CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DU VIEILLISSEMENT DU COGNAC - IDENTIFICATION DE LA SCOPOLÉTINE, DE L'AESCULÉTINE, DE L'OMBELLIFÉRONE, DE LA β-METHYL-OMBELLIFÉRONE, DE L'ÆSCULINE, ET DE LA SCOPOLINE, HÉTÉROSIDES PROVENANT DU BOIS (*)

E. JOSEPH et M. MARCHE
Laboratoire du Cognac
Station Viticole de Cognac
16-Cognac (France)

Après un rappel des travaux antérieurs effectués sur les eaux-de-vie de provenances diverses, nous nous sommes attachés à étudier les substances naturellement présentes dans le bois, dissoutes dans le cognac pendant le séjour en barriques, ainsi que les substances formées par interaction entre les composants du cognac et ceux du bois.

Nous précisons ensuite les méthodes analytiques utilisées pour la détection et l'identification de ces substances : chromatographie sur couche mince, spectres d'absorption en ultra-violet. Nous cherchons enfin à identifier les composants du cognac provenant du bois et nous étudions leurs modifications au cours du vieillissement.

PREMIERE PARTIE

I. - RAPPEL DES TRAVAUX ANTERIEURS CONCERNANT LES TRANSFORMATIONS DU COGNAC AU CONTACT DU BOIS DE CHENE.

THEORIE NOUVELLE DU VIEILLISSEMENT

Les substances extraites du bois de chêne par le cognac constituent ce qu'il est convenu d'appeler « l'extrait sec », c'est-à-dire le résidu fixe après évaporation de l'alcool, de l'eau et des autres composants volatils. L'extrait sec du cognac, après quatre à huit ans de fût, est de l'ordre de 0,5 à 2 g par litre ; il comprend un groupe complexe de substances, acides, tanins, matières colorantes, glucose, pigments, esters, aldéhydes aromatiques, etc...

(*) Travail réalisé sous la direction de M. J. LAFON, Directeur des Services Techniques au Bureau National du Cognac.

On a constaté depuis longtemps que la rapidité du vieillissement est d'autant plus grande que le degré alcoolique initial du cognac est plus bas, que le volume de la barrique est plus faible et que le bois de la barrique provient de chêne de Limousin ou de Tronçais à l'exclusion de toute autre essence.

Plusieurs aldéhydes aromatiques proviennent de la dégradation oxydative de la lignine ; la vanilline et l'aldéhyde coniférique sont formés à partir des fibres tendres du bois tandis que l'aldéhyde syringique et l'aldéhyde sinapique proviennent du bois dur. L'aldéhyde para-hydroxybenzoïque est également formé à partir de la lignine ; nous l'avons rencontré dans un certain nombre de plantes. Certaines de ces substances proviennent directement du bois tandis que d'autres dérivent de l'éthanolyse de la lignine.

La lignine.

La lignine constitue, après la cellulose, le composant principal du bois puisqu'elle participe à la formation du tissu végétal. Son individualité en tant que substance chimique n'a pas été nettement établie et sa composition centésimale varie avec son mode d'extraction.

La lignine a été étudiée au point de vue de sa préparation et de sa composition chimique en 1913 par WILLSTÄTTER et ZECHMEISTER et en 1922 par WILLSTÄTTER et KALB ; ces auteurs l'ont isolée à l'état pur et ont étudié en particulier les dérivés de son hydrolyse en milieu acide. La constitution de cette substance est cependant encore mal connue, bien que KLASON (1920, 1922, 1923 et 1925) ait cherché à établir une relation entre elle et l'aldéhyde coniférique qui en dérive ; BRAUNS et HILBERT (1934), en examinant les produits de dégradation de la lignine extraite des végétaux par des procédés différents, ont constaté qu'elle renferme toujours un groupement : — O — CH_2 — O —. La présence de ce groupement est confirmée par les recherches de KLASON (1934), de PAULY (1934) et de EICHLER (1934).

Toutefois, KLASON lui attribue une structure aromatique et considère qu'elle provient de la condensation de l'alcool coniférique ; c'est cette hypothèse que nous adoptons pour expliquer les transformations de cette substance au contact du cognac. En effet, la plupart des produits de dégradation de la lignine correspondent au cycle protocatéchique, substitué en 1-3-4 (alcool coniférique, acide protocatéchique) et au cycle pyrogallique substitué en 1-2-3, l'un et l'autre présents dans les tissus du bois de chêne. L'alcool coniférique dérive d'un alcool dihydroxy - 3,4 cinnamique - 1, qui

présente un rapport de proportions avec certains sucres existant dans le cognac, les pentoses et le gaz carbonique rencontrés par l'un de nous dans les barriques de vieillissement.

$$2\ C_5\ H_{10}\ O_5 \longrightarrow C_9\ H_{10}\ O_3 + 5\ H_2O + CO_2$$

HOFFMESTER (1927) identifie le principe appelé « hadromal », constituant spécifique des membranes lignifiées du bois, avec l'aldéhyde coniférique.

Contrairement à la cellulose, la lignine est soluble dans le cognac ; sa présence y est mise en évidence au moyen du phloroglucinol en milieu chlorhydrique. Dans ces conditions, il se développe une coloration rouge violacée ; ce réactif n'est cependant pas spécifique de la lignine et donne aussi une coloration avec les aldéhydes à noyaux phénol qui l'accompagnent selon CZAPECK (1899).

La lignine forme avec l'éthanol une véritable combinaison appelée éthanol-lignine semi-acétal qui s'hydrolyse progressivement en donnant naissance à des molécules monomères à noyaux aromatiques, possédant des fonctions diverses : phénol, aldéhyde, cétone, acide, alcool, céto-acide, etc..., lesquelles réagissent à leur tour sur les composants volatils du cognac en engendrant d'autres corps, volatils ou non, possédant généralement les qualités organoleptiques caractéristiques du cognac vieux.

L'éthanol-lignine est semblable à la lignine de BRAUNS (1952) obtenue par l'action prolongée de l'éthanol sur la sciure de bois de chêne.

FREUDENBERG (1956) assimile ce composé aux principes des lignanes difficilement cristallisables ; ceux-ci sont des dimères de dérivés de n-propylbenzène par l'atome de carbone de la chaîne latérale. On attribue aux dimères issus de la lignine de BRAUNS la constitution suivante :

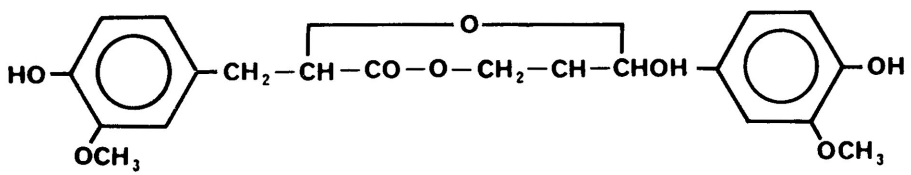


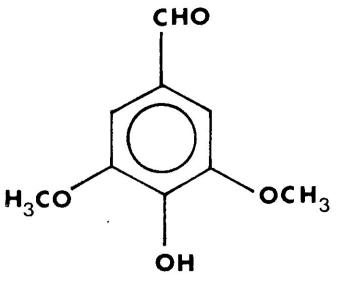
Fig. 1. — Formule de la lignine (BRAUNS)

A cette structure se rattache la lignine soluble du cognac.

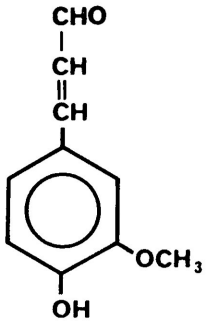
Le mécanisme de l'hydrolyse acide de la lignine et des oxydations successives des produits obtenus est le suivant : les points d'attaque des molécules par l'oxygène sont les doubles liaisons

Lignine du bois		Alcool coniférique
+ éthanol	pH 4 à 5	+ éthanol
+ eau	——————→	+ lignine
Alcool sinapique		Vanilline + éthylvanilline
+ oxygène	——————→	+ aldéhyde sinapique
aldéhyde coniférique		+ aldéhyde syringique

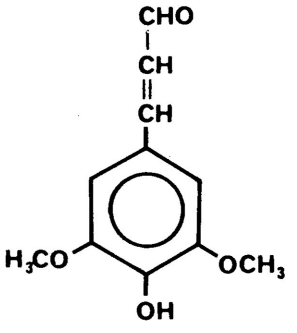
Cette réaction est influencée par la température et l'état de dilution du milieu alcoolique. Nous avons étudié les conditions optimales de son développement ; ce travail fera l'objet d'une étude ultérieure.



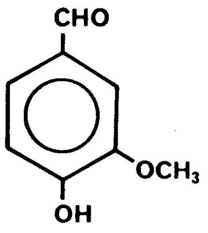
Aldéhyde syringique
(hydroxy-4 diméthoxy-3,5 benzaldéhyde)



Aldéhyde coniférique
(hydroxy-4 méthoxy-3 cinnamaldéhyde)



Aldéhyde sinapique
(hydroxy-4 diméthoxy-3,5 cinnamaldéhyde)



Vanilline
(hydroxy-4 méthoxy-3 benzaldéhyde)

Fig. 2. — Formules des aldéhydes obtenues par hydrolyse acide et oxydation de la lignine.

La vanilline rencontrée dans le cognac n'a peut être pas pour seule origine la dégradation oxydative de la lignine. Une proportion très faible

de cet aldéhyde peut aussi provenir de la distillation des vins et de leurs lies, produits dans les distillats desquels il a été signalé, à côté de l'aldéhyde benzoïque (ORDONNEAU 1903), dans les termes suivants : « Enfin. il existe dans les vins un corps analogue ou identique à la vanilline. J'en ai obtenu quelques centigrammes dans le cours d'une étude sur les acides volatils des vins. D'ailleurs, en opérant sur 250 cc d'eau-de-vie très vieille et pure, on peut après distillation de l'alcool et évaporation du résidu obtenir par l'éther quelques milligrammes de corps huileux qui paraît constitué par de la vanille probablement mélangée d'acide vanillique.

« Le bouquet des vins est donc principalement constitué par des corps aromatiques provenant du raisin et analogues à ceux que contiennent les essences de plantes diverses ; ce sont surtout des alcools et leurs éthers en mélange avec l'aldéhyde benzoïque et probablement avec la vanilline. »

Hémicelluloses.

A côté de la lignine, parmi les principaux composants solubles du bois subissant des transformations au cours du vieillissement, il y a lieu de placer les hémicelluloses communément appelées gommes de bois, qui sont des composés contenant des groupements méthoxyles.

La composition centésimale de ces substances est très proche de celle de la cellulose. Mais la constitution moléculaire de tous ces polyholosides possédant des degrés de condensation divers, n'est pas exactement définie ; ce sont des hexosanes $(C_6 H_{10} O_5)n$ et des pentosanes $(C_5 H_8 O_4)n$, les uns s'hydrolysant en hexoses, les autres en pentoses.

Les hémicelluloses et la lignine étant l'une et l'autre colloïdales, elles possèdent des affinités physiques réciproques et s'interpénètrent dans les cellules du bois comme si elles étaient unies chimiquement. Il n'en est cependant rien ; ces substances gardent leur individualité propre.

La lignine se dissout dans le butanol — 1 et le dioxane alors que les hémicelluloses y sont très peu solubles.

Les hémicelluloses, dans le cognac, s'hydrolysent sous l'influence du milieu hydro-alcoolique suivant des vitesses variables en fonction du pH et de la température du milieu, en donnant naissance à divers sucres, notamment le glucose, le xylose, l'arabinose, le mannose, le galactose. le

rhamnose (LITCHEV et PANAITOV 1960) et à deux acides à fonctions acide-aldéhyde-alcool qui sont l'acide d-glucuronique et l'acide d-galacturonique en proportions variables suivant leur provenance (SCHRYVER, 1923 et 1926, SKOURIKHIN, 1960).

Au début du vieillissement, l'arabinose et le xylose prédominent tandis qu'au bout de 10 à 15 ans de vieillissement le glucose et le lévulose sont présents en quantités plus importantes. Le d-fructose peut se former par épimérisation à partir du glucose.

Une tentative de séparation des hémicelluloses a conduit SCHRYVER (1923 et 1926) à classer ces substances en deux groupes, A et B, suivant que leur hydrolyse aboutit à l'un ou l'autre de ces acide-aldéhyde-alcool :

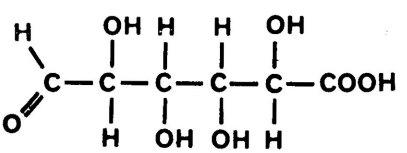
— l'hémicellulose A, qui s'hydrolyse en donnant l'acide d-glucuronique hexanetétrol - 2,3,4,5 al - 6 oïque - 1, dont la formule est la suivante : CHO $(CHOH)_4$ COOH (formule brute : $C_6 H_{10} O_7$),

— l'hémicellulose B, qui s'hydrolyse en donnant l'acide d-galacturonique :

COOH $(CHOH)_4$ CHO (formule brute : $C_6H_{10}O_7$).

Ces deux acides sont présents dans le cognac ainsi que leurs lactones. Le premier acide s'hydrolyse à son tour en donnant du furfural et du gaz carbonique.

L'acide galacturonique est au galactose ce que l'acide glucuronique est au glucose. Sa formule est la suivante :



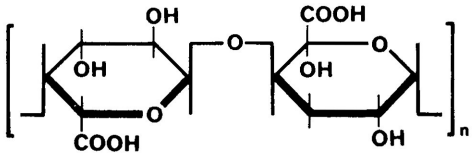
L'acide galacturonique n'a pas seulement pour origine l'hydrolyse acide de l'hémicellulose B ; sa présence a été mise en évidence dans le bois de chêne où il se rencontre naturellement sous forme d'acides conjugués dans les acides pectiques (acides polygalacturoniques). Cet acide existe dans le cognac sous sa forme alpha $C_6 H_{10} O_7$, H_2O où on le caractérise par les sels qu'il forme avec certains alcaloïdes tels que la brucine (OEHLE et BEHREND 1925, LIEBMANN et SCHERL, DJAMPOLADYAN 1957, DJAMPOLADYAN et MNDJOYAN 1969) et la cinchonine ; cependant la combinaison de sa fonction aldéhyde avec la dinitro-2,4 phénylhydrazine ne permet pas, dans nos conditions expérimentales, son identification par chromatographie.

Le xylose provenant de l'hydrolyse en milieu acide de l'hémicellulose B donne lui-même progressivement du furfural

$$C_5\ H_{10}\ O_5 \longrightarrow C_4\ H_3\ O\ CHO + 3H_2O$$

Ce furfural peut être dosé au moyen du phloroglucinol (DOREE, 1933).

Les pectines existent dans le bois ; elles ont également été isolées des fruits par BRACONNOT (1831). Mais la connaissance de la nature exacte de ces substances dans les végétaux est récente et est due à DEULE (1943) et surtout à PEYNAUD (1951).



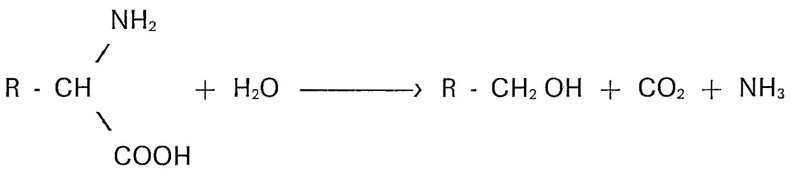
A côté des substances principales, les cellules du bois renferment de l'acide oxalique, malique et succinique qui se dissolvent dans le cognac et qui entraînent certains accidents (comme les troubles formés par la précipitation de l'acide oxalique en présence de calcium) ainsi que les substances azotées dont les principales sont les amino-acides rencontrés jusqu'ici au nombre de 12 dans les extraits hydroalcooliques de chêne par MNDJOYAN et **al.**, (1971). Ce sont principalement l'α-alanine, l'acide aspartique, la sérine, l'acide glutamique, la proline, le glycocolle, la thréonine, la leucine, qui sont les plus abondants dans les extraits alcooliques de chêne ; puis viennent, à des teneurs plus faibles, la tyrosine, la valine, la méthionine et la l (—) -phénylalanine. Le bois de chêne renferme jusqu'à 1,28 p. 100 de substances azotées, mais les amino-acides apparaissent surtout au début du vieillissement, provenant probablement de la dégradation des protéines du bois au contact du cognac. Le cognac lui-même contient des substances azotées à noyau pyridique et pyrazinique appelés alcaloïdes des fuselols qui ont pour origine probable, selon ORDONNEAU, l'action des bactéries sur les levures vieilles du vin. L'oxydation de la base principale, la tétraméthylpyrazine conduit à la formation d'acide pyrazine-tétracarboxylique. Ces bases aminées sont également susceptibles d'entrer en combinaison avec les composés carbonylés et les glucides. Au cours d'une période de vieillissement plus longue, le taux d'amino-acides de l'eau-de-vie diminue, tandis que celui de certains alcools à noyau benzénique d'odeur agréable augmente. Cette évolution est très importante et explique la formation du bon goût et du bouquet du cognac vieux.

