IDENTIFICATION DE SUBSTANCES EXTRAITES DU BOIS NEUF DE CHÊNE DU LIMOUSIN PAR DES EAUX-DE-VIE DE VIN.

A.P. BELCHIOR et L.C. CARNEIRO
Centre National d'Etudes Vitivinicoles
Département de Technologie
Dois Portos, Portugal.

L'étude des substances extraites du bois, dans les eaux-de-vie de vin élaborées au C.N.E.V. et logées pendant six mois en fûts de bois de chêne « Limousin », permet l'identification, par chromatographie sur papier, de deux acides libres (acide ellagique et acide gallique), de cinq sucres (arabinose, glucose, xylose, rhamnose et fucose) et de la vanilline.

Les études des eaux-de-vie, récemment commencées au C.N.E.V., comprennent le vieillissement en fûts de bois de chêne.

La qualité du vieillissement dépend beaucoup du séjour dans ces fûts. Le bois contribue, par ses éléments solubles, d'une façon importante, au vieillissement (LAFON et **al.,** 1964 ; LAFON, 1971 ; GUYMON et CROWELL, 1970 ; RIBÉREAU-GAYON, 1971). Il nous semble donc important, au début de ces études, de connaître les substances extraites du bois.

Puisque les substances phénoliques semblent jouer un rôle fondamental dans ces phénomènes, nous les avons étudiées en premier. Les identifications ont été faites par chromatographie sur papier.

Parallèlement nous avons étudié les sucres, dans les eaux-de-vie âgées, provenant de l'hydrolyse des hémicellulose du bois.

MATERIEL ET METHODES.

Eaux-de-vie.

Elles sont obtenues par le procédé charentais (cognac), (BELCHIOR et GARCIA, 1971), puis logées six mois en fûts neufs de bois de chêne « Limousin » de fabrication portugaise. Chaque fût est traité au préalable avec 10 litres d'eau et 0,5 litre d'acide sulfurique, pendant 48 heures. Il

est rincé avec de l'eau, traité avec une solution de chlorure de sodium à 5 p. 100 pendant 24 heures, puis rincé à nouveau avec de l'eau. Pendant chaque traitement le fût est roulé fréquemment.

Substances de référence.

Acide gallique	: FLUKA
Acide ellagique	: FLUKA
Vanilline	: HOPKIN et WILLIAMS
D-glucose	: J.T. BAKER
D-arabinose	: MERCK
D-xylose	: MERCK
D-fructose	: MERCK
L-rhamnose	: MERCK
L-fucose	: BDH

Chromatographie analytique.

Les composés phénoliques et les sucres sont séparés par chromatographie descendante à une ou deux dimensions sur papier Whatman n° 1.

Pour séparer les substances phénoliques, on utilise avec satisfaction, en deux dimensions, le butanol acétique (couche supérieure du mélange : n-butanol-acide acétique-eau, 4-1-5 v/v) et l'acide acétique en solution aqueuse à 2 et 15 p. 100 (RIBÉREAU-GAYON, 1968).

D'autres solvants ont été essayés, en particulier isopropanol-eau, 3-2, v/v (HENNIG et **al.**, 1960). Celui-ci permet de confirmer les identifications.

Pour séparer les sucres le solvant n-butanol-éthanol-eau, 40-19-11 v/v (MELAMED, 1962), donne les meilleurs résultats. Cependant le fructose et l'arabinose ne sont pas séparés ; il en est de même avec le butanol acétique.

La plupart des composés phénoliques étudiés possèdent une fluorescence en lumière U.V. (350 nm) en présence ou non de vapeurs d'ammoniaque. Les aldéhydes phénoliques sont révélés par la benzidine (BRICOUT, 1971).

Les sucres sont révélés par le phtalate de **p**-anisidine (RANDERATH, 1964), spécifique des sucres réducteurs, en rouge pour les pentoses, jaune pour les hexoses et vert-jaune pour les méthylpentoses.

