absorption électronique [10-11]. La comparaison des spectres Raman d'un vin blanc sec enregistré avec des longueurs d'onde d'excitation de 325 et 532 nm, reportée dans la *figure 5*, illustre bien l'effet d'intensification des raies Raman par effet de résonance. Si les spectroscopies d'absorption UV-visible et de fluorescence ne permettent pas d'identifier, dans un mélange comme le vin, les espèces moléculaires, la diffusion Raman permet en partie cette identification. Les raies vers 1 600-1 700  $\text{cm}^{-1}$  sont particulièrement intenses et nous observons dans la plupart des cas deux maxima, le premier pic vers 1 600  $\text{cm}^{-1}$  attribué majoritairement aux elongations C=C du cycle phénolique, et le second vers 1 630  $\text{cm}^{-1}$  attribué majoritairement aux vibrations d'elongation du groupement styrène  $-\text{HC}=\text{CH}-$  de la molécule.

En réalisant une somme pondérée des spectres des solutions modèles d'acides « libres », on peut parvenir à reproduire assez bien le spectre du vin blanc, comme nous pouvons le constater sur la *figure 6*, et ainsi en déduire les concentrations des différentes familles de molécules excitées par la longueur d'onde laser utilisée. Pour ce vin, les espèces majoritaires sont l'acide p-coumarique et l'acide caftarique.

### Diffusion Raman exaltée des vins rouges

La formulation d'un vin rouge est beaucoup plus complexe que celle d'un vin blanc. S'il est aussi possible d'exalter les signaux Raman des acides hydrocinnamiques, à l'instar des vins blancs comme le montre la *figure 1a* pour une excitation à 325 nm, leur analyse est cependant plus délicate en raison de la forte intensité de l'émission de fluorescence. Nous ne sommes pas parvenus à exalter les spectres Raman des anthocyanes (dont la malvidine-3-O-glucoside est une molécule prototype) que l'on trouve dans les vins macérés (rouge), l'émission de fluorescence étant toujours beaucoup trop intense. Nous nous sommes alors tournés vers une autre

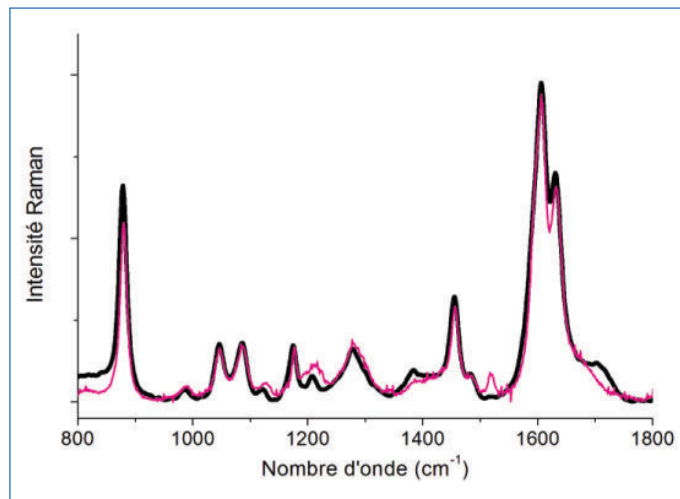


Figure 6 - Spectre Raman à 325 nm du vin blanc sec (noir) et de la somme pondérée des spectres des acides hydrocinnamiques.

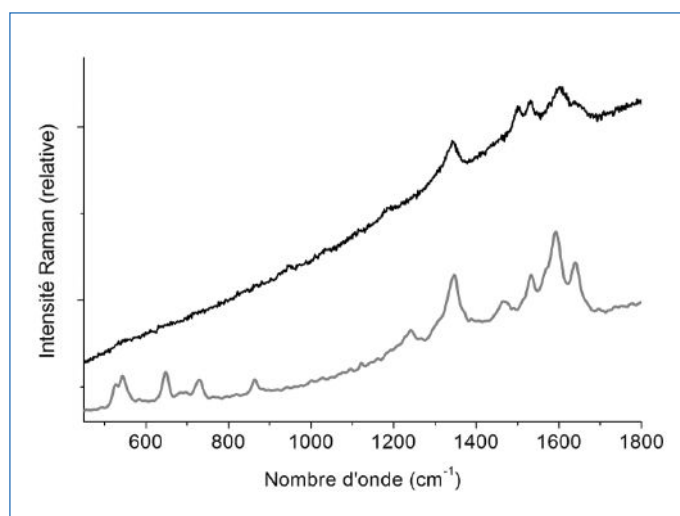


Figure 7 - Spectres SERS d'un vin rouge (noir) et d'une solution modèle de malvidine 3-O-glucoside (gris).

