

Sur le plan qualitatif, par contre, les essais organoleptiques indiquent que malgré ce taux d'extraction très faible c'est bien l'arôme caractéristique que l'on retrouve dans l'extrait organique. Et, en accord avec cette constatation, on observe que le distillat de fraises, après 2 extractions à l'éther, a perdu tout arôme caractéristique. Dans le cas de la framboise, une très faible odeur persiste encore dans la phase aqueuse. Par ces résultats il devient évident qu'un faible pourcentage seulement de la matière organique volatile contribue à l'arôme caractéristique.

Nous remercions la Direction de la Maison FIRMENICH & CIE et M. M. STOLL, Directeur scientifique, de la permission de publier ces résultats.

SUMMARY

A process for the removal of volatile flavor constituents directly from the fruits and the further concentration of the separated fruit flavor are described.

The efficiency of the process has been evaluated by processing model solutions of known concentration of volatile substances and by organoleptic panel tests.

Concentrates of the volatile part of fresh strawberry and raspberry flavor have been prepared. Some particulars on these volatile flavors have been established.

Laboratoires de Recherches, FIRMENICH & CIE, Genève

255. Recherches sur les arômes

5^e communication¹⁾

Analyse de l'arôme des framboises

I. Les constituants carbonylés volatils

par M. Winter et E. Sundt

Dédié à M. le Prof. L. RUZICKA à l'occasion de son 75^e anniversaire

(25 VIII 62)

Le dernier travail publié sur l'arôme de framboise a été exécuté par SCHINZ & SEIDEL²⁾ il y a environ 25 ans. Ces auteurs donnaient également un aperçu des composants isolés de la framboise lors de recherches antérieures. Dans tous ces travaux, l'huile de framboises analysée avait été obtenue par extraction d'un jus de fruit plus ou moins fermenté. Or il est connu que les jus de fruits subissent des transformations rapides sous l'influence de microorganismes et de ferments³⁾, affectant l'arôme caractéristique.

Le procédé que nous venons de décrire dans le travail précédent¹⁾ nous a paru favorable à l'isolement d'un arôme de framboise non altéré. Nous avons vite constaté que ceci était vrai uniquement si l'on utilisait des fruits fraîchement récoltés et d'une

¹⁾ 4^e communication, Helv. 45, 2186 (1962).

²⁾ H. SCHINZ & C. F. SEIDEL, Helv. 40, 1839 (1957); 44, 278 (1961).

³⁾ Voir par exemple D. K. TRESSLER & M. A. JOSLYN, «Fruit and Vegetable Juice», Processing Technology, p. 69, etc., The AVI Publishing Comp. Inc., Westport USA., 1961.

qualité impeccable. Des lots de fruits quelque peu éprouvés par le transport ou par un stockage même limité nous ont fourni des distillats particuliers: les analyses ont donné pour le carbone total et les esters des valeurs doubles ou triples des valeurs moyennes¹⁾ (jusqu'à 190 mg de carbone et 0,28 mmole d'ester par kg de fruits). Les fruits abîmés au contact de l'air produisent visiblement davantage de substances volatiles.

Un examen organoleptique et chimique des distillats de l'extrait étheré et de l'huile de framboises a mis en évidence les points suivants:

1) La préparation de l'huile de framboises par extraction de son distillat, suivie d'une concentration complète de l'extrait, est accompagnée de pertes en substances volatiles et également de transformations plus ou moins évidentes, ceci malgré toutes les précautions. L'huile de framboises concentrée, tout en restant caractéristique du fruit, n'a plus, après redilution, la fraîcheur et la finesse des distillats frais.

2) Les groupes fonctionnels dominants des composants de l'huile de framboises (spectre IR.) sont les groupes carbonyle et hydroxyle.

3) En séparant les composés carbonylés, soit du distillat par réaction de la dinitro-2,4-phénylhydrazine (abréviation: DNPH), soit de l'extrait étheré par réaction avec le réactif «T» de GIRARD, on constate la disparition de notes caractéristiques. D'autre part, en hydrolysant les dinitro-2,4-phénylhydrazones (abréviation: DNP), on constate la réapparition des notes de framboise caractéristiques.

4) L'huile de framboises privée des corps carbonylés montre encore des notes caractéristiques; elle est composée essentiellement d'un mélange d'alcools et d'acétate d'éthyle.

Ces constatations permettent d'avancer l'hypothèse que l'arôme caractéristique de la framboise est constitué en premier lieu par un mélange de composés carbonylés et d'alcools.

Une approximation quantitative de la composition d'un distillat de framboise peut être obtenue en exprimant les résultats des différentes analyses¹⁾ en centièmes du carbone total (tableau 1).

Tableau 1. Composition approximative d'un distillat de framboise

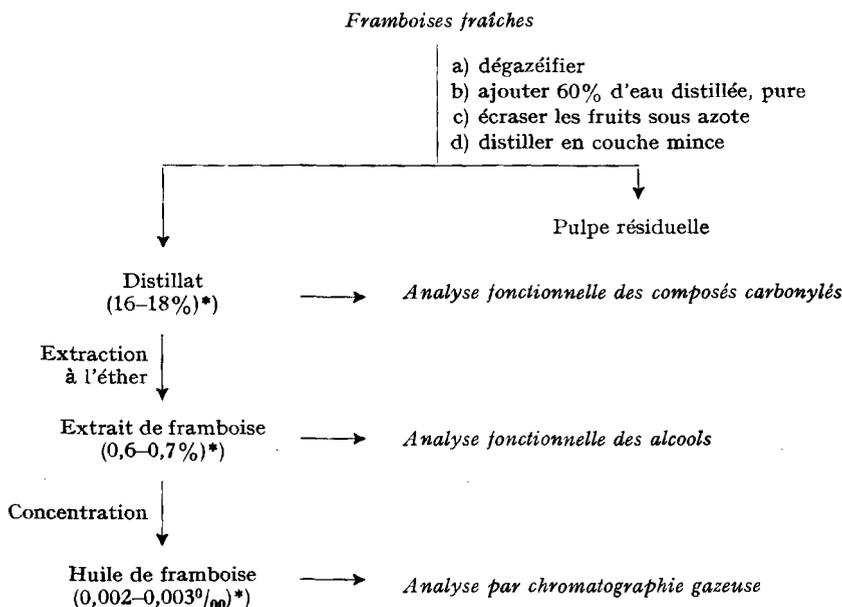
	Teneur exprimée en % du carbone total (100% = 373 mg/l)
CO ₂ libre (dissous)	1
Constituants carbonylés (calc. comme acétaldéhyde)	14
Ester (calc. comme acétate d'éthyle)	10
Alcool méthylique (dosage direct ⁴⁾)	40
Solde (acides + alcools, sans méthanol)	35

Sur la base de ces résultats nous avons adopté pour l'analyse des composants volatils de l'arôme de framboise le schéma tracé dans le tableau 2.

Dans ce premier mémoire nous rapportons les résultats obtenus dans l'analyse fonctionnelle des constituants carbonylés. En partant de distillats frais, correspondant

⁴⁾ Dosage par oxydation en aldéhyde formique, puis réaction avec de l'acide chromotrope et mesure de la couleur formée; voir F. FEIGL, «Spot Tests» II, Organic Applications, p. 244, Elsevier Publishing Company, Amsterdam 1954.

Tableau 2. Schéma général de l'analyse



*) calculé par rapport au poids des framboises traitées.

à 580 kg de framboises¹⁾ nous avons précipité les composés carbonylés comme DNP (voir tableau 3). Afin d'isoler les DNP, éventuellement solubles dans les grands volumes d'eau, nous avons extrait les filtrats au pentane et ensuite au benzène. En plus, nous avons retenu les substances carbonylées volatiles non condensées lors de la distillation, au moyen de 3 barboteurs contenant une solution de DNPH (unité I¹⁾).

Le choix de la DNPH comme réactif pour les constituants carbonylés s'est fait après avoir étudié une gamme d'autres réactifs, notamment la dinitro-2,4-phénylsemicarbazide⁵⁾, la *p*-nitrophénylsemicarbazide⁶⁾, la (*p*-azophényl-phényl)-semicarbazide⁷⁾ et le *m*-nitrobenzohydraside⁸⁾. Pour résoudre notre problème un réactif idéal devrait posséder les propriétés suivantes: solubilité favorable en milieu aqueux, grande réactivité et sensibilité, dérivés peu solubles dans l'eau, aisément cristallisables, stables, à F. caractéristique, et aisément purifiables par des procédés chromatographiques. La réalisation de cette dernière exigence se trouve grandement facilitée lorsque les dérivés possèdent une couleur intense. D'autre part, les dérivés devraient permettre une régénération aisée des substances carbonylées par hydrolyse. Bien que les dinitro-2,4-phénylhydrazones ne remplissent pas toutes ces conditions, elles réunissent, d'après nos expériences, d'importants avantages.

⁵⁾ J. L. McVEIRGH & J. D. ROSE, *J. chem. Soc.* 1945, 713; A. E. GILLAM & D. G. MOSS, *ibid.*, 1947, 1387.