Chromatographie préparative :

Les substances à identifier sont plus pures si elles sont d'abord fractionnées par chromatographie préparative sur papier Whatman n° 3 avec le solvant éthanol-eau, 7-3 v/v (RIBÉREAU-GAYON, 1968).

Lorsque la séparation est insuffisante en une dimension, on procède alors de la façon suivante :

— dépôt sur plusieurs feuilles de papier Whatman n° 3 d'une grande quantité d'eau-de-vie (concentrée au tiers, sous vide, à température ambiante).

— développement avec le butanol acétique

— découpage des bandes

— élution de chaque bande en faisant d'abord circuler l'éluat jusqu'à la partie inférieure de la bande, puis, après séchage, en faisant à nouveau circuler l'éluat. Alors 4 à 5 gouttes suffisent pour éluer la totalité de la substance présente.

— dépôt de l'éluat sur feuilles de papier Whatman n° 3

— développement avec l'acide acétique à 2 p. 100

— élution de chaque bande.

La substance éluée est ainsi mieux séparée et donc plus pure.

Hydrolyse acide et alcaline.

Les hydrolyses sont effectuées sur l'eau-de-vie concentrée au tiers et sur les éluats des chromatogrammes (RIBÉREAU-GAYON, 1968).

RESULTATS ET DISCUSSION

Les identifications sont faites par comparaison des données chromatographiques des substances étudiées et des substances de référence : Rf avec différents solvants, fluorescence en lumière U.V. avec ou sans vapeur d'ammoniaque, révélateurs colorés. Les comparaisons sont toujours faites, sur un même chromatogramme, entre l'éluat de la substance inconnue, la substance de référence et le mélange éluat-substance de référence.

Composés phénoliques.

Les tâches n° 1 et 2 sont identifiées respectivement aux acides gallique et ellagique (figure 1, tableau I).

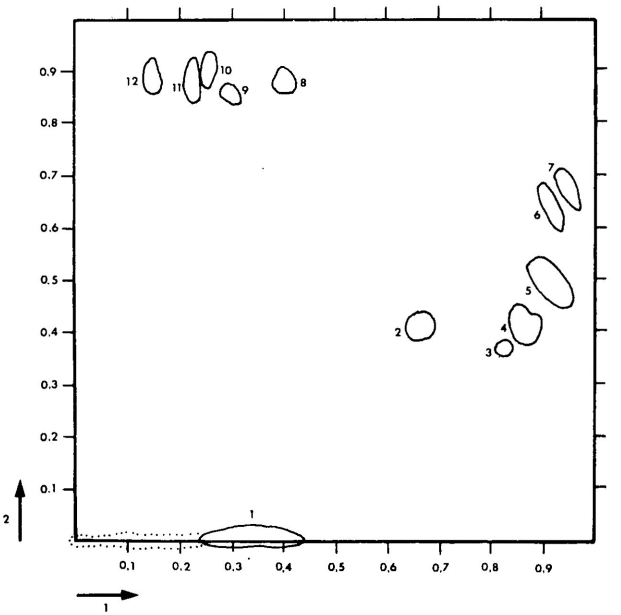


Fig. 1. — Chromatogramme à deux dimensions d'une eau-de-vie.
1- butanol acétique. 2- acide acétique à 2 p. 100.

Pour identifier les tâches n° 4 et 5 nous procédons aux hydrolyses acide et alcaline directement sur l'eau-de-vie concentrée au tiers. Celle-ci rougit lors de l'addition de NaOH 2N, sous atmosphère d'azote et reprend sa couleur initiale à la fin de l'hydrolyse, quand le milieu est réacidifié. Or l'acide gallique donne la même couleur rouge en milieu alcalin. Le changement de couleur observé est donc dû à la présence de l'acide gallique, au moins en partie. Après hydrolyse alcaline il n'apparaît aucun changement par chromatographie analytique.

