

CHROM. 19 335

DOSAGE SIMULTANÉ DES ALDÉHYDES AROMATIQUES ET DES COUMARINES PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE

APPLICATION AUX VINS ET EAUX-DE-VIE VIEILLIS EN FÛT DE CHÊNE

MARIE-HÉLÈNE SALAGOITY-AUGUSTE*, CHRISTIAN TRICARD et PIERRE SUDRAUD

Laboratoire Interrégional de la Répression des Fraudes de Bordeaux, 351, cours de la Libération, 33405 Talence (France)

(Reçu le 20 octobre 1986; manuscrit modifié reçu le 2 décembre, 1986)

SUMMARY

Simultaneous determination of aromatic aldehydes and coumarins by high-performance liquid chromatography. Application to wines and brandies stored in oak barrels

Aromatic aldehydes (vanillin, syringaldehyde, coniferaldehyde and sinapaldehyde) and coumarins (esculetin, umbelliferone, scopoletin and methylumbelliferone) are natural wood compounds. Storage of wines and brandies in oak barrels increases notably aldehydes and coumarins (particularly scopoletin) concentrations. These compounds were separated by high-performance liquid chromatography, on hydrocarbon bonded reversed-phase packings, with a water-acetonitrile elution gradient. They were first extracted from wines and brandies by diethyl ether and then injected on chromatographic column. A double detection was used to determine simultaneously aromatic aldehydes and coumarins by UV absorption and fluorescence respectively.

INTRODUCTION

Au cours du vieillissement des eaux-de-vie en fût de chêne, certains constituants du bois sont extraits préférentiellement. Nous nous intéresserons en particulier à deux familles de composés phénoliques provenant du bois: les aldéhydes qui sont des produits de dégradation de la lignine et les coumarines. Nous tenterons de retrouver ces substances dans les eaux-de-vie mais aussi dans les vins conservés en barriques de chêne.

Depuis une quinzaine d'années, plusieurs travaux sur la séparation des aldéhydes aromatiques dans les eaux-de-vie utilisent la chromatographie sur couche mince (CCM) ou sur colonne^{1,2} mais ces techniques se prêtent mal à l'analyse quantitative. Plus récemment, la chromatographie liquide haute performance (CLHP) sur colonne de silice greffée type C₁₈ avec une détection par absorption dans l'UV a permis de séparer et de doser de façon rapide et sensible les aldéhydes en solution synthétique³ mais aussi dans les eaux-de-vie vieilles en fût de chêne⁴⁻⁷. Dans les vins,

les aldéhydes aromatiques n'ont pratiquement pas été étudiés mais leur présence est tout à fait probable et ils constituent vraisemblablement un élément organoleptique important apporté au vin par le bois⁸. Cependant ils sont certainement moins abondants que dans les eaux-de-vie, car d'une part les vins séjournent moins longtemps en barriques et d'autre part les aldéhydes sont extraits moins facilement du bois, les vins présentant des teneurs en éthanol plus faibles. De plus, il est probable que dans les vins ces aldéhydes soient partiellement combinés.

En ce qui concerne les coumarines, peu de travaux ont été effectués à ce jour. Outre les aldéhydes aromatiques, Bricout¹ a identifié la scopolétine dans les eaux-de-vie d'Armagnac par spectrométrie de masse. Joseph et Marche⁹ ont également mis en évidence dans le cognac la présence de coumarines (scopolétine, aesculétine, ombelliférone et méthyl ombelliférone) et de leur hétérosides; ils ont séparé ces substances par CCM et les ont identifiées grâce à leur fluorescence caractéristique. Plus récemment Tamma *et al.*¹⁰ ont utilisé la CLHP sur colonne de silice greffée type C₁₈ avec détection par absorption dans l'UV à 340 nm pour séparer et doser les coumarines dans des tissus végétaux.

Ces différents travaux sur les aldéhydes et les coumarines nous ont permis, dans un premier temps, de mettre au point une méthode de séparation et de dosage simultané de ces deux types de substances par CLHP, et ensuite de les mettre en évidence dans les eaux-de-vie, ainsi que dans les vins ayant séjourné en barriques de chêne.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Appareillage et réactifs

Le chromatographe en phase liquide utilisé est un système composé des éléments suivants: une pompe permettant l'utilisation de gradients d'élution et de débit (Série 5060, VARIAN Instrument Group, Palo Alto, CA, U.S.A.); un injecteur d'échantillon à boucle de 20 μ l (Valco, Houston, TX, U.S.A.); un spectrophotomètre UV-VIS à longueur d'onde variable (Modèle 770, Spectra Physics, Santa Clara, CA, U.S.A.); un spectrofluorimètre à longueur d'onde variable (Modèle SFM 23/B, Kontron, Zürich, Suisse).