Les amino-acides réagissent avec les oses en formant des composés de condensation glucidoaminiques et des combinaisons particulières connues sous le nom de mélanoïdines. Ce sont des produits qui ont une coloration propre et qui participent à la formation du bouquet du cognac

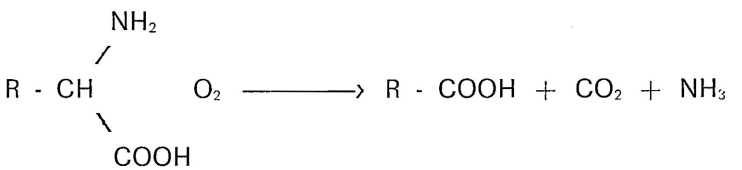
PETROSYAN (1961) a mis en évidence la formation par réaction de condensation intramoléculaire entre la phénylalanine d'une part, le glucose, le xylose et un autre sucre non identifié d'autre part, d'amino-sucres et de mélanoïdines.

Les quinones et les enzymes catalysent la décomposition oxydative des amino-sucres par l'oxygène. L'α-amino-acide peut subir à la fois une désamination et une décarboxylation, qui s'accompagnent d'une hydratation ou d'une oxydation et qui conduit à la formation soit d'alcools, soit d'acides. Ce mécanisme est considéré comme étant la source d'alcools supérieurs, de leurs esters et de leurs acétals qui peuvent jouer un rôle important dans la formation du bouquet du cognac.

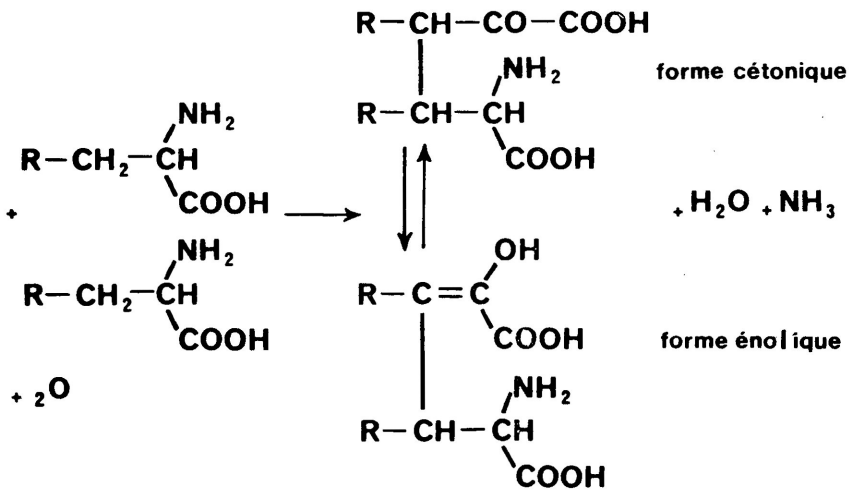
La formation enzymatique d'alcools supérieurs dans la réaction d'EHRLICH par hydratation, désamination et décarboxylation des α-amino-acides est bien connue.



Il en est de même de la formation d'acides gras par oxydation, désamination et décarboxylation des α-amino-acides :



ainsi que de la production d'acides cétoniques signalée aussi dans le cognac par les auteurs russes.



La l (-) -phénylalanine a été recherchée dans le cognac vieux par PETROSYAN en 1961, qui l'a caractérisé et a mis aussi en évidence la présence de phénylacétaldéhyde, acétal éthylique de l'alcool phényléthylique, ainsi que l'alcool β-phényléthylique, issus de la dégration oxydative de cet α-amino-acide, comme le prévoit la théorie. L'alcool phényléthylique primaire et le phénylacétaldéhyde sont des produits qui possèdent un parfum agréable de rose fanée et apportent au cognac une odeur de fleur.

Tanins.

Enfin il faut considérer certaines substances à fonction phénol, existant naturellement dans le bois, à des teneurs variables selon l'espèce végétale considérée, qui sont dissoutes par le cognac et qui jouent un rôle important par leur constitution chimique, soit seules, soit par l'intermédiaire de leurs dérivés d'hydrolyse d'oxydation et de polymérisation formés au cours du vieillissement, telles que les quinones.

La présence de ces substances signalée par BLACK et **al.** (1953) et BALDWIN et **al.** (1967), nous a amenés à chercher à les identifier, à étudier leurs propriétés, ainsi que leur dosage, afin de connaître leur origine, leur évolution, leur rôle au cours du vieillissement et leur influence sur la qualité du cognac.

L'ensemble des produits formés au cours du vieillissement est fortement influencé par la dimension des barriques utilisées, la température, l'état hygrométrique du lieu d'entrepôt et par la porosité du bois.

On a aussi mis en évidence le fait que les substances présentes dans l'extrait sec provenant de l'éthanolyse des composants du bois se forment sous l'influence de l'acidité. Comme nous l'avons indiqué précédemment, le pH du cognac logé en barriques varie entre 4 et 5 dans les premières années.

Les autres substances existant naturellement dans le bois et extraites par l'alcool et l'eau du distillat et qui subissent d'importantes modifications chimiques par interaction des composants du cognac, sont les phénols à fonction acide. Une propriété importante de ces substances est la facilité avec laquelle s'oxydent celles qui possèdent 2 OH phénoliques en position ortho.

A ce groupe se rattachent des acides-phénols, comme par exemple les acides galliques (acide trihydroxy — 3, 4, 5 benzoïque possédant trois fonctions phénol).

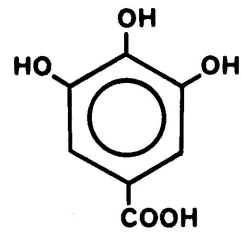


Fig. 3. — Formule de l'acide gallique

Cet acide gallique est la substance fondamentale de tous les tanins de chêne dans lesquels il existe, soit sous forme libre, soit sous forme d'esters ou de glucosides, provenant d'une hydrolyse acide ou enzymatique ; sa saveur est douce, tandis que celle du glucoside dont il dérive est amère ; cette propriété organoleptique explique l'amertume de certains cognacs jeunes à pH élevé, dans lesquels ces transformations n'ont pas eu le temps de s'accomplir. La tannase catalyse la scission des esters dont le reste possède au moins deux radicaux phénols. Pour que l'hydrolyse soit possible, il faut encore que le carbonyle estérifié sur le noyau benzénique ne soit pas en position ortho par rapport à l'un des groupements phénol.

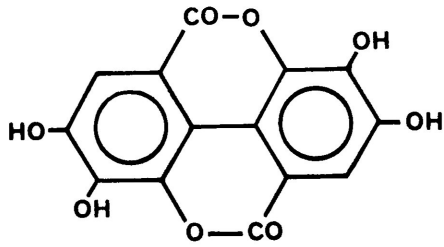


Fig. 4. — Formule de l'acide ellagique

On y rattache également l'acide ellagique (hexahydroxy-4,5,2',3',4 diphénylcarboxylique ainsi que l'acide lutéolique (carboxy-6' hexahydroxy -4,5,2',3',4 biphénylolide-2).

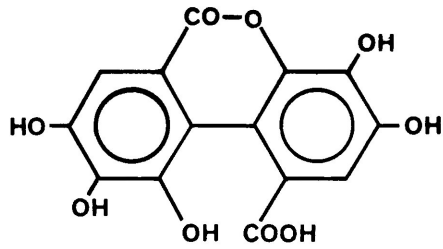


Fig. 5. — Formule de l'acide lutéolique

L'acide gallique provient de la scission par la tannase d'un depside, l'acide **m**-digallique, à saveur astringente et amère.

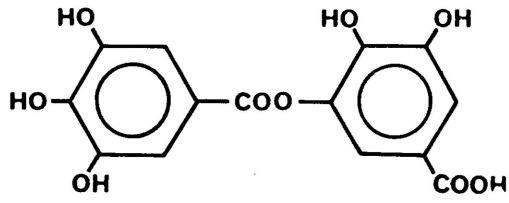


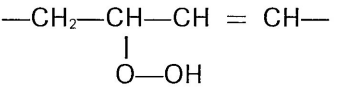
Fig. 6. — Formule de l'acide **m** - digallique

Cet acide contient deux noyaux aromatiques sur lesquels sont fixés cinq groupements OH libres unis à une fonction carbonyle libre ; il est présent dans le bois de chêne sous forme d'un glucoside et chaque groupe hydroxyle du glucose est combiné à un reste d'acide gallique.

L'acide ellagique provient de la condensation de deux molécules d'acide gallique.

L'oxydation de ces substances ainsi que celle de tous les orthodiphénols catalysée par les polyphénoloxydases (EVANS et RAPER, 1937) entraîne la formation des quinones correspondantes qui donnent au cognac sa teinte brune caractéristique. Les quinones possèdent des propriétés oxydantes par l'aptitude qu'elles ont de fixer deux atomes d'hydrogène pour former des phénols : cette oxydation s'exerce probablement sur les acides aliphatiques ou sur leurs esters présents dans les distillats de vin ; ces composés possèdent une chaîne hydrocarbonée dans laquelle l'atome d'hydrogène placé en alpha par rapport à la fonction acide est mobile.

Il y a production d'hydroperoxydes fixés sur le carbone en position alpha de la double liaison :



Ces peroxydes donnent ultérieurement, par rupture de la chaîne, des acides à chaîne plus courte et des composés carbonylés, qui ont un parfum et une saveur agréables caractérisant les cognacs vieux (fig. 8). L'oxydation des alcools supérieurs dans ces conditions paraît très difficile, sinon impossible, en raison de leur stabilité.

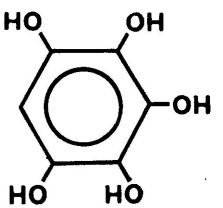


Fig. 7. — Formule de la quercite

Dans le groupe des matières tannoïdes du chêne, outre les acides gallique, ellagique, vanillique, caféique, férulique et sinapique, outre la quercite $C_6H_{12}O_5$ (BRACONNOT 1831), les sucres, le rouge de chêne (rouge phlobaphénique) (PERROT et GORRIS, 1909), on trouve un tanin phloroglucique, l'acide quercitannique (STENHOUSE) ; c'est une substance phénolique amorphe qui se dissout dans le cognac qu'elle colore en jaune, couleur caractéristique des eaux-de-vie jeunes logées dans des fûts neufs. Au cours du vieillissement, l'acide quercitannique est hydrolysé

avec formation d'un sucre et d'un produit rouge, le rouge de chêne (BOTTINGER, 1883) ; c'est à ce produit que les cognacs vieux doivent leur teinte « feu ».

La quercite de BRACONNOT est une substance à saveur douce qui accompagne un flavonol, la quercétine et son glucoside la quercitrine responsables de la couleur jaune d'or du cognac.

D'après JURD (1962), l'acide quercitannique serait constitué d'un triglucoside provenant de la condensation de quatre à cinq molécules d'acide gallique combinées à une seule molécule glucidique et mélangées à de l'acide gallique libre.

L'acide quercitannique peut être caractérisé dans le cognac par la coloration noire intense qu'il donne en présence de chlorure ferrique ; d'autre part, après évaporation des composants volatils du cognac et reprise du résidu par l'eau, la solution traitée par l'eau de brome forme un précipité floconneux caractéristique.

L'acétate basique de plomb précipite un tannate de plomb au moyen duquel on le sépare du cognac pour le doser en déterminant l'indice de permanganate en présence de carmin d'indigo (méthode LOEWENTHAL).

Les solutions de sels de strychnine insolubilisent totalement ces phénols sous forme d'un précipité blanc floconneux composé d'une molécule de strychnine pour une molécule de tanin auquel TROTMAN et HACKFORD (1931) attribuent la formule suivante :

$C_{21}H_{22}N_2O_2$, $C_{14}H_{10}O_9$

0,125 g de gallo-tanin donne ainsi 0,2546 g de ce composé.

Ce réactif permet encore une détection à la concentration de 1/20.000. Le précipité se redissout dans l'acide acétique et dans la potasse en solutions très diluées. L'alcaloïde permet de fractionner aisément les tanins en « tanins vrais » et en polyphénols « non tanins ». Nous l'avons utilisé pour séparer de nombreux composés phénoliques du bois, même en milieu alcoolique.

La propriété des alcaloïdes de précipiter les « tanins vrais » a été mise à profit par BRUGIRARD et TAVERNIER (1952) qui indiquent notamment un dosage gravimétrique de ces substances dans les cidres, au moyen du réactif suivant :

— sulfate de cinchonine ..... 1,30 g
— acide sulfurique ..... 5 gouttes
— eau ..... 250 ml.

Ce réactif est employé dans la proportion de 25 ml pour 50 ml de prise d'essai étendue de 40 ml d'eau. Le précipité de tannate de cinchonine formé est recueilli sur filtre taré au bout de 12 heures, lavé à l'eau à plusieurs reprises, séché à l'étuve à vide à une température inférieure à 70° C et pesé.

Le poids de tannate de cinchonine correspond au poids x de « tanins vrais » :

$$x = \frac{P \times 1000}{1452}.$$

Le tannate de cinchonine aurait pour formule

$C_{20}H_{24}N_2O,\ (C_{14}H_{10}O_9)_2$

la formule du sulfate de cinchonine étant la suivante :

$2(C_{20}H_{24}N_2O) — SO_4H_2,\ 2\ H_2O$

Les auteurs ont apporté à ce procédé une modification intéressante en précisant les conditions de pH les plus favorables à la précipitation et en déterminant l'indice de permanganate avant et après précipitation. SUDRAUD (1958) a appliqué avec succès cette méthode à l'étude des tanins dans les vins de Bordeaux ; son extension au cognac, après évaporation de l'alcool et des autres composants volatils donne d'excellents résultats en ce qui concerne l'étude de l'enrichissement des eaux-de-vie en acide gallotannique $C_{14}H_{10}O_9$.

On englobe sous le nom de tanin (ou matières tannoïdes) un certain nombre de substances amorphes contenues dans les tissus végétaux, solubles dans l'eau et l'alcool, ayant une saveur astringente et qui ont entre elles la propriété de posséder plusieurs fonctions phénol. Les tanins se caractérisent par leur aptitude à précipiter les protéines et la plupart des alcaloïdes, ainsi qu'à former avec les sels de fer (Fe^{+++}) des complexes colorés allant du vert au bleu noirâtre ; cette réaction est extrêmement sensible, ce qui permet de mettre en évidence la moindre trace de fer présente dans le milieu où il se trouve.

Les tanins pyrogalliques sont des dérivés de l'acide gallique. Les leucoanthocyanes du chêne apportent leur coloration propre au cognac avant d'être hydrolysées par suite de l'augmentation de l'acidité.

FREUDENBERG (1921) a proposé la classification suivante des matières tannoïdes :

A - Matières tannoïdes hydrolysables :

Par distillation sèche ——————→ pyrogallol
Coloration bleue avec Fe^{+++}

1° - Combinaison du type ester
Depsides

— acide polyphénolique + acide polyphénolique
— acide polyphénolique + un oxacide (lacéronique, chlorogénique, digallique, lutéique)

Glucosides (groupe sur lequel ont porté nos recherches)

— acide polyphénolique + glucose
— acide polyphénolique + alcool

2° - Combinaisons de l'acide ellagique

— acide ellagique + sucre
— acide ellagique + acide

B - Matières tannoïdes condensées

Par distillation sèche ——————→ pyrocatéchine
Coloration verte avec Fe^{+++}

1° - Oxycétones cycliques : maclurine

2° - Catéchine (+ flavone et anthocyane), renferme de la phloroglucine + pyrocatéchine.

COUILLAUD (1960) a étudié la teneur minimale en fer qui provoque l'apparition de cette casse ferrique ainsi que de la fluorescence verte qui l'accompagne. Cette teneur a été trouvée égale ou supérieure à 0,6 mg de fer (Fe^{+++}) par litre pour les cognacs trois étoiles, à pH 3,7.

Pour les cognacs plus âgés dont le pH est plus faible, l'apparition de ce phénomène se trouve retardée et nécessite la présence d'une quantité plus élevée de fer. Les viticulteurs et les négociants font attention à éviter tout contact accidentel de métaux ferreux avec le cognac. Mais la nature

exacte des substances classées sous le nom de tanins est mal définie ; aussi, il nous est apparu souhaitable, dans le cadre d'une étude des diverses substances présentes dans l'extrait sec du bois, d'identifier les principaux composés classés dans ce groupe. Pour cela nous avons utilisé les méthodes chromatographiques.

