

SUMMARY

Fulvene has been prepared by condensing cyclopentadiene with formaldehyde at -15° using sodium ethylate as a base. UV-, IR-, NMR.- and mass spectra as well as polarographic half-wave potentials have been recorded.

Organisch-chemisches Laboratorium
der Eidg. Technischen Hochschule Zürich
Institut für organische Chemie
der Universität Bern
Gerichtlich-medizinisches Institut
der Universität Bern

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] J. THIEC & J. WIEMANN, *Bull. Soc. chim. France* **23**, 177 (1956); **27**, 1066 (1960).
- [2] J. THIELE & H. BALHORN, *Liebigs Ann. Chem.* **348**, 1 (1906); J. THIELE, *Ber. deutsch. chem. Ges.* **33**, 666 (1900).
- [3] H. J. F. ANGUS, J. McDONALD BLAIR & D. BRYCE-SMITH, *J. chem. Soc.* **1960**, 2003.
- [4] H. J. F. ANGUS & D. BRYCE-SMITH, *J. chem. Soc.* **1960**, 1409.
- [5] M. NEUENSCHWANDER, DORIS MEUCHE & H. SCHALTEGGER, *Helv.* **46**, 1760 (1963), **47**, 1022 (1964).
- [6] G. VAN DYKE TIERS, *Tables of τ -values*, Minnesota 1958.
- [7] B. B. PULLMAN & A. PULLMAN, *Les Théories électroniques de la Chimie organique*, Paris 1952, p. 545.
- [8] J. A. POPLE, W. G. SCHNEIDER & H. J. BERNSTEIN, *High-resolution Nuclear Magnetic Resonance*, New York 1959.
- [9] PH. FRANÇOIS & A. JULG, *J. Chim. phys.* **57**, 490 (1960).
- [10] H. BLATTMANN, DORIS MEUCHE & E. HEILBRONNER, *Helv.* (in Vorbereitung).
- [11] B. WILHALM, DORIS MEUCHE & M. NEUENSCHWANDER, *Helv.* (in Vorbereitung).
- [12] W. v. FREIESLEBEN, *Angew. Chem.* **75**, 576 (1963).

134. Recherches sur les arômes

10^e communication [1]¹⁾

Sur l'arôme des fraises fraîches.**Analyse des composés carbonylés, esters et alcools volatils**

par M. Winter et B. Willhalm

(14 V 64)

En entreprenant ce travail, notre but était d'examiner la nature de l'arôme des fraises fraîches. Nous avons déjà publié quelques résultats préliminaires il y a quelques années [2]. Les premières notions sur les composants de cet arôme ont été acquises grâce aux travaux de COPPENS & HOEJENBOS [3]. Par la suite, de nombreux autres chercheurs se sont attaqués à ce sujet [4–11]; voici une récapitulation des substances volatiles trouvées, classées d'après leur groupe fonctionnel:

¹⁾ Les chiffres entre crochets renvoient à la bibliographie, p. 1227.

Alcools: méthanol [2] [5] [6], éthanol [2] [5] [6], n-propanol [6], butanol-1 [6], butanol-2 [6], isobutanol [6], pentanol-1 [6], pentanol-2 [6], alcool isoamylique [3] [6] [7], hexanol [3] [6], hexène-2-ol-*trans* [6], éthyl-2-hexanol²⁾ [2], *d, l*- α -terpinéol [3], *l*-(+)-bornéol [3], terpine [3], «cis-terpinol-hydrate» [4], phényl-2-éthanol [7], *p*-hydroxyphényl-2-éthanol [7] et alcool isofenchylique [3] (à confirmer).

Composés carbonylés: acétaldéhyde [2] [5] [10], n-butanal [4], hexanal [2], hexène-2-al [2] [5], acétoheptanal [2] [5] [10], méthyl-3-butanone-2 [10], acétophénone [4] et diacétyle [2] [3] [4] [5].

Esters: acétate de méthyle [10], acétate d'éthyle, [3] [10], acétate de butyle [6], acétate d'isoamyle [6], acétate d'hexyle [6], acétate d'hexène-2-yle-*trans* [6], propionate d'éthyle [10], butyrate de méthyle [10], butyrate d'éthyle [6], isobutyrate de méthyle [10], isobutyrate d'éthyle [10], valérate et isovalérate d'éthyle [6], caproate d'éthyle [6], cinnamate d'éthyle [6], salicylate d'éthyle [3], en plus un formiate et un benzoate [3] ont été signalés, et l'acétoacétate d'éthyle [4] (supposé).

Acides, libres ou sous forme estérifiée: formique [2] [3] [10], acétique [2] [3] [4] [5] [6] [10], propionique [2] [10], butyrique [2] [5] [6] [10], isobutyrique [2] [5] [10], n-valérique [2] [5], isovalérique [6], caproïque [2] [3] [4] [5], benzoïque [3], cinnamique [3] [4] [7], salicylique [3] [7] et succinique [7].

Divers: acétoïne [3]; plusieurs acétals: diméthoxyméthane, diméthoxy-1,1-éthane, méthoxy-1-éthoxy-1-éthane, diéthoxy-1,1-éthane, éthoxy-1-propoxy-1-éthane [10], H₂S [1], CH₃SH [1], CH₃SSCH₃ [1]; maltol [11].

Il s'agit donc en tout de 66 composés dont quelques-uns ne sont que probables. Dans plusieurs cas, manquent également des preuves de l'identification. Lorsqu'on compare les résultats obtenus par les différents chercheurs, on est frappé par leur discordance, qu'on peut expliquer d'une part par la diversité des techniques analytiques utilisées. Il est clair que chaque progrès réalisé dans ce domaine a permis d'isoler et d'identifier de nouvelles substances. D'autre part, les procédés d'extraction et l'enrichissement de l'arôme peuvent également se refléter dans les résultats analytiques. Ainsi, certains auteurs sont partis du jus de fraises (plus ou moins fermenté), et d'autres, de fraises congelées ou encore de condensats obtenus lors de la préparation de confitures. En outre, des traitements très différents ont été utilisés pour enrichir l'arôme (extractions, distillation, etc.). A part ces facteurs expérimentaux, le résultat d'analyse peut encore dépendre de la variété et de la qualité des fruits.

Nos recherches ont débuté par l'étude des possibilités d'approvisionnement en fraises aromatiques et de première qualité. Vu la fragilité de ces fruits, il fallait tenir compte de leur provenance, des possibilités d'acheminement rapide, du volume de la récolte, du degré de maturité et encore des conditions météorologiques avant la cueillette. Malgré les inconvénients d'un transport plus long, nous avons finalement préféré la variété «*Surprise des halles*» importée de la région de Lyon, à une variété cultivée abondamment en Suisse, «*Madame MOUTOT*». En effet, cette dernière donnait un extrait bien moins aromatique. L'acheminement des fraises vers le laboratoire se faisait soit par train, soit par camion. Entre la récolte et le traitement des fruits s'écoulaient de 20 à 36 heures. Des fruits cueillis très mûrs étaient parfois légèrement abîmés à l'arrivée.

