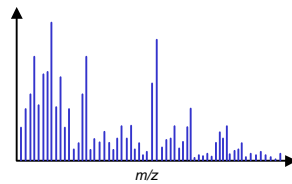




**Thèse**

Présentée par Frédéric Begnaud

# **Contribution au développement de l'analyse non séparative d'espaces de tête par spectrométrie de masse.**



*Pour l'obtention du grade de*

Docteur ès Sciences de l'Université Blaise Pascal de Clermont Ferrand

Soutenue le 23 mai 2005 devant le Jury suivant :

Professeur Jean-Bernard Gros

Docteur Jean-Louis Berdagué

Professeur Eric Dufour

Docteur Christian Salles

Docteur Catherine Thonat

Docteur Daniel Picque

Président

Directeur de thèse

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

*" Le scientifique est un Homme dont l'ignorance a des lacunes "*

Jean Rostand

*" S'il n'y a pas de solution,  
c'est qu'il n'y a pas de problème "*

devise Shadok

## Remerciements

---

Avant tout, j'aimerais remercier Messieurs Dufour et Salles pour avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse.

Ma gratitude va aussi à Monsieur Gros pour avoir accepté de présider le jury, ainsi qu'à Madame Thonat et Monsieur Picque, membres examinateurs.

Il me faut bien sûr évoquer Jean-Louis Berdagué, mon directeur de thèse. Responsable de mes travaux de recherches, directeur du laboratoire où j'étais employé, redoutable vétériste et chasseur de morilles hors-pair, je lui dois énormément. Scientifiquement, Jean-Louis m'a apporté une formation de très haut niveau. Il m'a fait confiance pour mener mes projets, et s'est toujours montré disponible pour un conseil ou pour corriger un papier (et quelles corrections!!), ce qui aux vues de son emploi du temps relève d'un formidable tour de force. Humainement aussi, sa bonne humeur et son goût pour les facéties les plus innocentes (quoi que...) m'ont permis de passer 4 années formidables en Auvergne. Mon seul regret sera de n'avoir jamais réussi à lui soutirer le moindre petit renseignement concernant les lieux de pousse des fameuses morilles, objet de toutes les convoitises et pour lesquelles il faut bien l'avouer son comportement devint parfois indigne... Mais je ne lui en tiens pas rancune, et je le remercie chaleureusement pour ces courtes mais intenses années auvergnates.

Je tiens aussi à remercier Christine Viallon, avec qui nous avons passé de formidables moments de bonne humeur. Sa gentillesse, ses compétences et sa serviabilité ont beaucoup fait pour maintenir l'ambiance du laboratoire à son meilleur niveau. Les Parisiens ont beaucoup de chance de l'avoir recueillie.

En ce qui concerne Christophe Pérès, je me dois de le remercier ici puisque lui-même l'a fait dans son mémoire de thèse. En cherchant bien, j'arriverais à lui trouver des comportements positifs, même si le fait d'avoir voulu me supprimer en VTT en m'obligeant à suivre son rythme effréné me laisse encore un souvenir cuisant. Malgré cela, il faut bien l'avouer Christophe a largement participé à faire que l'Auvergne me laisse de formidables souvenirs. Outre un excellent collègue de travail et un co-auteur de talent, Christophe a été, et reste, un



ami avec qui il fait bon passer un moment. Enfin, et ce n'est pas rien, il a accepté de relire ce mémoire. Les fautes sont en partie de lui.

Autre relectrice de talent, Agnès Cornu, redoutable transfuge de l'URH, peintre de génie et avant-gardiste de la mise en forme des posters scientifiques. Merci Agnès d'avoir relu tant de papiers sans rechigner, et d'avoir encore accepté de relire cette thèse. Les fautes qui ne sont pas du précédent personnage sont d'Agnès.

Le laboratoire Flaveur n'aurait pas été ce qu'il est sans le sourire perpétuel de Nathalie Kondjoyan, le formidable sens du bricolage de l'indispensable Christian Denoyer et la contribution informatique irremplaçable de Pascal Tournayre. Merci mille fois à tous les trois.

Je continuerai par une redoutable équipe féminine, la Biosens' Team. Catherine, Delphine et Oriane sont de drôles de dames, charmantes mais dangereuses. Il est impossible de leur résister lorsqu'elles demandent un service, une aide ou un conseil. Je leur souhaite bonne chance pour la suite de leur entreprise.

Enfin, je terminerai ces lignes en remerciant du fond du cœur ma famille, dont l'indispensable soutien n'a jamais failli malgré les distances, et ma douce Ingrid qui a supporté mes angoisses et questions existentielles pendant ces 5 années, et qui continue vaillamment à le faire, aujourd'hui épaulée par mes petites Zoé et Maëlle.

Ce travail leur est dédié.

## **Préambule**

---

Ces travaux de recherche ont été menés dans le cadre de mon poste d'Ingénieur d'Études au sein du laboratoire Flaveur du centre de recherche de l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) de Clermont-Ferrand-Theix (Puy de Dôme). Ce laboratoire fait partie intégrante de la Station de Recherche sur la Viande et a pour mission l'étude du déterminisme de la flaveur des produits d'origine animale. Pour ce faire, Jean-Louis Berdagué et son équipe conçoivent et mettent en place des techniques d'investigation variées et innovantes. Il possède aujourd'hui un niveau d'expertise reconnu dans la caractérisation des produits d'origine animale par spectrométrie de masse. Dès 1991, le laboratoire Flaveur a initié des recherches sur l'analyse rapide par espace de tête - spectrométrie de masse. Le développement de ces techniques de caractérisation non séparatives m'ayant été confié, nous avons décidé conjointement avec le docteur Berdagué de traiter ce sujet sous la forme d'une thèse doctorale. Les résultats présentés dans ce mémoire sont issus des projets réalisés lors de ces quatre dernières années, dont certains ont demandé l'encadrement d'étudiants de premier et de second cycle universitaire. Chaque projet a fait l'objet d'une publication scientifique.

## **Glossaire**

---

Les différents travaux présentés font référence à des techniques dont l'appellation parfois longue et compliquée invite à faire appel aux sigles correspondants. Dans le but de ne pas ajouter à la confusion qui existe souvent entre les multiples sigles, les abréviations et appellations utilisées feront référence à la dénomination anglo-saxonne de l'appareil, de la méthode ou de la technique désignée.

Le glossaire proposé rassemble les principales abréviations d'usage avec leurs équivalences et leur traduction.

**amu** (atomic mass units) : unités de masse atomique

**APCI** (Atmospheric Pressure Chemical Ionisation) : ionisation chimique sous pression atmosphérique

**aua** (arbitrary units of abundance) : unités arbitraires d'abondance

**CDA** (Canonical Discriminant Analysis) : analyse factorielle discriminante

**Cross-validation** : validation croisée

**DHS-MS** (Dynamic HeadSpace - Mass Spectrometry) : espace de tête dynamique - spectrométrie de masse

**GC-MS** (Gas Chromatography - Mass Spectrometry) : chromatographie en phase gazeuse - spectrométrie de masse

**NSA-MS** (Non-Separative Analysis - Mass Spectrometry) : terme général recouvrant l'ensemble des techniques d'analyse globale de l'espace de tête par spectrométrie de masse

**HS-MI-MS** (HeadSpace - Membrane Inlet - Mass Spectrometry) : espace de tête introduit via une membrane – spectrométrie de masse

**HSSE** (HeadSpace Sorptive Extraction) : extraction par sorption dans l'espace de tête

**INDEX** (inside needle dynamic extraction) : extraction dynamique sur phase solide déposée dans une aiguille

**m/z** : ratio masse/charge

**MI-MS** (Membrane Inlet - Mass Spectrometry) : introduction via une membrane - spectrométrie de masse

**MS** (Mass Spectrometry) : spectrométrie de masse

**NN** (Neural Network) : réseau de neurones ou réseau neuromimétique

**P&T** (Purge and Trap) : balayage et piégeage

**PCA** (Principal Components Analysis) : analyse en composantes principales

**PLS** (Partial Least Squares) : moindres carrés partiels

**PTR-MS** (Proton Transfer Reaction – Mass Spectrometry) : spectrométrie de masse avec ionisation par réaction de transfert de proton

**SBSE** (Stir Bar Sorptive Extraction) : extraction par sorption sur barreau magnétique (appellation commerciale : *Twister*)

**SGA** (Standard Gas Addition) : addition d'un gaz standard directement dans la source du spectromètre de masse

**SHS-MS** (Static HeadSpace - Mass Spectrometry) : espace de tête statique - spectrométrie de masse

**Split / splitless** : avec division de flux / sans division de flux

**SPME** (Solid Phase MicroExtraction) : microextraction en phase solide

**TIC** (Total Ion Current) : courant ionique total

**TOF-MS** (Time Of Flight – Mass Spectrometry) : spectromètre de masse à temps de vol

**Tuning** : procédure d'optimisation des paramètres d'acquisition (ici, d'un spectromètre de masse). Par abus de langage, ce terme peut également désigner les valeurs des paramètres d'acquisition.

# **Sommaire**

# Sommaire

---

<b>Remerciements</b> .....	<b>4</b>
<b>Préambule</b> .....	<b>6</b>
<b>Glossaire</b> .....	<b>7</b>
<b>Sommaire</b> .....	<b>10</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>13</b>
<b>Partie 1 : Caractérisation des produits et sous-produits de l'industrie agroalimentaire par analyse non séparative d'espaces de tête - spectrométrie de masse (NSA-MS). Etat de l'Art.....</b>	<b>17</b>
1.1 <i>Principe général</i> .....	17
1.2 <i>Aspect instrumental</i> .....	18
1.2.1 Le module d'extraction-injection .....	18
1.2.2 La ligne de transfert .....	23
1.2.3 Le spectromètre de masse .....	24
1.3 <i>Elaboration d'une méthode d'analyse non séparative</i> .....	25
1.3.1 Sélection de conditions limitant l'introduction d'eau et d'air .....	25
1.3.2 Correction des dérives : une nécessité pour l'élaboration de bases de données .....	26
1.3.3 Sélection des fragments de masse pertinents et établissement d'un diagnostic .....	28
1.4 <i>Conclusion</i> .....	31
<b>Partie 2 : Optimisation du réglage du spectromètre de masse pour l'acquisition d'empreintes spectrales</b> .....	<b>34</b>
2.1 <i>Influence de l'énergie d'ionisation sur la qualité des empreintes spectrales obtenues par espace de tête statique-spectrométrie de masse</i> .....	35
2.2 <i>Bilan</i> .....	43
<b>Partie 3 : Mise en œuvre de l'analyse non séparative d'espaces de tête par spectrométrie de masse</b> .....	<b>45</b>
3.1 <i>Contrôle a posteriori du traitement thermique des farines de viandes : évaluation des potentialités de la méthode d'espace de tête statique - spectrométrie de masse</i> .....	47
3.2 <i>Caractérisation des effluents volatils de bâtiments d'élevage par microextraction en phase solide</i> .....	55
3.3 <i>Mise en œuvre de nouvelles méthodes de caractérisation d'atmosphères d'élevages porcins</i> ....	68
3.4 <i>Bilan</i> .....	81
<b>Partie 4 : Éléments de résolution des dérives instrumentales</b> .....	<b>83</b>
4.1 <i>Correction des dérives temporelles des spectromètres de masse par addition de gaz standard (SGA)</i> .....	84
4.2 <i>Bilan</i> .....	89

