

ÉTUDE PAR C.L.H.P. DE LA RÉACTION GLUCOSIDE DE MALVIDINE-ACÉTALDÉHYDE- COMPOSÉ PHÉNOLIQUE

J.P. ROGGERO, S. COEN, P. ARCHIER et C. ROCHEVILLE-DIVORNE

Université d'Avignon. Laboratoire de Chimie Organique et Analytique
33, rue Louis-Pasteur, 84000 Avignon (France)

INTRODUCTION

Le rôle de l'acétaldéhyde dans le vieillissement du vin a été à plusieurs reprises évoqué (SOMERS, 1971 ; TIMBERLAKE et BRIDLE, 1976 a) et en particulier TIMBERLAKE et BRIDLE (1976 b) ont étudié sur des solutions modèles l'interaction entre une anthocyane, l'acétaldéhyde et des phénols tels que la catéchine, l'épicatéchine et les procyanidines B2 et C1. Ces auteurs ont montré qu'en présence de ces phénols la couleur de la solution augmente et vire au violet, que l'on peut en chromatographie sur couche mince mettre en évidence un composé nouveau présentant une absorbance maximale vers 555nm à pH 3,5 et vers 536 nm en milieu très acide, et que par la suite la solution précipite.

Toutefois, il ne semble pas que le problème ait été réexaminé depuis que la chromatographie liquide a remplacé la CCM dans l'analyse des anthocyanes en raison de sa résolution et de sa sensibilité inégales (WULF et NAGEL, 1978 ; NAGEL et WULF, 1979 ; ROGGERO et *al.*, 1986). Pensant qu'à l'aide de cette technique on pourrait vérifier si un seul composé de condensation se forme en présence d'un phénol végétal donné et que de plus une étude cinétique (actuellement en cours) devrait être possible, nous avons entrepris le travail dont les premiers résultats sont décrits ici.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Nous avons mis en solution des quantités variables de monoglucoside de malvidine (sous forme de chlorhydrate), d'acétaldéhyde et de catéchine (ou d'épicatéchine) dans un milieu correspondant approximativement au vin, à savoir un mélange eau-éthanol (90/10 v/v) saturé en hydrogénotartrate de potassium (pH = 3,5 environ).

Il s'est avéré, après plusieurs essais, que les concentrations optimales, permettant d'obtenir des réactions relativement rapides mais parfaitement susceptibles d'être étudiées convenablement sont les suivantes :

Glucoside de malvidine	: 0,5 mg/ml
Catéchine (épicatéchine)	: 1,0 mg/ml
Acétaldéhyde	: 0,4 mg/ml

La concentration en anthocyane ayant été choisie de façon à correspondre à celle d'un vin rouge bien coloré et celle de la catéchine étant plus élevée afin de réaliser une condensation complète, la concentration en acétaldéhyde a du être ajustée avec soin.

Le mélange a été laissé à l'obscurité et des prélèvements ont été soumis à l'analyse chromatographique après des temps variables.

Nous avons utilisé un appareil de chromatographie liquide constitué de deux pompes WATERS (590 et 510), d'un programmeur WATERS 660, d'un injecteur RHEODYNE 7010 équipé d'une boucle de 10 μ l et d'un détecteur WATERS 481 opérant à 546 nm. La colonne était une cartouche Superspher 100 RP 18 de MERCK (250-4) protégée par une précolonne et le signal était traité par un calculateur D-2000 (MERCK-HITACHI).

les conditions analytiques sont les suivantes :

Solvant A : eau-acide formique (90/10)

Solvant B : eau-acide formique-acétonitrile (60/10/30)

Débit : 0,7 ml/mn

Gradient linéaire entre 20 et 85 p. 100 de (B) en 70 minutes

L'utilisation d'un calculateur associé à une boucle d'injection permet de mesurer avec précision l'aire d'un pic chromatographique. Le pic du glucoside de malvidine à l'instant initial était d'environ $1,8 \cdot 10^7$ unités de comptage et sa décroissance en fonction du temps a permis d'étudier l'évolution de la réaction.