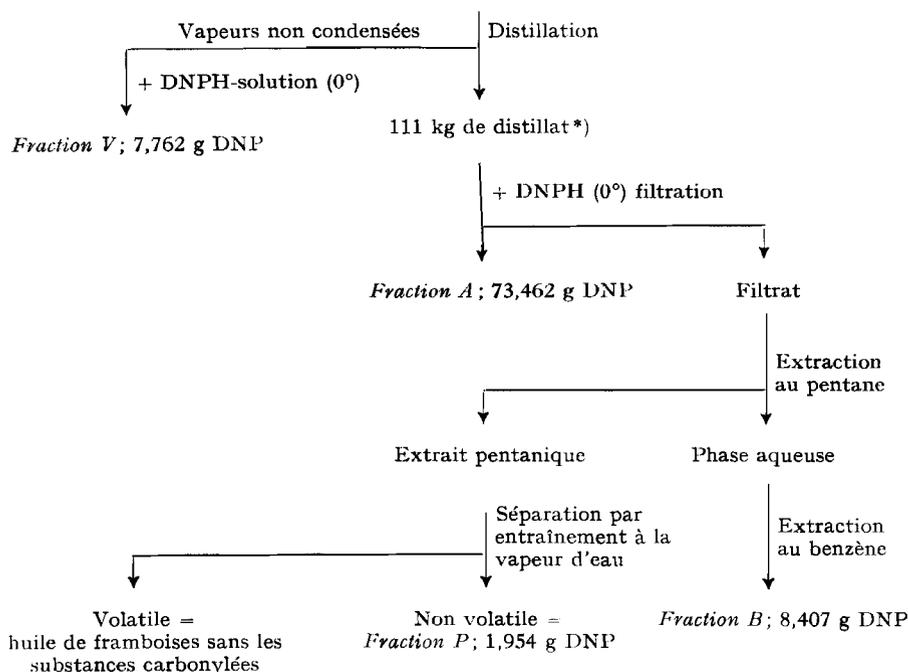
⁶⁾ R. BARRÉ & L. PICHÉ, *Can. F. Research* 2013, 17 (1942); *Chem. Abstr.* 36, 2530 (1942).

⁷⁾ F. BOHLMANN, *Chem. Ber.* 84, 490 (1951); M. WINTER, E. DEMOLE & E. SUNDT, *Helv.* 40, 467 (1957).

⁸⁾ TH. CURTIUS & O. TRACHMANN, *J. prakt. Chem.* 51, 165 (1895); F. WILD, «*Characterisation of Organic Compounds*», p. 118, Cambridge University Press 1948.

Tableau 3. Schéma de la précipitation des corps carbonylés

580 kg de framboises



*) Ce distillat est composé de 100 kg de premiers distillats et de 11 kg d'un deuxième distillat.

Les dinitro-2,4-phénylhydrazones de framboises obtenues (tableau 3, fractions A, V, P et B) ont été séparées par chromatographie d'adsorption et chromatographie de partage, sur colonne et sur papier. Un grand nombre de travaux ont été publiés traitant de la chromatographie des DNP⁹⁾. L'acide silicique, seul ou en mélange avec de la célite, ainsi que l'oxyde d'aluminium ont été proposés par différents auteurs. Nous avons observé différentes anomalies sur de tels supports, comme l'ont déjà signalé FORSS & DUNSTONE¹⁰⁾. Dans des séparations par partage sur des colonnes de célite ou de silicagel, des isomérisations en *cis-trans* (*syn-anti*) ont fréquemment été rapportées¹¹⁾. En chromatographie d'adsorption nous avons obtenu d'excellents résultats avec le support Kieselguhr-Bentonite, 1:4 (poids)¹²⁾. Ce support se distingue par une grande inactivité vis-à-vis des DNP et donne d'excellentes séparations; même des dérivés isomères à chaîne droite et ramifiée respectivement peuvent être séparés.

⁹⁾ Voir bibliographie dans E. LEDERER, « Chromatographie en Chimie Organique et Biologique », Vol. 1, p. 430, Masson, Paris 1959.

¹⁰⁾ D. A. FORSS & E. A. DUNSTONE, Austral. J. Chemistry 10, 506 (1957).

¹¹⁾ P. HAVERKAMP-BEGEMANN & K. DE JONG, Rec. Trav. chim. Pays-Bas 78, 275 (1959); H. VAN DUIN, Thèse Free University Amsterdam, Mai 1961.

¹²⁾ J. A. ELVIDGE & M. WHALLEY, Chemistry & Ind. 1955, 589.

Dans la chromatographie sur papier nous avons fait usage des systèmes proposés par HORNER & KIRMSE¹³), SUNDT & WINTER¹⁴) et également d'un système inversé, huile de paraffine-diméthylformamide-eau¹⁵). En chromatographie de partage sur colonne, nous avons obtenu de bons résultats en utilisant comme support une poudre de polyamide (perlon, «70–100 mesh»), imprégnée de 60–80% de nitrométhane comme phase stationnaire et d'hexane comme phase mobile. En combinant de façon judicieuse la chromatographie d'adsorption et de partage, nous avons pu résoudre tous les problèmes de séparation rencontrés.

L'identification définitive des dérivés s'est faite sur la base des critères suivants: valeur Rf (dans différents systèmes), F. et F. de mélange, spectres IR. et UV. Dans certains cas, les dérivés ont été hydrolysés, et les fractions carbonylées libérées, analysées par spectrométrie de masse.

Plusieurs méthodes de régénération des substances carbonylées en partant des DNP ont été publiées après l'exécution du présent travail¹⁶). Nous avons, en principe, utilisé deux méthodes: a) une méthode qualitative qui servait à évaluer rapidement l'intérêt olfactif des substances carbonylées transformées en DNP: on chauffait dans un micro-creuset un cristal de dérivé en présence d'une goutte d'acide sulfurique ou phosphorique à 50–80%; b) une méthode préparative qui consistait à réduire les DNP à 0° en diaminophénylhydrazones, composants qui s'hydrolysent très facilement en milieu acide (voir partie expérimentale).

La méthode analytique que nous avons utilisée (voir partie expérimentale) nous a permis d'isoler même des constituants carbonylés présents seulement en traces (concentrations inférieures à 0,1 p.p.m.) qui, sous forme libre, se seraient transformées (oxydés) ou volatilisées. Elle offre toutefois de sérieuses difficultés. Il faut compter non seulement avec la possibilité d'une formation d'artéfacts (voir plus loin) mais encore avec une propriété inhérente aux DNP, leur tendance à la polymorphie¹⁷) et à l'isomérisation *cis-trans*¹⁸).

Ces propriétés particulières de certaines arylhydrazones nous ont préoccupés, spécialement dans l'analyse des DNP ayant un Rf à la hauteur des DNP-ionones. La séparation chromatographique de cette fraction a été très ardue et fréquemment nous avons obtenu des fractions non cristallisables, fait pourtant rare avec les DNP. Notre analyse a révélé que ce jet était composé principalement des DNP des (+)- α -ionone et β -ionone. Chacun de ces dérivés existait dans le mélange initial sous deux

¹³) L. HORNER & W. KIRMSE, *Liebigs Ann. Chem.* 597, 50 (1955).

¹⁴) E. SUNDT & M. WINTER, *Analyt. Chemistry* 30, 1620 (1958).

¹⁵) J. GASPARIĆ & M. VECERA, *Microchimica Acta* 1958, 68, proposent ce système dans une communication traitant de la chromatographie sur papier. Nous avons adapté ce système aux dérivés DNP aliphatiques supérieurs, en imprégnant les papiers avec 15% d'huile de paraffine et en utilisant comme phase mobile DMF-H₂O dans les proportions de 85:15.

¹⁶) M. KEENEY, *Analyt. Chemistry* 29, 1489 (1957); G. CASNATI & B. CAVALLERI, *Gazz. chim. ital.* 89, 615 (1959); *Chem. Abstr.* 54, 12045 (1960); J. DEMAECCKER & R. H. MARTIN, *Bull. Soc. chim. belges* 68, 365 (1959); *Chem. Abstr.* 54, 3165 (1960).

¹⁷) Voir par exemple GL. CLARK, W. I. KAYE & TH. D. PARKS, *Ind. & Eng. Chemistry, Analyt. Ed.* 78, 310 (1946).