<b>Discussion .....</b>	<b>91</b>
<b>Conclusion et Perspectives.....</b>	<b>97</b>
<b>Valorisation de ces travaux : publications, communications et rapports.....</b>	<b>100</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>104</b>
<b>Annexe 1 .....</b>	<b>113</b>

# **Introduction**



## Introduction

---

L'analyse physico-chimique a toujours été indispensable dans les industries agroalimentaires, pour notamment caractériser et évaluer les productions. Sous la pression des consommateurs et autorités civiles, la législation s'est renforcée et impose progressivement la mise en place de vérifications et contrôles toujours plus nombreux et poussés. Outre le suivi des matières premières et des produits élaborés, les nuisances olfactives générées par les unités de production sont également des points sensibles que l'industriel se doit de maîtriser. La confiance que l'utilisateur peut avoir envers les produits qu'il consomme est souvent la résultante de contrôles dont le coût est non négligeable. Ainsi, l'analyse des composés volatils et la recherche de défauts d'odeur peut atteindre la somme de 1000€ par échantillon tandis que la caractérisation de certains produits tels que la vanilline est facturée jusqu'à 2000€. Les analyses sensorielles, indispensables pour caractériser la composition de l'arôme ou la texture des aliments, nécessitent un investissement humain et financier très important. Elles ne sont donc applicables couramment que par les grands groupes industriels, et uniquement pour des produits à fort potentiel commercial. D'autre part, de nombreuses problématiques cruciales ne trouvent pas encore de moyens techniques de quantification et de caractérisation objective. C'est notamment le cas des émissions malodorantes rejetées par certains centres de production animale et certaines usines agroalimentaires. C'est pourquoi, face à ces limites, les industriels et les organismes de contrôle souhaitent disposer de nouveaux outils de caractérisation, rapides et peu onéreux. L'objectif n'est pas de s'affranchir des techniques reconnues quand elles existent, mais plutôt de limiter leur usage par l'utilisation de méthodes requérant moins de temps pour des contrôles de routine.

La mise en place de telles techniques implique de limiter voire d'éliminer l'étape séparative des techniques de caractérisation actuellement employées. Des recherches dans ce domaine ont montré que l'analyse globale de la fraction volatile d'un produit, sans séparation chromatographique préalable, aboutit à l'obtention d'un signal ou d'une empreinte spectrale caractéristique. La comparaison d'un tel signal avec ceux contenus dans une base de données regroupant les empreintes de références, parfaitement caractérisées et représentatives de l'univers d'un produit donné permet a priori d'établir un diagnostic rapide. Différentes

techniques ont été mises en œuvre pour générer de tels signaux. Ainsi a-t-on pu voir au début des années 1990 le développement des capteurs d'arômes, aussi appelés nez électroniques. Leurs défauts intrinsèques (fragilité des senseurs, non linéarité des signaux) et leurs performances limitées (absence de spécificité) ont fortement restreint leurs applications industrielles. Les constructeurs d'appareils analytiques et les chercheurs se sont aussi intéressés à la spectrométrie de masse en tant que moyen de générer des empreintes. En effet, l'injection directe de la fraction volatile d'un produit (pré-concentrée ou non) dans la chambre d'ionisation d'un spectromètre de masse permet d'obtenir un spectre caractéristique. Ces spectres peuvent être utilisés à des fins de caractérisation, d'estimation ou de contrôle. Dès 1993, Berdagué *et al.* (Berdagué *et al.*, 1993) ont montré que la caractérisation des produits par analyse non séparative de leur fraction volatile par spectrométrie de masse constituait une solution prometteuse. L'ensemble de ces techniques a été regroupé sous le terme général d'analyse non-séparative d'espace de tête – spectrométrie de masse (NSA-MS).

L'objectif de ce travail est de contribuer au développement des techniques de NSA-MS. L'étude de problèmes pratiques issus de l'agroalimentaire ou de l'environnement a servi de support aux options d'évolution techniques présentées.

Les récents développements dans le domaine de la NSA-MS seront tout d'abord présentés. Les principales caractéristiques des appareillages utilisés ou mis au point seront décrits, ainsi que les applications développées dans le domaine agroalimentaire. A ce titre, les différentes techniques d'extraction des composés volatils seront détaillées, ainsi que le transfert des molécules et leur détection par spectrométrie de masse. Les points clés des stratégies analytiques basées sur l'utilisation de ces techniques seront présentés. En particulier, la sélection des conditions opératoires, les sources potentielles d'instabilité des appareillages, les méthodes permettant d'en limiter les effets ainsi que l'exploitation des données seront discutées.

Partant de cet état de l'art, les recherches ont été dirigées selon trois axes apparus essentiels pour assurer le développement des techniques de NSA-MS : l'optimisation des conditions d'acquisition des empreintes spectrales par le spectromètre de masse et leur pré-traitement, l'échantillonnage et l'exploitation des données spectrales, et la stabilité de l'instrumentation (condition nécessaire à l'établissement de bases de données pérennes).

Le premier axe sera détaillé dans le cadre d'une étude sur l'influence de l'énergie d'ionisation sur la qualité des empreintes spectrales.

Le second axe sera développé à partir de trois études de cas originaux regroupant les principales attentes liées à l'emploi des NSA-MS dans le domaine des produits et sous-produits d'origine animale : le contrôle *a posteriori* de procédés sensibles (contrôle des barèmes de cuisson de farines de viandes animales), la classification d'échantillons (reconnaissance d'atmosphères d'élevage) et l'estimation de caractéristiques sensorielles (odeurs d'atmosphères d'élevage porcin).

Les travaux concernant le troisième axe de recherche donneront lieu à la présentation d'une nouvelle méthode de correction des dérives instrumentales.

Ces présentations seront suivies d'une discussion permettant d'évoquer les perspectives de ces techniques en terme d'évolution des méthodes et d'applications dans le domaine industriel.

# **1**

**Caractérisation des produits  
et sous-produits de  
l'industrie agroalimentaire  
par analyse non séparative  
d'espaces de tête -  
spectrométrie de masse  
(NSA-MS).  
Etat de l'Art**

# Partie 1 : Caractérisation des produits et sous-produits de l'industrie agroalimentaire par analyse non séparative d'espaces de tête - spectrométrie de masse (NSA-MS). Etat de l'Art

## 1.1 Principe général

Le principe général des systèmes de caractérisation par NSA-MS consiste à introduire sans séparation chromatographique préalable les composés volatils issus d'un produit dans la chambre d'ionisation d'un spectromètre de masse. Le spectre de masse obtenu suite à l'ionisation et à la fragmentation simultanée de l'ensemble des molécules injectées constitue une empreinte caractéristique du produit analysé. L'exploitation de l'information spectrale ainsi obtenue permet d'émettre un diagnostic qualitatif sur le produit analysé (figure 1).

Ces systèmes sont constitués d'un module d'extraction-injection couplé à un spectromètre de masse, via une ligne de transfert. En terme d'instrumentation, la principale différence avec les systèmes séparatifs classiques est précisément le remplacement de la colonne chromatographique par une courte ligne de transfert.

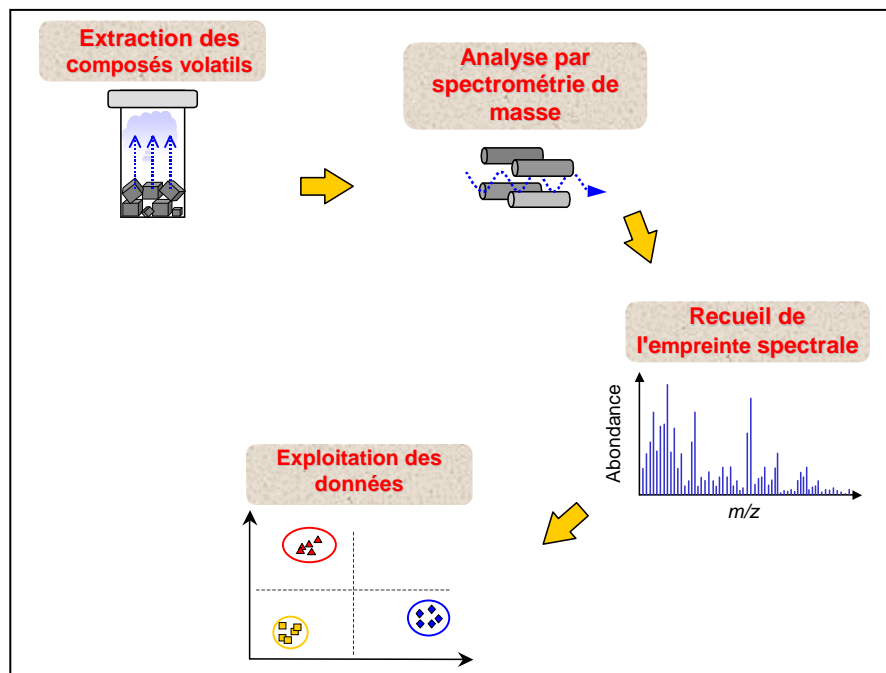


Figure 1 : Principe général d'une analyse par NSA-MS.

## 1.2 Aspect instrumental

### 1.2.1 Le module d'extraction-injection

#### ***Extraction des composés volatils sans préconcentration : espace de tête statique (SHS-MS)***

L'espace de tête statique consiste à placer l'échantillon dans un flacon hermétiquement scellé puis, une fois l'équilibre entre la matrice et la phase gazeuse établi, à prélever les molécules présentes dans l'espace de tête. Souvent utilisée pour l'analyse de produits laitiers (Christensen and Reineccius, 1992 ; Fenaille *et al.*, 2003 ; Fernandez-Garcia, 1996 ; Gallois and Langlois, 1990 ; Kubickova and Grosch, 1997 ; Ulberth, 1991), cette technique présente l'avantage d'être très simple à mettre en œuvre, la température de l'échantillon, la durée d'équilibration et la taille du flacon étant les principaux paramètres à optimiser (Kolb and Ettre, 1997). En revanche, du fait de l'absence de préconcentration, la sensibilité de ce type d'instrumentation peut s'avérer insuffisante pour certaines applications. Sur un plan technique, on distingue principalement 5 systèmes d'extraction-injection pour la plupart automatisés. Les principales caractéristiques des systèmes SHS-MS cités ci-dessous ont été reportées dans le tableau 1.

**Prélèvement par seringue.** Un aliquote de l'espace de tête est prélevé puis injecté au moyen d'une seringue. Cette technique a notamment été utilisée pour caractériser des Emmentals suisses selon leur stade d'affinage (Schaller *et al.*, 2000a ; Schaller *et al.*, 2000b). Le système commercial "SmartNose" (SMart Nose, Marin-Epagnier, Switzerland) est équipé de ce système.