RÉSULTATS

Au cours des premiers jours de réaction deux composés nouveaux apparaissent aussi bien dans le cas d'utilisation d'épicatéchine que dans celui de la catéchine. Ces produits que nous notons ME-1, ME-2, MC-1 et MC-2 deviennent rapidement très abondants alors que le pic correspondant au glucoside de malvidine décroît. De plus, le rapport des intégrations des pics 2 et 1 reste constant, à savoir 1,50 dans le cas de la catéchine (valeurs limites 1,34 et 1,64) et 2,8 dans celui de l'épicatéchine (valeurs limites 2,64 et 3,0). Un essai entre le diglucoside de malvidine, beaucoup moins réactif, et l'épicatéchine a donné une valeur de 1,84.

Le temps de demi-réaction est, dans les conditions expérimentales utilisées, de 11 jours environ avec l'épicatéchine et de 14 jours avec la catéchine.

Peu après on peut voir apparaître dans les chromatogrammes deux nouveaux pics notés MC-3 et MC-4, (ME-3 et ME-4 pour l'épicatéchine) qui se détachent de plus en plus nettement parmi d'autres composés moins abondants. Ces produits se forment au détriment des précédents dont les concentrations commencent alors à régesser, tandis que la solution laisse lentement déposer un précipité.

Après filtration et redissolution de ce précipité dans du méthanol acidifié (HCl 0,1 p. 100), l'analyse montre qu'il contient des quantités notables des composés -3 et -4 mais aussi de nombreux autres produits non identifiés. De plus, le monoglucoside de

TABLEAU I

**Réaction entre le monoglucoside de malvidine,
l'acétaldéhyde et la catéchine.**

Jours	Rapport des intégrations relatives au monoglucoside de malvidine initial					Rapport MC-2 / MC-1
	Mv-3G I	MC-1	MC-2	MC-3	MC-4	
1	98,3	0,12	0,20	—	—	1,64
2	91,1	0,50	0,83	—	—	1,64
3	87,8	1,67	2,23	—	—	1,34
6	75,6	3,30	4,83	—	—	1,47
8	66,1	4,60	6,50	—	—	1,44
9	65,6	4,80	7,10	—	—	1,48
13	53,1	7,00	10,4	—	—	1,48
14	50,3	7,20	11,2	—	—	1,56
20	31,3	8,60	12,8	—	—	1,49
22	27,8	10,2	15,8	0,82	1,41	1,56
24	23,8	10,8	16,7	0,97	0,77	1,54
43	5,1	8,80	13,6	1,58	1,42	1,54
51	2,8	7,30	11,7	1,37	1,49	1,61

TABLEAU II

**Réaction entre le monoglucoside de malvidine,
l'acétaldéhyde et l'épicatéchine.**

Jours	Rapport des intégrations relatives au monoglucoside de malvidine initial					Rapport ME-2 / ME-1
	Mv-3G I	ME-1	ME-2	ME-3	ME-4	
1	94,4	0,33	0,99	—	—	3,0
7	71,3	4,80	12,8	—	—	2,64
9	57,2	6,4	18,9	—	—	2,93
13	42,8	7,20	21,1	0,74	1,52	2,92
17	27,2	7,4	21,1	1,31	2,33	2,84
20	21,7	8,7	24,2	1,79	3,09	2,79
22	17,1	8,1	22,7	1,86	2,83	2,80
24	12,8	7,4	20,9	1,88	2,24	2,83
42	2,1	3,5	9,5	1,85	1,92	2,72
44	1,6	2,9	8,6	1,63	1,62	2,94
49	1,2	2,4	6,6	1,51	2,28	2,78
51	1,0	1,9	5,5	1,26	1,96	2,93

malvidine semble très entraîné par co-précipitation car il est en concentration plus forte dans le précipité que dans la solution filtrée. Les composés -1 et -2 sont relativement peu entraînés et le diglucoside de malvide (présent en impureté dans l'échantillon de départ) reste en solution (figure 1).