Les auteurs américains ont identifié, par chromatographie sur papier et sur couche mince, la vanilline, l'aldéhyde coniférique, l'aldéhyde sinapique, l'aldéhyde syringique ; ils ont mis en évidence la formation de furfural au cours du vieillissement, par hydrolyse des polyholosides. LITCHEV et PANAITOV (1960) signalent la présence de huit aldéhydes aromatiques dans une eau-de-vie de quatre ans ; ils identifient quatre d'entre elles à l'aldéhyde syringique, la vanilline, l'aldéhyde coniférique et l'aldéhyde para-hydroxybenzoïque ; ces auteurs utilisent la chromatographie sur papier pour séparer les divers composés fixes de l'eau-de-vie, extraits sous forme de dinitro-2,4 phényl-hydrazones pour les aldéhydes et, pour les autres composés, par des solvants appropriés.

Au cours de notre étude, nous nous sommes efforcés de séparer, d'isoler et de doser semi-quantitativement les composants des bois de chêne de Limousin et de Tronçais ; nous avons suivi leur évolution dans le cognac afin de rechercher les substances nouvelles auxquelles ils peuvent donner naissance par polymérisation, hydrolyse, oxydation et interaction avec les composants du cognac.

Pour cela nous avons fait appel aux méthodes de chromatographie sur couche mince suivant les indications récentes publiées par RANDERATH (1971). Antérieurement, les auteurs français ainsi que les américains et les russes avaient utilisé avec succès diverses techniques de chromatographie sur papier et sur couche mince pour séparer et identifier les substances extractibles du bois par les eaux-de-vie.

Nous avons été amenés à modifier les procédés d'extraction afin d'obtenir un meilleur rendement, une meilleure séparation par une concentration supérieure des extraits ainsi qu'une meilleure reproductibilité. Au cours des différentes manipulations lors de l'extraction des substances du cognac et des bois, nous avons dû éviter leur destruction partielle soit par polymérisation, hydrolyse, oxydation au contact de l'air ou action chimique du solvant utilisé.

Ces corps sont d'abord séparés en utilisant les caractéristiques propres à leur fonction chimique. En premier lieu, les aldéhydes sont précipités par la dinitro-2,4, phénylhydrazine (en solution chlorhydrique 2 N)

à l'état de dinitro-2,4, phénylhydrazones ; ces hydrazones, insolubles dans le milieu réactionnel, sont recueillies et purifiées par lavage puis redissoutes dans l'acétate d'éthyle ; ce solvant est choisi de préférence au dichlorométhane, parce qu'il est moins volatil, quoiqu'il possède un pouvoir solvant plus faible à l'égard des hydrazones.

Les échantillons de cognac analysés proviennent de cognacs conservés en chais de vieillissement.

Le matériel végétal utilisé provient du cœur du chêne de Limousin et de Tronçais.

DEUXIEME PARTIE

II. - EXPERIMENTATION

On fractionne les divers composés en utilisant les propriétés de leurs fonctions chimiques et on procède à leur identification.

1 - Précipitation des composés carbonylés totaux sous forme de dinitro-2,4 phénylhydrazones (D.N.P.H.).

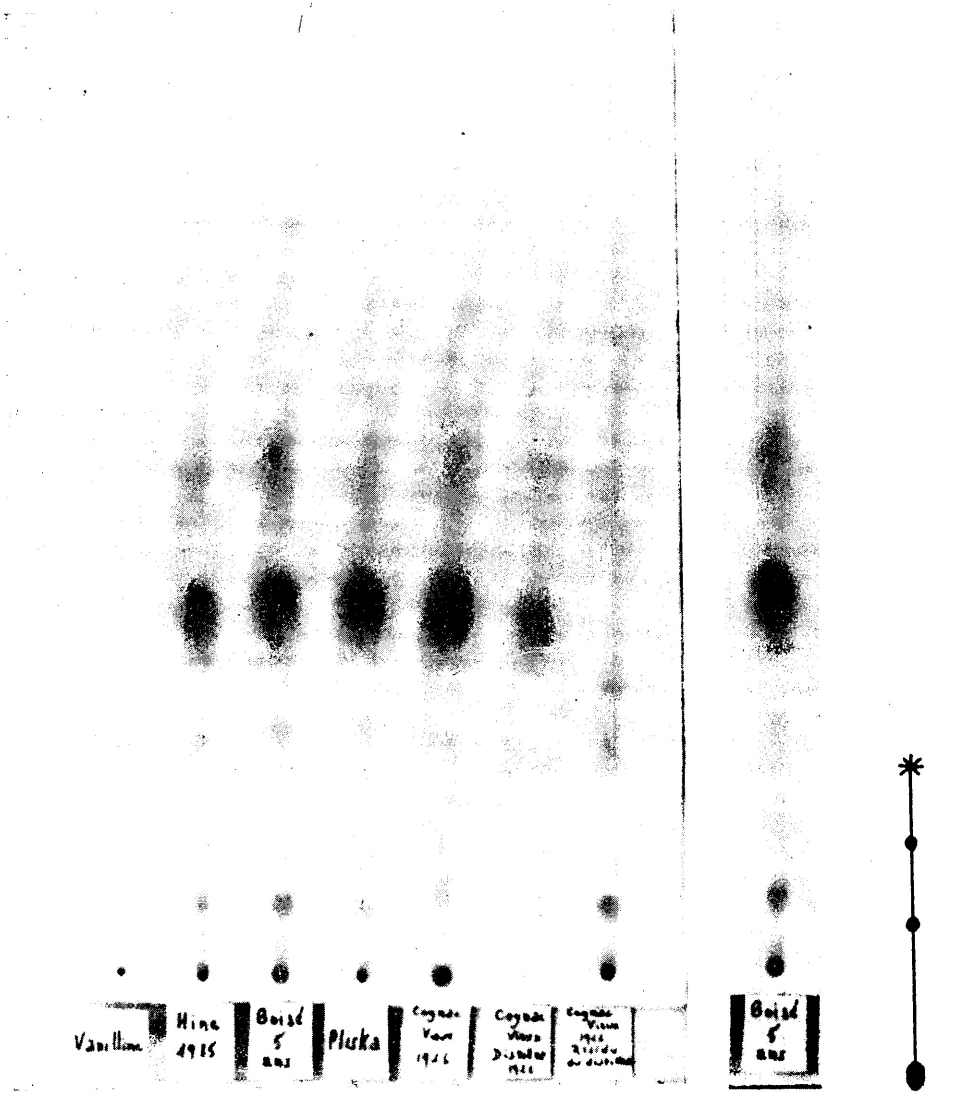
2. - Chromatographie des DNPH formées suivant la technique de HEBRE modifiée par JOSEPH et SHINOHARA.

Principe de la méthode.

Les aldéhydes, les cétones et les α-cétoacides réagissent sur les hydrazines substituées en donnant l'hydrazone correspondante, avec perte d'une molécule d'eau ; les réactions sont les suivantes :

$$\underset{\text{aldéhyde}}{R{-}CH = O} + \underset{\text{phénylhydrazine}}{C_6H_5{-}NH{-}NH_2} \longrightarrow \underset{\text{phénylhydrazone}}{R{-}CH = N{-}NH{-}C_6H_5} + H_2O$$

$$\underset{\text{cétone}}{\begin{matrix} R \\ \diagdown \\ C = O \\ \diagup \\ R' \end{matrix}} + \underset{\text{phénylhydrazine}}{C_6H_5{-}NH{-}NH_2} \longrightarrow \underset{\text{phénylhydrazone}}{\begin{matrix} R \\ \diagdown \\ C = N{-}NH{-}C_6H_5 \\ \diagup \\ R' \end{matrix}} + H_2O$$



A Chromatogramme général

B Ordre d'apparition des taches.

C

B 1 - Tache de départ 2 - 5HMF 3 - Vanilline 4 - Cétones aliphatiques de C_8 à C_{11} 5 - Furfural 6 - Inconnu 7 - Isopropanal 8 - Isobutanal 9 - Isovaléraldéhyde 10 - Hexanal 11 - Heptanal 12 - Aldéhyde cinnamique.

C 1 - Tache de départ 2 - 5HMF (Rf 0,06) 3 - Aldéhyde syringique 4 - Vanilline

Fig. 8. — Chromatographie sur couche mince des DNPH des substances cabonylées dans le cognac

Les hydrazones, insolubles dans le milieu réactionnel, précipitent ; elles sont recueillies et purifiées puis reprises par un solvant organique pour être chromatographiées.

Mode opératoire.

1° - Réactif

Acide chlorhydrique 2N
Dinitro-2,4 phénylhydrazine (Merck)

On dissout à froid 1 g de dinitro-2,4 phénylhydrazine dans 100 ml d'acide chlorydrique 2N, puis on filtre la solution de teinte orangée qui doit être parfaitement limpide. Elle se conserve plusieurs jours.

2° - Matériel de chromatographie.

— plaques de verre 35 cm x 17 cm recouvertes de gel de silice G, selon la technique de STAHL ; (épaisseur de la couche 0,25 mm environ). Les plaques enduites à l'étaleur et activées pendant 30 minutes à 110° C donnent de meilleurs résultats que celles mises à sécher plusieurs jours en dessicateur à vide en présence d' «Actigel ».

— cuve à chromatographie en verre, parallélépipédique, de dimensions : 40 cm x 20 cm x 10 cm.

3° Solvant.

n-hexane	150 ml
Acétate d'isoamyle	50 ml
Acide undécylénique	8 ml
Pentanol-2	1 ml
n-phényléthanol	1 ml

Ce solvant permet une bonne séparation des hydrazones, des aldéhydes de C_2 à C_6 ainsi que des méthyl-cétones et du furfural qui se situe entre l'éthanal et le propanal (fig. 8). Il apparaît des isomères **cis-trans** à partir de l'aldéhyde isovalérique ce qui amène à effectuer une légère correction pour cette dernière.

L'aldéhyde valérique se trouve confondu avec la vanilline.

4° - Détermination des Rf des DNPH des substances de référence et des substances carbonylées présentes dans les cognacs. Protocole expérimental.

Pour les cognacs ou les infusions hydroalcooliques de bois de chêne le volume de la prise d'essai est de 300 ml ; cette quantité est nécessaire pour obtenir une quantité suffisante de dinitro-2,4 phénylhydrazones en vue de la chromatographie.

La précipitation est réalisée par la solution chlorhydrique de dinitro-2,4 phénylhydrazine, à raison de 20 ml par 100 ml de prise d'essai ; elle commence immédiatement après l'addition du réactif et s'effectue d'autant mieux qu'on frotte la paroi du vase avec une baguette de verre.

On place le liquide à + 2° C pendant 24 heures pour insolubiliser au maximum les hydrazones. Il convient de noter ici que les hydrazones des aldéhydes en C_3 précipitent toujours avec un mauvais rendement. Le précipité obtenu est de couleur jaune. Les précipités formés par le furfural et le 5-hydroxyméthylfurfural sont de couleur rouge orangée.

Après avoir été soumis à l'action du froid pendant la durée indiquée, le précipité est recueilli sur un entonnoir filtrant muni d'une plaque de verre fritté (n° 3), recouverte d'une rondelle de papier filtre taré. Le précipité est lavé d'abord à plusieurs reprises avec HCl 2N, jusqu'à ce que le liquide qui s'écoule soit incolore ; on lave ensuite à l'eau tiède pour éliminer les traces d'acide.

La rondelle de papier est alors retirée de l'entonnoir, séchée sous vide, dans un dessicateur en présence d'actigel et enfin pesée.

Echantillons analysés : Le tableau II rassemble les résultats relatifs aux poids d'hydrazones obtenus pour différents échantillons ainsi que le volume d'acétate d'éthyle nécessaire à leur dissolution.

Les hydrazones sont ensuite dissoutes dans un volume suffisant d'acétate d'éthyle ; le solvant est évaporé jusqu'au plus petit volume qui permet de les maintenir en solution ; on ajuste alors à un volume déterminé

La chromatographie de cette solution est effectuée de la façon suivante :

— on dépose 0,2 microlitre sur la plaque au moyen d'une micropipette à piston.

— le développement s'effectue dans la cuve contenant le solvant décrit plus haut (pour une température de 19 à 22° C, la durée de développement est de trois heures environ).

TABLEAU I

Dètermination des Rf des DNPH des substances de référence et des substances carbonylées présentes dans le cognac

Témoins	Rf	Rf des substances présentes dans le cognac
Ethanal	0,37	0,36
n - propanal	0,42	0,42
iso-butanal	0,75	0,76
iso-valéraldéhyde	0,84	0,85
n - hexanal	0,88	0,85
n - heptanal	0,94	0,85
Furfural	0,50	0,50
5 H M F (*)	0,03	0,50
Aldéhyde cinnamique	0,83	0,50
Vanilline	0,23	0,22
Aldéhyde syringique	0,07 à 0,10	0,07

* (1) 5-hydroxyméthylfurfural = ce corps peut être dosé colorimétriquement, sur le liquide déféqué, par l'acide barbiturique en solution aqueuse à 0,5 pour 100 en présence de **p**-toluidine dissoute dans l'isopropanol et l'acide acétique. Il se développe une coloration rouge (CHARPENTIER, 1969) proportionnelle à la concentration.

On définit ainsi le Rf : « Le déplacement d'une substance au cours de la chromatographie sur la plaque dépend de son coefficient de partage entre deux phases non miscibles. On peut établir pour chaque substance une constante qui lui est propre :

$$Rf = \frac{\text{distance parcourue par le solvant}}{\text{distance parcourue par la substance}} \text{ »}$$

L'utilisation de cette technique permet d'identifier certains aldéhydes du tableau I. De nombreuses taches n'ont pas encore été identifiées. Il apparaît que plusieurs substances importantes, qui sont formées au cours de l'oxydation de la lignine, échappent, par cette technique, à l'identification (notamment les aldéhydes coniférique, sinapique, et syringique) soit parce qu'elles sont présentes à des teneurs insuffisantes, soit en raison de l'interférence des diverses taches.

En outre, les alcools et les huiles essentielles du cognac, en raison de leur pouvoir solvant à l'égard des hydrazones, donnent un faible rendement lors de la récupération de ces composés.

Le dosage semi-quantitatif des aldéhydes a été réalisé par comparaison visuelle des taches avec des témoins d'aldéhydes obtenus dans les mêmes conditions. La teneur de chaque aldéhyde témoin était de 20 mg par litre en solution dans l'alcool à 40°.

L'aldéhyde syringique, composant du bouquet des cognacs, est récupéré lors de la précipitation avec un rendement très déficitaire. En effet pour un milligramme d'aldéhyde syringique la théorie prévoit la formation de 2,16 mg d'hydrazone :

$$\underbrace{(NO_2)_2\,C_6H_3 - NH - NH_2}_{198{,}15} + \underbrace{C_9H_{11}O_2}_{154} \longrightarrow \underbrace{H_2O}_{18} + \underbrace{(NO_2)_2\,C_6H_3 - NH - NH - C_9H_{13}O}_{334}$$

soit pour 1 mg d'aldéhyde syringique

$$\frac{334{,}15 \times 1}{154} = 2{,}168 \text{ mg de l'hydrazone correspondante.}$$

Or l'expérience montre que pour 100 mg d'aldéhyde syringique on n'obtient jamais, dans les meilleures conditions, qu'un poids de 120 mg d'hydrazone, ce qui correspond à un rendement de 55 pour cent.

Les quantités totales d'hydrazones obtenues dans le cas de divers cognacs ont été déterminées et figurent dans le tableau II.

Une tentative de dosage de chaque aldéhyde a été réalisée par dissolution des hydrazones dans du kérosène rectifié bouillant entre 180 et 200° C et par mesure de l'absorption en U.V. aux longueurs d'ondes convenables selon une technique récemment mise au point [MOLINA

et **al.** 1970]. Les résultats obtenus sont encourageants et vont être poursuivis.

TABLEAU II

Echantilons	Volume de la prise d'essai (ml)	Poids du précipité de dinitro - 2,4 phénylhydrazones obtenu	Volume d'acétate d'éthyle utilisé pour la dissolution (ml)
Cognac vieux (49° 1) 1926	300	532 mg	20
Même échantillon Distillé	150	**Distillat** 112 mg Aldéhydes + cétones aliphatiques **Solde de la distillation** 50 mg Aldéhydes à noyaux	11 2,5
Cognac vieux (43° 5) 1935	300	229 mg	10
Eau-de-vie de vin de Bulgarie « PLISKA »	300	224 mg	10
Eau-de-vie de 5 ans (28°)	300	156 mg	5

Des essais de fractionnement d'hydrazones dans le dichlorométhane ont été tentés pour séparer les aldéhydes en plusieurs groupes ; ceux de la série aliphatique ne présentent dans le cas de cette étude qu'un intérêt secondaire car elles ont déjà fait l'objet de recherches par chromatographie en phase gazeuse de la part de COUILLAUD.