¹⁸) H. BREDERECK, *Ber. deutsch. chem. Ges.* 65, 1833 (1932); H. BREDERECK & E. FRITZSCHE, *ibid.* 70, 802 (1937); B. E. GORDON, F. WOPAT, JR., H. D. BURNHAM & L. C. JONES, JR., *Analyt. Chemistry* 23, 1754 (1951); H. VAN DUIN, *Nature* 780, 1473 (1957); H. O. HOUSE, *J. Amer. chem. Soc.* 77, 5087 (1955).

isomères: l'un instable et l'autre stable, le dernier cristallisant sous différentes formes polymères. En milieu acide on observait une isomérisation totale et irréversible de l'isomère instable en l'isomère stable. Egalement durant la chromatographie sur papier nous avons observé une isomérisation partielle dans le même sens. Par analogie avec d'autres cas signalés dans la littérature¹⁹⁾ nous considérons que nous avons affaire à une isomérisation géométrique *cis-trans* de la double liaison carbone-azote. Dans le cas de la (+)- α -ionone-DNP et également de la *d,l*- α -ionone-DNP nous avons réussi à séparer les deux paires d'isomères, dont les propriétés physiques sont résumées dans le tableau 4. Ces isomères se distinguent par leur F., leur Rf et leur spectre IR. Des différences spectrales apparaissent aussi bien lorsqu'on travaille en pastilles KBr

Tableau 4. Propriétés physiques de dinitro-2,4-phénylhydrazones de l' α -ionone

	Naturelle (+)- α -ionone forme stable (H5A)	Naturelle (+)- α -ionone forme instable (H5B)	Synthétique (+)- α -ionone forme stable	Synthétique <i>d,l</i> - α -ionone forme stable	Synthétique <i>d,l</i> - α -ionone forme instable
F.	H^{\oplus} 128,5-130° $\xleftrightarrow{\phi}$ 102/110-113°		127,5-128°	151-152°	103-107° (à 125°, traces)
Rf ^{a)}	0,44	0,40	0,44	0,44	0,40
$[\alpha]_D^{20}$	+ 476° (CHCl ₃)	+ 264° ^{b)} (CHCl ₃)	+ 490° (benzène)	-	-
UV. (CHCl ₃)	λ_{max} 382 m μ <i>E</i> = 26800	λ_{max} 381 m μ <i>E</i> = 26425	λ_{max} 383 m μ <i>E</i> = 27800	λ_{max} 382 m μ ^{c)} <i>E</i> = 29300	λ_{max} 381 m μ <i>E</i> = 29200
IR.	en pastilles KBr: différents		en pastilles KBr: petites différences		en past. KBr et en solut. CCl ₄ : différents de ceux de la <i>d,l</i> - α -ionone, forme stable
IR.	en solution CCl ₄ : différents		en solution CCl ₄ : identiques		
a) Système inversé, huile de paraffine/DMF-H ₂ O ¹⁶⁾ ; b) Dérivé optiquement impur; c) Y. R. NAVES & P. ARDIZIO, Helv. 23, 1228 (1949).					

qu'en solution. Par contre les DNP énantiomères et racémiques ainsi que des DNP polymorphes qui ont la même isomérisation géométrique donnent des spectres différents seulement en pastilles KBr et non en solution. Des essais en blanc ont montré que nos conditions spéciales de précipitation des DNP (milieu aqueux, grande dilution, 0°) favorisent la formation de l'isomère instable.

Les résultats de notre analyse sont résumés dans le tableau 5. Ils diffèrent sensiblement de ceux rapportés dans la littérature²⁾ qui comportent: l'aldéhyde anisique¹⁹⁾, l'irone¹⁹⁾, l'aldéhyde benzoïque²⁰⁾, la menthone²⁰⁾, le diacétyle²⁰⁾²¹⁾, les furfuroles et méthyl-5-furfurole-2²²⁾ et la *p*-hydroxyphénylbutanone-3²³⁾. COPPENS & HOEJENBOS²⁰⁾

¹⁹⁾ E. ELZE, Riechstoffindustrie & Kosmetik 4, 72 (1929).

²⁰⁾ A. COPPENS & L. HOEJENBOS, Rec. Trav. chim. Pays-Bas 58, 675 (1939).

²¹⁾ H. BOHNSACK, Ber. deutsch. chem. Ges. 75 B, 72 (1942).

²²⁾ H. BOHNSACK & M. KERSCHBAUM, communication privée. Nous remercions très vivement le Dr H. BOHNSACK de nous avoir communiqué ces résultats et permis leur publication.

supposent encore la présence d'acétoïne et BOHNSACK & KERSCHBAUM²⁴⁾ ont isolé du marc de framboise de la β -ionone. Par contre, ces derniers auteurs n'ont pu isoler ni l'aldéhyde anisique ni l'irone; WILSON²⁵⁾, de son côté, arrive à la conclusion que la β -ionone est absente dans l'huile de framboises. Quant à nous, nous avons régulièrement isolé la (+)- α -ionone et la β -ionone dans les framboises de différentes régions, aussi bien de la première que de la deuxième récolte (années 1955–1957). On peut se demander si des carotinoïdes sont à l'origine de ces ionones. Nous pensons que la framboise contient encore des traces d'un troisième isomère des ionones ou d'un corps analogue (voir partie expérimentale), que nous n'avons pas encore réussi à identifier. Parmi les autres constituants, la β , β -diméthylacroléine nous semble être d'un intérêt spécial du fait de son squelette isoprénique. A notre connaissance, cet aldéhyde n'a

Tableau 5. Substances carbonylées trouvées dans les framboises

DNP			Concentration
Rf	Désig.	Composé carbonylé	dans les fruits
			p.p.m.
0	H 18	diacétyle	Tr
0,05	H 19	acétoïne	M
0,20	H 0	acétaldéhyde	26
0,23	H 10	acroléine	Tr
0,33	H 1	acétone	F
0,34	H 16	propanal	Tr
0,37	H 6	β , β -diméthylacroléine	F
0,45	H 9	pentène-2-al	F
0,53	H 13	<i>cis</i> -hexène-3-al	2
0,55	H 2	hexène-2-al	M
0,59	H 12	pentanone-2	Tr
0,65	H 3	hexanal	M
0,76	H 4	H 4, non identifié	Tr
0,90 } 0,90 }	H 5	{ (+)- α -ionone { β -ionone	M Tr

Echelle des concentrations: M (moyenne) = 1–0,1 p.p.m.
F (faible) = 0,1–0,01 p.p.m.
Tr (traces) = < 0,01 p.p.m.

été isolé jusqu'ici d'aucun produit naturel. Des travaux de BIRCH²⁶⁾ appuient l'hypothèse d'un mécanisme de synthèse polyisoprénique, partant de l'acide mévalonique qui passerait par la β , β -diméthylacroléine ou son anion, formé par décarboxylation du méthyl-3-oxo-5-pentène-3-oïque. C'est également la première fois que le *cis*-hexène-3-al-1 a été trouvé dans un produit naturel. La détermination de sa structure et de celle de la *cis*-hexène-3-al-DNP est décrite dans la partie expérimentale. La fig. montre l'identité des spectres IR. des DNP naturelles (courbe A) et synthétiques (courbe B).

²³⁾ H. SCHINZ & C. F. SEIDEL, *Helv.* 44, 278 (1961).

²⁴⁾ Mentionnés par Y.-R. NAVES, *Helv.* 30, 956 (1947).

²⁵⁾ J. B. WILSON, *J. Assoc. offic. Agr. Chemists* 22, 378 (1939); *Chem. Abstr.* 33, 6978 (1939).

²⁶⁾ A. J. BIRCH, R. J. ENGLISH, R. A. MASSY-WESTROPP & H. SMITH, *Proc. chem. Soc.* 1957, 233.

Le *cis*-hexène-3-al-1 est doté d'une odeur verte caractéristique et très puissante²⁷⁾. Dans un travail récent, HOFFMANN²⁸⁾ a identifié le *cis*- et le *trans*-hexène-3-al-1 ainsi que l'hexanal parmi les produits de rancissement de l'huile de soya oxydée par l'air. On peut en déduire que tous ces produits sont des artéfacts.

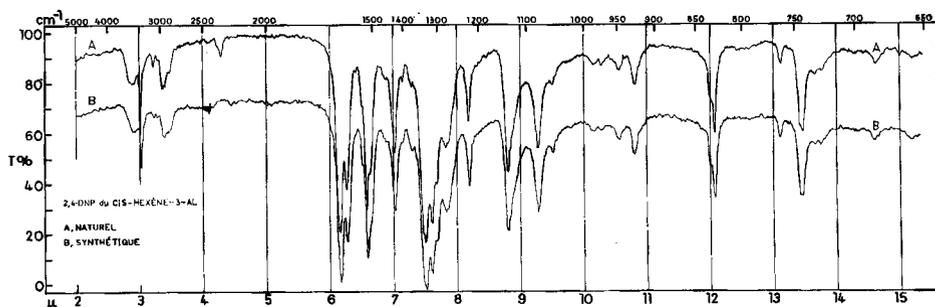


Fig. 1. Spectres IR. des dinitro-2,4-phénylhydrazones des *cis*-hexène-3-al-1 naturel et synthétique

Par la localisation de la double liaison en position β de la fonction aldéhydrique, l'hexène-3-al, ou ses dérivés, subissent aisément une isomérisation en hexène-2-al, dénommé «aldéhyde de feuilles», ou les dérivés correspondants. A notre avis, il serait possible que cet aldéhyde de feuilles, isolé fréquemment de divers végétaux, proviendrait parfois, du moins partiellement, du *cis*-hexène-3-al-1. Les feuilles de thé, par exemple, pourraient contenir à côté de l'hexène-2-al-1²⁹⁾ également l'hexène-3-al-1. Récemment, DÄSSLER & MAYER³⁰⁾ attribuaient une odeur de framboise à un extrait aqueux de feuilles d'érable, mais aucune des substances isolées, dont l'une était l'hexanal-2, ne révélait une telle odeur. Il se pourrait bien qu'il s'agît en fait d'un hexène-3-al-1 isomérisé.