Les substances de référence sont d'origines diverses: la vanilline et le syringaldéhyde sont des produits commerciaux (Fluka, Buchs, Suisse); le coniféraldéhyde et le sinapaldéhyde ont été synthétisés au Laboratoire de Chimie Organique de l'Université de Bordeaux I, respectivement à partir des acides férulique et sinapique selon la technique de Nakamura *et al.*¹¹; l'aesculétine, la scopolétine, l'ombelliférone et la méthyl ombelliférone nous ont été fournies par la Société Sarsynthèse (Mérignac, France).

Conditions chromatographiques

La séparation simultanée des aldéhydes aromatiques et des coumarines est réalisée sur une colonne de silice greffée par des groupements octadécyl (Ultrasphère ODS, 15 cm \times 4,7 mm I.D., 5 μ m, Beckman Instruments, Berkeley, CA, U.S.A.) à l'aide d'une phase mobile constituée de deux solvants: (A) eau distillée contenant 3% d'acide acétique; (B) acétonitrile contenant 3% d'acide acétique. Tous les solvants utilisés sont de pureté analytique (Merck, Darmstadt, R.F.A.).

Le gradient d'élution retenu pour obtenir une séparation correcte est le suivant:

<i>t (min)</i>	<i>A (%)</i>	<i>B (%)</i>
0	94	6
10	94	6
30	82	18
35	67	33
40	42	58

Le débit de la phase mobile est de 1 ml/min. La séparation est réalisée à température ambiante. Les aldéhydes sont détectés au moyen d'un spectrophotomètre UV réglé à 313 nm.

Quant aux coumarines, elles sont contenues en trop faibles quantités pour pouvoir être dosées par absorption dans l'UV; cependant, elles possèdent une fluorescence naturelle^{1,2} qui permet de les détecter à des concentrations très faibles (de l'ordre de 1 mg/l pour l'aesculétine et de 1 µg/l pour les autres) au moyen d'un fluorimètre placé à la sortie de la colonne. L'enregistrement de leur spectre de fluorescence nous a permis de déterminer les longueurs d'onde optimales de détection: 340 nm pour l'excitation et 425 nm pour l'émission.

Extraction des aldéhydes et des coumarines

Les aldéhydes et les coumarines ne peuvent pas être dosés par injection directe des eaux-de-vie ou des vins qui sont des milieux complexes, riches en composés phénoliques. Il est nécessaire d'avoir recours à un procédé permettant de les isoler avant de les analyser.

Puech et Jouret⁴ préconisent une extraction par l'éther des aldéhydes aromatiques sur les eaux-de-vie ajustées à pH 7. En ce qui concerne les coumarines, les travaux sont peu nombreux: Joseph et Marche⁹ signalent qu'elles sont solubles dans l'acétate d'éthyle et dans l'éther. Nous avons comparé l'extraction par ces deux solvants; les rendements obtenus sont sensiblement les mêmes mais l'acétate d'éthyle extrait, outre les aldéhydes et les coumarines, de nombreuses substances présentes dans les vins et les eaux-de-vie qui absorbent dans l'UV et gênent ainsi la détection des aldéhydes à 313 nm. Nous avons donc pratiqué une extraction par l'éther dans les conditions suivantes:

Le vin ou l'eau-de-vie (20 ml) sont amenés à pH 7 avec une solution de soude 0,1 N. Ils sont ensuite saturés en chlorure de sodium puis extraits à trois reprises par 20, 20 et 10 ml d'éther éthylique en agitant chaque fois pendant 5 min au moyen d'un barreau magnétique et en centrifugeant pendant 10 min. La phase surnageante, contenant les aldéhydes aromatiques et les coumarines en solution dans l'éther, est transvasée dans un ballon après chaque extraction; l'ensemble est évaporé à sec à l'évaporateur rotatif et repris par 2 ml de méthanol, puis injecté dans le chromatographe.