Ces fractionnements répétés ont également permis d'éliminer les hydrazones formées à partir des groupement carbonylés présents dans la lignine et qui provoquent des interférences. La technique de fractionnement est cependant longue et nécessite la mise en œuvre d'une quantité de cognac très importante pour obtenir suffisamment d'hydrazones ; d'autre part, les solubilités de ces substances étant peu différentes, il en résulte des interférences de taches lorsqu'on rechromatographie chacune des fractions isolées.

Procédé GUYMON et CROWELL modifié.

Après avoir identifié les composés carbonylés totaux du cognac au moyen de la technique précédemment décrite, nous avons recherché la possibilité de caractériser uniquement les substances à noyaux aromatiques provenant du bois. Pour cela, la méthode de GUYMON et CROWELL (1968) a été utilisée avec quelques modifications. Elle a pour principe l'élimination des composants volatils du cognac par distillation à basse température, sous pression réduite et l'extraction des principes fixes du résidu par un solvant convenable avec ou sans relargage par un sel minéral.

Matériel.

— Evaporateur rotatif
— Ampoule à décanter de 2 litres
— Azote
— Benzène (Merck)
— Chloroforme pur (Merck)
— Acétate d'éthyle pur (Merck).

Protocole expérimental.

Les cognacs et les extraits solubles du bois étudié sont de même origine que ceux analysés précédemment. Le volume de la prise d'essai est, pour chaque échantillon, de 4 litres, évaporé sous pression réduite et sous courant d'azote pour éviter toute altération par l'oxygène de l'air (fig. 9). La température est maintenue à environ 30° C pendant la durée de l'opération qui nécessite plusieurs jours. Il importe que la température ne dépasse pas 30° C afin d'éviter la détérioration de certaines substances fragiles.

On poursuit l'évaporation jusqu'à réduction du volume à 1 litre. Ce concentré, saturé de sulfate de magnésium pour le relargage, est placé dans l'ampoule à décanter et épuisé par quatre fois 200 ml de benzène pur (Merck).

L'agitation doit être poursuivie longtemps ; chaque extrait benzénique est agité avec de l'eau saturée de sulfate de magnésium puis séché sur Na_2SO_4 anhydre.

Pour extraire les coumarines un deuxième épuisement par le chloroforme des eaux-mères de l'extraction benzénique s'impose. Ce solvant est employé après élimination totale du benzène par évaporation et dans les mêmes proportions que celui-ci et séché sur Na_2SO_4 anhydre.

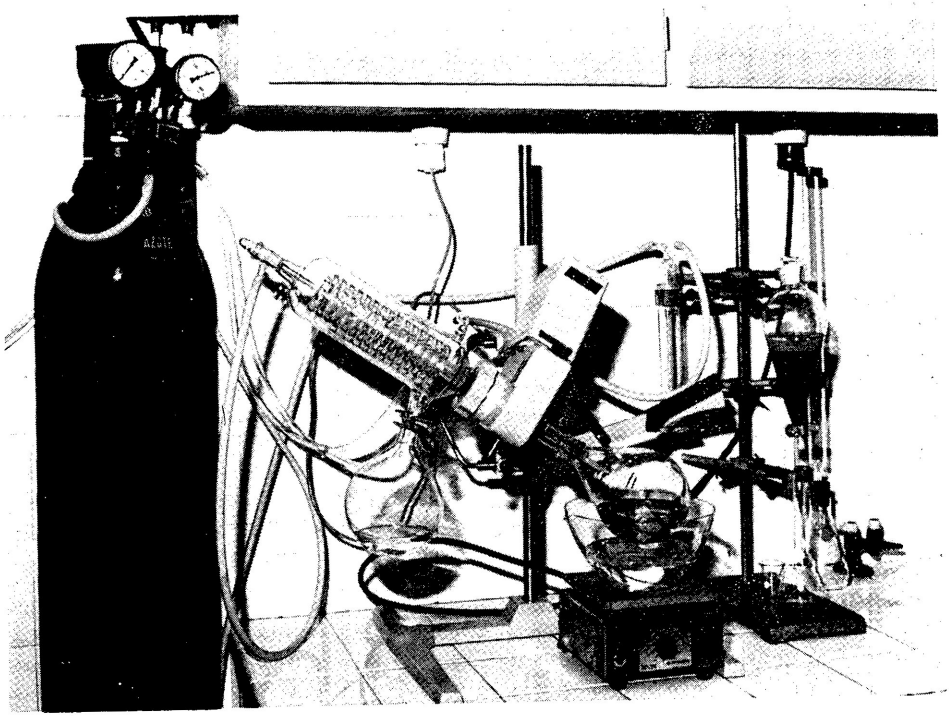


Fig. 9 — Appareillage d'évaporation sous pression réduite et sous courant d'azote.

Solvant A :

éther de pétrole	100	ml
alcool isoamylique (Merck)	16	ml
acide acétique (Merck)	0,25	ml

Solvant B :

benzène (Merck)	95	ml
méthanol (Merck)	5	ml

Les deux révélateurs utilisés sont préparés comme suit :

pour le premier : phloroglucinol (Merck) : 2,5 g, éthanol : 75 ml, HCl pur : 25 ml. Ce réactif se conserve deux ou trois semaines.

pour le deuxième : dinitro-2,4 phénylhydrazine à 0,1 p. 100 dans H Cl 2N. Ce dernier révélateur donne de meilleurs résultats et permet notamment une plus longue conservation des taches des chromatogrammes.

Les substances de référence sont dissoutes dans l'éthanol à la dose de 100 mg par litre et déposées sur les plaques.

Plaque n° 1	Quantité déposée sur les plaques
Vanilline	0,01 ml
Aldéhyde syringique	0,01 ml
p-hydroxybenzaldéhyde	0,01 ml
Scopolétine	0,005 ml

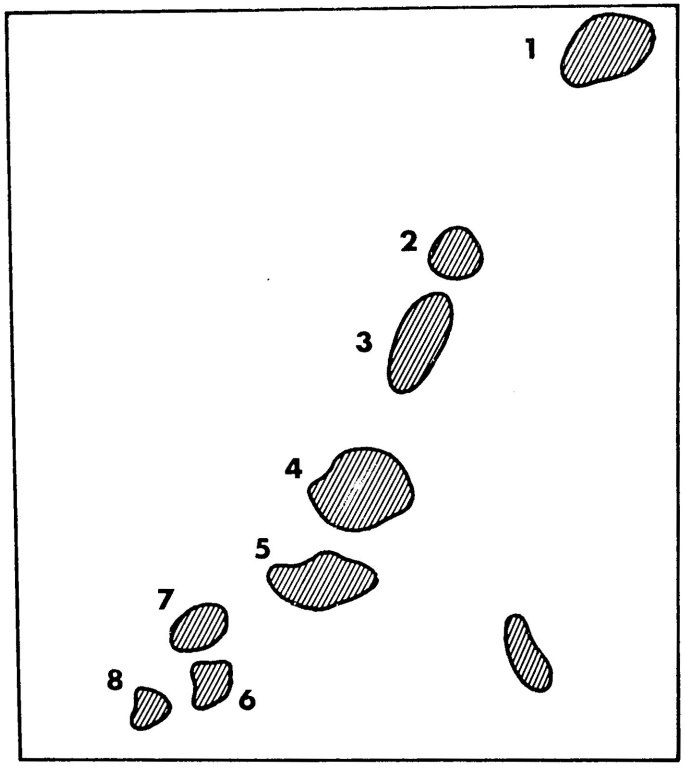


Fig. 10. — Chromatographie sur couche mince, en deux dimensions, d'un extrait de cognac.

1 - Huiles essentielles
2 - Vanilline
3 - Aldéhyde coniférique
4 - Aldéhyde syringique
5 - Aldéhyde sinapique
6 - Aesculétine ? (fluorescence verte)
7 - Scopolétine (fluorescence bleue-opalescente)
8 - 5 H.M.F.
9 - Tache de départ
10 - Inconnu

Solvant 1
Ether de pétrole 100
Alcool isoamylique 16
Acide acétique 0,25
Solvant 2
Benzène 95
Alcool méthylique 5
Révélateur dinitro 2,4 phényl hydrazine à 0,1 p. 100 dans HCl 2 N

ISVV

Plaque n° 2	Quantité déposée sur les plaques
Vanilline	0,005 ml
Aldéhyde syringique	0,005 ml
p-hydroxybenzaldéhyde	0,005 ml
Scopolétine	0,0025 ml

Les taches fluorescentes sont plus importantes et plus nombreuses si l'on réalise une deuxième extraction, par l'éther, le dichlorométhane et le chloroforme, du liquide préalablement épuisé par le benzène et si l'on évapore ensemble les deux extraits ; ceci s'explique par leur meilleure solubilité dans ces solvants que dans le benzène.

La chromatographie est réalisée en deux dimensions en utilisant successivement chaque solvant (fig. 10). La détermination des Rf donne les résultats suivants (tableau III).

TABLEAU III

Rf dès substances identifiées dans les extraits de cognac.

Témoins	Première chromatographie Témoin	Première chromatographie Ethanol	Deuxième chromatographie Benzène	Boisé Limousin
1 - Vanilline	0,75	0,75	0,6	0,65
2 - Aldéhyde coniférique				0,61
3 - Aldéhyde syringique	0,62	0,59	0,42	0,4
4 - Aldéhyde sinapique				0,3
5 - Scopolétine	0,25	0,27	0,30	0,1
6 - Aldéhydes non identifiés			0.14	0,09

Après identification des taches, nous avons ainsi analysé quatre cognacs les uns jeunes, les autres vieux, les uns logés en fût de chêne du Limousin, les autres en fût de chêne du Tronçais. Les résultats obtenus sont les suivants (tableau IV et V) :

TABLEAU IV

Substances présentes dans les extraits de cognac en fonction de l'âge

Première origine de bois : Limousin

	Cognac jeune logé en fût de chêne (vieillissement de 3 ans)	Cognac vieux logé en fût de chêne (vieillissement de 20 ans)	Ordre de grandeur comparatif
Aldéhyde para-hydroxybenzoïque	+ +	—	+ +
Vanilline	±	+ + +	+ +
Aldéhyde coniférique	+ +	+ +	0
Aldéhyde syringique	+ +	+ +	0
Aldéhyde sinapique	+ + +	+ + +	0
Scopolétine (fluorescente en U.V.)	+ +	+ + + +	2
Tache non identifiée (fluorescente en U.V.)	+ +	+ + +	1
Tache non identifiée (visible en lumière ordinaire)	+ +	+ + +	1

Le signe + indique, pour chaque substance, une augmentation de la teneur; le signe — indique une diminution de la teneur ou une absence.

Dans le cas d'une extraction par l'éther, il est nécessaire de procéder à un relargage préalable par un sel minéral afin d'obtenir une bonne résolution des deux phases en diminuant la miscibilité réciproque des liquides. Dans le cas d'une telle extraction, il faut tenir compte du fait qu'à 12° C l'eau dissout 1/10 de son volume d'éther et l'éther 1/50 de son volume d'eau. Il est indispensable de sécher les extraits par Na_2SO_4 anhydre.

Les taches apparaissent après pulvérisation des révélateurs A ou B. On constate que les plaques révélées par la dinitro-2,4 phénylhydrazine se conservent beaucoup plus longtemps que celles révélées par le phloroglucinol. Toutefois ces dernières, observées en lumière ultra-violette, après alcalinisation et pulvérisation d'un indicateur de fluorescence permettent de détecter plusieurs taches invisibles en lumière ordinaire

L'une de ces taches a été identifiée par JOSEPH au cours d'un travail précédent publié par LAFON (1971) qui le relate ainsi :

« Depuis l'exposé de ce mémoire, en septembre 1970, M. Edgard JOSEPH, poursuivant ses travaux de recherche sur la composition des bois, mit en évidence une tache supplémentaire, particulièrement importante dans les cognacs vieux logés en fûts de chêne du Limousin, mais en quantité moindre dans les cognacs logés en chêne de Tronçais. Cette tache a été identifiée par fluorescence en lumière ultra-violette avec la scopolétine (ester monométhylique de la 4,5-dihydroxycoumarine). ».

TABLEAU V

Substances présentes dans les extraits de cognac en fonction de l'âge
Deuxième origine de bois : Tronçais

	Cognac jeune logé en fût de chêne (vieillissement de 3 ans)	Cognac vieux logé en fût de chêne (vieillissement de 20 ans)	Ordre de grandeur comparatif
Aldéhyde para-hydroxybenzoïque	—	—	0
Vanilline	±	+ ±	1
Aldéhyde conifférique	+ ±	+	0
Aldéhyde syringique	+ ±	+ ± +	1
Aldéhyde sinapique	±	+	
Scopolétine (fluorescente en U.V.)	±	+	
Tache non identifiée (fluorescente en U.V.)	+ +	+ +	0
Tache non identifiée (visible en lumière ordinaire)	+ +	+ +	0

Le signe + indique, pour chaque substance, une augmentation de la teneur; le signe — indique une diminution de la teneur ou une absence.

(Seules des analyses sur un très grand nombre d'échantillons permettraient de déceler des différences en fonction de l'origine des bois).

La fluorescence bleue opalescente se manifeste en ultra-violet à partir de 345 nm. Deux autres taches fluorescentes observées ont des

Rf voisins, l'un de l'ombelliférone, lactone de l'acide trioxycinnamique, l'autre de la β-méthylombelliférone.

Une autre tache fluorescente jaune-vert, moins importante que la première, apparaît aussi quand on soumet la plaque à des vapeurs d'ammoniaque ; nous avons cherché à l'identifier au cours de recherches sur les coumarines dont nous parlerons dans la troisième partie de cet exposé. Nous désignons cette tache sous la dénomination « tache fluorescente non identifiée ». Elle donne une intensité maximum de fluorescence entre 345 et 355 nm.

Il est à noter que la fluorescence bleue des quatre taches est fortement augmentée en présence de vapeurs d'ammoniaque, conformément à la prévision relative à l'influence du pH sur cette propriété des coumarines

Dans la première partie de l'opération qui consiste à évaporer l'éthanol et les autres composants volatils du cognac avant l'extraction par le benzène, le résidu de l'évaporation laisse déposer un précipité léger d'aspect floconneux recueilli sur filtre **Millipore** (0,45 μ) à l'aide d'une microseringue.

Recherche de la lignine-éthanol

Ce précipité, lavé plusieurs fois à l'eau, est tout d'abord traité par le dioxane, puis acidifié par HCl à 1 p. 100. On obtient ainsi la dissolution d'une certaine quantité de précipité ; on traite ensuite par le butanol-1 qui dissout une autre quantité de précipité. Chaque fraction est évaporée à sec sous pression réduite et sous azote. On obtient une substance gommeuse brun clair que l'on admet être la lignine-éthanol (semi-acétal de la lignine). Ceci est confirmé par l'étude chimique que nous avons réalisée sur chaque fraction ; on les soumet chacune à l'action du nitrobenzène en milieu fortement alcalin ; cette réaction donne naissance à de la vanilline, conformément à la théorie de l'oxydation de la lignine qui prévoit cette formation. La vanilline est identifiée au moyen du phloroglucinol ainsi qu'il a été dit plus haut. La diméthylhydrorésorcine réagit également positivement sur le produit de la réaction après séparation du nitrobenzène et de la soude.

La fraction non soluble dans les deux solvants organiques utilisés du précipité se dissout et se colore en brun en présence d'une solution de potasse. Cette dissolution, dans de telles conditions, permet de penser que la dernière fraction de précipité contient des hémicelluloses et des pectines, substances colloïdales sur lesquelles sont adsorbés des tanins :

ceux-ci sont à l'origine de la coloration obtenue en présence de la solution de potasse.

Les eaux-mères de l'extraction benzénique sont analysées séparément

Protocole de fractionnement.

Après séparation complète des phases benzénique et chloroformique, et refroidissement afin de permettre la précipitation d'une partie du sulfate de magnésium ayant servi au relargage, les eaux ainsi traitées présentaient une acidité notable et réduisaient la liqueur de Fehling.

Recherche de l'acide lactique.

Une partie aliquote de ces eaux est déféquée par l'acétate basique de plomb ; le filtrat, additionné de lait de chaux, est évaporé à sec. Le mélange des sels de calcium et de l'excès de chaux est lavé à l'eau et attaqué par un excès d'acide sulfurique ; après addition d'un peu de sulfate de manganèse et d'une solution de permanganate de potassium très diluée, on procède à la distillation. La fraction de tête recueillie contient suffisamment d'éthanal pour colorer le réactif de Schiff. Cette présence d'éthanal dans le distillat indique l'existence d'acide lactique dans le liquide traité. Cet acide lactique présent dans le cognac ne provient pas de la dégradation des substances du bois mais a le vin pour origine. Il passe dans l'eau-de-vie sous forme d'esters volatils lors de la distillation.