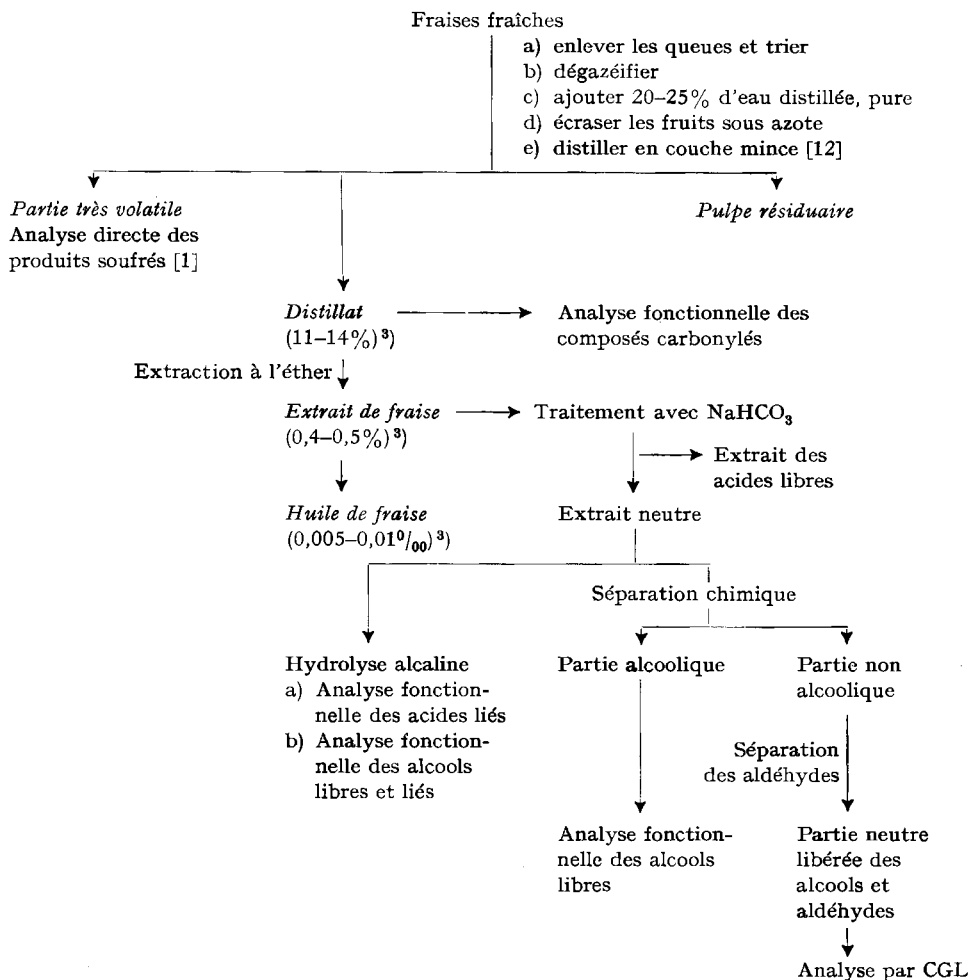
L'isolement et l'enrichissement de l'arôme se faisaient suivant un procédé spécial, récemment décrit [12]: préparation d'une purée de fraises dans une atmosphère appauvrie en oxygène; distillation immédiate en continu de cette purée dans deux évaporateurs à couche mince. *Les distillats aqueux* contenant l'arôme enrichi environ 8 fois, sont extraits en continu par un petit volume d'éther (600 ml pour 20 l de distillat

²⁾ Artéfact, voir ce travail, page 1220.

aqueux); *cet extrait de fraise* contient l'arôme enrichi d'environ 150 à 200 fois. Nous voudrions souligner l'importance de l'extraction avec un petit volume d'éther. En effet, la concentration de solutions étherées trop diluées – même dans de très bonnes colonnes de fractionnement – occasionne des pertes sensibles en substances volatiles. Ceci a été confirmé récemment pour les esters méthyliques des acides aliphatiques C_2 à C_8 , par STEDMAN & MILLER [13].

Par des études préliminaires, organoleptiques, chimiques et physicochimiques, les renseignements suivants sur le caractère et la chimie de l'arôme de fraise fraîche ont pu être obtenus:

a) Les distillats aqueux frais et redilués à la concentration initiale reproduisent très fidèlement l'arôme de fraise fraîche, mais certaines notes caractéristiques (du

Tableau 1. *Schéma de l'analyse immédiate*

³⁾ Par rapport au poids des fruits

genre soufré) sont extrêmement instables. En manipulant les distillats à basse température et sous azote, on réussit à retarder ces détériorations. En passant à l'extrait de fraise et, par évaporation complète du dissolvant, à l'*huile de fraise*, une détérioration plus accentuée de certaines notes caractéristiques se manifeste, et l'*huile de fraise*, tout en gardant encore un arôme caractéristique, n'a plus, après redilution, la fraîcheur et la finesse des distillats initiaux.

b) L'arôme caractéristique des distillats semble être dû: en premier lieu à des composés sensibles à l'alcali (acides, esters, etc.); à des substances non caractérisables, instables; à des composés carbonylés. Les alcools sont peu caractéristiques.

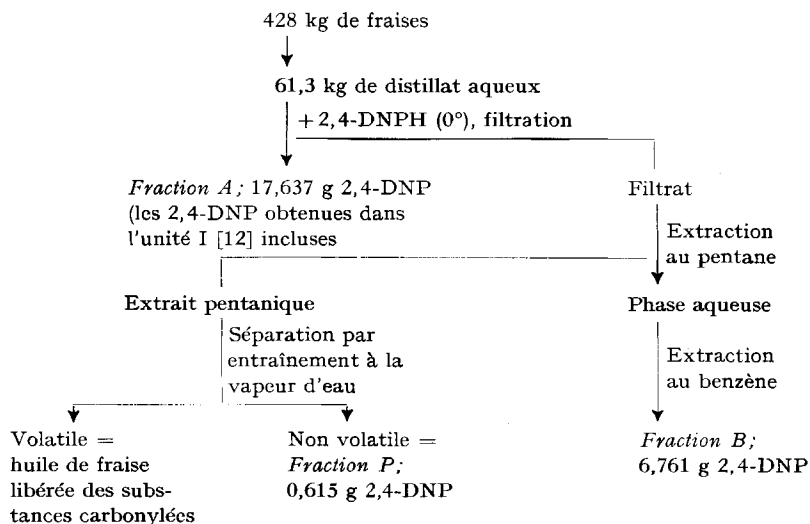
c) Les groupes fonctionnels dominants de l'*huile de fraise neutre* sont les carbonyles et les esters, 80 à 90% du carbone total présent dans les distillats de fraise appartiennent aux molécules qui possèdent ces fonctions d'après les résultats de nos différentes analyses ([12], tableau 2).

d) La chromatographie en phase gazeuse met bien en évidence la présence d'un grand nombre de composés.