Dans notre cas il serait également possible que l'hexène-2-al isolé de la framboise fût un artéfact. Cette hypothèse est soutenue par le fait que l'absorption d'un distillat frais, dans l'UV. à 226 $m\mu$, est extrêmement faible. A l'aide d'une courbe étalon, nous avons pu montrer que l'intensité de ce maximum à 226 $m\mu$ correspond à environ un dixième seulement de l'hexène-2-al isolé comme dinitro-2,4-phénylhydrazone. Or on connaît déjà quatre autres substances carbonylées α, β -insaturées qui contribuent à cette adsorption (voir tableau 5). D'autre part, après acidulation d'un distillat frais jusqu'au pH 0,3, on constate que l'intensité de l'absorption à 226 $m\mu$ augmente rapidement.

Le diacétyle pourrait également être un artéfact. Il n'a été isolé qu'en traces et ces dernières pourraient provenir de l'oxydation de l'acétoïne par un excès de dinitro-2,4-phénylhydrazine.

La Fig. 2 (p. 2205) montre 3 taches de DNP qui ne figurent pas dans le tableau récapitulatif 5. Il s'agit du H 15, qui est une autre forme cristalline du *cis*-hexène-3-al-DNP (bimorphie), du H 14 qui est le *trans*-hexène-3-al-DNP et du H 17 qui est

²⁷⁾ La synthèse de cet aldéhyde et l'utilisation du produit synthétique ont fait l'objet de demandes de brevets.

²⁸⁾ G. HOFFMANN, J. Amer. Oil Chemists' Soc. 38, 1 (1961).

²⁹⁾ R. YAMAMOTO & Y. KATO, Chem. Zbl. 1936, I, 1329.

³⁰⁾ J. G. DÄSSLER & R. MAYER, Naturwiss. 46, 448 (1959).

du crotonal-DNP. Les deux derniers dérivés sont des artéfacts formés au cours de traitements spéciaux (voir partie expérimentale).

Sur le plan quantitatif on constate que l'aldéhyde acétique contribue pour 95% au mélange des constituants carbonylés. Ceci explique les grandes « pertes » observées dans les bilans des corps carbonylés et du carbone total lorsqu'on passe du distillat à l'extraît éthéré.

En comparant nos résultats à ceux des travaux antérieurs effectués, comme il a été dit, sur un jus de framboise ou un marc de framboise, nous concluons que notre analyse n'a confirmé comme composants volatils que la β -ionone et le diacétyle – ce dernier considéré plutôt comme un artéfact. Nous pensons que les autres corps carbonylés trouvés dans les travaux antérieurs n'existent pas dans la framboise fraîche, exception faite de la *p*-hydroxyphényl-butanone-3, que nous avons aisément isolée de notre « pulpe résiduelle » (tabl. 2). Des transformations biologiques et enzymatiques du jus de framboises pourraient expliquer la présence de certains des corps carbonylés isolés dans les recherches antérieures, notamment de l'aldéhyde benzoïque, du furfural et du méthyl-5-furfural-2. La question de savoir dans quelle mesure la variété des fruits est responsable de ces différences reste posée.

Nous remercions la Direction de la Maison FIRMENICH & CIE et M. M. STOLL, directeur scientifique, de la permission de publier ces résultats.

Partie expérimentale

Avec la collaboration technique de M. P. ENGGIST.

Tous les réactifs utilisés ont été de la pureté « pour analyse ». Tous les dissolvants et l'eau ont été spécialement purifiés dans notre laboratoire. Les F. ont été déterminés dans un bloc métallique chauffé électriquement ou dans un microscope à platine chauffante « LEITZ »; ils ne sont pas corrigés.

Abréviations: DNPH = dinitro-2,4-phénylhydrazine; DNP = dérivé dinitro-2,4-phénylhydrazone; Chr. P. = chromatographie qualitative sur papier; Chr. P. P. = chromatographie préparative sur papier. Système DD = Chr. P. avec le système diméthylformamide (DMF)-décaline¹³⁾; système CC = Chr. P. avec le système cyclohexane-cyclohexène¹⁴⁾; système PD = Chr. P. en phase inverse sur papier imprégné d'huile de paraffine, avec DMF-H₂O comme phase mobile¹⁵⁾. Intensités des taches sur Chr. P.: *ww* = traces, *w* = faible, *m* = moyen, *s* = fort, *ss* = très fort. K-B = support chromatographique consistant en un mélange de 1 partie (poids) de Kieselguhr et 4 parties de Bentonite¹²⁾ (British Drug House). La Chr. P. P. comprend les opérations suivantes: la solution des DNP est déposée en ligne continue sur une série de feuilles et on développe soit feuille par feuille (séparation la meilleure) soit en bloc³¹⁾. Les différentes zones sont ensuite découpées en morceaux. Dans un turmix, en présence de CH₃OH-H₂O ou CH₃OH-CHCl₃, on réduit les morceaux de papier en une pâte fine. Ceci permet une extraction rapide et complète des feuilles de papier en 30 à 60 secondes. Ensuite on filtre, sépare l'eau, concentre et chromatographie le résidu sur une petite colonne de K-B, pour éliminer de petites impuretés intervenues durant les différentes opérations. Après une cristallisation, les dérivés DNP ainsi traités sont normalement purs pour l'analyse.

I. Préparation des DNP

580 kg de framboises de première qualité (variétés « Lloyd George », « Bois rouge », « Bois blanc », 2^e récolte 1957, fruits de la région des Voirons, Haute Savoie) ont été distillés en 5 opérations sous les conditions normales décrites précédemment¹⁾. Dans la première opération, la pulpe résiduelle a été redistillée, mais comme les distillats obtenus ne contenaient plus au total que 15% de substances carbonylées par rapport au premier passage, on a renoncé à traiter la pulpe des opérations

³¹⁾ E. VON ARX & R. NEHER, Helv. 39, 1664 (1956).

suyvantes. Toutes ces opérations ont fourni au total 111 kg de distillat (voir tableau 1) dont l'analyse variait dans les limites suivantes: valeur carbonyle: 0,424 à 0,756 mmole/kg de fruits; valeur carbone: 76 à 91 mg/kg de fruits.

Les 111 kg de distillat contenaient au total 369 mmoles de substances carbonylées. Immédiatement après la distillation chaque condensat fut traité séparément avec une solution de DNPH (préparation de cette «solution standardisée»: dissoudre 1 g de DNPH dans 20 ml de H₂SO₄ conc. Pour activer la dissolution, ajouter quelques gouttes d'eau, puis, en refroidissant, diluer à 100 ml et filtrer la solution. $c = 0,05$ mmole DNPH par ml); température de réaction 1–3°; durée de la réaction 5–15 h. En tout, on a ajouté 545 mmoles de DNPH. Les précipités filtrés furent soigneusement lavés à neutralité avec de l'eau pure et séchés dans le dessiccateur. Les rendements en dérivés DNP sont indiqués dans le tableau 3.

II. Analyses des DNP

A. *Analyse de la fraction A.* Le Chr. P. (Système DD) montre les taches suivantes: Rf 0 à 0,01 (*ww*), 0,1 (*ww*), 0,2 (*ss*), 0,34 (*w*) ~ 0,55 (*m*), 0,65 (*ww*), 0,9 (*ww*). Le mélange des DNP est séparé par plusieurs chromatographies, la première sur une colonne de K·B¹²) (contenant 12,5–13% H₂O). A titre d'exemple nous décrivons ici en détail un des premiers chromatogrammes: on prépare dans un ballon une suspension de 500 g de K·B dans du benzène. En appliquant un vide partiel (~ 50 Torr) à cette suspension, tout en la secouant, on éloigne entièrement l'air retenu par le support. Par portions, on verse le mélange dans un tube chromatographique. Après chaque addition on remue avec une baguette de verre et attend la sédimentation avant de verser la portion suivante. La sédimentation peut être accélérée par l'application d'une faible pression d'azote (environ 5–10 cm de Hg). Une fois la colonne remplie on applique une pression d'azote de 20–40 cm de Hg, tout en laissant couler du benzène. Pour de grandes colonnes une telle pression est nécessaire afin d'obtenir un débit d'écoulement raisonnable. Il est important de comprimer et de décompresser très graduellement, pour éviter la formation de fissures dans le support. On introduit dans cette colonne une solution de 18,180 g de dérivés (jet A) dans du benzène et commence immédiatement l'élution, d'abord avec du benzène puis avec des mélanges de polarité plus élevée. Très vite