Recherche du glycérol.

Une autre partie aliquote du même liquide préalablement déféqué par le sous-acétate de plomb est soumise à l'oxydation périodique (réaction de MALAPRADE) ; on obtient du méthanal mis en évidence par l'acide chromotropique en solution sulfurique (réaction de EEGRIVE), ce qui indique la présence de glycérol.

Recherche du butanediol-2,3. (CH_3—CHOH—CHOH—CH_3).

Une quatrième partie aliquote du même liquide déféqué et désacidifié comme précédemment est soumise à l'action de l'eau de brome ; après élimination de l'excès de brome par le sulfate ferreux, on distille en recueillant seulement la fraction de tête qu'on traite selon la technique de PEYNAUD et LAFON (1951), on met en évidence la présence de diacétyle, dicétone qui provient de l'oxydation progressive du butanediol -2,3. La spécificité des réactions ultérieures permet de conclure, selon HOOREMAN (1948), à la présence certaine de ce diol dans le résidu de l'évaporation partielle du cognac.

Le butanediol, en lui-même, n'apporte au cognac ni odeur, ni goût caractéristiques aux faibles doses présentes, mais ses produits d'oxydation l'acétoïne (3-hydroxy-2-butanone CH_3—CHOH—CO—CH_3) et surtout le diacétyle (butanedione-2,3, CH_3—CO—CO—CH_3) possèdent un parfum et une saveur caractéristiques de beurre, agréables et pénétrants qui se retrouvent à des concentrations très faibles. La teneur des cognacs en ces substances augmente avec l'âge par oxydation progressive du diol, catalysée par les peroxydes formés dans l'eau-de-vie.

Les résidus des extractions benzénique et chloroformique qui ont subi un relargage pour cette première opération se prêtent mal à la recherche ultérieure des composants solubles qu'elles renferment, en raison du sulfate de magnésium qui reste dissout et qu'on ne parvient pas à éliminer. Dans le cas d'une telle étude, il importe d'éviter le relargage préalable.

TROISIEME PARTIE

RECHERCHE DES COUMARINES ET IDENTIFICATON DES HETEROSIDES NON FLAVONOIQUES DU BOIS DE CHENE.

Cette recherche est basée sur l'emploi du procédé de BALDWIN et **al.** (1967) modifié.

L'étude a porté sur quatre échantillons de cognac provenant, les uns de barriques en chêne du Limousin, les autres de barriques en chêne de Tronçais, et âgés respectivement de 3 et 20 ans.

On évapore 4 litres de chaque type de cognac au moyen de l'évaporateur rotatif, sous courant d'azote et sous pression réduite. La température du liquide est stabilisée de façon à ne pas dépasser 35° C pendant toute l'évaporation.

La concentration est poussée jusqu'à ce qu'il ne reste plus dans le ballon de l'évaporateur qu'un volume d'environ 200 ml.

Ce résidu est filtré sur filtre Millipore 0,45 µ, de façon à retenir les substances qui ont précipité, telles que éthanol-lignine, hémicelluloses. pectines et autres substances extraites du bois.

Après filtration, les concentrés sont de couleur brun clair dans le cas des cognacs jeunes et marron foncé dans le cas des cognacs plus

âgés. Ils sont transvasés en ampoule à décanter et épuisés successivement par quatre fois 200 ml de chloroforme. Les extraits chloroformiques lavés sont rassemblés dans le ballon de l'évaporateur pour être distillés ; le résidu de cette première extraction est ensuite saturé de sulfate de magnésium et épuisé par l'éther éthylique, à quatre reprises comme précédemment. Chaque portion du solvant d'extraction est lavée à l'eau saturée de sulfate de magnésium et les diverses fractions sont rassemblées ; le tout est enfin mélangé à l'extrait chloroformique pour être évaporé avec lui. A 20° C, 100 g d'eau dissolvent 0,822 g de chloroforme.

Le résidu de la deuxième extraction est de nouveau épuisé par l'acétate d'éthyle dans les mêmes conditions que précédemment. Ce dernier extrait est mélangé aux précédents et le tout est soumis à l'évaporation complète sous courant d'azote à une température d'environ 30° C (à 20° C 100 g d'eau dissolvent 8,53 g d'acétate d'éthyle et 100 g d'acétate d'éthyle dissolvent 3.07 g d'eau) justifiant une dessication sur Na_2SO_4.

Le résidu d'évaporation possède une odeur agréable rappelant celle du bois, où se distingue un subtil parfum vanillé dans le cas des extraits des cognacs âgés. La saveur des extraits de cognacs jeunes est très amère, tandis que celle des cognacs vieux est douce et agréable.

Le résidu fixe se présente sous l'aspect d'une masse amorphe, brun clair, qui, reprise par l'éthanol à 90 p. 100 pour être chromatographiée comme les extraits obtenus suivant GUYMON et CROWELL, laisse déposer une substance blanche floconneuse, probablement composée d'éthanol-lignine. La chromatographie est réalisée selon les indications données pour les phénols par RANDERATH (1971) sur plaques de gel de silice G en solution dans l'acétate de sodium ; l'épaisseur de la couche est de 0,3 mm. Les plaques sont séchées à l'étuve à 105° C pendant 30 minutes.

Le solvant est composé du mélange suivant (volume à volume) :

toluène 5, formiate d'éthyle 4, acide formique 1.

Avec ce solvant les glucosides flavonoïques restent sur la ligne de départ. Seules les aglycones migrent et peuvent être séparés.

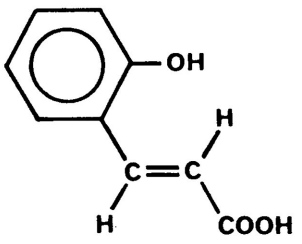
Pour fractionner les glucosides, on utilise un autre solvant, plus polaire, composé du mélange suivant : acétate d'éthyle 5, méthyléthylcétone 3, acide formique 1, eau 1. Les aglycones migrent alors à proxilité du front et les glucosides ne restent plus au point de départ.

On obtient, après développement, les mêmes taches que précédemment, auxquelles il vient s'en ajouter de nouvelles, visibles en lumière ordinaire sous l'action du phloroglucinol ; il apparaît également des zones fluorescentes bleues-vertes et bleues-opalescentes, nombreuses sous l'influence des sels de diazonium après alcalinisation par les vapeurs d'ammoniac en U.V. à partir de 366 nm, par pulvérisation du réactif de NEU (1957) (diphénylborate de β-aminoéthyle) en solution à 1 p. 100 dans le méthanol, à raison de 10 ml par plaque de 20 × 20.

La fluorescence des liquides d'extraction et des taches qu'ils donnent indique la présence dans le cognac de plusieurs substances possédant des groupements fluorophores ; la connaissance que l'on a de la constitution de ces groupements permet de les rattacher à des chaînes hétérocycliques hexagonales ; cependant, comme la présence d'un fluorophore dans une molécule ne suffit pas à produire la fluorescence, il résulte que ces groupements sont reliés à deux ou plusieurs noyaux benzéniques, étant donné que la fluorescence provient de la juxtaposition de noyaux benzéniques autour du fluorophore. Il y a trois possibilités de condensation en position ortho du noyau de la γ-pyrone avec celui du benzène : la **coumarine** (1,2 benzopyrone), l'**isocoumarine** et la **chromone.**

L'absorption sélective dans l'ultra-violet étant liée à la présence dans la molécule de groupements bien définis, les résultats de l'étude spectrophotométrique montrent que l'on se trouve en présence de corps possédant la structure des coumarines. L'une de ces substances a déjà été identifiée au cours d'un travail antérieur de JOSEPH publié par LAFON (1971). On appelle coumarine, la **cis** hydroxy-2 cinnamolide, lactone de l'acide ortho-hydroxycinnanique. Cet acide-alcool non saturé peut exister sous deux formes stéréoisomères, la forme **cis** et la forme **trans** :

Acide **trans** ou acide coumarique



Acide **cis** ou acide coumarinique

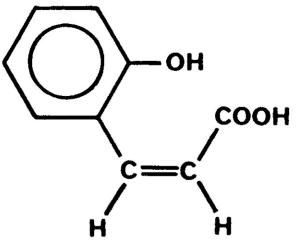
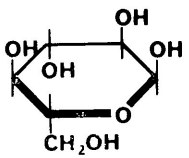


Fig. 11. — Formules de l'acide **trans** coumarique et de l'acide **cis** coumarique

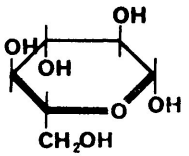
L'acide **cis,** appelé acide coumarique n'est pas connu à l'état libre, mais sous forme d'esters et de sels alcalins. Quand on veut le déplacer de ces derniers par des acides forts, il perd de l'eau et se transforme en

lactone cyclique ou coumarine. Cette dernière peut donner de nouveau avec les bases alcalines des sels de l'acide coumarique. La coumarine est une substance odorante répandue dans le règne végétal. Les différents dérivés d'oxydation de la coumarine sont très répandus chez les végétaux sous forme de glucosides facilement hydrolysables par les enzymes et les acides en un sucre et un aglycone. Un glucoside ou hétéroside est un composé formé d'un ose ayant conservé le pont oxydique et d'un aglycone relié au carbone 1 de l'ose par l'intermédiaire d'un atome d'oxygène. Ce composé possède en outre la propriété caractéristique de se scinder par fixation des éléments de l'eau sous l'influence des enzymes et des acides en un ose et un aglycone. La lettre β indique la nature de la forme stéréoisomérique de l'ose réuni à l'aglycone, conditionnée par l'isomérie **cis** - **trans-**. Dans la formule cyclique les atomes de carbone de la chaîne et l'oxygène du pont oxydique sont dans un même plan, les H et et les OH des carbones de la chaîne se trouvent donc de part et d'autre de ce plan.

Pour un sucre **d,** on admet, si les OH 1 et 2 (aldoses ou 2 et 3 (cétoses sont du même côté du plan (position **cis)** que l'on a affaire à la forme α, s'ils sont de part et d'autre (position **trans**) c'est la forme β. Par exemple pour le d-glucopyranose les deux formes α et β sont représentées ainsi



α - d - glucopyranose



β - d - glucopyranose

Tous les hétérosides végétaux connus sont de la forme β, donc ceux du chêne et par suite du cognac.

Les hétérosides ne possèdent pas d'odeur, leur saveur est généralement amère ; ils sont stables à l'air. Les altérations qu'ils peuvent subir par oxydation ne proviennent, en général que de l'aglycone, la fonction aldéhyde de l'ose étant bloquée et ne présentant plus de ce fait le caractère réducteur des sucres ; seul l'aglycone peut leur conférer des propriétés réductrices.

Les glucosidases (tannases) hydrolysent les hétérosides pour donner des oses et des aglycones.

La β-glucosidase est sensible à l'influence de la température. L'inactivation ou la destruction de l'enzyme se produit à une température supérieure à 40° C. Les acides hydrolysent plus difficilement les hétérosides à froid. Les pyranosides résistent particulièrement bien à leur action hydratante et il faut chauffer pour obtenir rapidement le résultat recherché. (HÉRISSEY et RABATE 1938). Cette transformation conditionne la saveur du cognac. Il importe qu'elle s'accomplisse dans de bonnes conditions.

L'identification est réalisée tout d'abord par la détermination du Rf de chaque tache par rapport à ceux de la scopolétine, de l'aesculine, de l'ombelliférone et de la β-méthylombelliférone pures ; ces valeurs sont identiques. On réalise ensuite le spectre d'absorption des substances isolées ; on obtient des maxima d'absorption en U.V., dont les valeurs correspondent respectivement à celles données par les tables de constantes pour la scopolétine, l'aesculétine, l'ombelliférone et la β-méthylombelliférone.

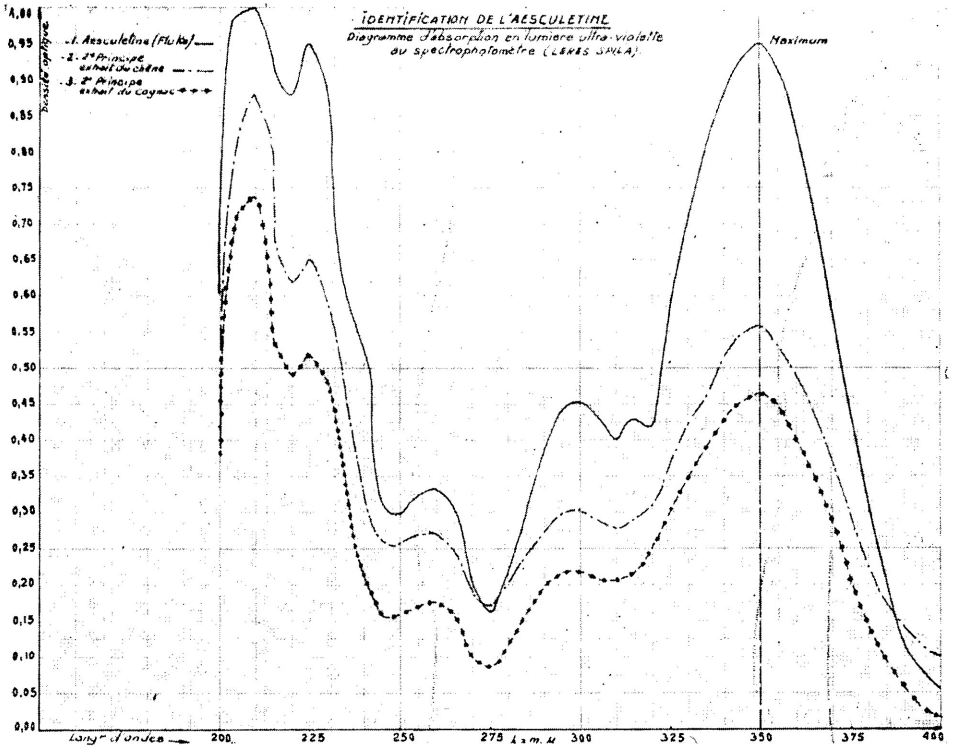
Les quatre taches principales fluorescentes en bleu-opalescent et jaune-vert en U.V. et proches du front solvant, sont entourées d'un trait ; le gel de silice est détaché à l'aide d'une pointe fine, puis recueilli pour être traité séparément par l'éthanol à 90 p. 100.

Protocole de fractionnement.

Trente plaques réunissant les taches de même Rf. ($\simeq 1$) et provenant d'un même extrait sont ainsi traitées. L'éthanol est évaporé jusqu'à ce qu'il ne reste plus que quelques gouttes de liquide. On sépare ainsi en quatre fractions les composés fluorescents solubles dans l'éthanol, caractéristiques des quatre principales taches observées.

Le gel de silice détaché est séparé de l'alcool après dissolution des composés fluorescents qu'il contient. L'éthanol est évaporé jusqu'à ce qu'il ne reste plus que quelques gouttes de liquide. Les très faibles quantités de liquide obtenues sont rechromatographiées ; chacune des nouvelles zones fluorescentes obtenues est redissoute dans l'éthanol pour être examinée au spectrophotomètre, en vue de la détermination de son absorption maxima dans l'ultra-violet.

La présence, dans l'alcool, d'acétate de sodium provenant de la préparation des plaques modifie profondément l'allure des spectres d'absorption en déplaçant les maxima vers la région visible du spectre. Avant de procéder à l'examen du spectre en utra-violet des corps fluorescents



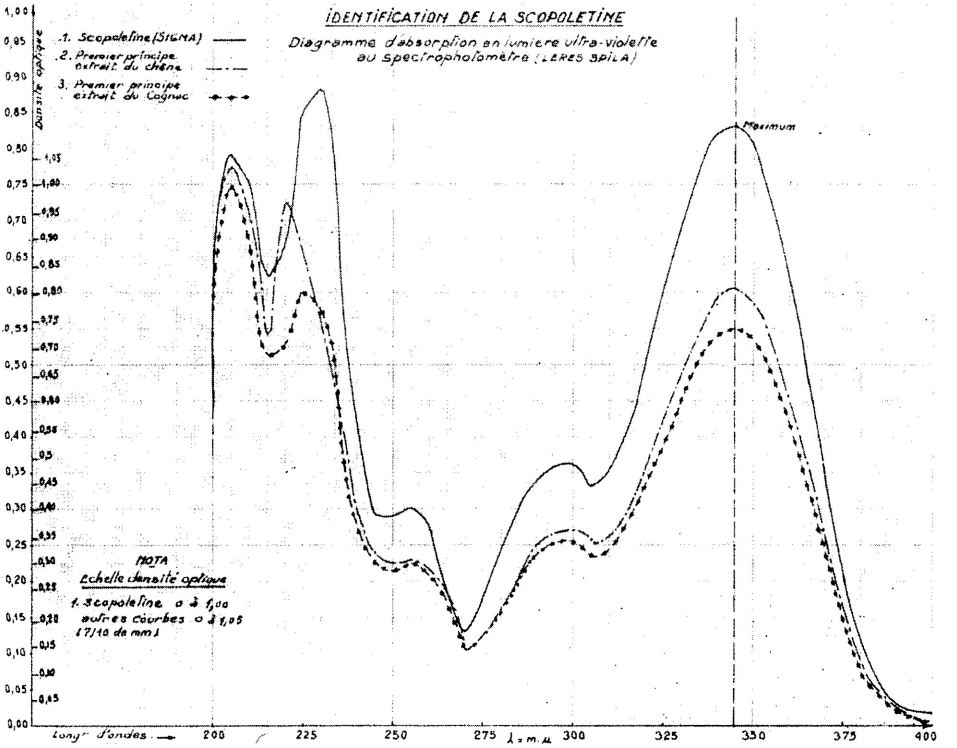


Fig. 12. — Identification de l'aesculétine et de la scopolétine par spectrophotométrie.

extraits des cognacs et des bois, il est indispensable d'éliminer l'acétate de sodium qui accompagne ces substances par des fractionnements répétés dans le chloroforme et dans l'acétate d'éthyle. Les coumarines étudiées étant plus solubles dans ces deux solvants que l'acétate de sodium, on parvient rapidement à une séparation complète indiquée par l'absence de sodium dans l'eau agitée avec ces solvants qu'on analyse en spectrophotométrie de flamme. Cette ultime purification réalisée, on reprend le résidu par l'alcool à 90 p. 100 et on établit le spectre d'absorption dans l'ultra-violet.