Cette extraction présente le double avantage: d'éliminer les substances qui pourraient polluer la phase stationnaire ou gêner la détection des aldéhydes et des coumarines; de concentrer dix fois les aldéhydes et les coumarines dont les teneurs sont très faibles dans les eaux-de-vie et surtout dans les vins.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Séparations obtenues

Les chromatogrammes des Figs. 1–3 ont été obtenus dans les conditions opératoires précédemment décrites par injection des extraits à l'éther d'une solution standard d'aldéhydes aromatiques et de coumarines (Fig. 1), d'un vin rouge ayant séjourné 1 an en barriques de chêne (Fig. 2), d'une eau-de-vie d'Armagnac vieillie en fût pendant 4 ans (Fig. 3).

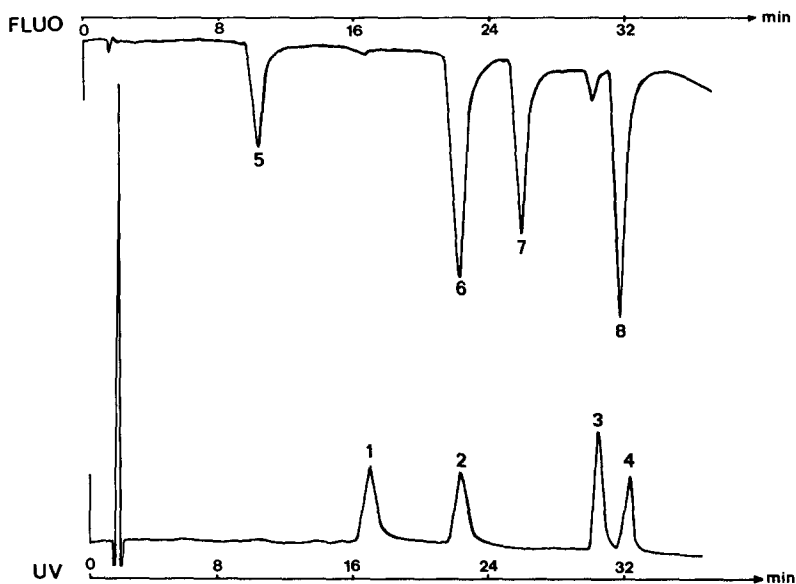


Fig. 1. Chromatogramme de l'extrait à l'éther d'une solution standard d'aldéhydes aromatiques et de coumarines. 1 = Vanilline (10,6 mg/l); 2 = syringaldéhyde (10,0 mg/l); 3 = coniféraldéhyde (8,6 mg/l); 4 = sinapaldéhyde (4,0 mg/l); 5 = aesculétine (15,0 mg/l); 6 = ombelliférone (62 μ g/l); 7 = scopolétine (58 μ g/l); 8 = méthyl ombelliférone (64 μ g/l).

L'utilisation d'un spectrophotomètre UV et d'un fluorimètre placés en série à la sortie de la colonne permet d'obtenir simultanément le chromatogramme des aldéhydes et celui des coumarines sur un enregistreur deux voies.

L'identification des pics a été effectuée par injection de solutions synthétiques d'aldéhydes et de coumarines pures dans les mêmes conditions que les vins et eaux-de-vie analysés.

Nous noterons que le furfural et l'hydroxyméthylfurfural peuvent également être dosés dans ces conditions, ils sont extraits par l'éther et absorbent dans l'UV à 313 nm. Ils sont d'ailleurs présents dans l'eau-de-vie d'Armagnac analysée (Fig. 3).

Rendement de l'extraction

Le rendement de l'extraction a été calculé à partir des chromatogrammes d'une solution standard d'aldéhydes et de coumarines injectée directement et analysée après extraction par l'éther. Les résultats sont donnés dans le Tableau I, ils ont été obtenus en faisant la moyenne de trois analyses.