Ces travaux préliminaires nous ont amenés à suivre la voie d'analyse tracée schématiquement dans le tableau 1. Les parties très volatiles ont été soumises à une analyse directe partielle, déjà décrite ailleurs [1]. Les composés carbonylés ont été isolés directement des distillats aqueux sous forme de dinitro-2,4-phénylhydrazones. D'autre part, nous avons préparé par des traitements chimiques classiques un extrait neutre, débarrassé des aldéhydes et des alcools. Cet extrait, riche en esters, a été analysé au moyen de la chromatographie en phase gazeuse. Pour faciliter l'identification de ces esters, nous avons préalablement analysé au moyen de dérivés leurs acides d'une part, et, d'autre part leurs alcools plus les alcools libres.

A. Analyse des composés carbonylés. — Nous avons précipité ces composés dans les distillats aqueux au moyen de la dinitro-2,4-phénylhydrazine (2,4-DNPH) suivant le tableau 2. Les trois jets de dinitro-2,4-phénylhydrazones (2,4-DNP) obtenus

Tableau 2. Schéma de précipitation des composés carbonylés



(A, B, P) ont ensuite été séparés par la technique chromatographique appliquée lors de l'analyse des 2,4-DNP de la framboise [14]. Le résultat de l'analyse est résumé dans le tableau 3. Comme nouvelles substances carbonylées, nous avons pu identifier le propanal, l'acroléine, le crotonal, le pentène-2-al, l'hexène-3-al-*cis*, la pentanone-2 et l'heptanone-2. Par contre, nous n'avons pu trouver ni le butanal ni l'acétophénone

Tableau 3. 2,4-DNP-dérivés isolés du distillat de fraise

Désignation ^{a)}	Rf ^{b)}	2,4-DNP de	Moyens d'identification utilisés	Composition des fractions			Concentration des carbonyles libres, en ppm ^{c)}
				A	B	P	
E 20	0,00	Diacétyle bis	Chr. P. ^{c)} , IR., F.	+	+		<i>F</i>
E 21	0,10	Diacétyle mono	Chr. P.	+	+		<i>F</i>
E 16	0,20	Acétaldéhyde	Chr. P., IR., F. mélange, analyse C, H ^{d)}	+	+	+	1,8
E 10	0,23	<i>Acroléine</i>	Chr. P., IR., F.	+			<i>Tr</i>
E 12	0,32	<i>Crotonal</i>	Chr. P., IR., F. mélange	+			<i>Tr</i>
E 17	0,33	Acétone	Chr. P., IR., F. mélange, analyse C, H	+	+	+	3,0
E 11	0,34	<i>Propanal</i>	Chr. P., IR., F. mélange	+			<i>Tr</i>
E 1	0,45	<i>Pentène-2-al</i>	Chr. P., IR.	+	+	+	<i>F</i>
E 13	0,53	<i>cis-Hexène-3-al</i>	Chr. P., IR., F. mélange,	+			<i>F</i>
E 18	0,55	Hexène-2-al	Chr. P., IR., F. mélange, analyse C, H	+	+	+	6,35
E 9	0,59	<i>Pentanone-2</i>	Chr. P., IR., F. mélange	+			<i>Tr</i>
E 19	0,65	Hexanal	Chr. P., IR., F. mélange	+		+	<i>M</i>
E 8	0,74	<i>Heptanone-2</i>	Chr. P., IR.	+			<i>F</i>
E 15	0,82	non identifié		+			<i>Tr</i>

^{a)} Numérotation des taches des chromatogrammes sur papier (fig., p.1224).

^{b)} Rf corrigé (acétaldéhyde-2,4-DNP = 0,20); système diméthylformamide-décaldine [15].

^{c)} Les Rf ont été déterminés dans les systèmes diméthylformamide-décaldine [15] et cyclohexane-cyclohexène [16].

^{d)} Analysé comme dérivé dimédon.

^{e)} Echelle des concentrations: *M* = 1–0,1 ppm; *F* = 0,1–0,01 ppm; *Tr* < 0,01 ppm.

[4], signalés antérieurement. La dernière substance pourrait être un artéfact dû à une fermentation. Le diacétyle doit se former par un mécanisme semblable, car nous avons constaté que des fruits tout à fait frais n'en contiennent point. Il a d'ailleurs été démontré par d'autres auteurs que la qualité de certains jus de fruits diminue avec l'accroissement du taux de diacétyle présent, ou de son précurseur, l'acétoïne [17].

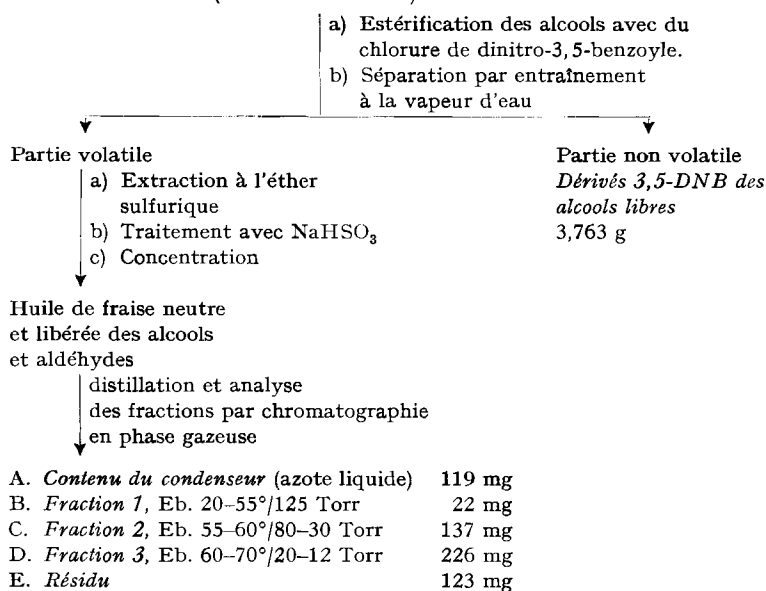
On constate que l'hexénal-2, l'acétone et l'acétaldéhyde sont de loin les substances carbonylées les plus abondantes. Quant à l'hexénal-2, nous avons déjà pu montrer que sa concentration varie avec la quantité d'oxygène présent au moment du broyage des fruits [2], cette concentration allant de 0,25 ppm (dans de l'azote pur) à 10,1 ppm (dans un mélange azote-air, 1:1). La formation des 0,25 ppm d'hexénal-2 dans une atmosphère d'azote s'explique par le fait qu'on n'arrive pas à éliminer les dernières traces d'oxygène incluses dans les fraises. Il s'ensuit que la fraise intacte ne contient pas d'hexénal-2. D'autre part, DIMICK & MAKOWER [5] ont montré que des fraises intactes chauffées ou congelées ne produisent plus d'hexénal-2 lors d'un broyage