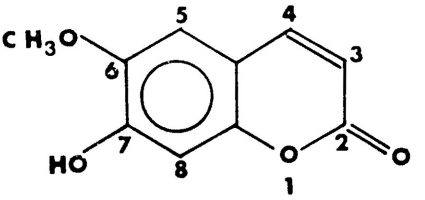
Le spectre présente un maximum à 340 et 350 mm. Ces valeurs correspondent au premier composé fluorescent bleu-opalescent en lumière de Wood ; l'allure générale du spectre d'absorption est identique à celle de la scopolétine pure, $C_{10} H_8 O_4$ — ester monométhylique de la fonction phénol β de l'aesculétine (méthoxy-6 hydroxy-7 coumarine).

Pour la deuxième tache fluorescente jaune-vert non identifiée, l'absorption maxima est comprise entre 345 et 355 nm ; l'allure générale du spectre correspondant exactement à celle de l'aesculétine pure : $C_9 H_6 O_4$ — (dihydroxy — 6,7 coumarine). (fig. 12).

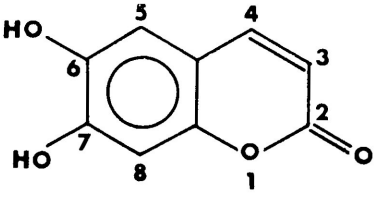
L'identification est réalisée avec, comme échantillon de référence, de la scopolétine pure (SIGMA) en solution alcoolique ; son Rf correspond exactement à celui de la tache fluorescente bleue inconnue ; dans tous les cas, l'intensité fluorescente est augmentée par pulvérisation d'ammoniaque. La valeur du Rf de la deuxième tache fluorescente jaune-vert non identifiée correspond à celle de l'aesculétine. Celle de la troisième et de la quatrième correspondent à l'ombelliférone et à la β-méthylombelliférone.

La scopolétine et l'aesculétine sont des coumarines qui se rencontrent fréquemment chez les végétaux, sous forme de glucosides pour l'aesculétine, sous forme de glucosides des esters de l'aesculétine pour la scopolétine. Elles proviennent de l'hydrolyse de ces glucosides ; ces substances sont toutes les deux présentes chez de nombreuses espèces végétales telles que le marronnier d'Inde, **Gelsemium sempervirens,** la belladone, le jalap, le tabac (YANK et **al.** 1957), l'avoine (GOODWIN et KAVANAGH 1949) et chêne (AGORAMURTHY et SESHADRI 1952), les prunes sèches (MISKOV), le café (THIER et **al.** 1968).

L'aesculétine extraite par ROCHLEDER (1863) du marron d'Inde **(Aesculus hippocastanum),** préparée par ROCHLEDER et SCHWARZ (1853) par



Scopolétine



Aesculétine

Fig. 13. — Formules de la scopolétine et de l'aesculétine.

hydrolyse de l'aesculine du marron d'Inde, puis synthétisée par GATTERMANN et KOBNER (1899) à partir de l'aldéhyde trihydroxy-2, 4, 5 benzoïque, par condensation intramoléculaire avec l'anhydride acétique, en présence d'acétate de sodium, cristallise en aiguilles blanches avec une demi-molécule d'eau ; elle fond à 276° C, est soluble dans l'éthanol, l'acétate d'éthyle et le chloroforme, mais ne l'est que faiblement dans l'eau et dans l'éther éthylique, ce qui permet de la séparer. Elle donne une coloration verte en présence de chlorure ferrique et est précipitée par l'acétate de plomb sous forme d'un précipité jaune. Elle réduit le nitrate d'argent et la liqueur de Fehling. Ses solutions hydroalcooliques sont fluorescentes en jaune-vert en lumière de Wood.

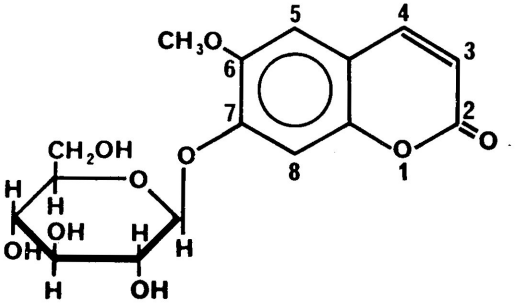
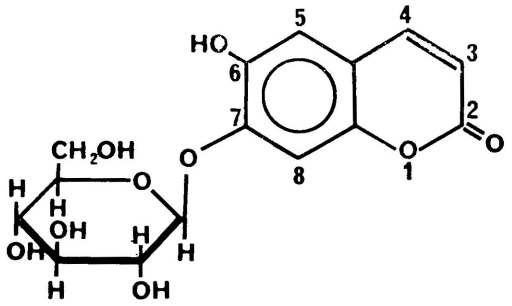


Fig. 14. — Formule du Scopoloside (hydroxy-6 méthoxy-7 coumarine-7 glucoside)



Aesculine (dihydroxy-6,7 coumarine-6 β-d-glucopyranoside - (6).
Fig. 14 bis. — Formule de l'aesculoside.

La scopolétine, rattachée à l'aesculétine par ERNST-SCHMIDT (1880) en tant qu'ester monométhylique de l'un des deux hydroxyles phénoliques, a été extraite, initialement, par WORMLEY, en 1870, de la racine du **Gelsemium sempervirens,** sous forme d'une substance inerte cristallisable appelée acide gelséminique ; on l'a rencontrée ensuite dans les **Scopolia atropoïdes** sous forme de coumarine libre et sous forme d'un glucoside, la scopoline* ou fabiatroside scopoloside oxy-7 méthoxy-6 coumarine-β-d-glucopyranoside (EIJKMAN 1884, MERZ 1932, BOSE et MOOKERJEE 1938) dont elle dérive par hydrolyse (fig. 14). Le scopoloside et le fabiatroside sont deux glucosides identiques des solanées rencontrés dans les racines de **Scopolia japonica,** l'autre dans **Fabiana imbricata.** La scopolétine a été rencontrée sous forme de glucoside ainsi qu'à l'état de coumarine libre dans diverses solanées notamment dans les feuilles de belladone **(Atropa belladonna) ;** elle a été signalée, dans cette plante, sous le nom d'acide chrysatropique, à côté d'une oxydase (LEPINOIS, KUNZ).

L'hydrolyse acide ou enzymatique du scopoloside donne naissance à la scopolétine libre :

$$\underset{\text{scopoloside}}{C_{16}\,H_{18}\,O_9} + H_2O \longrightarrow \underset{\text{d-glucose}}{C_6\,H_{12}\,O_6} + \underset{\text{scopolétine}}{C_{10}\,H_8\,O_4}$$

De là provient le nom de scopolétine, sous lequel on la désigne le plus généralement (SCHMIDT, 1890, 1892, 1898).

Abondante dans le rhizome du **Gelsemium sempervirens** où elle se trouve mélangée à l'aesculine, elle a aussi été désignée anciennement

* Ne pas confondre la scopoline glucoside avec la scopoline ou oscine alcaloïde.

du nom d'acide gelséminique par WORMLEY et MOORE (1910 et 1911) qui ont reconnu son identité avec la scopolétine.

La scopolétine forme de petits cristaux blancs ambrés, fondant à 204° C, sublimables, insolubles dans l'eau, le benzène et le sulfure de carbone, légèrement solubles dans l'eau alcaline, l'acide acétique, très solubles dans l'éthanol, l'éther, l'acétone et le chloroforme.. La solution dans le mélange éthanol-eau est fortement fluorescente en bleu-opalescent visible ; cette fluorescence est renforcée par l'alcalinité et augmente en lumière de Wood.

Elle est susceptible de se transformer en aesculétine par remplacement de son groupement méthoxy-6 par un hydroxyle phénolique sous diverses influences telles que l'action de l'acide iodhydrique (ERNST-SCHMIDT, 1890) ; cette caractéristique a permis d'établir sa relation avec l'aesculétine. Par chauffage en milieu acide, cette déméthylation s'opère également et il semble que cette transformation peut avoir lieu à froid, dans le cognac, sous l'effet de la diminution du pH après une longue durée et être à l'origine de l'aesculétine, rencontrée seulement dans les cognacs très vieux.

Si l'on ajoute une faible quantité de scopolétine à un cognac vieux de 20 ans à pH 3,7 dans lequel on trouvait à la fois la scopolétine et l'aesculétine, et si on porte à ébullition sous reflux pendant dix-huit heures, la chromatographie laisse apparaître les taches des deux coumarines à beaucoup plus forte concentration. La teneur en aesculétine de l'échantillon de scopolétine SIGMA utilisé pour cet essai s'est révélé être nulle ; il est donc évident que l'aesculétine formée au cours de cette expérience provient de la dégradation de la scopolétine par les acides du cognac.

Un échantillon de cognac témoin chauffé dans les mêmes conditions montre que les taches des deux coumarines restent inchangées.

La présence d'aesculétine dans le cognac aurait alors pour origine l'hydrolyse de la scopolétine ; elle peut cependant provenir aussi de l'hydrolyse de l'aesculine ; nous nous sommes efforcés de vérifier cette hypothèse en recherchant ce glucoside, ainsi que son homologue le scopoloside dans le cognac et dans le bois de chêne, puisqu'il paraît probable que la scopolétine provient de ce dernier hétéroside. La connaissance chimique de la scopolétine est due surtout à POWER et ROGERSON (1912), GLASER (1928), HEAD (1931), MERZ (1932), BELL (1936), BOSE et MOOKERJEE (1938), SIEBURG (1921).

L'aesculétine peut aussi provenir de la transformation de l'orthoquinone de l'acide cis-caféique, acide présent dans le bois de chêne. Pourtant, nous sommes enclins à penser que l'aesculétine dérive probablement et pour sa part la plus importante, de l'hydrolyse de l'aesculine, étant donné que la scopolétine est difficilement hydrolysable dans les conditions de pH du cognac. La scopolétine est présente dans tous les cognacs vieux, en proportions variables, mais toujours très supérieures à la substance identifiée avec l'aesculétine ; elle provient certainement de l'hydrolyse acide ou enzymatique du scopoloside, mais cet hétéroside n'étant pas ou peu fluorescent normalement (sauf en solution sulfurique) il n'a pu être caractérisé.

Dans les aesculotanins des végétaux, l'aesculétine a pour origine l'hydrolyse de son hexoside, l'aesculine :

$$\underset{\text{aesculine}}{C_{15}\,H_{16}\,O_9} + H_2O \longrightarrow \underset{\text{d-glucose}}{C_6\,H_{12}\,O_6} + \underset{\text{aesculétine}}{C_9\,H_6\,O_4}$$

Ce dédoublement se produit sous l'influence des acides (ROCHLEDER et SCHWARZ, 1853) ou d'enzymes tels que l'émulsine et l'aesculase (SIGMUD, 1910). Extraite d'abord de l'écorce du marronier d'Inde par MINOR en 1830, l'aesculine a été synthétisée par GLASER et KRAUS en 1923. L'aesculine pure Merck cristallise avec une demi molécule d'eau en fines aiguilles blanches, incolores, à réaction légèrement acide, fondant à 160° C. C'est un saponoside présent dans de nombreuses plantes. Elle possède une saveur très amère. Elle est peu soluble à froid dans l'eau et l'alcool, mais elle s'y dissout mieux à chaud. Ses solutions sont fortement fluorescentes en bleu opalescent. Elle possède toutes les propriétés de la vitamine P. La scopoline est analogue.

Recherche de l'aesculoside et du scopoloside dans le bois de chêne.

Nous n'avons pas rencontré ces glucosides en proportions notables dans les extraits de cognac obtenus par les procédés indiqués ; dans ces extraits, le dérivé d'hydrolyse de ce glucoside, l'aesculétine, se trouve présent, ainsi que l'ester monométhylique de cette coumarine, la scopolétine, qui s'est toujours trouvée être la plus abondante dans tous les cognacs étudiés ainsi que dans le bois des barriques de vieillissement.

Le chêne pédonculé du Limousin paraît contenir plus de scopolétine que d'aesculétine. La teneur du chêne de Tronçais en ces deux composés est inférieure à celle du chêne de Limousin.

Estimant la présence de l'aesculine et de la scopoline possible dans le bois de chêne neuf, du fait de l'existence constante, dans ce végétal, de l'aesculétine et de la scopolétine dont ils sont les principes immédiats, nous les y avons recherchés.

Le chêne fraîchement coupé est réduit en copeaux et épuisé par l'éthanol à 90 p. 100 bouillant. L'extrait est déféqué par l'acétate de plomb afin de précipiter les tanins, les gommes et les mucilages ; on filtre et on soumet ce filtrat à l'action d'un courant de gaz carbonique ou mieux d'hydrogène sulfuré pour précipiter l'excès de plomb ; on filtre à nouveau et on évapore pour éliminer l'éthanol. La solution aqueuse ainsi concentrée est alors extraite dans les mêmes conditions que les résidus de cognac concentrés, avec relargage par un sel minéral en employant les mêmes solvants(chloroforme, éther éthylique, acétate d'éthyle). On peut aussi précipiter les tanins par un alcaloïde (Strychnine), filtrer, évaporer le filtrat et reprendre le résidu par la pyridine, bon solvant des glucosides, évaporer la pyridine et redissoudre l'extrait dans l'alcool. Les sucres sont éliminés à l'aide de charbon.

Le mélange des solvants d'extraction est évaporé et le résidu sec repris par l'éthanol à 90 p. 100 pour être chromatographié comme précédemment, dans le cas des extraits de cognacs.

On voit tout d'abord apparaître en lumière de Wood, après pulvérisation du réactif de NEU, les taches spécifiques de la scopolétine et de l'aesculétine ; il apparaît aussi de nombreuses taches fluorescentes de moindre étendue. L'une d'elles, fluorescente, en bleu-opalescent, de Rf. voisin de l'aesculine pure Merck est entourée d'un trait.

Le gel de silice d'un grand nombre de plaques portant ces taches est gratté et recueilli pour être traité par l'éthanol ; on dissout en portant à ébullition en présence d'acide chlorhydrique dilué. Après neutralisation de l'acide, la solution est de nouveau évaporée à sec ; le résidu est redissout dans l'éthanol pour être rechromatographié. Cette deuxième chromatographie révèle, de la même manière, les deux premières taches fluorescentes de la scopolétine et de l'aesculétine libres, ainsi que les diverses autres taches fluorescentes non identifiées ; la tache inconnue qui avait été entourée d'un trait est absente, ce qui permet de supposer que la substance correspondante a été dégradée par l'ébullition en milieu acide. Cette substance n'a pas encore été identifiée avec certitude. Cependant, des taches d'aesculine pure, déposées sur des plaques de référence, donnent des Rf voisins ; elles ont, en outre, été hydrolysées au bout de la même durée d'ébullition en présence d'une solution acide de même

concentration. Après neutralisation par $CaCO_3$, la solution est extraite par les solvants habituels, qui sont évaporés. Le résidu des taches d'aesculine pure témoin et celui des taches de même Rf provenant des extraits de chêne, repris par l'alcool et rechromatographié, ne laisse plus apparaître qu'une seule et même tache : celle de l'aesculétine.

Ceci permet de conclure à la présence probable de l'aesculine ou de son isomère la cichoriine dans le bois de chêne, ainsi que de plusieurs autres coumarines dont l'une paraît correspondre à l'ombelliférone.