Après hydrolyse acide les taches des acides ne sont pas altérées mais les taches n° 4 et n° 5 le sont. Les produits d'hydrolyse ne sont pas très visibles. Les observations sont plus nettes si les taches 4 et 5 sont d'abord éluées, puis hydrolysées dans leur état.

La tache n° 4 est soumise à l'hydrolyse acide pendant 45 minutes ; le milieu réactionnel est alors extrait par l'alcool isoamylique. La phase organique, chromatographiée à l'aide du butanol acétique, révèle une

TABLEAU I

VALEURS DE Rf ET REACTIONS COLOREES DES SUBSTANCES ETUDIEES

[1- n-butanol - acide acétique - eau (4-1-5, v/v) ; 2- acide acétique 2 p. 100 ; 3- acide acétique 15 p. 100 ; 4- iso propanol-eau (3-2 v/v) ; 5- n-butanol-éthanol-eau (40-19-11, v/v)]

Tache N°	Substance	Rf					Fluorescence		Coloration	
		1	2	3	4	5	U.V.	U.V. + NH_4OH	Benzidine	Phtalate de p-anisidine
1	Ac. ellagique	0,34	0,00	0,02	0,25	—	Violet	Jaunâtre	0	0
2	Ac. gallique	0,66	0,41	0,50	0,72	—	Lilas	Violacé	0	0
3	Inconnu	0,83	0,37	0,48	—	—	Bleu-lilas	Bleu	0	0
4	Inconnu	0,87	0,42	0,57	0,81	—	Vert-bleu	Jaune-vert	Rouge	Jaune-orange
5	Inconnu	0,91	0,50	0,62	0,88	—	Bleu clair	Verdâtre	Rouge	Jaune
6	Inconnu	0,91	0,63	0,77	—	—	0	0	Orange	Jaune
7	Vanilline	0,96	0,68	0,80	—	—	0	Lilas	Jaune	Jaune
8	Rhamnose	0,40	0,88	0,93	—	0,44	0	0	Jaune foncé	Jaune-vert
9	Fucose	0,30	0,86	—	—	0,38	0	0	Jaune foncé	Jaune-vert
10	Xylose	0,26	0,90	—	—	0,33	0	0	Brun	Rouge
11	Arabinose	0,23	0,89	0,88	—	0,29	0	0	Brun	Rouge
12	Glucose	0,15	0,89	0,97	—	0,25	0	0	Beige	Jaune

tache de Rf inférieur à celui de la tache primitive. La phase aqueuse renferme du glucose. Après hydrolyse alcaline on obtient une tache, supposée être un acide phénol, de Rf légèrement inférieur à celui de la tache initiale. L'ensemble de ces données nous amène à supposer qu'il s'agit d'un hétéroside acylé (RIBÉREAU-GAYON, 1968).

La tache n° 5 n'est pas modifiée par l'hydrolyse alcaline. L'hydrolyse acide ne semble commencer qu'après 4 heures, selon les observations chromatographiques. Une tache de sucre apparaît dans la phase aqueuse, et une autre, supposée être l'aglycone dans la phase organique. Cette dernière a un Rf inférieur à celui de la tache primitive, dont l'intensité diminue notablement. La tache n° 5 semble donc être un hétéroside.

L'identification de ces deux taches est poursuivie.

La présence d'aldéhyde dans les eaux-de-vie âgées est souvent signalée (BRICOUT, 1971 ; LAFON, 1971 ; SINGLETON et **al.**, 1969 ; SKOURIKHINE, 1971) ; elle l'est même dans une eau-de-vie d'un an (LAFON, 1971).

Dans les eaux-de-vie du C.N.E.V. la tache n° 7 (figure 1) est identifiée à la vanilline.

La tache n° 6 n'est visible qu'à l'aide de révélateurs (tableau I). Elle présente la couleur signalée par BRICOUT (1971) pour la syringaldéhyde en présence de benzidine, mais une confirmation est nécessaire.

Sucres.