Tableau 6. *Chromatogramme de 18,18 g de jet A sur K·B*

Fraction	Dissolvant	ml	Poids mg	Composition ^{a) b)}
0	benzène	500	—	—
1	benzène-CHCl ₃ 9:1	300	36	H 5, H 11
2	benzène-CHCl ₃ 8:2	15	10	H 5, <u>H 11</u> , <u>H 13</u> , H 7, H 8,
3	benzène-CHCl ₃ 7:3	15	15	H 5, <u>H 11</u> , <u>H 13</u> , H 7, H 8
4	benzène-CHCl ₃ 6:4	40	66	<u>H 5</u> , <u>H 11</u> , <u>H 13</u>
5	benzène-CHCl ₃ 55:45	60	123	<u>H 5</u> , H 13
6	benzène-CHCl ₃ 1:1	120	355	<u>H 5</u> , H 3, H 13
7	benzène-CHCl ₃ 4:6	120	370	<u>H 5</u> , H 3, H 2, H 13
8	benzène-CHCl ₃ 3:1	150	320	<u>H 5</u> , <u>H 4</u> , <u>H 3</u> , H 2, H 13
9	benzène-CHCl ₃ 15:85	150	74	<u>H 4</u> , H 3, H 2, <u>H 12</u> , <u>H 13</u>
10	CHCl ₃	40	19	<u>H 3</u> , H 2, <u>H 12</u> , <u>H 9</u> , <u>H 6</u> , <u>H 16</u>
11	CHCl ₃	40	130	<u>H 2</u> , H 1, H 6, H 16
12	CHCl ₃ -CH ₃ OH 98:2	500	4214	H 0
13	CHCl ₃ -CH ₃ OH 96:4	2500	10230	H 0
14	CHCl ₃ -CH ₃ OH 95:5	150	660	H 0
Total			16622	= 91,5%

^{a)} voir schéma des taches, Fig. 2.

^{b)} la concentration des dérivés soulignés en strié est très faible.

on observe la formation de zones de couleurs différentes et plus ou moins bien séparées les unes des autres. Il est important de procéder à l'éluion des zones d'une façon suivie; chaque arrêt rend les fronts des zones plus diffus, ce qui entrave une bonne séparation. On recueille les fractions des éluats zone après zone; elles sont concentrées puis examinées par Chr. P. Le tableau 6 résume le résultat obtenu. Sur la partie supérieure de la colonne subsiste une zone jaune (pouvant être extraite au nitrométhane ou à la pyridine et contenant de la diacétyl-bis-DNP). Cette zone ne fut pas extraite dans ce chromatogramme.

L'analyse par Chr. P. montre que la majorité des éluats se composent d'un mélange de différents produits. D'autre part, chaque tache peut être en soi un mélange de dérivés inséparables dans les conditions chromatographiques utilisées. Ainsi les dérivés H 1, H 6 et H 16 de la fraction 11 ont pratiquement le même Rf dans le système DD. La composition des fractions, indiquée au tableau 6, n'a donc été obtenue qu'au cours de l'analyse.

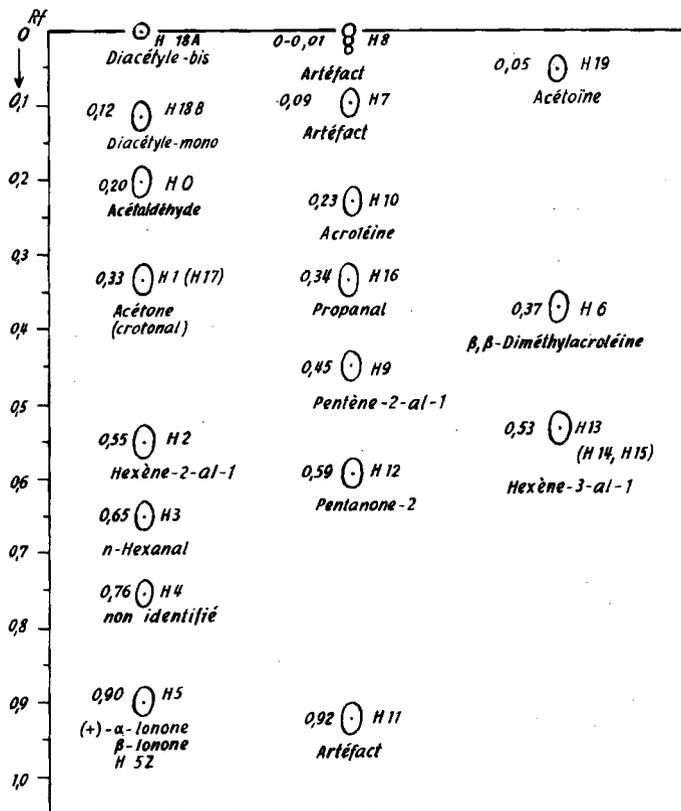


Fig. 2. Chromatographie sur papier des dérivés DNP de la framboise. Schéma des taches (Système DD)

Toutes ces fractions ont par la suite été soumises à une analyse approfondie à l'aide de la chromatographie sur colonne, la Chr. P.P. avec différents systèmes, la chromatographie de partage sur colonne et également le partage entre dissolvants. En combinant de façon judicieuse toutes ces possibilités on a isolé finalement les produits H 0 à H 19 représentés dans la Fig. 2. Les taches H 11, H 7, H 8 ne correspondent pas à des dérivés DNP véritables et sont à considérer comme des artéfacts. Au cours de l'analyse nous avons rencontré encore d'autres de ces produits qui ne figurent pas sur la Fig. 2. Ces artéfacts se distinguent des dérivés DNP véritables par l'une ou plusieurs des propriétés suivantes: dans les chromatogrammes sur papier ils ne montrent pas,

après traitement avec de l'alcali, de changements caractéristiques de couleurs, et en lumière ultraviolette on observe des couleurs fluorescentes bleues à violettes. Les positions respectives des zones sur colonnes K-B et dans les Chr. P. sont souvent «anormales». Enfin l'hydrolyse acide de ces produits ne régénère pas de corps carbonylés. L'origine de ces artéfacts peut être très variée: a) impuretés du réactif DNPH; b) transformation de l'excès du réactif, soit en solution, soit sur les colonnes chromatographiques; c) transformation de dérivés DNP vrais.

Séparation ultérieure et identification des dérivés DNP (dans l'ordre des valeurs Rf décroissantes). Le produit de départ a été obtenu en réunissant toutes les fractions correspondantes des premiers chromatogrammes, effectués comme on vient de la décrire (tabl. 6).

Substance H 11, Rf 0,92. Cette tache ne correspond pas à un dérivé DNP et montre les caractéristiques des artéfacts, notamment une fluorescence bleuâtre sous l'UV. On observe cette tache dans les premiers éluats chromatographiques contenant le H 5 (voir plus bas). Nous avons retenu deux hypothèses pour expliquer H 11: il pourrait s'agir soit d'une impureté (présente dans le jet des DNP brutes) soit d'un produit de décomposition caractéristique d'un dérivé DNP instable et présent en très petite quantité.

Substance H 5, Rf 0,90: mélange des α - et β -ionones-DNP. La tache H 5 est éluee dans les premières fractions du chromat. 1 sur K-B (voir tabl. 6). Elle est accompagnée de l'artéfact H 11 mentionné plus haut. En rechromatographiant sur 20 g K-B toutes les fractions enrichies en H 5 on obtient la séparation représentée dans le tableau 7.

Ce chromatogramme se singularise par le fait que la substance donnant la tache H 5 «traîne» sur la colonne, d'où l'on conclut que H 5 pourrait être un mélange. En confirmation de cette hypothèse, les éluats concentrés se présentent sous forme soit huileuse, soit partiellement cristallisée, soit entièrement cristallisée et de couleur variée. Malgré cela, on n'obtient qu'une seule tache dans les systèmes DD et CC. Par contre, il est possible d'observer une séparation dans le système PD, comme le montre la Fig. 3. Il s'ensuit que la tache H 5 (système DD) est un mélange d'au moins 2 substances désignées comme H 5A et H 5B (Fig. 3). Mais l'aspect des fractions 1-10 (tabl. 7) permet de prédire que le mélange doit être encore plus complexe. D'autre part les fractions montrent les pouvoirs rotatoires suivantes:

$$\begin{aligned} \text{fr. 2: } [\alpha]_{\text{D}}^{20,5} &= +431^\circ; c = 4,0, \text{ benzène} \\ \text{fr. 4: } [\alpha]_{\text{D}}^{25} &= +336^\circ; c = 3,99, \text{ benzène} \\ \text{fr. 6: } [\alpha]_{\text{D}}^{20} &= +145^\circ; c = 4,0, \text{ benzène} \end{aligned}$$

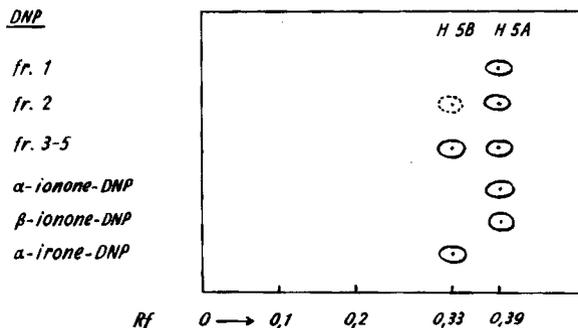


Fig. 3. Chromatogramme sur papier des fractions 1-5, tableau 7 (système PD)

Les fr. 1 et 2 (tabl. 7) sont purifiées par chromatographie de partage sur perlon (colonne préparée avec de la poudre de perlon, «70-100 mesh», imprégnée de 80% de nitrométhane, et élution avec de l'hexane saturé de nitrométhane), chromatographie d'adsorption sur K-B et recristallisation fractionnée. Toutes ces opérations sont contrôlées par le pouvoir rotatoire, le F. et l'aspect des cristaux. Les jets obtenus ont l'apparence de mélanges; les F. se situent entre 111° et 132° et les pouvoirs rotatoires varient entre +260° et +476° (benzène). Un jet à l'aspect homogène donne à l'analyse: F. 128,5-130,5°; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +377^\circ$; Rf 0,44 (H 5A).