**Entraînement de l'espace de tête par flux de gaz inerte.** L'espace de tête est entraîné par le flux de gaz vecteur dans la chambre d'ionisation du spectromètre de masse pendant une courte durée. Les appareillages mettant en œuvre une extraction-injection de ce type ont été employés dans le cadre d'études utilisant des spectromètres de masse haute résolution de type temps de vol (Pugh *et al.*, 1999) et ion trap (Goodner and Rouseff, 2001). La particularité de ces systèmes étant plutôt liée aux caractéristiques techniques de ces spectromètres, ces deux études ont été évoquées dans la suite de cette partie.

**Pressurisation-détente** (balance pressure system). Le flacon est pressurisé au moyen du gaz vecteur de manière à appliquer la même pression dans le flacon et en tête de la ligne de transfert. Après arrêt du gaz vecteur, l'injection est réalisée par la détente du mélange gazeux dans la ligne de transfert. Le MS-Sensor® (HKR Sensorsysteme GmbH, Munich, Germany) exploite cette technologie issue des systèmes développés par Perkin-Elmer (Norwalk, CT). Dittmann (Dittmann *et al.*, 2000) a utilisé cet appareillage pour mettre au point une méthode permettant de discriminer différentes sauces tomate selon leurs caractéristiques aromatiques.

**Pressurisation et remplissage d'une boucle** (Pressure/loop systems). Le flacon est mis en surpression par rapport à la boucle d'injection au moyen d'un gaz inerte. La boucle d'injection est ensuite remplie par dépressurisation de l'espace de tête. Enfin, le balayage de la boucle par le gaz vecteur entraîne les composés volatils dans le spectromètre de masse. Ce système équipe les Chemsensor® mis au point par Agilent Technologies (Palo Alto, CA) et a été utilisé pour la caractérisation rapide des fromages (Pérès *et al.*, 2001) et le suivi de sols pollués par des hydrocarbures de pétrole (Perez Pavon *et al.*, 2003b).

**Introduction via une membrane (HS-MI-MS)**. Le système espace de tête – introduction par membrane– spectrométrie de masse (HS-MI-MS) est un appareillage développé par Mendès (Mendes *et al.*, 2000) pour l'analyse rapide de traces de composés organiques volatils (VOCs) dans des matrices solides. Les composés volatils désorbés par l'échantillon traversent une membrane spécifique par pervaporation puis sont directement transférés dans la chambre d'ionisation par ouverture d'une vanne. Cette technique a été appliquée à des échantillons de sols mais peut tout aussi bien être mise en œuvre pour l'analyse de produits agroalimentaires. Cependant, la nature hydrophobe de la membrane (en règle générale, un polymère à base de silicone) favorise la perméation des molécules apolaires et limite celle des composés polaires. Cette discrimination représente une limitation majeure de cette technique (et des autres méthodes dérivées de la MI-MS, Kotiaho *et al.*, 1997 ; Lauritsen and Kotiaho, 1996) pour la caractérisation de mélanges gazeux complexes constitués de molécules de polarités très différentes.

**Tableau 1** : Principales caractéristiques de systèmes NSA-MS mis au point à ce jour pour la caractérisation de produits par analyse non séparative de leur fraction volatile.

<sup>a</sup> : Static Headspace; <sup>b</sup> : Solid Phase Microextraction; <sup>c</sup> : Dynamic Headspace

<b>Système</b>	<b>Constructeur</b>	<b>Analyseur de masse</b>	<b>Technique d'extraction des composés</b>
Chemsensor <sup>®</sup>	Agilent Technologies	Quadripôle (HP5973, Agilent)	<b>SHS</b> <sup>a</sup> (pressurisation et remplissage d'une boucle) (HP 7694, Agilent)
MS-Sensor <sup>®</sup>	HKR Sensorsysteme GmbH	Quadripôle (TurboMass, Perkin elmer)	<b>SHS</b> (pressurisation-détente) (HS40XL, Perkin Elmer)
SMart Nose <sup>®</sup>	SMart Nose	Quadripôle (Balzers)	<b>SHS</b> (seringue) et <b>SPME</b> <sup>b</sup> (CTC CombiPal) <b>Purge-and-Trap</b> (Tekmar LCS 2000)
SPME-MS	Montage en laboratoire (Marsili, 1999)	Quadripôle (Saturn, Varian)	<b>SPME</b> (75 µm carboxen/PDMS)
Ion-Trap-MS	Montage en laboratoire (Goodner and Rouseff, 2001)	Trappe d'ions (Finnigan GCQ Plus, Thermoquest)	<b>SHS</b> (Entraînement par gaz inerte, montage en laboratoire ; Goodner and Rouseff, 2001)
TOF-MS AP+ Nose	Micromass	Temps de vol (LCT, Micromass )	<b>SHS</b> (Entraînement par gaz inerte), interface APCI+
HS-MI-MS	Montage en laboratoire (Mendes <i>et al.</i> , 2000)	Quadripôle (Balzers)	<b>SHS</b> (introduction par membrane, montage en laboratoire ; Mendes <i>et al.</i> , 2000)

### ***Extraction des composés volatils avec préconcentration***

Afin d'augmenter les quantités de matière injectées, différentes méthodes de préconcentration telles que le Purge-and-Trap (P&T), l'espace de tête dynamique (DHS) et la microextraction en phase solide (SPME) sont proposées. La préconcentration permet d'accroître la sensibilité du système mais engendre une étape supplémentaire qui peut s'avérer limitante d'un point de vue temporel et générer des artefacts analytiques (effets mémoires, bleeding de l'adsorbant, adsorptions irréversibles). A cet effet, la méthode de préconcentration doit être considérée avec attention.

**Purge-and-Trap et espace de tête dynamique.** Les techniques de Purge-and-Trap (P&T) et d'espace de tête dynamique (DHS) sont des méthodes classiques de préconcentration des composés volatils, utilisées dans des domaines d'application variés (Canac-Arteaga, 2001 ; Pillonel *et al.*, 2002). Pour les deux méthodes, les composés volatils sont entraînés sur un adsorbant par un flux de gaz inerte. L'appauvrissement permanent de l'espace de tête



provoque ainsi un déplacement de l'équilibre qui favorise la désorption des molécules de la matrice. Les molécules piégées sont ensuite thermiquement désorbées puis injectées dans la chambre d'ionisation du spectromètre de masse. Au-delà du choix du piège, les principaux paramètres à optimiser sont la température de l'échantillon, la durée d'équilibration, le flux de gaz extracteur ainsi que la durée de balayage de l'espace de tête. Dans le cas du P&T, le flux de gaz traverse l'échantillon (de préférence liquide ou pulvérulent) alors que dans le cas du DHS, seul l'espace de tête est balayé par le gaz.

Selon Schaller (Schaller, 2000 ; Schaller *et al.*, 2000b), le système P&T-MS n'a pas donné des résultats satisfaisants en terme de répétabilité et d'extraction de composés de faible poids moléculaire. D'autres études nuancent ces résultats puisque dans une étude portant sur la discrimination de fromages de type Camembert, un système DHS-MS a permis une classification satisfaisante des lots de fromages étudiés (Pérès *et al.*, 2002b). De même, en 2003 Boudaoud et Eveleigh (Boudaoud and Eveleigh, 2003) ont montré que l'analyse des composés volatils de bouchons de liège par DHS-MS permettait d'obtenir une signature spectrale caractéristique de leur origine géographique.

Les différents pièges adsorbants existants ont été inventoriés et décrits par Núñez (Núñez *et al.*, 1984) et Harper (Harper, 2000). Ils peuvent être constitués de carbone activé ou graphitisé ou bien de polymères poreux. Les pièges à base de carbone présentent une grande surface spécifique et une forte capacité d'adsorption des composés les plus polaires. Cette adsorption peut dans certains cas s'avérer irréversible et s'accompagner de rétention de fortes quantités d'eau. En revanche, les pièges à base de polymères poreux (eg Tenax TA, Chromosorb) ont une capacité d'adsorption plus faible mais présentent une affinité plus limitée pour l'eau. Enfin, la combinaison de plusieurs types d'adsorbants spécifiques dans un même piège permet d'étendre les capacités de piégeage à une plus grande variété de familles chimiques (Ciccioli *et al.*, 1992 ; Laye *et al.*, 1995 ; Sturges and Elkins, 1993).

**Microextraction en phase solide (SPME).** Alors que le P&T et le DHS nécessitent d'importants moyens matériels (gaz extracteur, nombreuses vannes, double circuit de gaz), la SPME permet une préconcentration facile à mettre en œuvre. Le principe consiste à exposer une fibre de silice recouverte d'une fine épaisseur d'adsorbant dans l'espace de tête de l'échantillon sur laquelle les composés volatils vont s'adsorber (Zhang and Pawliszyn, 1993). Les molécules ainsi piégées sont ensuite thermiquement désorbées puis injectées dans la chambre d'ionisation du spectromètre de masse. Outre la nature de l'adsorbant déposé sur la fibre, les principaux paramètres à optimiser sont la durée d'équilibration avant extraction, la

température de l'échantillon et la durée d'exposition de la fibre. Jusqu'en 1999, 4 types de fibres étaient proposés à la vente : les fibres polydiméthylsiloxane (PDMS), polyacrylate (PA), carbowax/polydiméthylsiloxane (CW/PDMS) et divinylbenzène/polydiméthylsiloxane (DVB/PDMS). L'incorporation de Carboxen dans des adsorbants comme le PDMS a conduit au développement de nouvelles fibres (Carboxen/PDMS, DVB/Carboxen/PDMS; Supelco, France) présentant des capacités d'adsorption nettement supérieures, notamment pour les composés de faible poids moléculaire. Ces fibres sont très utilisées dans le domaine agroalimentaire, de la biologie ou de l'environnement (Abalos *et al.*, 2000 ; Augusto *et al.*, 2000 ; Hill and Smith, 2000 ; Lee *et al.*, 1999 ; Page and Lacroix, 2000). Dans le cadre d'analyses non séparatives, la fibre carboxen/PDMS a été mise en oeuvre pour la discrimination de lots de fromages (Pérès *et al.*, 2000 ; Pérès *et al.*, 2001) et la caractérisation de défauts d'odeurs dans le lait (Marsili, 1999). Les autres phases sont aussi utilisées, ainsi la DVB/PDMS a été employée pour discriminer des variétés de tomates et évaluer leur durée de conservation (Berna *et al.*, 2004), mais aussi pour estimer la fermeté des pommes (Saevels *et al.*, 2004).

**Autres techniques d'extraction avec préconcentration.** D'autres techniques d'extraction dérivées de la SPME présentent également un certain potentiel pour le couplage direct à un spectromètre de masse.

Zhang et Pawliszyn (Zhang and Pawliszyn, 1996) ont proposé un système constitué d'une fibre SPME couplée à une seringue d'extraction de gaz. Lors du retrait de la fibre SPME, un certain volume de gaz est également extrait de l'espace de tête. Ce système permet ainsi l'analyse de composés présentant peu d'affinités avec la fibre. Cette technique a été récemment modifiée (la phase est déposée sur la paroi interne de la seringue) et commercialisée par Chrompack sous le nom de Solid Phase Dynamic Extraction (SPDE).