ultérieur à l'air. En conclusion, cet aldéhyde semble se former sous l'action d'un enzyme agissant sur un substrat inconnu, et seulement en présence d'oxygène. Une formation analogue d'hexénal-2 dans des feuilles vertes a été signalée par NYE & SPOEHR [18] et MAJOR et collab. [19]. Il serait intéressant d'établir s'il s'agit dans tous ces cas d'une réaction enzymatique subie par le même substrat.

Quant à l'origine des autres composés carbonylés, plusieurs hypothèses peuvent être envisagées. Pour les méthylcétones qui sont toutes à nombre impair d'atomes de carbone, leur formation par décarboxylation d'acides β -cétoniques semble plausible. La décarboxylation oxydative enzymatique de l'alanine et de la thréonine fournirait l'acétaldéhyde et l' α -hydroxypropanal, ce dernier se déshydratant en acroléine. L'alanine et la thréonine sont en effet les plus abondants des acides aminés simples, à côté de traces de valine et de leucine [20], qui pourraient donner les aldéhydes isobutyrique et isovalérique pas encore décelés à ce jour. Le *cis*-hexène-3-al et l'hexanal pourraient être formés par dégradation oxydative des acides linoléique et linolique [21].

B. Analyse chimique des alcools et esters. – Les alcools libres ont été isolés de l'extrait de fraise neutre sous forme de leurs dinitro-3,5-benzoates [22] (voir tableau 4) en suivant la technique antérieurement décrite dans l'analyse des alcools de l'huile de

Tableau 4. *Séparation et fractionnement des alcools*
Extrait de fraise neutre provenant de 300 kg de fruits (Tableau 1)
(concentré à 150 ml)



framboise [23]. Le mélange des dérivés a été séparé par chromatographie sur colonne et sur papier. Nous avons pu identifier finalement les sept alcools figurant au tableau 5, et dont deux n'avaient pas encore été signalés comme constituants de la fraise, soit le pentène-1-ol-3 et l'heptanol-2. Deux dérivés n'ont pas pu être identifiés; de plus, nous n'avons plus pu retrouver l'éthyl-2-hexanol, signalé antérieurement [2]. Des vérifi-

Tableau 5. 3,5-DNB isolés de l'extrait de fraise neutre

Désignation	Rf ^{a)}	3,5-DNB du	Moyens d'identification utilisés	Concentration en alcool libre, en ppm ^{b)}
L 10	0,18	Méthanol	Chr. P., F. mélange, IR.	F
L 9	0,32	Ethanol	Chr. P., F. mélange	1,51
L 6	0,55	Butanol-1	Chr. P., F. mélange	F
L 4	0,55	<i>Pentène-1-ol-3</i>	Chr. P., F. mélange, IR.	F
L 5	0,61	non identifié		Tr
L 2	0,64	non identifié		Tr
L 3	0,65	Hexène-2-ol- <i>trans</i>	Chr. P., F. mélange, IR.	M
L 8	0,71	Hexanol-1	Chr. P., F. mélange, IR.	M
L 1	0,77	<i>Heptanol-2</i>	Chr. P., IR., MS.	F

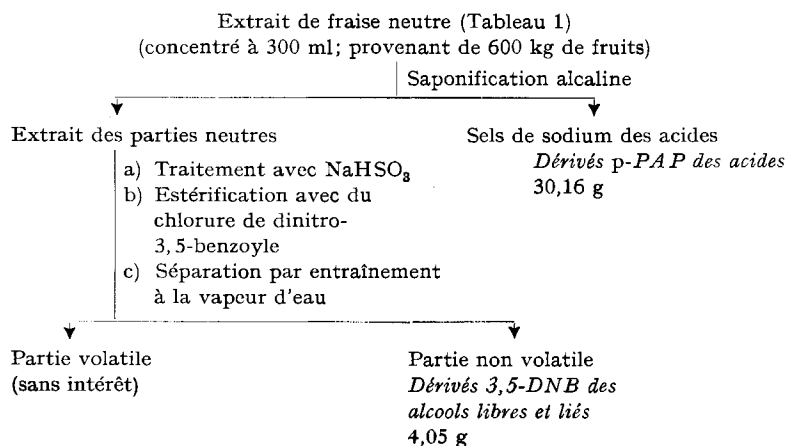
a) Rf corrigé (alcool éthylique = 0,32), système diméthylformamide – décaline [24].

b) Echelle des concentrations: M = 1–0,1 ppm; F = 0,1–0,01 ppm; Tr < 0,01 ppm.

cations ont confirmé que cet alcool n'est pas présent dans la fraise. Il a dû être introduit comme artéfact lors de notre première analyse (origines supposées: caoutchouc synthétique ou graisse pour rodages). Nous n'avons pas pu déceler non plus un bon nombre des alcools cités plus haut et isolés par d'autres auteurs.

Une autre portion du même extrait de fraise neutre a été traité suivant le tableau 6. Après une hydrolyse alcaline ménagée (voir partie expérimentale) les acides engendrés ont été transformés en *p*-phényl-azophénacylates (*p*-PAP) [25]. Après des séparations

Tableau 6. Traitement de l'extrait neutre après saponification



chromatographiques multiples, on a pu identifier au moyen des valeurs Rf, des F. et F. de mélanges, et des spectres IR. les dérivés des acides suivants: acétique, propionique, butyrique, valérique (mélange d'isomères), caproïque et caprylique. Des esters de tous ces acides doivent par conséquent se trouver dans l'huile de fraise.

De la partie neutre de l'hydrolysats alcalin nous avons de nouveau isolé les alcools comme dinitro-3,5-benzoates. Ce mélange de dérivés contient donc aussi bien ceux des alcools libres que ceux des alcools liés aux esters. Par suite d'un incident technique

lors d'une chromatographie sur colonne, l'analyse de ce mélange n'a pas pu se faire avec la précision espérée. Néanmoins, les dérivés des alcools suivants ont pu être identifiés: méthanol (utilisé comme dissolvant), éthanol, propanol-1, propanol-2, butanol-1, hexanol-1, heptanol-2, pentène-1-ol-3 et l'hexène-2-ol-1-*trans*. En plus des alcools déjà signalés dans le tableau 5, nous avons donc encore trouvé les propanol-1 et propanol-2. Des esters de ces alcools doivent donc faire partie de l'huile de fraise.