méthode permettant d'amplifier le signal Raman, la technique dite de diffusion Raman exaltée de surface (SERS, « surface enhanced Raman scattering »). Il s'agit ici de préparer un substrat recouvert de nanoparticules d'or ou d'argent en interaction avec l'échantillon analysé. Excitées par le laser à leur maximum d'absorption électronique (c'est-à-dire à la fréquence du plasmon (ou gaz d'électron) se formant à la surface des nanoparticules), les nanoparticules métalliques, en contact avec les molécules analysées, voient le champ électrique généré localement amplifié, ce qui permet d'intensifier considérablement les raies Raman des molécules en interaction.

Nous avons ainsi réalisé un dépôt métallique d'argent [12] dont le maximum de la large bande plasmon est vers 568 nm, énergie correspondant à la région spectrale dans laquelle les dérivés d'anthocyanes absorbent le rayonnement. Nous avons déposé sur ce substrat SERS une goutte de vin rouge irradiée avec un laser à 532 nm. Nous obtenons en quelques secondes un signal Raman très intense avec une puissance laser de quelques dizaines de  $\mu\text{W}$  (*figure 7*). Nous avons reporté sur cette même figure le spectre SERS de la solution modèle de malvidine-3-O-glucoside (maximum d'absorption vers 523 nm) à pH acide. Manifestement ces deux spectres



sont proches, avec cependant des différences notables liées au fait que la composition du vin rouge est évidemment bien plus complexe que celle de la solution modèle.

Ces résultats ne sont que très préliminaires, même si l'utilisation de substrats SERS semble prometteuse, et il reste beaucoup à faire avant d'utiliser cette technique à des fins analytiques.

## Perspectives

Il est clair que les spectres vibrationnels d'absorption infrarouge ou de diffusion Raman normale des vins, hors résonance électronique ou hors effet SERS, ne permettent pas d'identifier des espèces. En amplifiant considérablement et sélectivement les signatures Raman de certaines molécules inobservables dans d'autres conditions, de nouvelles perspectives s'ouvrent pour l'analyse chimique des vins. D'autres familles moléculaires que les acides hydroxycinnamiques (les acides phénoliques par exemple) sont probablement identifiables par spectroscopie Raman de résonance pour des longueurs d'onde d'excitation inférieures à 325 nm. En ce qui concerne l'emploi de substrats SERS pour analyser les anthocyanes, une difficulté majeure est certainement de pouvoir fabriquer des plateformes identiques permettant de réaliser des expériences répétables et reproductibles. De nombreuses équipes travaillent sur la préparation de substrats SERS [13-14] et de leur production industrielle afin de détecter de très faibles concentrations ou des traces de molécules dans des domaines d'applications très variés allant de l'agro-alimentaire jusqu'au médical. On peut penser que ces progrès bénéficieront aux études du vin.

*Ce travail a été soutenu par l'ANRT pour le financement d'une allocation doctorale CIFRE avec la société Advanced Track and Trace, que les auteurs remercient, ainsi que la Région Nouvelle-Aquitaine et la Chambre de Commerce et d'Industrie de Bordeaux pour leur soutien dans ce projet, en particulier à travers le cofinancement des équipements Raman de la plateforme Spectroscopie et Imagerie Vibrationnelle (SIV) de l'Institut des Sciences Moléculaires (ISM).*

[1] R. Bauer, H. Nieuwoudt, F.F. Bauer, J. Kossmann, K.R. Koch, K.H. Esbensen, FTIR spectroscopy for grape and wine analysis, *Anal. Chem.*, **2008**, *80*, p. 1371-79.