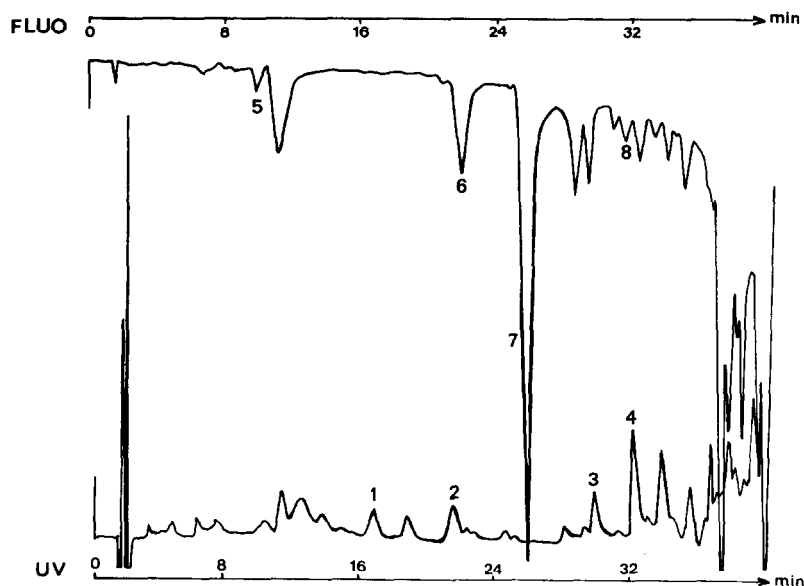


Fig. 2. Chromatogramme de l'extrait à l'éther d'un vin rouge ayant séjourné en barrique de chêne. 1 = Vanilline; 2 = syringaldéhyde; 3 = coniféraldéhyde; 4 = sinapaldéhyde; 5 = aesculétine; 6 = ombelliférone; 7 = scopolétine; 8 = méthyl ombelliférone.

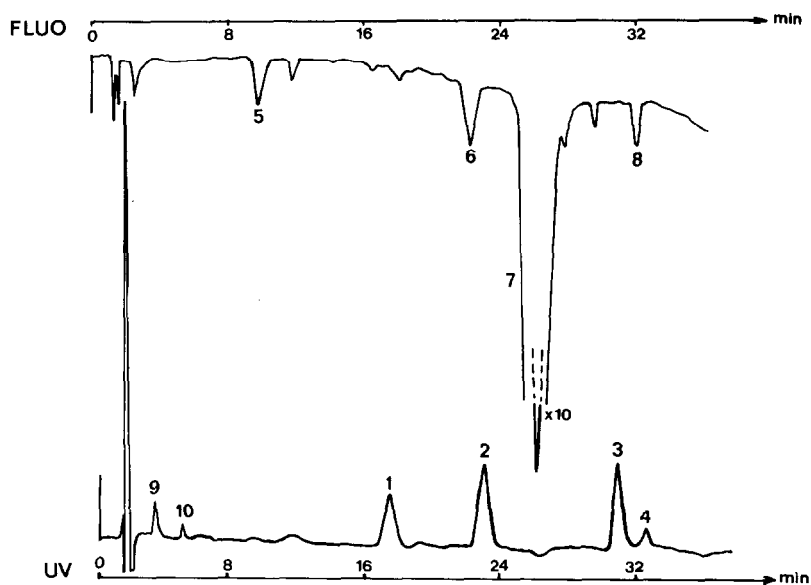


Fig. 3. Chromatogramme de l'extrait à l'éther d'une eau-de-vie d'Armagnac vieillie en fût de chêne. 1 = Vanilline; 2 = syringaldéhyde; 3 = coniféraldéhyde; 4 = sinapaldéhyde; 5 = aesculétine; 6 = ombelliférone; 7 = scopolétine; 8 = méthyl ombelliférone; 9 = hydroxyméthylfurfural; 10 = furfural.

TABLEAU I

RENDEMENT DE L'EXTRACTION PAR L'ÉTHÉR DES ALDÉHYDES ET DES COUMARINES

	<i>Hauteur du pic avant extraction (mm)</i>	<i>Hauteur du pic après extraction (mm)</i>	<i>Rendement (%)</i>
Vanilline	48	33	68
Syringaldéhyde	58	48	83
Coniféraldéhyde	52	50	96
Sinapaldéhyde	22	19	86
Aesculétine	62	40	65
Ombelliférone	176	157	89
Scopolétine	121	94	78
Méthyl ombelliférone	118	114	97

Le rendement est compris entre 65 et 97% suivant les substances. Une quatrième extraction par l'éther pratiquée sur les échantillons après les trois premières n'augmente pas le rendement de façon sensible. Afin de rendre l'analyse quantitative, les teneurs en aldéhydes et en coumarines des vins et des eaux-de-vie doivent donc être calculées à partir d'une solution standard extraite elle aussi par l'éther.

Répétabilité

La répétabilité du dosage des aldéhydes et des coumarines a été étudiée à partir du même échantillon de vin extrait et injecté six fois dans les mêmes conditions. Les résultats obtenus sont groupés dans le Tableau II.