C. Analyse des esters par chromatographie en phase gazeuse (CGL). – L'huile de fraise neutre et débarrassée des alcools et aldéhydes, a été distillée dans une

Tableau 7. *Analyse par chromatographie en phase gazeuse des fractions A–E, Tableau 4*

Pic Nr.	Origine	Col. NP ^{a)}		Col. P ^{b)}		Substance	Moyens d'identi- fication	Concen- tration dans les fruits en ppm ^{d)}
		Temp. Colonne	T _R ^{c)}	Temp. Colonne	T _R ^{c)}			
1	fr. A, B, C	100°	50	120°	56	Acétate d'éthyle	T _R	F
2	fr. A	100°	70			Chloroforme (diss.)	T _R , SM	Tr
3	fr. A	100°	88			Acétate de propyle	T _R , SM	Tr
4	fr. A, B, C	100°	91 (épaule)	120°	83	Propionate d'éthyle	T _R , SM	F
5	fr. A, B, C	100°	99	120°	96	Butyrate de méthyle	T _R , SM	M
6	fr. A, B, C, D	100°	146	120°	117	—	—	F
7	fr. A, B, C, D	100°	167	120°	131	Butyrate d'éthyle	T _R , SM	M
8	fr. A, B, C, D	100°	187	120°	144	Acétate de n-butyle	T _R , SM	F
9	fr. D	150°	75			Butyrate d'isopropyle	T _R , SM	F
10	fr. A, B, C, D	150°	84	150°	89	—	T _R , SM	F
11	fr. D	150°	85	150°	115	Crotonate d'éthyle	T _R , SM	F
12	fr. A, D	150°	95	150°	102	Acétate d'isoamyle	T _R , SM	F
13	fr. D	150°	113			Heptanone	T _R , SM	F
14	fr. A, D	150°	125	150°	134	Caproate de méthyle	T _R , SM	M
15	fr. D, E	150°	181	150°	173	Caproate d'éthyle	T _R	M
16	fr. D, E	150°	188 (épaule)	150°	241	Acétate d'hexène-2- yle- <i>trans</i>	T _R , SM	F
17	fr. D, E	150°	192 (épaule)	150°	202	Acétate d'hexyle	T _R , SM	M
18	fr. E	200°	113			—	—	F
19	fr. E	200°	132	200°	140	Butyrate d'hexène-2- yle- <i>trans</i>	T _R , SM	F
20	fr. E	200°	135 (épaule)	200°	125	Butyrate d'hexyle	T _R , SM	F
21	fr. E			200°	269	Alcool benzylique	T _R , SM	Tr
22	fr. E	200°	157			—	—	Tr
23	fr. E	200°	198			—	—	Tr
24	fr. E	200°	239			—	—	Tr
25	fr. E	200°	260			—	—	Tr
26	fr. E	200°	302			—	—	Tr
27	fr. E	200°	455	200°	810	—	—	M

a) Apiézon L sur Célite, 70–100 mesh, 40:60.

b) Emulphor O sur Célite, 70–100 mesh, 40:60.

c) Temps de rétention exprimé en min.

d) Echelle des concentrations: M = 1–0,1 ppm; F = 0,1–0,01 ppm; Tr < 0,01 ppm.

colonne micro-CRAIG et recueillie en les fractions A à E, tableau 4. Chaque fraction a été analysée par CGL sur deux colonnes: l'une polaire et l'autre non polaire. Les pics étaient identifiés d'abord par comparaison de leur temps de rétention avec celui de substances de référence. Dans le choix de celles-ci, nous étions guidés par le résultat précieux de l'analyse fonctionnelle des fragments acides et alcooliques des esters décrits sous B. En outre, dans la plupart des cas nous avons analysé les éluats des pics chromatographiques par spectrométrie de masse (SM).

Les résultats de ces analyses sont récapitulés dans le tableau 7. Parmi les 16 esters identifiés se trouvent 6 qui n'ont pas encore été signalés comme constituants de la fraise: l'acétate de propyle, le caproate de méthyle (un composé majeur) le crotonate d'éthyle, puis les butyrates de propyle-2, d'hexène-2-yle-*trans* et d'hexyle. Plusieurs autres pics ne sont pas encore identifiés; certains d'entre eux correspondent à des composés présents en concentration très faible. Suivant leurs T_R il pourrait s'agir d'esters supérieurs. Leur identification exigerait la mise en œuvre de davantage de produit de départ.

Les concentrations indiquées dans les tableaux 3, 5 et 7 sont celles trouvées dans nos distillats. Dans les fruits, ces concentrations peuvent être sensiblement différentes, suivant les substances, du fait que l'entraînement de l'arôme par la vapeur d'eau n'est pas quantitatif.

En conclusion, ce travail a permis d'identifier 15 nouveaux composés dans l'arôme de fraise fraîche. Un bon nombre de substances signalées antérieurement n'a pas pu être confirmé. D'autre part, on n'a pas réussi à identifier toutes les substances décelées au cours de ce travail. Bien des recherches seront encore nécessaires pour connaître la composition complète de cet arôme exquis.

Nous remercions la Direction de la maison FIRMENICH & CIE et M. M. STOLL, Directeur scientifique, de nous avoir permis de publier ces résultats.

Nos remerciements s'adressent également au Prof. K. BIEMANN, M. I. T., Cambridge (U. S. A.), pour la prise et l'interprétation des spectres de masse, au laboratoire physico-chimique (E. PAL-LUY) pour la mesure des spectres infrarouges et l'exécution des micro-analyses, et enfin au laboratoire de M. E. SUNDT pour l'exécution des chromatographies sur papier, et à MM. L. SOETET †, W. D. GRAHAM et CH. A. VODOZ pour les analyses organoleptiques.

Partie expérimentale

Avec la collaboration technique de P. ENIGIST et R. CHAPPAZ

Tous les réactifs utilisés ont été de la qualité «pour analyse». Tous les dissolvants et l'eau [12] ont été spécialement purifiés dans notre laboratoire; l'éther notamment a été libéré de toute trace d'alcools, de composés carbonylés et de peroxydes et redistillé, juste avant emploi. 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: 2,4-DNPH = dinitro-2,4-phénylhydrazine; 2,4-DNP = dérivé dinitro-2,4-phénylhydrazine; 3,5-DNB = dinitro-3,5-benzoate; *p*-PAP = *p*-phénylazophénacylate $C_6H_5-N=N-C_6H_4CO-CH_2OCOR$; Chr. P. = chromatographie analytique sur papier; Chr. P. P. = chromatographie préparative sur papier. Système DD = Chr. P. dans le système diméthylformamide-décane [15]; système CC = Chr. P. dans le système cyclohexane-cyclohexène [16]; système PD = Chr. P. en phase inverse sur papier imprégné d'huile de paraffine, avec diméthylformamide- H_2O comme phase mobile [26]. Intensité des taches sur Chr. P.: *ww* = traces, *w* = faible, *m* = moyen, *s* = fort, *ss* = très fort. SM. = spectre de masse.