[2] D. Cozzolino, J. McCarthy, E. Bartowsky, Comparison of near infrared and mid infrared spectroscopy to discriminate between wines produced by different *Oenococcus oeni* strains after malolactic fermentation: a feasibility study, *Food Control*, **2012**, *26*, p. 81-87.

[3] F.J. Acevedo, J. Jiménez, S. Maldonado, E. Domínguez, A. Narváez, Classification of wines produced in specific regions by UV-visible spectroscopy combined with support vector machines, *J. Agric. Food Chem.*, **2007**, *55*, p. 6842-49.

[4] Z. Wu, E. Xu, J. Long, X. Pan, X. Xu, Z. Jin, A. Jiao, Comparison between ATR-IR, Raman, concatenated ATR-IR and Raman spectroscopy for the determination of total antioxidant capacity and total phenolic content of Chinese rice wine, *Food Chem.*, **2016**, *194*, p. 671-679.

[5] C.J. Bevin, A.J. Fergusson, W.B. Perry, L.J. Janik, D. Cozzolino, Development of a rapid "fingerprinting" system for wine authenticity by mid-infrared spectroscopy, *J. Agric. Food Chem.*, **2006**, *54*, p. 9713-18.

[6] P. Brunerie, K. Gouret, B. Fil, S. Verger, J.-L. Bruneel, F. Guillaume, C. Bruneel-Delhay, Portable device for controlling an alcoholic beverage through a container, a system and a method associated thereto, Brevet US 11105743, **2021**.

[7] P. Colombar, V. Pichon, Miniaturisation des outils et des objets d'étude, *L'Act. Chim.*, **2017**, *418-419*, p. 13-16.

[8] C. Martin, J.-L. Bruneel, F. Guyon, B. Médina, M. Jourdes, P.-L. Teissedre, F. Guillaume, Raman spectroscopy of white wines, *Food Chem.*, **2015**, *181*, p. 235-240.

[9] Z.G. Cerovic, A. Ounis, A. Cartelat, G. Latouche, Y. Goulas, S. Meyer, I. Moya, The use of chlorophyll fluorescence excitation spectra for the non-destructive in situ assessment of UV-absorbing compounds in leaves, *Plant Cell Environ.*, **2002**, *25*, p. 1663-76.

[10] C. Martin, J.-L. Bruneel, F. Castet, A. Fritsch, P.-L. Teissedre, M. Jourdes, F. Guillaume, Spectroscopic and theoretical investigations of phenolic acids in white wines, *Food Chem.*, **2017**, *221*, p. 568-575.

[11] C. Martin, La spectroscopie Raman pour la lutte contre la contrefaçon et pour la sécurisation de la filière vin, Thèse, Université de Bordeaux, **2015**.

[12] D. Talaga, S. Bonhommeau, Bare and protected sputtered-noble-metal films for surface-enhanced Raman spectroscopy, *Chem. Phys. Lett.*, **2014**, *615*, p. 89-93.

[13] P. Mandal, B.S. Tewari, Progress in surface enhanced Raman scattering molecular sensing: a review, *Surf. Interfaces*, **2022**, *28*, 101655.

[14] L. Da-Wei, Z. Wen-Lei, L. Yuan-Ting, L. Yi-Tao, Recent progress in surface enhanced Raman spectroscopy for the detection of environmental pollutants, *Microchim. Acta*, **2014**, *615*, p. 89-93.

### François GUILLAUME,

Directeur de recherche au CNRS, Institut des Sciences Moléculaires, Groupe Spectroscopie Moléculaire, Université de Bordeaux, Talence.

\* francois.guillaume@u-bordeaux.fr



**Site de ressources en Chimie pour les enseignants**

Thèmes en lien avec les **PROGRAMMES D'ENSEIGNEMENT**  
Contenu validé par des **CHERCHEURS**

Articles, Vidéos, Diaporamas  
**AGENDA, ACTUALITÉS**  
événements, conférences, parutions scientifiques...

<http://culturesciences.chimie.ens.fr>