Par ailleurs, Gerstel commercialise un système d'extraction par sorption dans l'espace de tête (HSSE, commercialisé sous le nom de "Twister"). Ce système se présente sous la forme d'un barreau magnétique sur lequel est déposé du polydiméthylsiloxane. En règle générale, cette quantité est de 50 à 200  $\mu\text{L}$  alors qu'elle est actuellement de l'ordre de 0.5  $\mu\text{L}$  pour une fibre SPME classique. L'utilisation est simple, l'étape d'extraction consistant à placer le barreau adsorbant dans l'espace de tête de l'échantillon à analyser. Les molécules ainsi piégées sont ensuite thermiquement désorbées puis injectées. Appliquée à l'analyse de molécules volatiles présentes dans l'espace de tête de matrices diverses telles que des plantes médicinales, de la

banane ou encore du café, la HSSE a permis d'atteindre des limites de détection inférieures de 2 à 3 ordres de magnitude à celles de la SPME (Tienpont *et al.*, 2000).

Enfin, le Dr. Tabacchi de l'université de Neuchatel (Suisse) développe un système basé sur l'extraction dynamique sur une phase solide déposée dans une aiguille (INDEx). L'action répétée d'aspiration et de refoulement de l'espace de tête au travers de l'aiguille, qui peut être automatisée, est susceptible de capter des composés de haut poids moléculaire avec un rendement élevé. En 2004, Marilley *et al.* ont montré que cette technique permettait de différencier les populations bactériennes de fromages (Marilley *et al.*, 2004). Cependant, les résultats présentés par Ampuero *et al.* (Ampuero *et al.*, 2004) et Pillonel *et al.* (Pillonel *et al.*, 2004) ne font pas apparaître de gains majeurs par rapport à la SPME.

Toutes ces techniques d'échantillonnage aboutissent à l'obtention d'échantillons caractéristiques des produits analysés. En revanche, elles sont peu représentatives de l'équilibre thermodynamique des composés présents à l'état gazeux. En effet, soit elles modifient cet équilibre lors du prélèvement (par pressurisation ou dépressurisation de la fraction volatile de l'échantillon), soit sont directement dépendantes de constantes de partage entre phases dont la valeur varie selon les molécules considérées (cas des adsorptions sur une fibre de microextraction en phase solide par exemple).

### 1.2.2 La ligne de transfert

La ligne de transfert assure le couplage entre le système d'extraction-injection et le spectromètre de masse. Cette ligne doit engendrer une perte de charge suffisante pour maintenir un vide de bonne qualité dans la source tout en permettant un acheminement rapide des molécules entre les deux modules. Le chauffage est nécessaire pour empêcher la recondensation des composés. De plus, la paroi interne doit être inactivée afin de limiter tout risque de pollution au fil des analyses (effets mémoires ou pertes de molécules par adsorptions réversibles ou irréversibles) et d'éviter la dégradation catalytique de certains composés.

En règle générale, on constate peu de différences entre les lignes proposées. Il s'agit de tubes inox ou de colonnes de silice désactivée. Leur longueur est comprise entre 0.5 et 5 m en fonction du diamètre interne choisi (entre 0.05 et 0.20 mm). Les revêtements internes sont de type Silcosteel<sup>®</sup> pour les tubes inox et les colonnes de silice sont inactivées par greffage.

### 1.2.3 Le spectromètre de masse

Les spectromètres de masse utilisés dans le domaine de la NSA-MS sont majoritairement équipés de filtres quadripolaires, en raison de leurs bonnes performances, de leur encombrement réduit et de leur prix inférieur à celui des autres appareillages. L'ionisation des molécules introduites dans la source du détecteur de masse est principalement effectuée par impact électronique à 70eV. La détection des ions est assurée soit par des multiplicateurs d'électrons, soit par des multiplicateurs de photons. Si les sensibilités sont comparables, les deux technologies se distinguent essentiellement par rapport à leur longévité et la limitation des risques de contamination. Les multiplicateurs d'électrons sont actuellement les plus répandus en raison de leur prix attractif mais leur perte de sensibilité au cours du temps constitue leur inconvénient majeur (durée de vie moyenne : 1 an pour une utilisation de 40 h par semaine ; burle, 2002). En revanche, les photomultiplicateurs sont par conception moins sensibles aux fluctuations du vide et aux risques de contaminations chimiques (dépôts sur les parois internes engendrant une perte de sensibilité). Ces multiplicateurs présentent par conséquent une stabilité et une longévité près de 10 fois supérieures à celle des électromultiplicateurs.

Le choix du type de pompe secondaire (à diffusion ou turbomoléculaire) revêt également une importance toute particulière dans la mesure où les quantités injectées peuvent être importantes et l'intervalle de temps trop court pour permettre un retour à l'équilibre entre deux échantillons. De ce fait, une capacité de pompage élevée limite les variations de qualité de vide et la pollution de la source au fil des analyses (encrassement). Les pompes turbomoléculaires présentent sur ce plan un avantage certain par rapport aux pompes à diffusion mais présentent une durée de vie moindre et un coût de fonctionnement plus élevé.

Plus rarement, d'autres systèmes ont été employés. Ainsi, l'ionisation des molécules sous pression atmosphérique suivie de l'analyse des fragments générés par spectrométrie de masse à temps de vol (TOF-MS) à haute résolution a été proposée par Pugh (Pugh *et al.*, 1999). La faible fragmentation des composés permet d'obtenir des ions spécifiques de leur origine moléculaire. L'expérimentateur accède ainsi à une information complémentaire à celle fournie par l'empreinte spectrale.

Autre cas d'application d'un spectromètre de masse non quadripolaire, Goodner et Rouseff (Goodner and Rouseff, 2001) ont exploité le potentiel d'un analyseur à trappe d'ion pour la caractérisation de différents jus de pamplemousse. La résolution en masse de cet instrument a permis l'identification de la molécule responsable des différences.

## 1.3 Elaboration d'une méthode d'analyse non séparative

### 1.3.1 Sélection de conditions limitant l'introduction d'eau et d'air

Les conditions opératoires choisies ne doivent pas générer de dysfonctionnement ou de pollution rapide de l'appareillage. Dans le cas du spectromètre de masse, le maintien d'un vide de bonne qualité nécessite de limiter les quantités de matière injectées. L'introduction d'oxygène est également connue pour affecter rapidement la durée de vie du filament. Ainsi, le balayage de l'espace de tête avec un gaz inerte avant l'étape d'équilibration constitue une solution simple pour pallier ce risque.

Les matrices agroalimentaires sont par ailleurs souvent caractérisées par une teneur en eau importante qui peut être la source de nombreux problèmes analytiques. Principalement, une forte adsorption d'eau sur les pièges peut affecter tant la reproductibilité des mesures que la durée de vie des adsorbants (Pérès *et al.*, 2001). De plus, la vapeur d'eau injectée peut également perturber fortement l'ionisation des molécules et modifier les spectres de masse (diminution de l'abondance de certains ions, formation d'adduits ; Heatherbell *et al.*, 1971 ; Johnson and Madden, 1990 ; Westendorf, 1992). A terme, l'introduction de quantités d'eau importantes peut altérer le détecteur de masse (Hinshaw, 1990).

Le contrôle de la température lors de l'extraction (température ambiante ou chauffage modéré) constitue la solution la plus simple à mettre en œuvre pour limiter ces problèmes. En complément, plusieurs techniques permettent également de limiter le piégeage de l'eau :

- **l'incorporation de sels hygroscopiques** dans la matrice du produit (Canac-Arteaga, 2001 ; Canac-Arteaga *et al.*, 2000).
- **l'évacuation de l'eau retenue sur le piège par un balayage de gaz sec** (systèmes avec préconcentration). Par exemple, procédure de dry purge pour les systèmes de Purge and Trap (P&T) de type "Tekmar" (Canac-Arteaga *et al.*, 1999b).
- **l'utilisation d'un piège froid** (généralement maintenu entre  $-10$  et  $-15^{\circ}\text{C}$ ) placé entre l'échantillon et le spectromètre de masse (système sans préconcentration) ou entre l'échantillon et l'adsorbant (système avec préconcentration) (Canac-Arteaga *et al.*, 1999a).
- **la perméation**, qui exploite la diffusion sélective des molécules d'eau à travers la paroi d'un tube spécifique, généralement en polymère de type Nafion® (Noij *et al.*, 1987 ; Pankow, 1991 ; Simmonds, 1984).

Ces techniques peuvent cependant conduire à une perte partielle ou totale de familles chimiques, notamment les plus polaires et les plus volatiles (Burns *et al.*, 1982 ; Canac-Arteaga *et al.*, 1999a ; Cochran and Henson, 1988 ; Noij *et al.*, 1987 ; Pankow, 1991 ; Pérès *et al.*, 2001). L'utilisation de sels hygroscopiques et le balayage du piège par un gaz sec sont des techniques simples à mettre en œuvre. A ce titre elles paraissent les plus adaptées pour le développement de méthodes de caractérisation rapide.

### 1.3.2 Correction des dérives : une nécessité pour l'élaboration de bases de données

L'utilisation des systèmes de caractérisation basés sur la reconnaissance d'empreintes nécessite impérativement la création de bases de données représentatives et pérennes. La pérennité des bases de données est très souvent remise en cause par l'instabilité des performances de l'instrumentation. Ainsi, les dérives de signal imputables au vieillissement et à la pollution de l'appareillage doivent être parfaitement maîtrisées afin d'obtenir, pour un produit donné, une empreinte unique et indépendante des paramètres d'acquisition. De nombreux travaux sur ce sujet ont été conduits dans le domaine des senseurs de gaz mais les résultats se sont montrés peu convaincants (Balaban *et al.*, 2000 ; Pearce and Gardner, 1998. ; Schaller, 2000 ; Schaller *et al.*, 2000a). La question de la stabilité temporelle du signal se pose également pour les systèmes de caractérisation par spectrométrie de masse. L'encrassement progressif de la source, les opérations de maintenance (ouverture et nettoyage de la source, changement de l'électro- ou du photo- multiplicateur, remplacement du filament...) ou encore une qualité du vide affectée par l'introduction importante de quantité de matière (Cardinal *et al.*, 2000) peuvent être à l'origine de dérives linéaires, non linéaires ou stochastiques du signal. Malgré les procédures de calibrage (tuning) déjà existantes, l'absence de redressement du signal lors des campagnes d'analyses peut rendre l'exploitation des données moins performante voire impossible. En conséquence, il est important d'être en mesure de suivre "l'état" des détecteurs de masse afin d'en corriger au mieux les évolutions. Pour ce faire, l'opération de normalisation ou de standardisation des spectres est une opération simple, couramment employée, permettant de s'affranchir des effets liés aux variations d'intensité des signaux acquis (sensibilité du détecteur, quantités injectées). Plusieurs approches ont déjà été proposées :

- **Normalisation interne.** La normalisation interne d'un spectre de masse consiste à exprimer l'intensité de chaque fragment de masse soit par rapport à l'intensité d'un fragment de

référence de ce même spectre, soit par rapport à la somme des intensités de tous ses fragments. L'information liée à l'intensité du signal est alors perdue. Cette technique de prétraitement corrige les défauts de reproductibilité des quantités injectées ainsi que les variations de sensibilité du détecteur, à condition qu'elles soient constantes pour tous les fragments de masse. Cependant, dans le cas où les fragments les plus abondants présentent une dérive plus accentuée que les autres, cette correction peut être insuffisante. En 2003, Perez-Pavon *et al.* (Perez Pavon *et al.*, 2003a) ont employé la normalisation interne pour stabiliser la variance de leurs données de HS-MS et assurer la validité de leur modèle de détection de la pollution de sols par des produits pétroliers pendant une année.