Une petite quantité d'aesculine pure rajoutée à un cognac âgé de 20 ans à pH 3,7 disparaît en majeure partie après une ébullition prolongée, 15 heures, sous réfrigérant à reflux et la tache d'aesculétine normalement présente augmente de surface dans des proportions considérables. Il résulte de cette expérience que l'aesculine peut se scinder facilement au sein du cognac par fixation d'eau en aesculétine et en hexose.

Le cognac dans lequel a été rajouté l'aesculine présente une saveur amère analogue à celle de certains cognacs jeunes placés dans des barriques de chêne fraîchement coupé. Cette saveur disparait au cours du vieillissement, avec la diminution du pH.

Une deuxième recherche a porté sur deux kilos de bois vert de chêne réduit en minces copeaux qui ont été épuisés par l'éthanol à 85-90 p. 100 bouillant, en présence de $CaCO_3$.

Le liquide concentré à sirop, à la température de 30° C est dilué avec de l'eau dans la proportion de 250 ml environ, et puis saturé de sulfate de sodium et de sulfate de magnésium pour le relargage. Il est ensuite placé dans une grande ampoule à décanter, pour en extraire les glucosides ainsi que les coumarines libres. Chacun des solvants suivants est employé dans la proportion de 200 ml et à raison de 4 agitations par solvant :

Chloroforme à froid
Dichlorométhane à froid
Formiate d'éthyle à froid
Acétate de méthyle à froid
Acétate d'éthyle bouillant
Acétate de propyle bouillant
Butanone-2 à froid
Acétate de n-butyle bouillant
Acétate d'isoamyle bouillant
Furanne à froid
Sulfure de carbone à froid
Propanol-1 à froid

Les solvants sont agités avec de l'eau saturée des mêmes sels que ceux utilisés pour le relargage, puis ils sont séchés sur SO_4Na_2 et évaporés et le résidu sec est repris par l'éthanol à 90 p. 100 pour être chromatographié. Le développement est réalisé avec le système suivant : toluène 5, formiate d'éthyle 4, acide formique 1, et en atmosphère saturée. Les glucosides flavonoïques restent sur la ligne de départ et l'aglycone migre avec le solvant ; 18 taches fluorescentes apparaissent par alcalinisation et pulvérisation du réactif de NEU. La tache de départ, fortement fluorescente, est grattée et le produit soumis à l'hydrolyse par ébullition avec l'acide chlorhydrique dilué. L'acide est neutralisé par le carbonate de calcium et les aglycones provenant de l'hydrolyse des glucosides sont extraits par le chloroforme, l'éther et l'acétate d'éthyle. Ces solvants sont évaporés et le résidu, redissout dans l'éthanol à 90 p. 100, est chromatographié dans les conditions précédentes.

Il apparaît de nombreuses taches fluorescentes où l'on reconnait notamment, de façon très caractéristique, celles de la scopolétine et de l'aesculétine.

Au point de départ, il n'y a plus de fluorescence ; cette dernière constatation indique la formation de scopolétine et d'aesculétine à l'état de coumarine libre dans l'hydrolyse de la tache des glucosides, et par conséquent l'existence de la scopoline et de l'aesculine dans le bois de chêne étudié. Les deux coumarines libres rencontrées ne peuvent provenir que de ces glucosides ou de la fraxine glucosido-8 pour la scopolétine, ou de la cichoriine glucosido-7 pour l'aesculétine.

La tache rechromatographiée dans le même système de solvant avant hydrolyse ne laisse apparaître aucun aglycone fluorescent. Au cours de cette dernière recherche, nous avons aussi identifié au nombre des taches fluorescentes l'ombelliférone (hydroxy-7 coumarine) et la β-méthylombelliférone (hydroxy-7 méthyl-4 coumarine) ainsi que la quercitrine auxquelles le cognac doit sa teinte jaune.

CONCLUSION

Le vieillissement naturel du cognac est comparable à la maturation du fruit qui demande pour développer son nectar une longue période d'attente durant laquelle s'accomplissent des réactions chimiques nombreuses d'hydrolyse et d'oxydation conditionnées par la respiration intracellulaire. Plusieurs de ces réactions par leur analogie donnent à la comparaison entre l'épicarpe du fruit et le bois de la barrique toute sa signification. Elles sont étroitement dépendantes les unes des autres et ne

sauraient être brusquées par des procédés artificiels sans qu'il en résulte un déséquilibre général profond perturbateur de la qualité. C'est pourquoi les viticulteurs charentais et les négociants soucieux de maintenir cette qualité au niveau de la renommée respectent scrupuleusement la tradition de la distillation dans des alambics simples qui assurent au cognac une composition constante et celle du vieillissement en barriques de chêne qui permet au distillat d'évoluer naturellement vers le stade final de son élaboration. Nous nous sommes efforcés d'expliquer quelques-unes des réactions chimiques qui conduisent étape par étape à ce stade ultime de la transformation des produits du raisin.

Après la lignine, les phénols sont les composants du chêne qui ont la plus grande influence sur le vieillissement des eaux-de-vie et sur leur qualité.

Les phénols jouent un rôle déterminant dans le vieillissement du cognac. Leur action s'exerce sur deux plans principaux : l'aspect physique du spiritueux, d'une part et, d'autre part, les transformations chimiques inhérentes à leurs groupements fonctionnels et à leur structure moléculaire

En premier lieu, ils modifient l'apparence du cognac jeune en lui apportant leur couleur propre. Celle-ci évolue du jaune paille au brun clair au fur-et-à-mesure des transformations chimiques qu'ils subissent par hydrolyse et par oxydation. Parallèlement à cette évolution, les qualités organoleptiques changent. L'amertume première due à la présence, en quantités importantes, de glucosides diminue en raison de l'hydrolyse de ces derniers. L'astringence des tanins pyrogalliques issus de cette hydrolyse s'atténue avec leur oxydation, pour ne plus laisser au cognac vieux que la caractéristique particulière qu'on appelle le « corps » de l'eau-de-vie, en même temps qu'il acquiert sa teinte « feu ».

Ces phénols sont également des facteurs du changement d'état de l'oxygène qui s'opère au sein du cognac au cours du vieillissement. Nous trouvons une allusion à ce changement d'état de l'oxygène dans le mémoire de GUYMON et CROWELL, auquel nous empruntons le passage suivant : « Les changements de composition sont le résultat : de l'extraction de ces composés du bois de chêne par le liquide alcoolique, de l'interaction chimique avec les composants initialement présents dans les eaux-de-vie et le changement d'état de l'oxygène ».

Ce mécanisme s'explique par l'oxydation qui, en un premier temps transforme les diphénols en quinones ; cette réaction est catalysée par des enzymes présents dans le bois de chêne des barriques. Les quinones

à leur tour, en présence des diphénols correspondants constituent un système rédox qui fonctionne en oxydant les produits propres à l'eau-de-vie et en reformant des phénols, fermant ainsi le cycle des transformations. L'oxygène qui entre en jeu provient directement de l'air ou est emprunté à certains composants du cognac jouant le rôle de peroxydes. Les composés carbonylés sont les produits principaux qui prennent naissance dans ces réactions d'oxydation (formation du « rancio » Charantais).

Pour ceux de la série aliphatique provenant du vin, il est vraisemblable qu'ils prennent naissance aux dépens des acides gras ou de leurs esters, par formation intermédiaire d'hydroperoxydes hydrolysables, comme nous l'envisageons précédemment, plutôt qu'aux dépens des alcools, du moins en ce qui concerne les termes supérieurs, difficilement oxydables.

Les points essentiels qui viennent d'être signalés au sujet des coumarines ont été établis par l'étude du spectre d'absorption en U.V. des taches recueillies sur couches minces. Ces substances sont fractionnées jusqu'à ce qu'il ne se produise plus sur les plaques de dédoublement de tache. L'individualité probable de chaque tache étant alors établie, on redissout cette substance dans son solvant de départ (éthanol — eau) et on étudie son spectre d'absorption. L'allure des courbes nous conduit à admettre comme évidente l'existence, dans le cognac, et dans le chêne, de quatre coumarines libres, voisines les unes des autres et possèdant de nombreux caractères communs avec la scopolétine, l'aesculétine, l'ombelliférone et la β-méthylombelliférone ; la présence dans le chêne, de deux hétérosides non flavonoïques présentant certaines analogies avec l'aesculoside et le scopoloside, est également problable.

L'étude analytique de l'influence de ces substances du bois de chêne sur le cognac a fait aussi l'objet de nos recherches. Ce travail présente des difficultés que nous ne sommes pas parvenus à surmonter en raison de la faible quantité de substances rencontrées et de l'imprécision des méthodes de détection qui ne nous ont pas permis de déterminer si l'aesculétine rencontrée dans le cognac résulte de la perte du groupement CH_3 estérifié à l'hydroxyle phénolique-6 de la scopolétine ou s'il provient de l'hydrolyse de l'aesculine du bois ou bien encore de la réduction de l'orthoquinone de l'acide cis-caféique ; nous demeurons dans l'incertitude quant à l'origine de cette coumarine.

Pourtant, nous sommes enclins à penser que l'aesculétine dérive plus probablement, pour une partie importante, de l'hydrolyse de l'aesculine ; en effet, la scopolétine est difficilement hydrolysable dans les

conditions de pH du cognac ; celle-ci est présente dans tous les cognacs, en proportions variables, mais toujours très supérieures à la substance identifiée à l'aesculétine. Des recherches sont en cours pour déterminer l'origine de la scopolétine et pour caractériser le scopoloside. Parallèlement à ce travail nous nous efforçons aussi d'identifier les nombreuses taches fluorescentes inconnues qui apparaissent sous l'action du révélateur au diphénylborate de β-aminoéthyle (réactif de NEU). Nous croyons dès maintenant pouvoir rattacher l'une de ces taches à l'ombelliférone, coumarine différant de l'aesculétine par remplacement de l'hydroxyle 6 par un atome d'hydrogène (fig. 15).

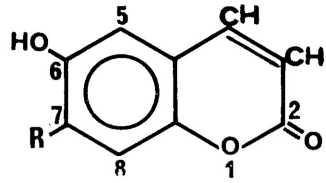


Fig. 15. — Formule de la coumarine.

dans la scopolétine R = $O CH_3$ correspond à l'acide férulique
dans l'aesculétine R = OH correspond à l'acide caféique
dan l'ombelliférone R = H correspond à l'acide **p**-coumarique

La réaction de réduction des quinones s'explique bien par l'hypothèse de THIELE, conformément à laquelle l'hydrogène est fixé par les valences résiduaires de l'oxygène, l'une des paires de liaisons doubles dissimulées se transformant en liaisons ordinaires. On obtient ainsi des hydroquinones, c'est-à-dire les dérivés du benzène à 3 doubles liaisons dans le noyau.

Les phénols naturels du cognac que nous venons d'étudier constituent les principes actifs des aesculotanins. Ce sont eux qui communiquent au marronnier d'Inde, au jalap, au mélilot et à bien d'autres végétaux encore leurs propriétés thérapeutiques bien connues.

Les pharmacologues ont reconnu à ces phénols les propriétés physiologiques de la vitamine P. Par ailleurs nul n'ignore les effets bénéfiques sur l'organisme du cognac absorbé à dose modérée, notamment dans le traitement des affections cardio-vasculaires à l'égard desquelles il joue un rôle sédatif. Son usage est recommandé dans la prophylaxie de l'angine de poitrine, en particulier, selon DAMY-MÉHAUD.

Les caractères de la vitamine P que renferme le cognac se manifestent par une augmentation de la résistance des capillaires, une diminution de la tension artérielle et une action marquée sur le flux coronaire, étudiée en particulier par VATIAINEN et **al.**, (1953).

Il a été aussi mis en évidence que l'action vaso-dilatatrice du cognac est d'autant plus marquée qu'il est plus vieux, c'est-à-dire qu'il renferme une dose d'aesculotanin plus élevée. Nous sommes enclins à penser que le cognac doit en grande partie ses propriétés physiologiques intéressantes à la présence de ces divers phénols.

Cette étude a été entreprise à l'instar de l'excellent travail de MM. J.F. GUYMON et E.A. CROWELL Département de Viticulture et Œnologie de l'Université de DAVIS, Californie, U.S.A. (1968, 1969 et 1970). Nous nous sommes inspirés de leurs méthodes et de leurs travaux sur le bois dans ses rapports avec le vieillissement naturel des eaux-de-vie.

Elle fait suite à l'étude du vieillisement du cognac de l'ouvrage de MM. R. LAFON, J. LAFON et P. COUILLAUD (1964) ainsi qu'à l'exposé sur le vieillissement du cognac de M. J. LAFON, présenté à CHYPRE, lors de la 9e session de la Commission II du 7 au 12 septembre 1970. Pour plus de détails, en ce qui concerne l'étude générale du problème, on se reportera à ces travaux.

La recherche des coumarines a été effectuée grâce aux précieuses indications puisées dans le mémoire de BALDWIN et **al.** (1967) qui a servi de base à nos recherches dans ce domaine.

Enfin, nous remercions les Usines E. MERCK d'avoir bien voulu nous accueillir dans leurs laboratoires de recherche à DARMSTADT, où nous avons reçu un précieux enseignement sur l'application des méthodes d'identification des composés organiques.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

AGHORAMURTHY K. et SESHADRI T.R. **J. Sci. Ind. Research,** 1952, **11** B, 411.

BALDWIN S., BLACK R.A., ANDREASEN A.A., et ADAMS S.L. Aromatic congener formation in maturation of alcoholic distillates. **J. Agri. Food Chem.** 1967, **15,** n° 3, 381-385.

BELL J.C. et ROBERTSON A. **J. Chem. Soc. London,** 1936, 1828.

BLACK R.A., ROSEN AA et ADAMS S.L. The chromatography separation of hardwood extractive composants giving color reactions with phloroglucinol. **J. Am. Chem. Soc.,** 1953, **75,** 5344-5346.

BOSE et MOOKERJEE C. 1938-**I**, 2922. In Beilstein page 248 (hexosen).

BOTTINGER Ber. **Deuts. Chem. Ges.**, 1883, **16,** 2710.

BRACONNOT H. **Ann. Chim. Phys.**, 1831, **47,** 266.

BRACONNOT H. **Ann. Chim. Phys.**, 3e série XXVII, 392.

BRAUNS F.E. **Chemistry of lignin,** Academic Press, New-York, 1952.

BRAUNS et HILBERT J. **Am. Chem. Soc.**, 1934, **56,** 748.

BRUGIRARD A. et TAVERNIER J., 1952. Les matières tannoïdes dans les cidres et les poirés. **Ann. Techn. Agri.** n° **3**, 311-343.

CHARPENTIER C. Dosage de l'hydroxyméthylfurfural (H.M.F.) dans les boissons fermentées, alcools et jus de fruits par spectrophotométrie d'absorption en U.V. **Ann. Fals. Exp. Chim.**, 1969, **687,** 271-286.

COUILLAUD P. Rôle des matières tannoïdes du cognac et dosage de ces substances, **Fiche de travail,** Laboratoire des cognacs, Station viticole, 1960.

CZAPECK. **Zeitschrift für physiologische chemie,** 1899, **27,** 147.

DEUEL H. **Ber. Schweiz. Bot. Ges.**, 1943, **53,** 219.

DJAMPOLADJIAN L.M., MNDJOYAN E.L. Modification des glucides de la lignine du chêne en milieu éthanolique. **Vinod. Vinogr.**, 1969, **29,** 13-16.

DOREE. **The methods of cellulose chemistry,** Chapmann and Hill, Londres, 1933, 354.

EICHLER O. **Cellulosechem.**, 1934, **15,** 114.

EIJKMAN J.F. Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas, 1884, **3,** 169.

FISCHER R. et EHRLICH H. **Archiv der Pharmazie,** 1936, **274,** 268.

FREUDENBERG K. Abderhalden - I - 442, 1923. Die chemie der naturlichen gerbstoffe, 1920, 110. Les tannins, **Handbuch biol. Arbeit. Abderhalden** Abt 1, Terl 10, 1921.

FREUDENBERG K. **Angew. Chem.** 1956, B, **68,** n° 3 - S, 84.

GATTERMANN L. et KOBNER M., **Ber. Deutsch. Chem. Ges.,** 1899, **32,** 288.

GLASER E. **Archiv der Pharmazie,** 1928, **266,** 573.

GLASER E. et KRAUS, **Biochem. Zeitung,** 1923, **133,** 182.

GOODWIN R.H. et KAVANAGH F. **Bull. Torrey Botan. Club,** 1949, **76,** 255.

GUYMON J.F. et CROWELL E.A. Separation of vanillin syringaldehyde and other aromatic compounds in the extracts of french and american oak woods by Brandy and aqueous alcohol solutions. **Qualitas plantarum et materiae vegetabiles,** 1968, **16,** 320-333.