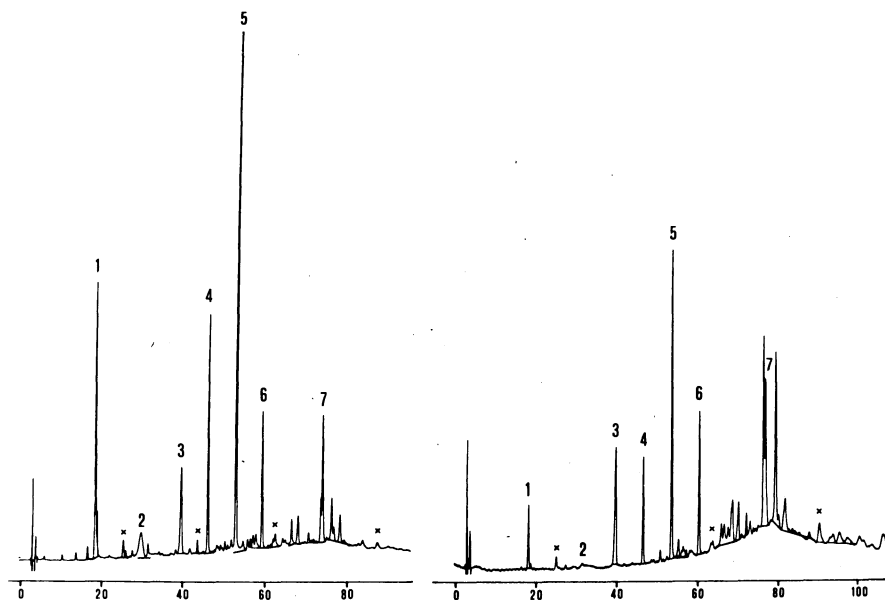


Fig. 1. — réaction entre le glucoside de malvidine, l'acétaldéhyde et l'épicatéchine.

A gauche : solution filtrée au 44ème jour.

A droite : précipité repris dans le méthanol acidifié.

1 : Epicatechine ; 2 : Diglucoside de malvidine (impureté) ; 3 : Monoglucoside de malvidine ;
4 : ME-1 ; 5 : ME-2 ; 6 : ME-3 ; 7 : ME-4 ; x : impuretés de l'échantillon utilisé.

Au bout de 50 jours environ la réaction est pratiquement terminée, la quantité résiduelle d'anthocyane représentant 1 à 2 p. 100 de sa valeur initiale.

Les tableaux I et II rassemblent les résultats analytiques relatifs à la catéchine et à l'épicatéchine.

Les temps de rétention (en minutes) enregistrées dans les conditions analytiques utilisées sont les suivants :

Catéchine : 9 ; Epicatechine : 17-18
 Diglucoside de malvidine : 29-30
 Monoglucoside de malvidine : 39-40
 ME-1 : 45 ; MC-1 : 48
 MC-2 : 51 ; ME-2 : 53
 ME-3 : 60 ; MC-3 : 63
 MC-4 : 73 ; ME-4 : 75

Tous les composés décrits sont en conséquence identifiables lors de l'analyse d'un mélange complexe.

DISCUSSION

Le mécanisme proposé par TIMBERLAKE et BRIDLE (1976 b) pour la réaction entre anthocyane, acétaldéhyde et composé phénolique nous paraît tout à fait compatible avec nos résultats expérimentaux. La catéchine réagissant sur l'acétaldéhyde protoné doit effectivement conduire après perte d'une molécule d'eau à un ion $(\text{Cat-CH-CH}_3)^+$ dans lequel le groupement CH-CH_3 se situe en position -8 sur le phénol. Cependant le fait que deux composés résultent de l'attaque électrophile de cet ion sur l'anthocyane permet de supposer que le pigment puisse réagir aussi bien par sa position -6 que par sa position -8, conduisant ainsi à MC-1 et à MC-2 (ou ME-1 et ME-2).

Les composés MC-3 et -4 (ou ME-3 et -4) pourraient provenir de la fixation ultérieure sur la position -6 du phénol d'une molécule d'anthocyane ou de catéchine (épicatéchine). Il est évident que seul une mesure par F.A.B.M.S. des masses molaires de ces composés pourra donner une certitude sur ce point. Nous pensons toutefois qu'une étude cinétique, actuellement en cours, apportera une première indication.

Manuscrit reçu le 1^{er} juin 1987; accepté pour publication le 17 juillet 1987.