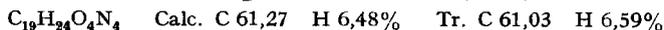


Tableau 7. Chromatogramme des fractions riches en H 5 sur K-B

Fraction	Dissolvant	ml	Poids mg	Composition ^{a)}
1	benzène-hexane 50:50	15	6	H 5, <u>H 11</u>
2	benzène-hexane 70:30	20	18	H 5, <u>H 11</u>
3	benzène	25	31	H 5, <u>H 11</u>
4	benzène-CHCl ₃ 70:30	25	12	H 5, <u>H 11</u>
5	benzène-CHCl ₃ 80:20	20	9	H 5, <u>H 11</u>
6	benzène-CHCl ₃ ~ 90:10	15	10	H 5, <u>H 11</u>
7	CHCl ₃	20	23	H 5, <u>H 13</u> , <u>H 7</u> , <u>H 8</u>
8	CHCl ₃	20	9	H 5, <u>H 13</u> , <u>H 7</u> , <u>H 8</u>
9	CHCl ₃	20	16	H 5, <u>H 13</u> , <u>H 7</u> , <u>H 8</u>
10	CHCl ₃	10	10	H 5, <u>H 13</u> , <u>H 7</u> , <u>H 8</u>

^{a)} selon Chr. P., système DD

Ces valeurs pour C et pour H correspondent à une ionone-DNP. Le spectre IR. en pastille KBr est légèrement différent de celui de la *d,l*- α -ionone-DNP [inversion dans l'intensité des doublets dans le « fingerprint » (835 et 1080 cm⁻¹)], mais identique au spectre IR. de la (+)- α -ionone-DNP authentique³²⁾. En solution chloroformique les spectres IR. des 3 dérivés (H 5 A, *d,l*- α -ionone-DNP et (+)- α -ionone-DNP) sont strictement identiques.

Deux autres jets cristallisés ont été hydrolysés, et les ionones libérées, examinées par spectrométrie de masse. Dans les deux cas il s'agissait d' α -ionone pure.

Voici le procédé de scission des dérivés DNP utilisés. Dissoudre 2–3 mg DNP (H 5 A) dans 0,5 ml DMF. Refroidir à 0° et ajouter goutte à goutte, en refroidissant, le mélange réducteur de 16 mg SnCl₂, 0,13 ml HCl conc., 0,25 ml H₂O et 0,5 ml DMF. Laisser réagir 15 min à 0°. La solution initialement brun foncé s'éclaircit jusqu'au jaune clair, ce qui indique la fin de la réduction. Ajouter 2 ml H₂O, entraîner à la vapeur d'eau, extraire le distillat à l'éther ou au pentane, concentrer et évaporer dans le réservoir du spectromètre de masse pour la prise du spectre. Les rendements en corps carbonylés régénérés varient de 80 à 50% de la théorie, suivant la structure du dérivé DNP. Le diacétyle-bis-DNP ne s'hydrolyse qu'en trace par cette méthode.

Conclusions: la seule substance présente dans la tache H 5 A des fr. 1 et 2 (tabl. 7) est la (+)- α -ionone-DNP, partiellement racémisée et présentant différentes formes cristallines.

La fraction 6 (tabl. 7) est également séparée par partage sur perlon. On obtient: fr. 6-1 et 6-2, composées de peu de H 5 A et beaucoup de H 5 B; puis fr. 6-3, 6-4, contenant H 5 A + très peu H 5 B, et fr. 6-5, ne contenant que H 5 A. Les fractions 6-3+6-4 (2,5 mg) sont hydrolysées et examinées par spectrométrie de masse; résultats: 90% α -ionone, 10% β -ionone et très peu d'une substance non identifiée (substance H 5 Z).

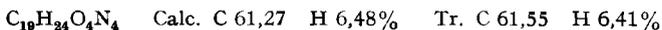
Les fractions 7 à 10 (tabl. 7) sont séparées des DNP inférieures (H 13) par rechromatographie sur K-B. Les fractions de H 5 obtenues contiennent peu de H 5 B, à côté de H 5 A. Pour isoler H 5 B on a réuni toutes les fractions précédemment enrichies en cette substance, et séparé H 5 B par Chr. P. P. (système inverse PD). En répétant cette opération avec la zone H 5 B on obtient de nouveau les deux zones H 5 A et H 5 B en quantité à peu près égale. Ceci indique qu'il y a transformation de H 5 B en H 5 A pendant les procédures de chromatographie. H 5 A est isolé et identifié comme (+)- α -ionone-DNP (IR., UV., $[\alpha]_D^{25} = +209^\circ$). La zone H 5 B donne, après une nouvelle purification par chromatographie sur perlon, et cristallisation dans de l'hexane à 0°, des cristaux oranges contenant quelques cristaux rouges, F. 102–110–113–129° (cristaux rouges); Chr. P. (système inverse PD): H 5 B + très peu de H 5 A, $[\alpha]_D^{25} = +264^\circ$ (benzène); UV.: λ_{max} 381 m μ , $E = 26425$ (donc caractéristique du système insaturé de l' α -ionone-DNP); spectre IR.: en pastille KBr et en solution, différent de celui de la (+)- α -ionone-DNP F. 128,5–130,5°. Tous

³²⁾ Dédoublément de la *d,l*- α -ionone suivant Y.-R. NAVES, Helv. 30, 769 (1947).

ces faits concordent avec l'hypothèse que H 5 B et H 5 A sont des isomères *cis-trans*. En examinant par la suite une DNP de la *d,l*- α -ionone, préparée dans les mêmes conditions que les DNP naturelles, on a pu isoler à côté du H 5 A racémique un H 5 B racémique qui donne en solution un IR. identique à celui du H 5 B naturel.

H 5 B se transforme en H 5 A par chauffage ou recristallisation en solution alcoolique faiblement acidulée avec quelques gouttes d'acide chlorhydrique. Dans les mêmes conditions il n'y a aucune isomérisation de l' α - en β -ionone-DNP. Dans le tableau 4 nous avons résumé les principales caractéristiques des DNP de l' α -ionone (isomères stables et instables).

Finalement, nous avons encore examiné toutes les fractions du chromatogramme du tableau 7, pauvres en H 5 B. En rechromatographiant plusieurs fois les derniers éluats sur K-B on obtient une séparation en H 5 A + H 5 B d'une part, et en un autre dérivé, de couleur rouge foncé, avec un Rf de H 5 A, d'autre part. Ce dernier dérivé, après plusieurs recristallisations dans de l'hexane, est optiquement inactif, F. 127-128,5°. On n'observe pas de dépression en mélange avec la β -ionone-DNP.



Le spectre IR. est également identique à celui de la β -ionone-DNP. Le spectre de masse d'un échantillon hydrolysé confirme qu'il s'agit de la β -ionone pure.

Nous avons pu montrer par des essais tests que la β -ionone-DNP précipite également comme un mélange des formes stables et instables dans les conditions expérimentales utilisées pour les DNP naturelles (grande dilution, faible acidité et à froid). Le dérivé brut est séparé par Chr. P. (système PD) en deux produits avec les Rf 0,40 et 0,44. Ici encore, on observe une isomérisation en un unique dérivé à Rf 0,44 (forme stable) en milieu acide à chaud.

Il n'a pas été possible d'obtenir suffisamment de dérivé H 5 Z pour déterminer sa structure.

Subst. H 4, Rf 0,76, non identifiée: Ce dérivé est élué sur K-B avec les fractions contenant H 3, H 13, H 2 (tabl. 6, fr. 8, 9, 10). Il n'est présent qu'en traces et n'a pas pu être isolé. D'après l'ordre d'éluion et le Rf, il pourrait s'agir d'une cétone à 8 atomes de carbone.