A. Analyse des composés carbonylés

I. *Préparation des 2,4-DNP.* 428 kg de fraises (fraise de la région lyonnaise, France; variété « Surprise des halles », récolte 1957) ont été distillés en 3 opérations, dans les conditions dites normales décrites antérieurement [12]. Les 61,3 kg de distillat, y compris le contenu des condenseurs, contenaient au total 92,8 mmoles de substances carbonylées, selon les dosages par micro-oximation [12]. Les distillats de chaque opération ont été immédiatement traités avec une « solution standardisée » [12] de 2,4-DNPH dans de l'acide sulfurique (au total avec 155 mmoles de réactif), à une température de 1–3°. Un trouble apparaît immédiatement et après quelques minutes, un précipité de couleur jaune à orange se forme. Après 15–18 h de réaction à 3°, le précipité est séparé par filtration et soigneusement lavé à neutralité; rendement: 17,637 g (tableau 2, fraction A). Le filtrat est ensuite soumis au traitement résumé dans le tableau 2, aboutissant à la fraction P des 2,4-DNP solubles dans le pentane et à une fraction B des 2,4-DNP solubles dans le benzène.

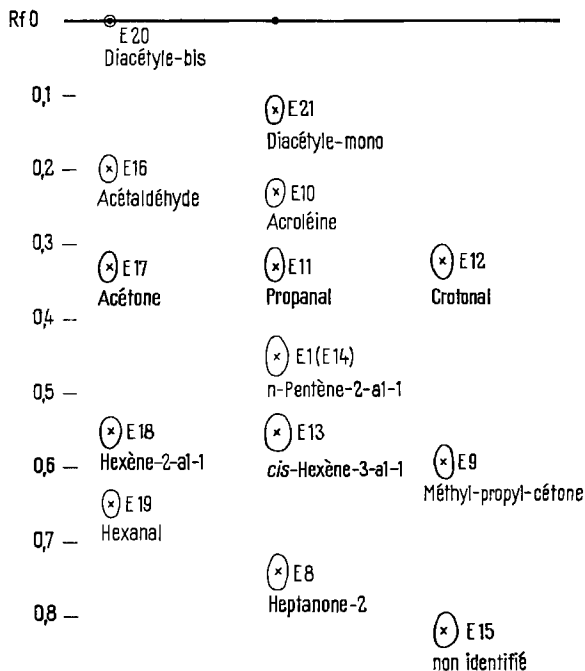
II. *Analyse des 2,4-DNP. Analyse de la fraction A.* La Chr. P. (système DD) montre les taches suivantes: Rf 0 (*ww*), 0,20 (*s*), 0,33 (*s*), 0,55 (*s*), 0,65 (*w*). On sépare d'abord 45 mg de dérivé insoluble dans le benzène (E 20), Rf 0, IR. et F. identiques à ceux du *diacétyl-bis-DNP*. La partie soluble est séparée une première fois, en sept opérations, sur des colonnes chromatographiques de terre d'infusoires-bentonite [27] (12–13% H₂O). Les 73 fractions séparées sont examinées par Chr. P. dans les deux systèmes DD et CC. Ces analyses montrent que la majorité des fractions sont encore des mélanges. D'autre part, nous n'avons plus observé les décompositions et transformations constatées lors de l'analyse précédente où l'acide silicique ou le mélange acide silicique – célite avaient été utilisés comme support [2].

Pour la suite de l'analyse on réunit les fractions de composition semblable et répète systématiquement les séparations chromatographiques sur colonne et sur papier, ce qui fait apparaître successivement les taches chromatographiques des dérivés 2,4-DNP représentés dans la fig.

Chromatographie sur papier des dinitro-2,4-phénylhydrazones de la fraise

Schéma des taches

(Système DD) (15)



Comme on l'a dit plus haut, on n'a pu reconnaître que les 5 taches de la colonne gauche dans le chromatogramme de la fraction A initiale, la concentration des autres dérivés étant alors trop petite. La séparation totale du mélange a nécessité environ 50 chromatographies sur colonne et 40 chromatographies préparatives sur papier. La purification finale des dérivés se fait par recristallisation dans un dissolvant approprié, et leur identification est accomplie par les moyens indiqués dans le tableau 3 et par comparaison avec des dérivés authentiques. La structure de l'hexène-3-al-*cis*-DNP (E 13) a encore été prouvée par sa conversion en milieu acide en hexène-2-al-2,4-DNP. Quant au dérivé E 1, son spectre IR. et ses Rf correspondaient bien à ceux du pentène-2-al-2,4-DNP authentique. La micro-ozonolyse donnait du propanal. Pourtant, le F. du dérivé du produit naturel a été trouvé à 149–152°, tandis que la pentène-2-al-2,4-DNP synthétique fond à 159–161°. Le F. du mélange s'est situé également entre 149–152°. Nous pensons que cette différence des F. ne peut s'expliquer que par une isomérisation *cis-trans* de la double liaison carbone-azote, la double liaison carbone-carbone des aldéhydes α,β -insaturés possédant toujours la géométrie *trans*.

Analyse de la fraction B. Au moyen de CHCl_3 on a séparé 5,280 g (78,3%) de substance rouge insoluble, identifiée au réactif 2,4-DNPH. La partie soluble est séparée sur terre d'infusoires-bentonite en 14 fractions. Leur analyse par Chr. P. a révélé les substances énumérées dans la colonne B du tableau 3. 17,7% de la fraction B sont attribuables aux dérivés de l'acétaldéhyde et de l'acétone. Aucun nouveau dérivé n'a pu être décelé dans cette fraction.

Analyse de la fraction P. Une simple analyse par Chr. P. P. a révélé la présence des dérivés de l'acétaldéhyde (ss), l'acétone (ss), l'hexénal-2 (w), l'hexanal (ww), le penténal-2 (ww) et de traces de réactif. Là également, il n'y avait aucun indice de la présence d'un nouveau dérivé.

Comme les détails expérimentaux de toutes les séparations sont analogues à ceux de l'analyse des substances carbonylées de la framboise [14], ils ne seront pas décrits ici.