- **Standardisation interne.** Elle nécessite l'ajout dans chaque échantillon d'une quantité connue d'une ou plusieurs molécules (standard interne) dont les fragments, et plus particulièrement le fragment choisi comme référence, n'interfèrent pas avec les ions des produits analysés. L'intensité de chaque fragment de masse de l'échantillon est alors divisée par l'intensité d'un fragment spécifique au composé standard ajouté. Les effets sont identiques à ceux de la normalisation interne, mais l'information quantitative est conservée (Marsili, 1999). Dans une étude sur la prédiction de la date limite de consommation du lait par SPME-MS, Marsili (Marsili, 2000) a pu s'affranchir des dérives du signal imputables à des problèmes instrumentaux importants (utilisation consécutive de plusieurs fibres SPME, changement de la pompe turbomoléculaire et remplacement du multiplicateur d'électron) grâce à l'ajout de chlorobenzène comme étalon interne. Cependant, cette technique impose de nouvelles étapes de manipulation de l'échantillon pour l'ajout du standard. De plus, les standards internes sont difficiles à trouver car leur fragmentation ne doit pas interférer avec celle de l'échantillon. Enfin, la mise en œuvre de ce type de méthode n'est possible que pour des échantillons en solution. Dans le cas de produits solides, il est difficile d'envisager cette option sans une étape de solubilisation de la matrice.

La standardisation interne a également déjà été effectuée par rapport à un ion naturellement présent dans tous les spectres et dont la variance était supposée indépendante des produits analysés (par exemple un fragment issu du bruit de fond). Schaller *et al.* ont ainsi proposé l'utilisation du fragment  $m/z = 40$  (argon) en tant que référence (Feldhoff *et al.*, 2000 ; Schaller, 2000). Ce choix apparaît peu robuste, le niveau d'argon dans un laboratoire étant loin de constituer une référence stable sur du long terme. Ce gaz est en effet fréquemment employé dans les laboratoires (inertisation, détection de fuites pour la maintenance des spectromètres de masse). De plus sa proportion dans l'air ambiant varie selon la localisation

géographique, ce qui limite les échanges de données entre laboratoires. Cette solution n'est donc applicable que pour des campagnes localisées et de courte durée.

- **Normalisation externe.** Cette méthode consiste à exprimer le spectre de masse des différents échantillons en fonction des spectres d'une référence analysée indépendamment de l'échantillon et à intervalles réguliers. La normalisation externe nécessite l'analyse et la gestion d'échantillons calibrés, ce qui est parfois difficile, notamment dans le domaine agroalimentaire (propriétés physico-chimiques du produit, durée de conservation). Cette méthode est particulièrement efficace dans le cas de dosages, l'échantillon de référence pouvant alors être une solution calibrée du ou des produits étudiés. Ainsi, Goodacre et Kell (Goodacre and Kell, 1996) ont appliqué avec succès cette approche pour le dosage du lysozyme dans le glycogène. En 2003 Perez-Pavon *et al.* (Perez Pavon *et al.*, 2003a) ont proposé une autre approche pour la quantification de composés organiques volatils par NSA-MS. A partir de l'analyse d'un set d'échantillons calibrés contenant les composés à doser, ils ont construit des modèles de calibration multivariés valides sur plus d'une année. La méthode s'est montrée efficace, mais a nécessité l'emploi de sets de calibration important. Ces techniques restent limitées au cas où un ou des composés sont spécifiquement recherchés. Ces méthodes ne sont donc pas aisément transposables à n'importe quelle campagne de NSA-MS.

Dans le but d'apporter une contribution significative à la résolution des problèmes liés à la pérennisation des banques de données spectrales, nous avons proposé une nouvelle méthode de correction des dérives temporelles des spectromètres de masse par ajout d'un gaz de référence (Standard Gaz Addition). Cette méthode sera développée dans la deuxième partie de ce mémoire.

### 1.3.3 Sélection des fragments de masse pertinents et établissement d'un diagnostic

Si les empreintes spectrales présentent un grand nombre de fragments, une partie de ce signal est souvent non informative. Une sélection des fragments répondant au problème posé s'avère donc nécessaire. Plusieurs stratégies sont alors envisageables.

- **La connaissance préalable de la composition du produit** permet souvent de déterminer les molécules d'intérêt dont les fragments de masse spécifiques seront exploités dans le cadre



de l'analyse non séparative. Ainsi, l'identification structurale ou la caractérisation des composés clés de l'arôme (Arora *et al.*, 1995 ; Stevenson *et al.*, 1996) peuvent être très utiles pour orienter la conduite d'une analyse non séparative (Mariaca *et al.*, 1999 ; Wampler, 1997). Le choix des paramètres expérimentaux (sélection de la technique d'extraction, conditions de température, de pression, préparation de l'échantillon, etc.) se fait alors en vue d'obtenir une réponse optimale pour ces fragments de masse. Il est ainsi possible de focaliser les performances du spectromètre de masse sur la détection de quelques fragments précis afin d'accroître sa sensibilité. Cette approche est particulièrement intéressante pour les systèmes de NSA-MS ne disposant pas de système de préconcentration des molécules. Dans le cas d'une étude sur la caractérisation de clous de girofle (Dittmann and Nitz, 2000), une série d'analyses séparatives par HS-GC-MS a mis en évidence que l'abondance de 3 molécules permettait de les discriminer selon leur fraîcheur. Le fragment caractéristique majoritaire de chaque molécule avait été sélectionné. La campagne d'analyses a donc été conduite en focalisant les performances du spectromètre sur la détection de ces 3 ions, aboutissant ainsi à une classification satisfaisante et robuste des produits. En 2004, Watanabe *et al.* ont discriminé le stade de maturation du fruit *Salacca edulis Reinw.* à partir des ions caractéristiques des méthyls esters contenus dans les empreintes spectrales acquises par HSS-MS (Supriyadi *et al.*, 2004).

- **L'utilisation de méthodes statistiques** permet également de sélectionner les fragments caractéristiques. En effet, il est généralement impossible de tester de façon exhaustive toutes les combinaisons de  $n$  fragments parmi  $p$ , la charge de calcul devenant rapidement considérable. A titre d'exemple, si  $n = 10$  et  $p = 150$ , le nombre de combinaisons est supérieur à  $10^{15}$ . Ainsi, diverses techniques sous-optimales de sélection basées sur des méthodes statistiques permettent d'obtenir des solutions performantes dans un temps de calcul raisonnable.

Selon la problématique, deux cas de figures sont envisageables.

- 1- Les données peuvent présenter une structure propre et exploitable, c'est-à-dire que les variations du caractère étudié dans les échantillons induisent dans les spectres de masse des modifications visibles à l'examen direct ou à l'aide d'outils d'analyse statistique non supervisés (analyse en composantes principales, décomposition de la variance).
- 2- Dans l'autre cas, les différences entre spectres sont plus faibles que celles évoquées précédemment. Il est alors nécessaire d'employer des méthodes supervisées qui sélectionnent sous contrainte les fragments ou les combinaisons de fragments répondant

au problème posé (sélection pas à pas ascendante ou descendante, réseaux neuromimétiques).

Mais la sélection des variables par voie statistique doit s'appuyer sur une validation chimique. En effet, la pertinence des fragments sélectionnés doit être appréciée par l'utilisateur sur la base de sa connaissance du produit. L'analyse détaillée de la composition d'un ou de deux échantillons de l'étude contribue à cette connaissance. En effet, même s'il est parfois délicat de relier de manière catégorique un fragment de masse d'une empreinte à un composé volatil unique, certains ions sont suffisamment caractéristiques de familles chimiques pour pouvoir remonter à leur origine moléculaire probable (composés soufrés, esters, cétones). Dans une étude sur la caractérisation rapide de fromages par DHS-MS, Pérès (Pérès *et al.*, 2002b) a ainsi montré que parmi les 5 fragments sélectionnés par une procédure pas à pas ascendante, 3 étaient des fragments majoritaires de composés soufrés identifiés par GC-MS.

Une fois sélectionnés, les fragments de masse servent de variables prédictives utilisées lors de l'élaboration de modèles statistiques. En fonction de la problématique, l'expérimentateur pourra mettre en œuvre des méthodes de visualisation (analyse en composantes principales), des méthodes de classification/reconnaissance (analyse factorielle discriminante, classification ascendante hiérarchique, moindre carrés partiels) ou encore des méthodes d'estimation/quantification (régressions, réseaux neuromimétiques). L'analyse en composantes principales et l'analyse factorielle discriminante sont en général les outils les plus utilisés (Dittmann and Nitz, 2000 ; Dittmann *et al.*, 1998 ; Dittmann *et al.*, 2000 ; Goodner and Rouseff, 2001 ; Marsili, 1999 ; Schaller, 2000). La méthode des moindres carrés partiels (PLS) a été mise en œuvre notamment par Marsili (Marsili, 2000) pour l'estimation de la date limite de consommation du lait.

Pour être validés, les modèles obtenus devront être confrontés à des données de test, *in extenso* des échantillons qui n'ont pas été utilisés lors des étapes de construction des modèles. Cette étape est primordiale pour tester la robustesse des estimations ou des classifications effectuées et permet d'éviter la formulation d'un diagnostic biaisé par une sur-modélisation des données d'apprentissage.