Subst. H 3, Rf 0,65: hexanal-DNP: H 3 s'élué sur K-B avec les fractions contenant H 13 et H 2 (tabl. 6, fr. 6-10). Par rechromatographie sur K-B on sépare H 13; ensuite H 3 s'est séparé aisément de H 2 par Chr. P. P.; recristallisation dans de l'hexane, F. 102°; cristaux jaunes. Identique à la DNP de l'hexanal d'après le spectre IR., le F. du mélange et le Rf.

Subst. H 12, Rf 0,59: pentanone-2-DNP. Ce produit a pu être décelé en faible quantité dans des chromatogrammes ultérieurs portant sur les fractions 9 et 10 (tabl. 6). Le dérivé se distingue des dérivés aldéhydiques qui l'accompagnent, par le fait qu'il donne avec de l'alcali une couleur brunâtre au lieu de jaune à orange. Par chromatographie répétée et finalement par Chr. P. P. on a obtenu 2,5 mg de dérivé purifié, correspondant à la tache H 12; F. 130/138-142°. Son spectre IR. est identique à celui de la méthyl-propylcétone-DNP authentique (F. 143-144°), et le F. du mélange ne présente pas de dépression.

Subst. H 2, Rf 0,55: hexène-2-al-1-DNP. Le dérivé H 2 est isolé en même temps que H 3 et de façon analogue. Après recristallisation dans un mélange de benzène-hexane, F. 146-148°, cristaux rouges; pas de dépression du F. du mélange avec de l'hexène-2-al-1-DNP authentique. Le spectre IR. [bandes caractéristiques à 1640 cm^{-1} , *m*, $-\text{HC}=\text{CH}-\text{CH}=\text{N}-$) et 987 cm^{-1} (*m*, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{trans}$)] et le Rf sont également identiques. Comme déjà exposé dans la partie théorique, le H 2 pourrait provenir, en partie ou entièrement, d'une isomérisation de l'hexène-3-al en hexène-2-al.

Subst. H 13, Rf 0,53: cis-hexène-3-al-1-DNP. En rechromatographiant les fractions 6 et 7 sur K-B (tabl. 6) on arrive à séparer un dérivé jaune, F. 99-101°. Par deux recristallisations dans un mélange de benzène-hexane le F. reste inchangé. En examinant ce dérivé par Chr. P. (système DD et CC) on obtient bien la tache H 13 comme substance principale mais elle est accompagnée de plusieurs autres taches; ainsi, dans le système DD on note une tache avec Rf $\sim 0,10$ (H 7), et 2-3 taches à la base (H 8). La tache H 7 se distingue par le fait qu'elle donne avec l'alcali une couleur rose. Dans la Chr. P. P. répétée (donc en extrayant H 13 et en la rechromatographiant) H 13 est de nouveau accompagnée des taches H 7 et H 8. Ceci signifie que H 7 et H 8 sont des artéfacts caractéristiques de H 13.

La structure de H 13 a été établie par les faits expérimentaux suivants:

1. Microcombustion (dérivé F. 99–101°).

$C_{12}H_{14}O_4N_4$ Calc. C 51,79 H 5,07 N 20,14% Tr. C 51,70 H 5,20 N 20,29%

Il s'agit donc d'un corps carbonylé à 6 atomes de carbone, contenant 1 double liaison.

2. Le spectre IR.: bandes à 3300 cm^{-1} (*m*), > NH; épaulement à 730 cm^{-1} (*m*), –CH=CH-*cis*; absence de la bande –CH=CH-*trans*. L'absence de la vibration d'intensité moyenne entre 1640–1650 cm^{-1} , caractéristique des dérivés DNP d'aldéhydes α,β -insaturés et non substitués en position α , est en accord avec la couleur jaune du dérivé H 13³³).

3. Le spectre UV. en solution alcaline, selon JONES, HOLMES & SELIGMANN³⁴) est en accord avec une structure aldéhydique. D'autre part, le spectre UV. en solution neutre (λ_{max} 358 $m\mu$, $\log E = 4,331$) confirme la structure d'une DNP d'un aldéhyde α,β -saturé (à noter que la vibration dans l'IR. à 3300 cm^{-1} serait plutôt significative d'une cétone-DNP³⁴)).

4. Par micro-ozonisation³⁵) de H 13 on obtient du propanal, identifié comme propanal-DNP.

5. Par traitement en milieu acide au bain-marie dans DMF, H 13 se transforme quantitativement en hexénal-2-DNP.

6. Finalement, la structure du H 13 fut prouvée en le comparant au DNP du *cis*-hexène-3-al-1 synthétique³⁶). Ce dernier est identique au H 13 et montre la même anomalie dans les Chr. P. Les spectres IR. des DNP naturelle et synthétique sont identiques (Fig. 1).

Subst. H 14, Rf 0,53. Ce dérivé a été obtenu par un traitement particulier: au moyen d'hydrogénosulfite de sodium les aldéhydes α,β -saturés ont été séparés des autres composants carbonylés. Les hydroxysulfonates ont ensuite été scindés en aldéhydes par traitement avec de l'acétate de plomb, et transformés en DNP par réaction ménagée à 0° avec du DNPH. Les DNP obtenues ont été analysées par la technique décrite. Le seul dérivé aldéhydique, α,β -saturé, qui différait des DNP obtenues par précipitation directe (selon tabl. 3), a été le H 14; il se présentait sous forme de cristaux jaunes, F. 83–86° (hexane); Rf = 0,53, donc comme le H 13.

$C_{12}H_{14}O_4N_4$ Calc. C 51,79 H 5,07% Tr. C 51,99 H 5,36%

Son spectre IR. ressemble très fortement à celui du H 13, si ce n'est qu'il montre une forte bande à 963 cm^{-1} (–HC=CH-*trans*). Or, le dérivé *trans*-hexénal-DNP synthétique³⁶) fond à 99–101°. Par contre, le mélange des dérivés *cis*- et *trans*-hexène-3-al-1 (1:1) donne un F. identique à celui de H 14. De même les spectres IR. de ce mélange et de H 14 sont identiques. H 14 n'est rien d'autre qu'un mélange des DNP du *cis*- et du *trans*-hexène-3-al-1. Comme nous n'avons trouvé ce dérivé que dans ce cas particulier, nous pensons qu'il y a eu isomérisation partielle de l'hydroxysulfonate *cis* en *trans*.

Subst. H 15, Rf 0,53. Quelques jets chromatographiques, correspondant dans le Chr. P. à la tache H 13, ont donné un spectre IR. (KBr) différant sensiblement du spectre IR. de H 13 dans la région du «finger-print». Ce dérivé, appelé H 15, fond à 99–101° et ne donne pas de dépression du F. avec H 13. Sous le microscope, H 15 montre nettement deux sortes de cristaux. Les spectres IR. de H 13 et de H 15, pris en solution chloroformique, sont identiques. Ces deux produits représentent donc deux formes cristallines différentes du même dérivé.

Subst. H 9, Rf 0,45: pentène-2-al-1-DNP. Ce constituant mineur se sépare seulement après une rechromatographie de la fr. 10 (tabl. 6). On le concentre encore davantage par une Chr. P. P. On obtient finalement 2,5 mg de dérivé correspondant à la tache H 9; après recristallisation dans alcool-H₂O, F. 150/159–163°; cristaux rouges. Sur papier, H 9 donne avec KOH la coloration foncée caractéristique des DNP des substances carbonylées α,β -insaturées. Le spectre IR. présente la vibration NH à 3280 cm^{-1} , position caractéristique d'un dérivé aldéhydique³⁴). D'autre part, on observe la vibration caractéristique de la conjugaison –HC=CH=N– à 1642 cm^{-1} (*m*) tandis que la vibration à 990 cm^{-1} est en accord avec une double liaison –HC=CH-*trans*.

Par micro-ozonisation³⁵) H 9 donne du propanal, isolé comme DNP. Tous ces faits sont compatibles avec la structure d'une DNP du pentène-2-al-1. Celle-ci a été prouvée par l'identité de H 9 avec la DNP du *trans*-pentène-2-al-1 synthétique (F. 161–163°, F. du mélange, *idem*).

³³) J. D. ROBERTS & CH. GREEN, J. Amer. chem. Soc. 68, 214 (1946).

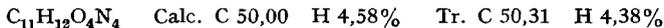
³⁴) L. A. JONES, J. C. HOLMES & R. B. SELIGMAN, Analyt. Chemistry 28, 191 (1956).

³⁵) M. WINTER & P. ENGGIST, «Nouveaux laboratoires de recherche Genève», Plaquette Firmenich & Cie, 1959, p. 31.

³⁶) M. WINTER, travail non publié.

Subst. H 1, Rf 0,33: acétone-DNP. Ce dérivé se trouve en très petite quantité dans les fractions précédant l'acétaldéhyde-DNP. Vu la complexité de ces fractions, nous n'avons pas insisté pour les séparer en composants purs. H 1 a été facilement isolé de la fraction B (voir plus loin).