Les 6,35 ppm d'hexène-2-al trouvées dans les fr. A, B et P correspondent à 98,3% de la quantité d'aldéhydes dosés globalement par mesure de la densité optique des distillats à 226 $\mu\mu$ [12]. La différence de 1,7% est due sans doute à l'absorption de l'acroléine et du pentène-2-al, les seuls composés isolés qui absorbent également dans cette région. Quant à la totalité des carbonyles (92,8 mmoles), nous n'avons pu en retrouver – suivant le bilan de notre analyse – que 73,4 mmoles. Nous pensons que la perte de 19,4 mmoles est due essentiellement à la solubilité des dérivés de composés carbonylés inférieurs (acétaldéhyde et acétone).

B. Analyse chimique des alcools et esters

I. Analyse des alcools libres (tableaux 4 et 5). 36 kg de distillat provenant de 300 kg de fraises (mélange, env. 90% variété « Surprise des halles » et 10% « Madame MOUTON », récolte 1959) sont extraits à l'éther, sous azote et à 2°, dans l'appareillage décrit antérieurement ([12], Fig. 4). L'extrait (1200 ml) est soigneusement concentré à 300 ml dans une colonne de fractionnement en verre (hauteur 1 m, remplissage d'hélices en verre, colonne surmontée d'une tête à reflux réglable). Le concentrat est lavé 4 fois à froid avec NaHCO_3 (3 décanteurs), ensuite à l'eau. On concentre la liqueur dans la même colonne à 150 ml et la sèche, sur des bâtonnets de LINDE, type 4A". On ajoute ensuite 10 g de chlorure de dinitro-3,5-benzoylé dans 200 ml de pyridine anhydre et laisse réagir pendant $3\frac{1}{2}$ jours à température ambiante. Traitement: lavages à froid (env. 2°) (3 décanteurs), 8 fois avec H_2SO_4 , 10%, 2 fois à l'eau, 6 fois avec NaOH, 10%, et à l'eau jusqu'au pH neutre. On distille l'éther dans la même colonne de fractionnement. Le résidu est distillé à la vapeur d'eau sous 50 Torr, dans un courant d'azote. On place deux condenseurs refroidis à –80° après le récepteur du distillat, pour retenir les parties volatiles entraînées. En tout, on recueille 500 ml de distillat aqueux; durée de l'opération 5 heures.

Le distillat et le contenu des condenseurs sont extraits à l'éther. Cet extrait contient les parties neutres débarrassées des alcools. La suite de leur traitement est décrite sous C, p. 1226.

Le résidu de l'entraînement à la vapeur est extrait avec un mélange hexane-benzène (1:1). Après concentration on obtient 3,763 g de 3,5-DNB bruts. Ils sont séparés une première fois en 34 fractions sur une colonne de 200 g d'acide silicique (MALLINCKRODT pour chromatographie, 100 « mesh », désactivé à une teneur d'eau de 18%); élution par gradient avec hexane-chloroforme, 5:1/méthanol. La composition des fractions est examinée par Chr. P. [16] et les mélanges sont rechromatographiés, d'abord sur le même support, puis sur terre d'infusoires-bentonite [23] (teneur en eau 13–14%), ou encore on sépare par Chr. P. P. (systèmes DD et CC). Finalement, les jets enrichis sont purifiés par cristallisation et identifiés de la façon indiquée dans le tableau 5.

Le dérivé 3,5-DNB de l'heptanol-2 naturel fondait à 57–58°. Son SM et son spectre IR. sont identiques à ceux du dérivé 3,5-DNB de l'heptanol-2 racémique, mais qui fond à 46–47°. Nous pensons que le dérivé naturel est un antipode optiquement actif; malheureusement nous n'avions pas assez de substance sous la main pour déterminer son pouvoir rotatoire.

II. Analyse des esters (tableaux 6). L'extrait étheré provenant de 72 kg de distillat (600 kg de fraises), identique à celui mentionné sous I, a été préconcentré, lavé avec NaHCO_3 et concentré à 300 ml (voir sous B. I (p. 1225)).

Hydrolyse des esters: On mélange la solution étherée avec une solution de 3,6 g de NaOH (90 mmoles) dans 5 ml d'eau et 60 ml de méthanol et maintient sous azote pendant 48 h à 40°, et ensuite 60 h à 25°. Ensuite, on ajoute 20 ml d'eau et, sépare par la voie habituelle en parties acides et neutres au moyen de 4 ampoules à décanter. Les parties neutres sont encore lavées avec de petits volumes d'eau pour éliminer le méthanol. Après 10 lavages, il n'en subsiste que des traces⁴⁾.

Analyse des alcools de la fraction neutre. La solution étherée des parties neutres est d'abord agitée avec 100 ml d'une solution de NaHSO_3 à 20%, puis lavée au NaHCO_3 et à l'eau. On concentre à 400 ml, sèche sur des bâtonnets de LINDE et ajoute une solution de 55,2 g de chlorure de dinitro-3,5-benzoyl dans 650 ml de pyridine. Après 3 jours de réaction à 25°, on traite comme indiqué plus haut sous B. I (p. 1225). Les 4,05 g de dérivés bruts sont séparés de façon analogue par chromatographie sur acide silicique (MALLINCKRODT, 100 mesh) et terre d'infusoires-bentonite. Par mégarde, on a utilisé une bentonite trop active (environ 7% d'eau). Pour éluer les dérivés, on a dû utiliser des concentrations élevées de méthanol, provoquant une transestérification d'un important pourcentage des 3,5-DNB, en dérivé méthylique. Néanmoins, les alcools cités plus haut (p. 1222) ont pu être identifiés.

Analyse des parties acides. Les phases aqueuses-méthanoliques contenant les sels sodiques des acides (pH 12,4) sont concentrées sous vide jusqu'à un volume de quelques ml. On neutralise avec HCl 0,5N; pour amener le pH de la solution à 8,25, il faut ajouter 26 mmoles de HCl. L'hydrolyse des esters a donc consommé 64 mmoles de NaOH. A cette solution on ajoute 22,3 g de bromure de *p*-phénylazophénacycle (74 mmoles), dissous dans 150 ml de diméthylformamide. On laisse réagir 1 h à température ambiante et évapore sous vide à sec, dans un évaporateur rotatif (température maximum du bain de chauffage 50°). Le résidu est repris dans du chloroforme; on filtre une partie insoluble de 1,827 g (produit de structure inconnue dont le spectre IR. ne comporte aucune bande d'ester), lave 3 fois à l'eau et concentre; rendement: 30,157 g en dérivés *p*-PAPE. On les sépare d'abord par chromatographie sur colonnes de SiO_2 (MALLINCKRODT, 100 mesh) en 23 fractions, puis en 82 sous-fractions. Après analyse par Chr. P. (systèmes DD et PI) on réunit les mélanges semblables, et répète le fractionnement sur SiO_2 , terre d'infusoires-bentonite ou encore par Chr. P. P. Purifications finale par recristallisation. Les dérivés recristallisés sont identifiés par leurs F. et F. de mélange avec des dérivés authentiques, les spectres IR. et les Rf. Rf observés: a) système DD, b) système PD: 0,20, 0,81, acide acétique; 0,33, 0,80, acide propionique; 0,44, 0,76, acide butyrique; 0,54, 0,70, acides valérianiques, mélange des isomères; 0,59, 0,64, acide caproïque; 0,75, 0,41, acide caprylique.