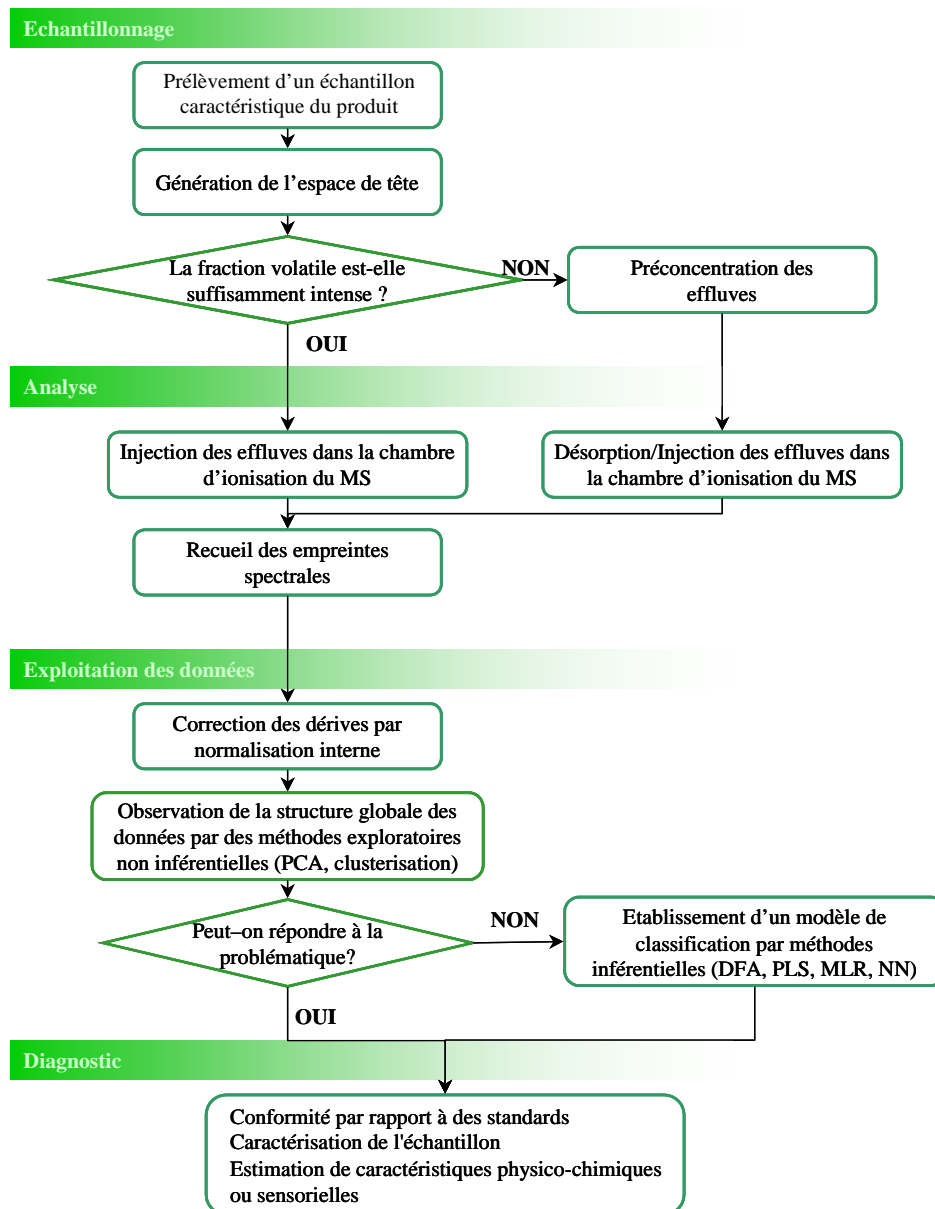
## 1.4 Conclusion

Les techniques de NSA-MS constituent une approche prometteuse pour la caractérisation de produits agroalimentaires. Ces systèmes aboutissent à l'obtention, en quelques minutes et souvent de manière non destructive, de l'empreinte spectrale d'un échantillon à partir de sa fraction volatile. Différentes techniques d'extraction-injection des composés volatils permettent de tenir compte des spécificités des matrices étudiées. Les étapes clés de l'élaboration d'une stratégie d'analyse non-séparative d'espace de tête par spectrométrie de masse sont résumées dans l'organigramme présenté en figure 2.

A l'issue de ce bilan, trois axes de recherche sont apparus essentiels pour le développement des NSA-MS :

- l'optimisation des conditions d'acquisition du signal par le spectromètre de masse, sujet qui n'a pas été abordé actuellement,
- le choix de la méthode d'échantillonnage et le pré-traitement des données spectrales avant leur exploitation,
- la pérennisation des signaux enregistrés par correction des variations du signal spectral liées aux dérives instrumentales. Cette étape est indispensable à l'établissement de bases de données.

Les résultats de ces recherches sont développés dans les parties suivantes de ce mémoire.



**Figure 2 :** organigramme d'une analyse non séparative d'espace de tête - spectrométrie de masse

# 2

## **Optimisation du réglage du spectromètre de masse pour l'acquisition d'empreintes spectrales**

## **Partie 2 : Optimisation du réglage du spectromètre de masse pour l'acquisition d'empreintes spectrales**

---

Les recherches sur l'optimisation du signal issu de NSA-MS ont essentiellement été axées sur les techniques d'échantillonnage de la fraction volatile avant injection dans le MS. Jusqu'à présent, les paramètres du MS étaient fixés par analogie avec les valeurs ordinairement employées pour les analyses séparatives, sans qu'aucun travail de recherche n'ait étayé ce choix. Ainsi, l'énergie d'ionisation des molécules était-elle tacitement fixée à 70eV, valeur usuellement employée en GC-MS. Ce niveau d'énergie assure en effet à la fois un bon rendement d'ionisation et l'obtention d'un spectre de masse caractéristique de la molécule ionisée. Cependant, lors de NSA-MS, les conditions d'ionisation sont différentes puisque toutes les molécules capturées dans l'espace de tête de l'échantillon sont fragmentées simultanément. Il n'est pas prouvé que des conditions optimales pour des analyses séparatives le soient également pour des analyses non séparatives. Ainsi, l'ionisation à 70eV aboutit à la production d'un grand nombre de fragments de faible poids (<80 uma), peu ou pas spécifiques de leur origine moléculaire. Les fragments de poids plus élevés étant plus caractéristiques de la molécule originale, la limitation de l'énergie d'ionisation pour favoriser le recueil de fragments de poids moléculaire élevés pourrait aboutir à des empreintes spectrales plus informatives. L'influence de l'énergie d'ionisation sur la qualité des empreintes d'espace de tête statique - spectrométrie de masse a donc été étudiée. Dans le cadre de cette étude, et afin d'estimer au mieux le potentiel informatif des signaux recueillis, le bruit spectral a été estimé pour pouvoir le dissocier de l'information contenue dans les empreintes spectrales.

Ces travaux ont fait l'objet d'un article paru en 2002 dans *Sensors and Actuators B*.

## 2.1 Influence de l'énergie d'ionisation sur la qualité des empreintes spectrales obtenues par espace de tête statique-spectrométrie de masse

### Influence of ionisation energy on the quality of static head space-mass spectrometry spectral fingerprints

F. Begnaud\*, J.L. Berdagué

*SRV/Flaveur, INRA de Theix, F63122 Saint-Genès-Champagnelle, France*

Received 6 June 2001; received in revised form 3 October 2001; accepted 10 October 2001

---

#### Abstract

The influence of the ionisation energy on the quality of spectral fingerprints recorded by static head space-mass spectrometry (SHS-MS) was studied on cheese, wine and flavoured soda. The parameters used to assess signal quality were noise level of spectra, total signal abundance, range of mass fragments above noise, signal-to-noise ratio of each mass fragment, and discriminating power of the spectral fingerprints. These parameters were measured at eight levels of ionisation energy ranging from 35 to 95 eV. Overall, up to 70–80 eV the quality of the mass spectra increased. Fine analysis of the mass spectra shows that the levels of ionisation energy that yielded the best signal-to-noise ratios were specific to the material being studied. This work also shows that a thorough study of the spectral noise helps optimise the spectral acquisition parameters and their exploitation in predictive models. © 2002 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

*Keywords:* Head space-mass spectrometry; Ionisation energy; Direct injection; Noise level

---

#### 1. Introduction

Analysis by direct injection-mass spectrometry consists in introducing a mixture or a gaseous extract directly into the ionisation chamber of a mass spectrometer. This injection, which is thus carried out with no prior chromatographic separation, affords a mass spectrum that serves as a fingerprint of the injected volatile fraction. This type of spectrum very often contains enough information to make it useful for fast characterisation or recognition of a wide range of substances and compounds. To date, research on the optimisation of the signal provided by the mass spectrometer with direct injection has mainly focused on procedures for sampling volatile components before their injection into the mass spectrometer. Thus, sampling can be carried out either with no prior pre-concentration step, using the static head space-mass spectrometry (SHS-MS) technique [1–5], or after a pre-concentration step generally of purge-and-trap type [6] or involving solid phase microextraction [7,8]. In contrast, no specific research on the analytical implications of the operating procedure (electron impact, chemical ionisation, etc.) and the fine setting of the mass spectrometer (type and energy of ionisation, management of signal drift

over long measurement periods, lifetime of filaments during repeated analysis runs, etc.) has yet been published. In this work we studied how the ionisation energy, in an electron impact fragmentation configuration, modified the quality of the signals obtained by automated SHS-MS. The parameters used to assess signal quality were noise level of spectra, total signal abundance, size range of mass fragments emerging above noise, signal-to-noise ratio of each mass fragment and discriminating power of the spectral fingerprints. These parameters were measured at eight ionisation levels ranging from 35 to 95 eV on three different materials: cheese, wine and flavoured soda.

#### 2. Materials and methods

##### 2.1. Nature and origin of samples

Three materials with widely differing volatile fractions were selected [9–11]. They were: (i) Président<sup>®</sup> Camembert cheese (limited desorption of a volatile fraction of small saturated and unsaturated organic molecules bearing one or more carboxyl, carbonyl, hydroxyl or sulphur-containing functional groups), (ii) Coteaux d'Ancenis 1998 red wine made with Gamay grapes (moderate desorption of a volatile fraction mainly comprising ethanol and to a lesser extent phenols, terpenes, alcohols and esters), and (iii) Coca Cola<sup>®</sup>

---

\* Corresponding author.

E-mail address: frederic.begnaud@clermont.inra.fr (F. Begnaud).

soda (high desorption of a volatile fraction very rich in terpenes, organic acids, esters, etc.).

## 2.2. Preparation of samples

The cheese samples were cubes of edge 0.5 cm obtained from a homogeneous portion of Camembert following complete removal of its soft rind. The samples of wine and soda were 5 ml aliquots. Before sampling, a unique volume of 200 ml of the soda was degassed by magnetic stirring (10 min) to remove the excess of carbon dioxide. For each material the 24 samples were taken and placed in capped vials (10 ml vials: ref. 5182–0838, Agilent Technologies; butyl/teflon septum: ref. 9301–0976, Agilent Technologies) in less than 15 min.

## 2.3. Generation of head space

The SHS generator (HP7694, Agilent Technologies, Les Ulis) comprised an automatic feed line with a total capacity of 44 vials equipped with an incubator to heat the samples. Enrichment of the head space was carried out at 80 °C for 20 min for the cheese samples and 50 °C for 20 min for the two liquids. At the end of this enrichment phase the vial was pressurised for 0.3 min by injection of extractor helium at 2.35 bar (Helium U, Air Liquide). Transfer of the vapour phase to the calibrated injection loop (volume: 3 ml, temperature: 95 °C for the cheese and 70 °C for the liquids, fill time: 0.15 min) was achieved by pressure release from the vials. Under the pressure of the carrier gas helium (flow rate: 10 ml min<sup>-1</sup> for 2 min), the vapour phase was injected into the mass spectrometer via a transfer line (length: 1 m, i.d.: 100 µm, lining: Silcosteel<sup>®</sup>, temperature: 115 °C for the cheese and 90 °C for the liquids, injection leak: 9 ml min<sup>-1</sup>). The average duration of one analysis was 5.2 min.