Le coefficient de répétabilité, z , a été calculé en utilisant le facteur de Student

$t_{0,05}$

$$z = \frac{\sigma t_{0,05} 100}{\bar{h}}$$

z définit l'intervalle $[100 - z, 100 + z]$ dans lequel on a 95 chances sur 100 de trouver

TABLEAU II

RÉPÉTABILITÉ DU DOSAGE DES ALDÉHYDES ET DES COUMARINES

	<i>Hauteur moyenne, \bar{h} (mm)</i>	<i>Ecart type, σ</i>	<i>Coefficient de répétabilité z (%)</i>
Vanilline	5,83	0,40	16
Syringaldéhyde	12,83	1,00	19
Coniféraldéhyde	13,33	1,00	18
Sinapaldéhyde	22,20	0,63	7
Aesculétine	5,17	0,40	19
Ombelliférone	18,50	0,45	6
Scopolétine	125,75	3,13	6
Méthyl ombelliférone	6,70	0,45	16

le résultat pour une valeur de la moyenne ramenée à 100. Le calcul de z permet donc de chiffrer la répétabilité du dosage. Les résultats obtenus sont satisfaisants, les valeurs de z restant inférieures à 20% pour toutes les substances dosées.

Étalonnage

Trois solutions standard de concentrations croissantes en aldéhydes et en coumarines ont été ajustées à pH 7, saturées en chlorure de sodium puis extraites par l'éther. Les extraits obtenus ont été injectés dans le chromatographe. La régression linéaire donnant la hauteur du pic en fonction de la concentration en aldéhyde ou en coumarine, ainsi que le coefficient de corrélation sont donnés dans le Tableau III.

TABLEAU III

RÉGRESSION LINÉAIRE POUR LES ALDÉHYDES ET LES COUMARINES

$$h \text{ (mm)} = aC \text{ (mg/l)}^* + b$$

	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>r</i> **
Vanilline	1,765	-0,499	0,9999
Syringaldéhyde	1,935	+0,750	0,9997
Coniféraldéhyde	3,978	-0,749	0,9998
Sinapaldéhyde	3,464	-0,500	0,9985
Aesculétine	1,809	+0,999	0,9993
Ombelliférone	1,058	+0,750	0,9999
Scopolétine	0,848	+0,750	0,9999
Méthyl ombelliférone	1,189	-0,499	0,9995

* De 5 à 30 mg/l pour les aldéhydes et l'aesculétine, de 0,03 à 0,15 mg/l pour les autres coumarines.

** Coefficient de corrélation.

Applications

A titre d'exemple, nous donnons les teneurs en aldéhydes aromatiques et en coumarines trouvées dans un vin rouge conservé en cuve en acier inoxydable et dans le même vin ayant séjourné 1 an en barriques de chêne neuves (Tableau IV), ainsi

TABLEAU IV

TENEURS EN ALDÉHYDES AROMATIQUES ET EN COUMARINES DANS UN VIN ROUGE CONSERVÉ EN CUVE EN ACIER INOXYDABLE ET EN BARRIQUE DE CHÊNE

	<i>Cuve en acier inoxydable</i>	<i>Barrique neuve</i>
Vanilline (mg/l)	0,1	0,4
Syringaldéhyde (mg/l)	0	0,5
Coniféraldéhyde (mg/l)	0,5	0,5
Sinapaldéhyde (mg/l)	0,7	0,9
Aesculétine (mg/l)	0,4	0,4
Ombelliférone (μg/l)	1,7	1,5
Scopolétine (μg/l)	1,9	15,5
Méthyl ombelliférone (μg/l)	0,4	0,8

TABLEAU V

TENEURS EN ALDÉHYDES AROMATIQUES ET EN COUMARINES DANS DES EAUX-DE-VIE DE VIN (ARMAGNAC) ET DE POMMES (CALVADOS) VIEILLIES EN FÛTS DE CHÊNE

	<i>Armagnac</i>	<i>Calvados</i>
Vanilline (mg/l)	2,4	1,9
Syringaldéhyde (mg/l)	2,5	3,1
Coniféraldéhyde (mg/l)	1,9	1,4
Sinapaldéhyde (mg/l)	0,6	1,1
Aesculétine (mg/l)	1,9	1,2
Ombelliférone (μ g/l)	2,8	2,8
Scopolétine (μ g/l)	301,1	220,8
Méthyl ombelliférone (μ g/l)	2,8	7,4

que dans deux eaux-de-vie vieilles pendant plus de 5 ans en fût de chêne: une eau-de-vie de vin d'Armagnac et une eau-de-vie de pommes du Calvados (Tableau V).