Subst. H 6, Rf 0,37: β,β -diméthylacroléine-DNP. Ce constituant mineur n'est pas décelable sur le Chr. P. après la première séparation (tabl. 6). Par rechromatographie des fr. 10 et 11, H 6 se concentre dans les fractions supérieures. Il est accompagné de H 16 et H 0, et précédé de H 9. Par recristallisation et rechromatographie on isole finalement 13 mg de dérivé rouge, Rf 0,37, F. 172–177°. Après une sublimation et deux recristallisations dans un mélange alcool-eau, le F. monte à 184/185,5–187°.



La structure a été établie de la façon suivante: après hydrolyse acide et réaction avec la DNPH on a obtenu de nouveau le dérivé H 6 (pas d'isomérisation). Par micro-ozonisation dans les conditions habituelles³⁶⁾ il se forme des traces d'un fragment carbonylé volatil qu'on n'a pas pu identifier. Le spectre IR. de H 6 présente la vibration NH à 3290 cm^{-1} , une vibration caractéristique à 1650 cm^{-1} (*m*, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{N}-$) et une faible bande à 978 cm^{-1} ($-\text{CH}=\text{CH}-$ *trans*). Spectre UV. (CHCl_3): λ_{max} 382 $\text{m}\mu$, $E = 28180$; en solution alcaline³⁴⁾: λ_{max} 460 $\text{m}\mu$, $E = 32780$, et λ_{max} 530, $E = 18900$. E_{max} diminue très peu avec le temps. Tous ces résultats appuient l'hypothèse d'après laquelle H 6 serait le dérivé d'un aldéhyde en C_6 , α,β -insaturé et ramifié. Par comparaison avec une DNP synthétique on a pu montrer qu'il s'agit du dérivé de la β,β -diméthyl-acroléine. L'aldéhyde fut préparé suivant FISCHER, ERTEL & LÖWENBERG³⁷⁾ ainsi que par oxydation du méthyl-3-butène-2-ol-1 avec le dioxyde de manganèse; DNP, F. 183–185°.

Subst. H 16, Rf 0,34, propanal-DNP. Comme indiqué plus haut, le dérivé H 6 est accompagné d'un autre dérivé (H 16) ayant un Rf légèrement plus petit et une couleur jaune. Par recristallisation du mélange H 16 et H 6, le premier est enrichi dans les liqueurs-mères. Purification finale par Chr. P. P. et recristallisation; F. 140/148–155°. Le spectre IR. de ce dérivé montre les bandes caractéristiques de la DNP du propanal, et en mélange avec un échantillon authentique (F. 153–154°), il ne présente pas de dépression du F.

Subst. H 17, Rf 0,33, crotonal-DNP. Nous avons pu isoler ce dérivé par l'intermédiaire des dérivés du dimédon lors d'une analyse préliminaire. L'hydrolyse alcaline des dérivés du dimédon a donné un mélange d'aldéhydes-DNP qui contenait, en plus des dérivés déjà décrits ici, un faible pourcentage de la DNP du crotonal. Dans l'analyse effectuée directement avec les DNP aucune trace de ce dérivé n'a pu être isolée. Ce dérivé est certainement un artéfact, formé par aldolisation de l'acétaldéhyde durant l'hydrolyse alcaline³⁸⁾.

Subst. H 10, Rf 0,20, acroléine-DNP. Un dérivé à Rf 0,20 accompagnait les fractions chromatographiques H 16 et H 6. Une séparation sur K-B n'a pas été possible. Nous avons alors séparé le mélange par Chr. P. P.; 25 mg de mélange ont fourni 8 mg de produit brut; après rechromatographie sur K-B on obtient 3,5 mg qui cristallisent dans un mélange alcool-eau; F. 155–161°. Le spectre IR. de ce jet montre deux vibrations caractéristiques d'une double liaison méthylénique (à 923 et 1002 cm^{-1}). Il est identique au spectre de l'acroléine-DNP (F. 160–161°).

Subst. H 0, Rf 0,20, acétaldéhyde-DNP. Ce dérivé constitue environ 95% des composants carbonylés de la framboise. Il est obtenu pur, directement, dans les dernières fractions du premier chromatogramme (tableau 7); fr. 13, F. 164–165,5°; après recristallisation dans un mélange CHCl_3 -hexane, F. 165–166°. Le F. du mélange et le spectre IR. confirment l'identité avec l'acétaldéhyde-DNP.

Subst. H 18A et H 18B, diacétyle-bis- et diacétyle-mono-DNP. La présence de ces dérivés dans la fraction A est probable, à en juger d'après des analyses qualitatives par Chr. P. et d'après la zone orange, très difficilement éluable, qui se forme lors de la chromatographie sur K-B. Nous n'avons pas isolé ces dérivés à l'état pur et le diacétyle ne se trouve qu'en traces dans nos distillats de framboise. Ceci se manifeste déjà par le fait que les jets de DNP sont entièrement solubles dans du benzène, tandis que le diacétyle-bis-DNP est pratiquement insoluble dans ce dissolvant.

B. *Analyse de la fraction V.* Ce jet a été obtenu de la façon suivante: Les vapeurs de distillation non condensées traversent trois barboteurs contenant une solution de DNPH dans de l'acide

³⁷⁾ F. G. FISCHER, L. ERTEL & K. LÖWENBERG, Ber. deutsch. chem. Ges. 64, 30 (1931).

³⁸⁾ M. WINTER & E. DEMOLE, Helv. 44, 271 (1961).

sulfurique dilué, refroidi à 0° (unité I¹). En général, il se forme un précipité dans les deux premiers barboteurs uniquement. Par filtration on obtient la fraction V. L'analyse de cette fraction (provenant de 5 opérations) a débuté également par un chromatogramme sur K-B; ensuite on a procédé comme pour la fraction A. Ceci nous a permis d'identifier les dérivés DNP des corps carbonylés suivants: 99% d'aldéhyde acétique et 1% d'un mélange d'hexène-3-al, hexène-2-al et hexanal.

C. *Analyse de la fraction B.* Les 8,4 g sont séparés au moyen du chloroforme en 6,4 g de cristaux insolubles (cristaux rouges, F. 195–199°, identifiés comme DNPH) et 2,0 g de cristaux solubles. Ces derniers sont séparés par chromatographie sur 60 g K-B en 14 fractions. Des premières fractions, on isole par sublimation du chloro-1-dinitro-2,4-benzène (Rf 0,18; système DD), provenant probablement d'une impureté présente dans le réactif DNPH utilisé. Dans les fractions suivantes (14 mg) on note au moyen de la Chr. P. la présence en petites quantités des dérivés DNP des hexanal, hexénal-3, hexénal-2 et propanal. La fraction suivante (10) est de nouveau séparée par Chr. P. P. De la large zone au Rf 0,33 on isole un dérivé jaune, F. 123–125°; le spectre IR. et le F. du mélange montrent qu'il s'agit de l'acétone-DNP (H 1).

La fraction 12 (éluee avec CHCl₃-MeOH, 10%) montre une seule tache avec un Rf de 0,05 (H 19) et donne une couleur brune intense caractéristique après traitement avec une solution d'alcali. Après deux recristallisations dans l'éthanol-H₂O, cristaux oranges F. 107 à 109°.

C₁₀H₁₂O₅N₄ Calc. C 44,78 H 4,51 N 20,89% Tr. C 44,99 H 4,89 N 21,21%

Par réaction à chaud avec un excès d'une solution alcoolique acide de DNPH on obtient le diacétyle-bis-DNP (F. > 300°, décomp.). Le F. du mélange et les spectres IR. du H 19 confirment son identité avec l'acétoïne-DNP racémique.

D. *Analyse de la fraction P.* Une première analyse qualitative par Chr. P. montre que cette fraction contient essentiellement de l'acétaldéhyde-DNP, accompagnée de traces de dérivés des homologues supérieurs déjà connus. Aucun nouveau dérivé ne se trouvant dans cette fraction, elle n'a pas été soumise à une analyse plus approfondie.

Les microanalyses et les mesures spectrophotométriques ont été effectuées dans notre service de chimie physique. Nous en remercions le Dr. E. PALLUY. Les spectres de masse ont été pris sur un instrument CONSOLIDATED 21-103 C; nous remercions le Prof. K. BIEMANN, MIT, Cambridge, U.S.A., de l'enregistrement et de l'interprétation de ces spectres.

SUMMARY

1. Preliminary investigations of raspberry oil have shown that carbonyls and alcohols are the most characteristic constituents.

2. The functional analysis of the volatile raspberry carbonyls *via* the 2,4-dinitrophenylhydrazones is described, showing the presence of fourteen carbonyl constituents: diacetyl, acetoin, acetaldehyde, acrolein, acetone, propanal, β,β -dimethylacrolein, 2-pentenal, *cis*-3-hexenal, 2-hexenal, 2-pentanone, hexanal, (+)- α -ionone and β -ionone.

Laboratoires de Recherches, FIRMENICH & CIE, Genève