GUYMON J.F. et CROWELL E.A. Studies of caprylic, capric, lauric and other free fatty acids in Brandies by gas chromatography, **Am. J. En. Vit.,** 1969, **20,** n° 3, 155-163 et 76-85.

GUYMON et CROWELL E.A. Brandy aging of some american and french oak cooperage. **Vines and Wines,** 1970, January, 23-25.

HOFFMESTER, **Ber. Deutsch. Chemis. Ges.,** 1927, **60,** 2062.

HOOREMAN M. 1947. Contribution à l'étude des fermentations butanedioiques. **C.R. Acad. Sciences, 225, 208. Thèse Doctorat ès-sciences,** Paris, 1948.

HEAD F.S. et ROBERTSON A., **J. Chem. Soc. London,** 1931, 1241.

HERISSEY H. et RABATE J. Cité par GRIGNARD. Traité de Chimie organique, 1938, **8,** 547.

JURD L. In Hillis W.E. Wood extractive. Academic Press, New-York, 1962.

KLASON P. **Ber. Deutsch. Chem. Ges** 1920, **53,** 706 et 1864. — 1922, **55,** 448. — 1923, **56,** 300. — 1925, **58,** 375. — 1934, **67,** 302.

KUNZ H. **Archiv der Pharmazie,** 1888, **226,** 701 et 721.

LAFON J. Problèmes actuels de technologie et de vieillissement du cognac et des eaux-de-vie de vin. **Bull. Of. Int. Vigne. Vin,** 1971, **482.** 339-355.

LAFON J. Problèmes actuels de technologie et de vieillissement du cognac et des eaux-de-vie de vin, **Le Vrai Cognac,** 1971, **255,** 7. **Le paysan Français,** 1971, **641,** 15.

LITCHEV V. et PANAITOV J. **Izv. Him. inst., ban. 6,** 121, 129, 167, 180. **Branntreveinrvirtschaft,** 1960, **100,** 106.

MERZ. Scopoline et Fabianaglykotannoid'' $C_{16}H_{18}O_9$. **Archiv der Pharmazie,** 1932, **270,** 480.

MINOR, **Archiv der Pharmazie,** 1830, **83,** 130.

MOLINA M., MELIOS C.V. et TABAK S.S. Sélection d'une fraction de kérosène dans le dosage spectrophotométrique des aldéhydes. **Chimie analytique, 52,** n° 6, 1970, 650 à 654.

MOORE C. W., **J. Chem. Soc. London,** 1910, **97,** (II) 2223. 1911, **99,** 1231.

MNDJOYAN E., SAAHYAN R.G. et AKHNAZARYAN F.A. Transformation des substances azotée du bois de chêne en milieu alcoolique (en russe). **Vinod. vinog. SSSR,** 1971, **31,** 5, **284,** 19.

NEU R. Détection des phénols en U.V. par les sels de diazonium : Diphénylborsäure - 2 - aminoaethylester (C_6H_5) 2 $BoCH_2$ CH_2 NH_2 **Mikrochim. Acta,** 1957, 196.

OEHLE et BEHREND, **Ber. Deutsch. Chem. Ges.,** 1925, **58,** 2585.

ORDONNEAU C. Etude sur le vieillissement des vins. **Bull. Soc. Chim.,** 1886, **45,** 332.

ORDONNEAU C. **Le Bouquet des vins et l'essence de moisissure,** 1903, p. 17-18. Imprimerie G. BERAULD, Cognac.

PAULY H., **Ber. Deutsch. Chem. Ges.,** 1934, **67,** 1117.

PEYNAUD E. **Ind. Agric. Alim.,** 1951, **68,** 609.

PEYNAUD E. et LAFON M. Présence et signification du diacétyle, de l'acétoïne et du butanediol 2,3 dans les eaux-de-vie. **Ann. Falsif. Fraudes,** 1951, **44,** 263-283. 1951, **44,** 399-402.

PERROT E. et GORRIS A. **Bulletin des sciences pharmacologiques,** 1909, **16,** 190.

POWER F.B. et MOORE, C.W., **J. Chem. Soc. London.,** 1909, **95,** 243.

POWER F.B. et ROGERSON H., **J. Chem. Soc. London.,** 1912, **101,** 5 et 401.

RANDERATH K. Chromatographie sur couches minces. Gauthier-Villars, éditeurs, Paris, 1971, 208-220, 347.

ROCHLEDER F. **Jahresberichte,** 1863, 589.

ROCHLEDER F. et SCHWARZ R. **Annalen der chemie und pharmazie,** 1853, **88,** 356.

SCHMIDT E. **Archiv der Pharmazie,** 1890, **228,** 435.

SCHMIDT E. **Archiv der Pharmazie,** 1892, **230,** 207. **Archiv der Pharmazie,** 1898, **236,** 324.

SCHRYVER, **Biochem. J.** 1923, **17,** 501. 1926, **20,** 626.

SEIKEL M.K., HOSTETTLER F.D. et NIEMANN G.J. Phenolics of **Quercus Rubra wood, Phytochemistry,** 1971, **10,** 2249-2251.

SIEBURG E. **Biochem. Z.,** 1921, **113,** 176.

SIGMUD W. **Monatshefte fur Chemie,** 1910, **31,** 657.

SKOURIKIN I.M., **Vinod. Vinog.** SSSR, 1960, 8-15.

STENHOUSE, **Annalen der chemie und pharmazie,** XLV, 16.

SUDRAUD P., **Annales Technol. Agricole,** 1958, **7,** 203.

TROTMAN et HACKFORD, cités par DENIGES G., CHELLE L. et LABAT A. **Précis de chimie analytique,** Edition Maloine, Paris, 1931, 372.

VATIAINEN O., VENHO E.V. et VAPAAVUORI M. Influence of various alcoholic beverages on coronary flow. Experiments on isolated rabbit hearts. **Ann. Med. Intern. Fenniac, Helsinki,** 1953, **42,** 2. 162-173.

WILLSTATTER R. et ZECHMEISTER, **Ber. Deutsch. Chem. Ges.,** 1913, **46,** 2401.

WILLSTÄTTER R. et KALB L., **Ber. Deutsch. Chem. Ges.,** 1922, **55,** 2637.

YANG C., NAKAGAWA Y. et WENDER S.H. Identification of Scopoletin in cigarette Tobacco and Smoke, **Journal of Organic Chemistry,** 1957, **23,** 204-205.

Outre les périodiques et les monographies déjà cités, on a consulté, pour la préparation de cette étude, les ouvrages d'ensemble et les mémoires généraux suivants :

EAUX-DE-VIE

BRAND J.M. Studies on grass lignins 1. Separation and quantitative determination of **p**-hydroxybenzaldehyde, vanillin and syringaldehyde by thinlayer chromatography. **J. chrom.,** 1966, **21,** 424-429.

CORDONNIER R. Les arômes des vins et des eaux-de-vie ; leur formation ; leur évolution. **Bull. Off. Int. Vigne, Vin.,** 1971, **44,** 1128-1148.

DAMY-MEHAUD M.J. Etude médico-technique du cognac. **Thèse Doctorat en Médecine,** Tours, 1970.

DJANPOLADYAN L.M. et PETROSSYAN Tz.L. Réactions d'oxydation au cours de la maturation des alcools de Cognac (En russe) **Biokhimiya Vinodeliya (Bioch. Vinofic.),** 1957, n° 5, 46-53, AC. SC. U.R.S.S. éd., Moscou.

EGOROV I.A. et BORISOVA N.B. The aromatic aldehydes of cognac spirits **Biokhim. Vinodeliya, Sbornik,** 1957, 5, 27-37. **Chemical albstract, 51,** 18458.

LAFON R., LAFON J. et COUILLAUD P. Le cognac ; sa distillation, 1964. J.B. Baillières et fils, Editeur, Paris.

LITCHEV V.I. et PANAITOV I.M. Identification of aldehydes in the spirit of cognac. **Vinod. Vinog. SSSR ;** 1958, **18** (4), 10-15. **Chemical abstract, 52,** 19010.

MNDJOYAN E.L., SAAKYAN R.G. et AKHNAZARYAN F.A. Transformations des substances azotées du bois de chêne en milieu alcoolique. **Vinod. Vinog. SSSR,** 1971, **31,** 19-20.

OTSUK K. Etude sur le mécanisme du vieillissement des eaux-de-vie. **2e Symposium International d'œnologie,** Bordeaux-Cognac, 1967, **2.** 1968, 619-625. Edité par l'Institut National de la Recherche Agronomique.

PETROSYAN T.L. Substances azotées des alcools de cognac et leur rôle dans la formation du cognac (en russe). **Voprosy biokhimü vinodeliya** (problèmes de chimie de vinification). Travaux Conf. Biochim de vinif. 1960, 1961, 191-197, Moscou.

RONKAINEN P., BRUMMER S., SNOMALAINEN H. Nouvelle méthode pour la détermination de composés carbonyles dans les solutions alcooliques. **2e Symposium International d'œnologie,** Bordeaux-Cognac, 1967, **2,** 603-617.

RONKAINEN P. Methods for the chromatography identification of carbonyl compounds isolated as their 2,4 dinitrophenylhydrazones from fermented solutions and alcohol distillates. **Thèses Université de Turku,** Finlande, 1966.

SHPRITMAN E.M. et NOVKHATKO D.A. The role of oak wood in the aging of cognac. **Sad Vinog. Vinod. Moldavie,** 1956, **11,** 47-50. **Chemical abstract,** 1957, **51,** 667.

SISAKYAN N.M. et EGOROV J.A. Chemical mechanism of the maturing of brandy spirits. **Biokhim vinodeliya Sbornik,** 1953, **4,** 121-41. **Chemical abstract,** 1957, **51,** 667.

SKURIKHIN I.M. Chemical process on aging of brandy alcohols in oak barrels. **Trudy Vsesoyuz. Nauch. Isseldovatel.** Inst. Vinodeliya i vinogradarstvo, 1957, **5, 69-90. Chemical abstract,** 1959, **53,** 12581.

SKURIKHIN I.M. Changes in lignin, tannin and reducing substances during the aging of brandy. **Vinod. Vinog. SSSR,** 1962, **22,** 17-22. **Chemical abstract,** 1962, **57,** 7704.

SKURIKHIN I.M. Effect of alcohol content, temperature, pH and age of barrel on the aging of brandies. **Vinod. Vinog. SSSR,** 1966, **26,** 10-15. **Chemical abstract,** 1967, **66,** 27687.

SKURIKHIN I.M. Sur les substances responsables de l'absorption ultraviolette des alcools de Cognac, **Izv. ser. Piscerv. Tekhnol.,** 1968. (2), 88-93.

SKURIKHIN I.M., SEMENENKO N.F. et EFIMOV B.N. Determination of aromatic aldehydes in cognac alcohol with aid of phloroglucinol **Izv. Vysshikh. Vchebn. Zavedenii,** Pishchevaya Teknol, 1966, **(1),** 171-191.

THIER H.P., BRICOUT J., VIANI R., REYMOND D., EGLI R.H. Scopoletin, ein Bestandteil des Rohkaffes. **Z. Lebensmittel unters. u Forsch.,** 1968, **137** (1), 1-4.

WUSTENFELD H. et MAESELER G. Trindbranntweine und likore, 1964, Paul Parey Editeur Berlin und Hamburg.

YAMADA K. et FUKU'Y. Wiskey flavor II High boiling components, 1963. **Nippon Nogai Kagaku, 37,** 53-57 C.A. 61 6345.

BOIS

BRAUNS F.E. The chemistry of lignin, 1952, Academic Press, New-York.

BRAUNS F.E. et BRAUNS D.A. The chemistry of lignin, 1960, Academic Press, New-York.

HILLIS W.E. **Wood extractives,** 1962, Academic Press. New-York and London.

HILLIS W.E. **The chemistry of vegetable tannins,** 1956, Leather trades ' chemists, Croydon, England.

JARRAUD C. Quercyl (extrait hydroalcoolique de chêne de Limousin). Französisches patent. Nr 1. 164. 437, 1958.

JARRAUD C. « Drajauryl » (Procédé pour l'obtention et la conservation d'extraits aqueux de cœur de chêne). Französische patent. Nr 1. 185. 686. 1968.

JARRAUD C. **Bois et vieillissement,** 1971, Analyses comparatives Limousin, Tronçais par Edgard JOSEPH Station Viticole de Cognac ,Jarraud Editeur, Angoulème.

JURD L. **The chemistry of flavonoïd compounds.** T.A. Geisman, Pergamon Press, 1962.

PEARL I.A. Lignin chemistry. **Chem. Eng. News,** 1964, **42,** 80-93.

PEARL I.A. et BEYER D.L. Studies on the chemistry of sapwood. IV. oxydation of aspen ligno-sulfonates with alkaline cupric and silver oxyde. Tappi, 1959, **42,** 800-804.

SCHUBERT W.J. **Lignin biochemistry,** 1965, Academic Press, New-York.

SEMENENKO N.I., SZURIHIN I.M. et LITSCHEV W.I. Untersuchung des französischen präparates « quercyl » zur beschlenningung der reife von weindestillaten. Sonderdruck aus Mitteillungen rebe und wein obstban und früchteverwertung. XVI. **Jahrgang. Klosterneuburg,** 1966, **XVI,** N° 1, 31-34.

GENERALITES

BEILSTEIN'S. **Handbuch der organischen chemie.**

CHARONNAT. Sur l'aesculine. **Bulletin des sciences pharmacologiques** (Novembre-Décembre 1940).

DIMOTAKI-HOURAKOU V. Absence d'acide glucuronique dans les vins. **An. Tech. Agri.,** 1962, **13**, 301-308.

FISCHER R. Acide tannique. **Bull. Soc. Chim. France,** 1912, **12,** 1280.

FLEURY P. et COURTOIS J. **Les diastases,** 1948, Armand Colin, Editeur, Paris.

FRANKEL-PATAL. Tables for identification of organic compounds. 1964, 301.

GAGNAIRE D., JAULMES P. et BUGAREL R. **Extraction et purification des espèces chimiques.** Collection monographie de Chimie organique, 1969, Masson et Cie, Editeurs, Paris.

GLASER et KRAUS, **Biochem. Zeit.,** 1923, **133,** 182.

GORIS A., LIOT A. et JANOT M.-M. Hétéroside de la dihydroxy - 6 - 7 coumarine dérivé de la benzopyrone (aesculoside) possédant plusieurs des activités de la vitamine P. **Pharmacie galénique,** 1949, 3e édition Masson Editeur, Paris.

GRIGNARD V., DUPONT G. et LOCQUIN R. Traité de chimie organique en 23 volumes, 1948, 1955. Nouveau tirage Masson Editeur, Paris.

GRUTZNER R. in HOUBEN J., Fortschritte der Heilstoffchemie, 2. Abt., Bd. III (Berlin 1939), S. **17.**

GUYMON J.F. Enquête sur l'influence des méthodes de distillation sur la composition des eaux-de-vie. **Vines and wines,** 1949, **30,** 21-24.

JAULMES P. **Analyses des vins 2e Edition,** 1951. Libr. Poulain. Montpellier.

KIRK-OTHMER. **Encyclopedia of chemical technology,** 2e Edition.

LEBEAU P., COURTOIS G. et JANOT M.M. **Traité de pharmacie chimique,** 4e Edition en 5 volumes, 1956, Masson Editeur, Paris.

RIBÉREAU-GAYON P. **Recherches sur les anthocyanes des végétaux. Application au genre Vitis.** Thèse doctorat ès-sciences, 1959.

RIBÉREAU-GAYON P. Les anthocyanes des fruits : méthodes d'identification et applications. Dans **mise au point de chimie analytique, organique, pharmaceutique,** etc..., **1963,** 189-220. Masson et Cie Editeurs, Paris.

RIBÉREAU-GAYON P. Les flavonosides de la baie dans le genre **Vitis. C.R. Acad. Sc.** Paris, 1964, **256,** 1335-1337.

RIBÉREAU-GAYON P. Les composés phénoliques des raisins et du vin. **Annales de physiologie végétale,** 1964, page 5.

RIBÉREAU-GAYON P. 1968. Les composés phénoliques des végétaux, Dunod, Paris.

« Nous n'avons pas pu confirmer la présence d'aesculétine et d'ombelliférone signalée par HENNING et BURKHARDT (1958), (HENNING K. et BURKHARDT R. 1958), **Weinberg und keller,** p. 542 et 573 ».

RIBÉREAU-GAYON J. et PEYNAUD E. **Analyse et contrôle des vins,** 2e Edition, 1958, Librairie polytechnique Béranger, Paris.

ULLMANN' S. **Encyklopadie der technischen chemie,** 3e Edition.

VAN RIJN J.L.L. **Die glykoside, 1931.** Borntraeger, Editeur, Berlin.