## 2.4. Mass spectrometry

The mass spectrometer was a quadripolar detector operating by electron impact (HP5973, Agilent Technologies, Les Ulis). The systems for processing detection and data acquisition parameters were computer-driven (Chemstation G1701BA v.B.01.00, copyright Hewlett-Packard 1989–1998). The computerised SHS-MS coupling instrumentation was named Chemical Sensor (HP4440, Agilent Technologies, Les Ulis). The spectral fingerprint provided by the software was the sum of the 720 mass spectra recorded during the 2 min acquisition time. This spectral fingerprint was built-up fragment by fragment using the formula:  $\mathcal{A}Fi = \sum_{\text{spectrum}=1}^{720} \max(Fi - 0.3; Fi + 0.3)$ , where  $\mathcal{A}Fi$  = abundance of fragment  $Fi$ ,  $i$  ranging from 33 to 180 amu;  $Fi - 0.3$  = intensity of the mass fragment ( $i - 0.3$ ) amu;  $Fi + 0.3$  = intensity of the mass fragment ( $i + 0.3$ ) amu. After acquisition, the intensity of the different mass fragments forming the spectral signature of each of the materials was automatically include into a results

matrix. In all, 148 mass fragments were acquired between 33 and 180 amu. The levels of ionisation energy were chosen with reference to (i) the work of Kienitz [12] on the production of ions by electron impact and (ii) the technical limits of the mass spectrometer. The experimental domain used ranged from 30 eV (signal too weak below this value) to 100 eV (to preserve the electron-generating filament). Eight energy levels were tested: 35, 50, 60, 65, 70, 75, 80 and 95 eV.

## 2.5. Experimental design

Each material was analysed three times running in increasing order of the eight ionisation energy settings. In all 72 SHS-MS spectra were recorded (three materials × eight ionisation energy settings × three repeats) and a (72 × 148) matrix was obtained. The 24 analyses of each material were performed on the same day to limit the effects of seasoning of the samples. To stabilise the instrumentation before and after each change of energy level blanks (vials containing ambient air) were intercalated between the eight sequences of three repeats. These blanks also enabled us to confirm the absence of memory effects between analyses.

## 2.6. Data analysis

For each of the three materials a (24 × 148) matrix was obtained. The absence of any anomalous spectrum in each of the three matrices was confirmed visually by principal components analysis [13].

### 2.6.1. Measurement of noise level and definition of detection threshold

The mass fragments of very low abundance that display a stochastic evolution were considered as noise elements in spectra. The average level of noise could be determined either empirically by visual inspection, or by a non-parametric method. This method consisted in measuring the abscissa of the first point of inflection on the curve plotting the evolution of the number of mass fragments in each spectrum as a function of the logarithm of their abundance (Fig. 1). This point of inflection (determined by the tangent method) represents the boundary between two distributions: that of the mass fragments of very low intensity that follow a normal distribution (left part of the curve) and that of mass fragments derived from injected volatile compounds that follow a log-normal distribution (right part of the curve). The ordinate of the inflection point corresponds to the noise level (Nb) in the spectrum. The instrumental detection threshold (Td) of the mass fragments in the spectra was set at  $Td = 2Nb$  (Fig. 3). The value of Td determined in this way is more accurate than the value estimated after close inspection of the spectra by an expert familiar with the instrumentation. The values Nb and Td were measured for each of the 72 SHS-MS spectra recorded.



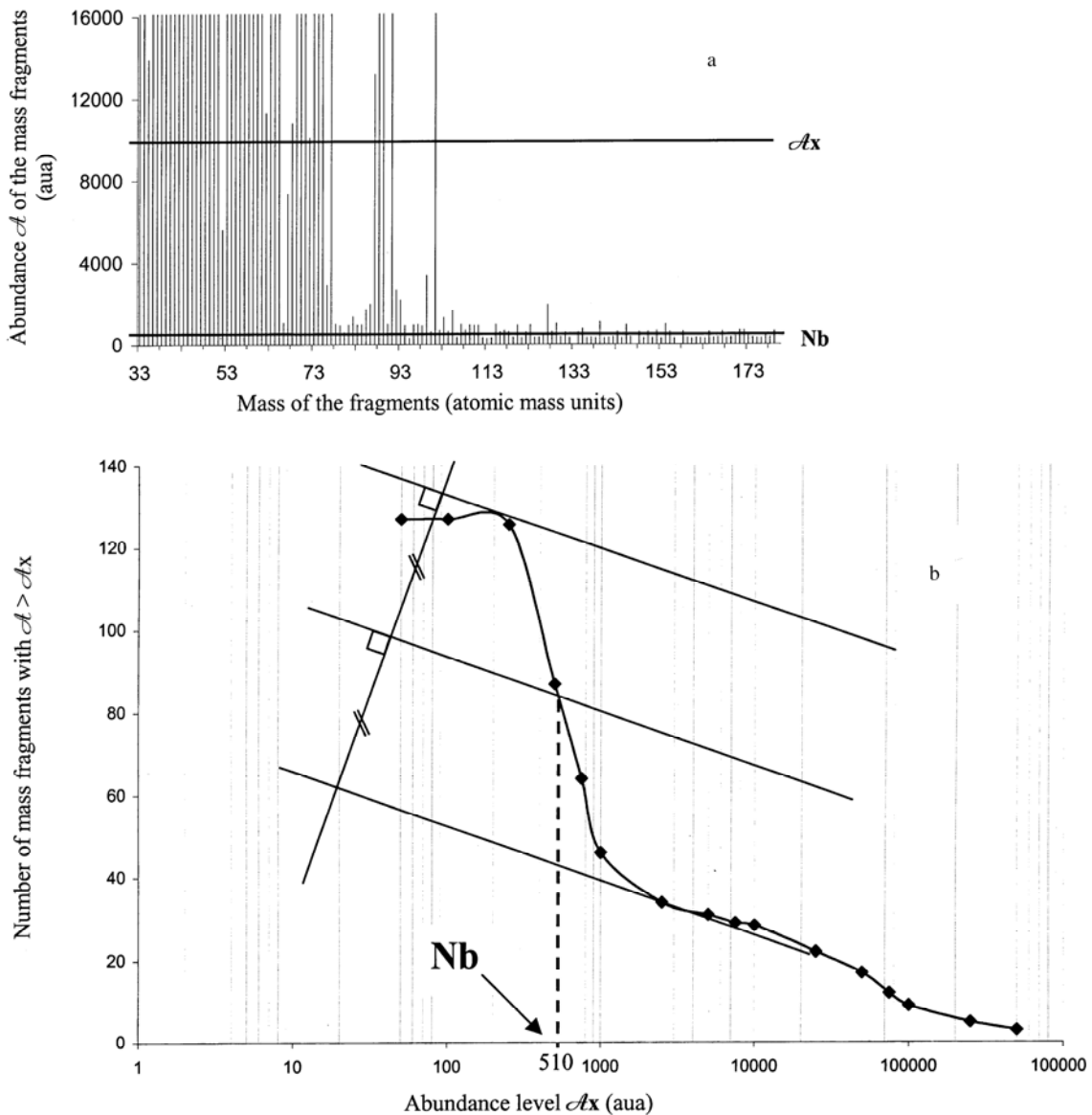


Fig. 1. Geometric determination of noise level (Nb) in spectral fingerprints. From any mass spectrum (part a) it is possible to count the number of fragments of which the abundance  $\mathcal{A}$  is greater than a given floating threshold value  $\mathcal{A}_x$ . The evolution of the number of mass fragments determined in this way as a function of the logarithm of  $\mathcal{A}_x$  with  $\mathcal{A}_x$  ranging between 0 and the abundance value for the largest mass fragment affords the curve presented in part b. The abscissa of the first inflection of this curve is Nb.

### 2.6.2. Localisation of best signal-to-noise ratios ( $\mathcal{A}/\text{Nb}$ ) according to ionisation energy

This operation was carried out for each material and for all the mass fragments for which the ratio  $\mathcal{A}/\text{Nb}$  was greater than 2. For each of those mass fragments a comparison of means test was carried out to determine the levels of ionisation energy that formed a homogeneous group ( $P < 0.05$ ) of maximum  $\mathcal{A}/\text{Nb}$  ratios. The Newman–Keuls test was chosen for comparison of means [14]. The homogeneous

groups of maximum  $\mathcal{A}/\text{Nb}$  ratios were visualised synthetically in localisation tables (Fig. 4).

### 2.6.3. Estimation of discriminating power of spectral fingerprints according to ionisation energy

A principal components analysis [13] was carried out on the ( $72 \times 148$ ) matrix that grouped all the analyses of the three materials at the eight different ionisation energy levels. To emphasise the shape of the spectra rather than their

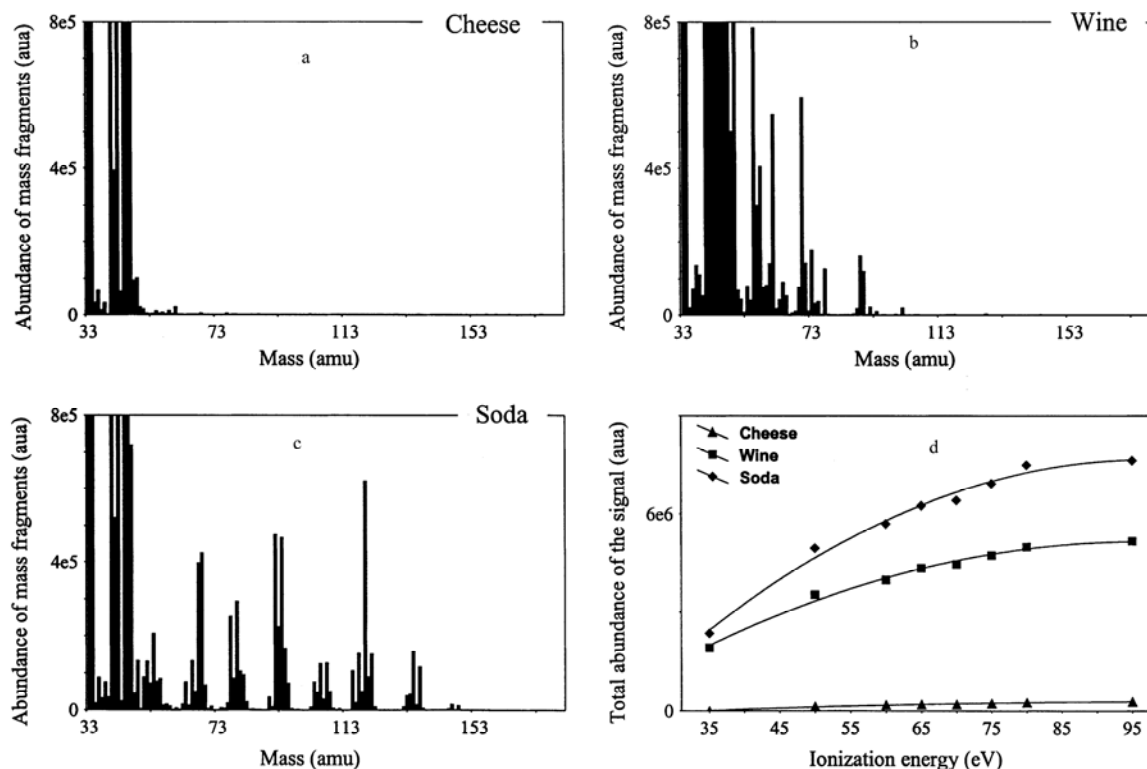


Fig. 2. Examples of mass spectra recorded by SHS-MS at 70 eV for each of the three materials (parts a–c). To visualise the fragments with low abundance the scale has been deliberately restricted to  $8 \times 10^5$  aua. The effect of ionisation energy level on the total abundance of the signal corresponding to the sum of mass fragments between 50 and 150 amu is shown in part d.