Cinq sucres sont identifiés dans les eaux-de-vie du C.N.E.V. en employant le butanol acétique et le butanol-éthanol-eau comme solvants (figure 1, tableau I). Ces sucres sont identifiés par comparaison avec des témoins authentiques. Ils sont tous signalés par SKOURIKHINE (1971), à l'exception du fucose. Le fructose n'est pas identifié dans ces eaux-de-vie ; il peut cependant se superposer à l'arabinose. Par quantités décroissantes, nous trouvons l'arabinose, le glucose, le xylose, le rhamnose et le fucose.

RESUMO

A partir de aguardentes vinicas elaboradas no CNEV, e após a estadia de seis meses em vasilhas de carvalho « Limousin » foi empreendido o estudo das substancias extraidas da madeira. Este trabalho é a descriçao da primeira parte daquele estudo em que, por cromatografia em papel,

foram identificados : dois àcidos — o àcido e o àcido elágico ; cinco açucares — arabinose, glucose, xilose, ramnose e fucose ; foi ainda identificada a vanilina supondo-se que uma outra mancha corresponderá a outro aldeido.

SUMMARY

Using wine brandies, distilled at CNEV, and after six months in new « Limousin » oak casks, a study of the substances extraced from the wood was begun. The present work is a description of the first part of that study, in wich, by means of paper chromatography, we have identified : two free acids — gallic acid ellagic acid ; five suggars — arabinose, glucose, xylose, rhamnose and fucose ; we also identified vanillin and we presume that, another spot, not yet identified, will correspond to another aldehyde.

Manuscrit remis le 15 septembre 1972.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BELCHIOR A.P. et GARCIA A.S.C., 1971. Comportamento de alguns constituintes volateis das aguardentes tipo « Cognac » no decurso da destilaçao. **Vin. Port. Doc.,** Série II, 6 (2), 1-14.

BLOCK R.J., DURRUM E.L. et ZWEIG G., 1958. **A Manual of Paper Chromatography and Paper Electrophoresis.** 2° ed. Academic Press, New-York, London.

BRICOUT K., 1971. Analyse de quelques constituants dérivés du chêne dans les vieilles eaux-de-vie d'Armagnac. **Ann. Technol. Agric., 20,** 217-223.

GUYMON J.F. et CROWELL E.A., 1970. Brandy aging some comparisons of American and French oak cooperage. **Wines and Vines,** 51, 23-25.

HENNIG K. et BURKHARDT R., 1960. Detection of phenolic compounds and hydroxy acids in grapes, wines and similar beverages. **Amer. Journ. Enol. Vitic., 11,** 64-79.

LAFON J., 1971. Problèmes actuels de technologie et de vieillissement des eaux-de-vie de vin et de marc de raisin. Bull. **O.I.V., 44,** 339-355.

LAFON R., LAFON J. et COUILLAUD P., 1964. **Le Cognac, sa distillation.** J.-B. Baillière, Paris.

MELAMED N., 1962. Détermination des sucres résiduels des vins, leur relation avec la fermentation malolactique. **Ann. Technol. Agric., 11,** 5-31.

RANDERATH K., 1964. **Thin layer chromatography.** Academic Press, New-York. London.

RIBÉREAU-GAYON P., 1964. **Les composés phénoliques du raisin et du vin.** Ann. Phys. Vég. INRA.

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

RIBÉREAU-GAYON P., 1971. Recherches technologiques sur les composés phénoliques des vins rouges. III-Influence du mode de logement sur les caractères chimiques et organoleptiques des vins rouges, plus particulièrement sur leur couleur. **Conn. Vigne Vin.,** 5, 87-97.

SINGLETON V.L. et ESAU P., 1969. **Phenolic substances in grapes and wines and their significance.** Academic Press, New-York and London.

SKOURIKHINE I.M., 1971. Problèmes actuels de technologie et de vieillissement des eaux-de-vie de vin et de marc de raisin. **Bull O.I.V., 44,** 355-359.