C. Analyse de la fraction des esters par chromatographie en phase gazeuse

L'instrument utilisé a été décrit par TOTH et collab. [29]; détecteurs à catharomètres, gaz vecteur He, 40–50 ml/min; colonnes en verre, longueur 2,4 m, diam. intérieur 6 mm, remplissage des colonnes, voir tableau 7.

Toutes les fractions et les substances de comparaison ont été injectées dans des colonnes polaires et non polaires, à deux températures. Les effluents des pics analysés ont été condensés dans des capillaires à point de fusion, refroidis par de la neige carbonique. Les SM. ont été enregistrés sur un appareil CEC 21–103 C et identifiés par comparaison aux SM d'échantillons authentiques ou aux SM. de la collection «API» (AMERICAN PETROLEUM INSTITUTE).

⁴⁾ Dosage par oxydation en aldéhyde formique, puis réaction avec de l'acide chromotropique et mesure de l'intensité de la couleur formée; voir [28].

SUMMARY

The analysis of the volatile parts of fresh strawberry flavour is described. Among 35 substances identified, the following had not been found before in strawberries:

1) Carbonyl compounds: propanal, acrolein, crotonal, pent-2-enal, *cis*-hex-3-enal, pentan-2-one, and heptan-2-one.

2) Alcohols: pent-1-en-3-ol, heptan-2-ol and benzylic alcohol.

3) Esters: propyl acetate, methyl caproate, hexyl butyrate, isopropyl butyrate, ethyl crotonate and *trans*-hex-2-en-1-yl butyrate.

The concentration of the described 35 substances is evaluated.

It is shown that 2-hexenal, the main carbonyl constituent of crushed strawberry, does not exist in the undamaged fruit, neither does diacetyl in the freshly harvested and undamaged fruit.

FIRMENICH & CIE, Laboratoires de Recherches, Genève

BIBLIOGRAPHIE

- [1] 9^e communication: Mitt. aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene *54*, 520 (1963).
- [2] M. WINTER, «Flavor Research and Food Acceptance», p. 290–301; Reinhold Publishing Corporation, New York 1958; M. WINTER, B. WILLHALM, M. HINDER, P. PALLUY & E. SUNDT, *Perfumery and Essential Oil Record* *49*, 250 (1958).
- [3] A. COPPENS & L. HOEJENBOS, *Rec. Trav. chim. Pays-Bas* *58*, 680 (1939).
- [4] J. MCGLUMPHY, *Food Technol.* *5*, 353 (1951).
- [5] K. P. DIMICK & B. MAKOWER, *Food Technol.* *10*, 73 (1956).
- [6] K. P. DIMICK & J. CORSE, *Angew. Chem.* *69*, 494 (1957); American Perfumer & Aromatics *71* (2), 45 (1958); J. CORSE & K. P. DIMICK, «Flavor Research and Food Acceptance», p. 302–314. Reinhold Publishing Corporation, New York 1958.
- [7] C. F. SEIDEL, H. SCHINZ & M. STOLL, *Helv.* *41*, 372 (1958).
- [8] D. S. BIDMEAD & D. WELTI, *Research (London)* *13*, 295 (1960).
- [9] R. TERANISHI, C. C. NIMMO & J. CORSE, *Analyt. Chemistry* *32*, 1384 (1960).
- [10] R. TERANISHI, J. W. CORSE, W. H. MCFADDEN, D. R. BLACK & A. I. MORGAN JR., *J. Food Science* *24*, 478 (1963).
- [11] H. BOHNSACK, *Riechstoffe & Aromen* *14*, 33 (1964).
- [12] M. WINTER, E. PALLUY, M. HINDER & B. WILLHALM, *Helv.* *45*, 2186 (1962).
- [13] R. L. STEDMAN & R. L. MILLER, *J. Chromatog.* *11*, 409 (1963).
- [14] M. WINTER & E. SUNDT, *Helv.* *45*, 2195 (1962).
- [15] L. HORNER & W. KIRMSE, *Liebigs Ann. Chem.* *597*, 50 (1955).
- [16] E. SUNDT & M. WINTER, *Analyt. Chemistry* *30*, 1620 (1958).
- [17] W. BUCHI & F. ULLMANN, *Schweiz. Z. Obst- und Weinbau* *67*, 459 (1958); R. E. O'NEILL, *Chem. Abstr.* *53*, 13443a (1959); *J. Ass. Off. Agric. Chem. (Washington)* *42*, 294 (1959).
- [18] W. NYE & H. A. SPOEHR, *Arch. Biochemistry* *2*, 23 (1943).
- [19] R. T. MAJOR, P. MARCHINI & A. J. BOULTON, *J. biol. Chemistry* *238*, 1813 (1963).
- [20] L. F. BURROUGHS, *J. Sci. Food Agric.* *11*, 14 (1960).
- [21] J. J. BRODERICK, *Amer. Perf. & Aromatics* *72*, (5), 49 (1958).
- [22] T. REICHSTEIN, *Helv.* *9*, 799 (1926).
- [23] E. SUNDT & M. WINTER, *Helv.* *45*, 2212 (1962).
- [24] E. SUNDT & M. WINTER, *Analyt. Chemistry* *29*, 851 (1957).
- [25] S. MASNY, *J. chem. Soc. Japan* *71*, 402 (1950); *Chem. Abstr.* *45*, 6400i (1951); R. M. IKEDA, A. D. WEBB & R. E. KEPNER, *Analyt. Chemistry* *26*, 1228 (1954); R. E. KEPNER, A. D. WEBB, R. L. KING & A. D. BOUD, *ibid.* *29*, 1162 (1957).
- [26] J. GASPARIČ & M. VEČEKA, *Microchimica Acta* *758*, 68.
- [27] J. A. ELVIDGE & M. WHALLEY, *Chemistry & Ind.* *1955*, 589.
- [28] F. FEIGL, *Spot Tests II, Organic Applications*, p. 244, Elsevier Publ. Corp., Amsterdam 1954.
- [29] P. TOH, E. KUGLER & E. KOVÁTS, *Helv.* *42*, 2519 (1959).