Comme prévu, le vin rouge conservé en barriques neuves est plus riche à la fois en aldéhydes aromatiques et en coumarines que celui qui est resté dans la cuve en acier inoxydable; il faut cependant noter que les substances qui ont le plus augmenté, donc qui sont vraisemblablement les plus caractéristiques du bois, sont la vanilline et le syringaldéhyde, mais surtout la scopolétine. En ce qui concerne les eaux-de-vie vieilles en fût, elles sont beaucoup plus riches que le vin, ceci en raison d'un plus long séjour au contact du bois et d'une plus forte teneur en alcool, ce qui facilite la dissolution des aldéhydes et des coumarines.

CONCLUSIONS

La méthode mise au point pour le dosage simultané de ces différentes substances est rapide, reproductible et sensible. Les premiers résultats obtenus sur les vins et les eaux-de-vie semblent satisfaisants; ils doivent maintenant être confirmés par l'analyse d'un grand nombre d'échantillons conservés dans des conditions différentes. La présence de substances particulièrement caractéristiques du bois, telles que la vanilline, le syringaldéhyde et la scopolétine dans un vin ou une eau-de-vie devrait permettre de présumer de son mode de conservation.

RÉSUMÉ

Les aldéhydes aromatiques (vanilline, syringaldéhyde, coniféraldéhyde et sinapaldéhyde) et les coumarines (aesculétine, scopolétine, ombelliférone et méthyl ombelliférone) sont des constituants naturels du bois. Le séjour en fût de chêne enrichit de façon notable les vins et les eaux-de-vie à la fois en aldéhydes aromatiques et en coumarines (plus particulièrement en scopolétine).

Ces substances peuvent être séparées et dosées par chromatographie liquide haute performance sur une colonne de silice greffée type C_{18} en utilisant un gradient d'élution. Elles sont préalablement extraites par l'éther des vins ou des eaux-de-vie avant d'être injectées sur la colonne chromatographique. Une double détection per-

met de doser simultanément les aldéhydes aromatiques par absorption dans l'UV et les coumarines par fluorescence.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient F. Marsal pour les synthèses du coniféraldéhyde et du sinapaldéhyde effectuées au laboratoire de chimie Organique du professeur Bouas-Laurent (Université de Bordeaux I).

BIBLIOGRAPHIE

- 1 J. Bricout, *Ann. Technol. Agric.*, 20 (1971) 217.
- 2 G. Alibert et J. L. Puech, *J. Chromatogr.*, 124 (1976) 369.
- 3 E. Burtscher, H. Binder, R. Concini et O. Bobleter, *J. Chromatogr.*, 252 (1982) 167.
- 4 J. L. Puech et C. Jouret, *Ann. Falsif. Excerpt. Chim.*, 75 (1982) 81.
- 5 J. L. Puech, *Am. J. Enol. Vitic.*, 35 (1984) 77.
- 6 P. Lehtonen, in L. Nykänen and P. Lehtonen (Editors), *Symposium on Flavour Research of Alcoholic Beverages, Helsinki, 1984*, Vol. 3, Foundation for Biotechnical and Industrial Fermentation Research, 1984, p. 121.
- 7 P. Sudraud, *Le Marché des Whiskies et des Eaux-de-Vie, Marseille, 2 et 3 Juin, 1983*, l'Institut de Chimie Analytique et du Contrôle de la Qualité, Université de Droit, d'Economie et des Sciences d'Aix Marseille, Marseille, 1983, p. 98.
- 8 J. Ribereau-Gayon, E. Peynaud, P. Ribereau-Gayon et P. Sudraud, *Sciences et Techniques du Vin*, Tome 3, Dunod, Paris, 1976.
- 9 E. Joseph et M. Marche, *Connaiss. Vigne Vin.*, 6 (1972) 273.
- 10 R. V. Tamma, G. C. Miller et R. Everett, *J. Chromatogr.*, 322 (1985) 236.
- 11 Y. Nakamura, F. Nakatsubo et T. Higuchi, *Wood Res.*, 56 (1974) 1.
- 12 P. Ribereau-Gayon, *Les Composés Phénoliques des Végétaux*, Dunod, Paris, 1968.