RÉSUMÉ

La catéchine ou l'épicatéchine réagissent sur le monoglucoside de malvidine en présence d'acétaldéhyde pour donner dans un premier temps deux composés de condensation fortement colorés. Le rapport des concentrations entre ces deux produits est constant dans le temps, mais variable selon le phénol. Le diglucoside réagit également mais beaucoup moins rapidement. Au bout d'un certain temps, deux nouveaux composés apparaissent et précipitent en entraînant d'autres colorants.

Des hypothèses sont émises relativement aux structures des pigments obtenus et à leur mode de formation.

SUMMARY

Catechin or epicatechin condense with malvidin 3-glucoside in the presence of acetaldehyde first giving two highly colored compounds in a stable ratio during their formation. That ratio depends upon the used phenol.

Malvidin 3,5-diglucoside reacts also, but very slowly.

In a second time two other compounds are formed and precipitation occurs. Several pigments are present in the precipitate.

A reaction scheme is proposed to explain the formation of the condensation products.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Catechine oder die Epicatechine reagieren unter Präsenz von Acetaldehyd auf den Malvidinmonoglucosid um in der ersten Etappe zwei kondensierte, stark gefärbte Stoffe zu geben. Das Verhältnis zwischen den beiden Stoffen bleibt zeitlich konstant, verändert sich jedoch je nach Phenol. Der Diglucosid reagiert ebenfalls aber viel langsamer.

Nach einer gewissen Zeit erscheinen zwei neue Verbindungen und fallen mit anderen Farbstoffen aus.

Es werden Hypothesen über die Struktur der erhaltenen Pigmente und deren Bildungsmodus aufgestellt.

RESUMEN

La catequina o la epitequina reaccionan con el monoglucósido de malvidina en presencia de acetaldehído para producir en un primer momento dos compuestos de condensación fuertemente coloreados. La proporción entre las concentraciones de estos dos productos es constante en el tiempo, pero es variable según el fenol. El diglucósido también reacciona pero mucho menor rápidamente. Después de un cierto tiempo, dos nuevos compuestos, aparecen y precipitan arrastrando otros colorantes.

Se emiten hipótesis en relación a las estructuras de los pigmentos obtenidos y a su modo de formación.

RIASSUNTO

La catechina o l'epicatechina reagiscono sul monoglucoside di malvidine in presenza di acetaldeide per dare in un primo tempo due composti di condensazione fortemente colorati. Il rapporto delle concentrazioni tra questi due prodotti é costante nel tempo, ma mutevole secondo il fenolo. Il diglucoside reagisce ugualmente ma molto meno rapidamente. Dopo un certo tempo, due nuovi composti appaiono e precipitano con altri coloranti.

I ipotesi sono espresse relativamente alle strutture dei pigmenti ottenuti e al loro modo di formazione.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- NAGEL C.W. et WULF L.W., 1979. Changes in the anthocyanins, flavonoids and hydroxycinnamic acid esters during fermentation and aging of Merlot and Cabernet-Sauvignon. *Am. J. Enol. Vitic.*, **30**, N° 2, 111-116.
- ROGGERO J.P., COEN S. et RAGONNET B., 1986. High Performance Liquid Chromatography. Survey on Changes in Pigment Content in Ripening Grapes of Syrah. An approach to Anthocyanin Metabolism. *Am. J. Enol. Vitic.*, **37**, N° 1, 77-83.
- SOMERS T.C., 1971. The polymeric nature of wine pigments. *Phytochem.*, **10**, 2175-2186.
- TIMBERLAKE C.F. et BRIDLE P., 1976 a. The effect of processing and other factors on the colour characteristics of some red wines. *Vitis*, **15**, 37-49.
- TIMBERLAKE C.F. et BRIDDLE P., 1976 b. Interactions between Anthocyanins, Phenolic Compounds and Acetaldehyde and their Significance in Red wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, **27**, N° 3, 97-105.
- WULF L.W. et NAGEL C.W., 1978. High Pressure Liquid Chromatographic separation of anthocyanins of *Vitis Vinifera*. *Am. J. Enol. Vitic.*, **29**, N° 1, 42-49.