intensity, this analysis was performed from normalised spectral data. The discriminating power of the spectral fingerprints was quantified by calculating the mean Euclidean distance between materials at different ionisation energies. This distance was calculated in the space of the first three principal components, which condense 75% of the data variance.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Visual analysis of spectra

Fig. 2a–c show that the shape of the spectra and their total abundance vary very widely according to the studied material. Thus, at first sight the spectra of the cheese showed a much smaller number of abundant mass fragments than those of the wine or the soda. For example, at 70 eV the range of mass fragments of abundance greater than  $1 \times 10^5$  aua was 33–48 amu for the cheese, 33–89 amu for the wine and 33–136 amu for the soda. The most abundant mass fragments corresponded to carbon dioxide (cheese), small molecules derived from alcoholic fermentation (wine) and esters and terpenes (soda). Systematically, the mass fragments with molecular weights below 50 amu contributed

strongly to the total abundance of the spectra. As these fragments were generally weakly specific, the effect of the ionisation energy on the abundance of the spectra (Fig. 2d) was studied in the range of fragments  $50 < m/z < 150$  amu. A study of the total ion count (TIC) in this zone prevented masking information by molecules such as ethanol or carbon dioxide, which are present in large amounts in the head space. In this area the total abundance of the spectra increased according to the ionisation energy (Fig. 2d). In addition, the differences between the abundances of the materials increased between 35 and 80 eV and then became stable. The effect of ionisation energy on the total abundance of the spectra between 50 and 150 amu was therefore positive, but the gain depended on the composition of the head space being analysed.

#### 3.2. Influence of ionisation energy on detection threshold

Fig. 3 shows that the detection threshold increases according to the ionisation energy. This increase was, however, stronger for the wine and the cheese than for the soda. This effect had two complementary causes. It has been demonstrated experimentally that the noise of an electronic impact source decreases as a linear function of the mass of the fragments. In a mass spectrum the fragments containing

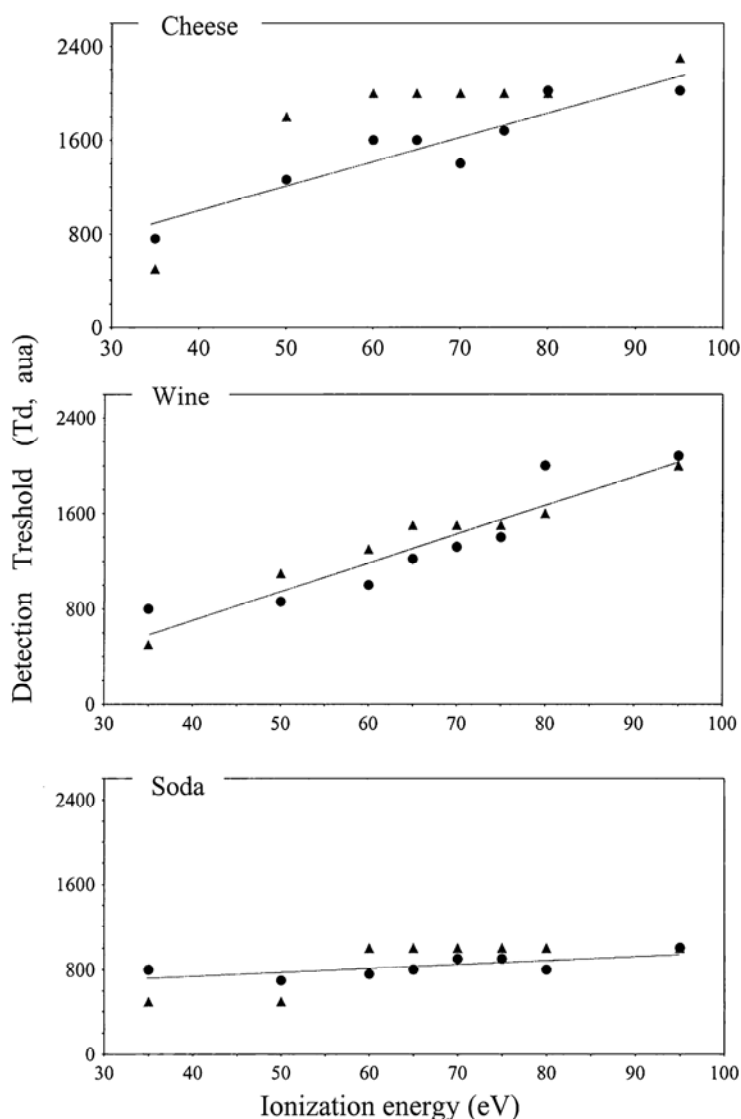


Fig. 3. Effect of ionisation energy level on the visual (▲) and measured (●) experimental detection threshold for each of the three materials.

information about the material mask a large proportion of the noise. In our study noise was observable only in the ranges  $150 < m/z < 180$  amu for the soda,  $130 < m/z < 180$  amu for the wine and  $70 < m/z < 180$  amu for the cheese (Fig. 2c–a). Hence, the noise observed for the soda was bound to be less than that observed for the wine or for the cheese.

### 3.3. Localisation of the best signal-to-noise ratios ( $\mathcal{A}/Nb$ ) according to the ionisation energy

After describing the shape, abundance and noise of the spectral fingerprints it is important from a metrological standpoint to describe the signal-to-noise ratio ( $\mathcal{A}/Nb$ ). The localisation of the best signal-to-noise ratios ( $\mathcal{A}/Nb$ )

according to the ionisation energy was carried out for each material for all the mass fragments with a value of  $\mathcal{A}/Nb$  greater than 2 (Fig. 4). The range of mass fragments with ratio  $\mathcal{A}/Nb$  above 2 was much broader for the soda and the wine than for the cheese. This means that for the cheese the number of fragments carrying information was very small compared with the soda or the wine, which confirms the observations in Fig. 2a–c. In addition, whatever the material, SHS-MS analyses show that there was no relevant information beyond 150 amu. More specifically, our study indicates that irrespective of the ionisation energy, recording mass fragments beyond 90 amu for cheese, 130 amu for wine and 150 amu for soda is not worthwhile. Practically, it is therefore possible to improve the quality of the measurements by

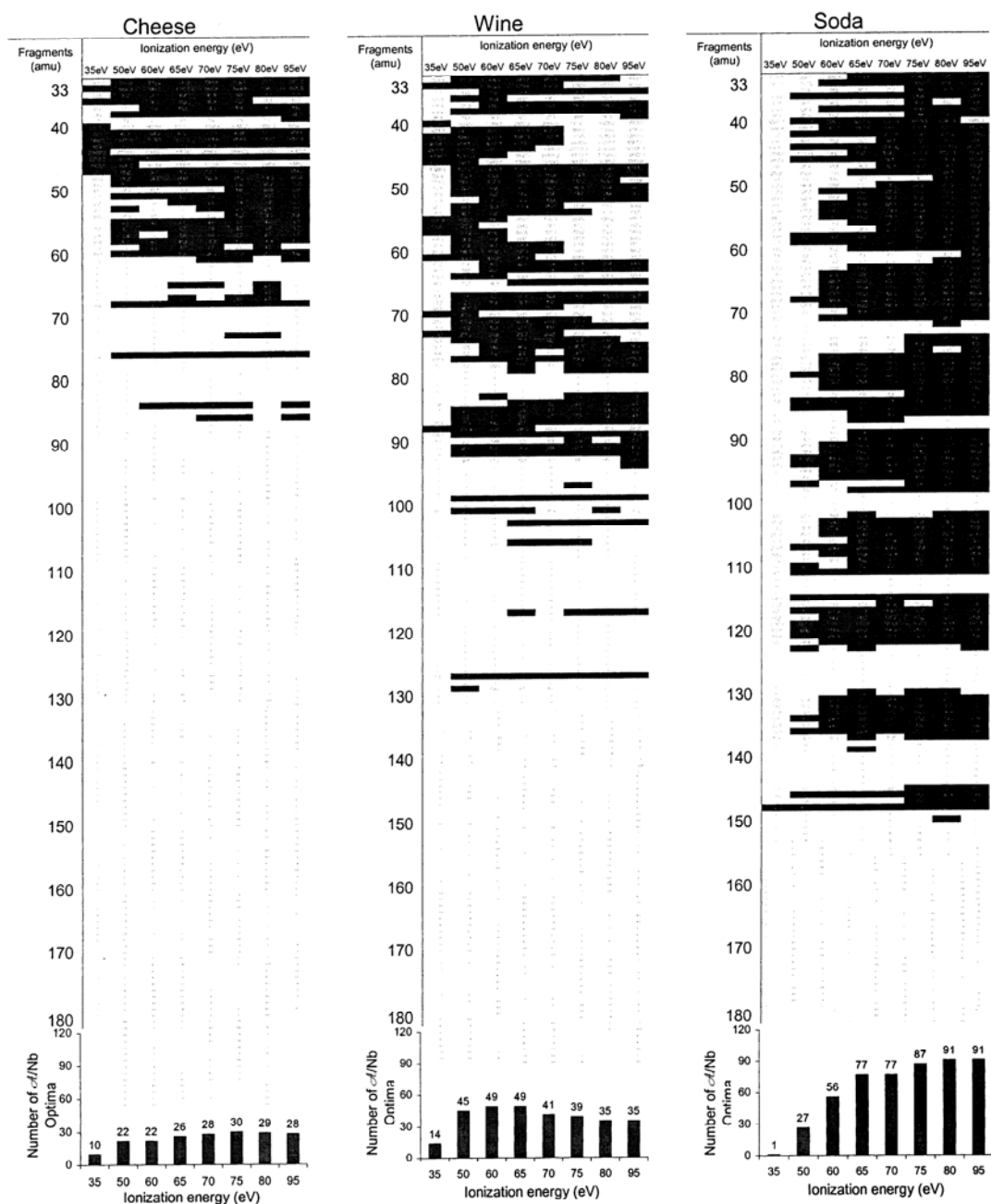


Fig. 4. Localisation of maximum signal-to-noise ratios ( $S/Nb$ ) per material and for each mass fragment, the homogeneous group (Newman–Keuls test) of maximum  $S/Nb$  ratios according to ionisation energy is highlighted.  $S/Nb$  values below 2 were ignored and replaced by dotted lines. Each table is followed by a histogram representing the number of maximum  $S/Nb$  ratios per ionisation energy level.

deliberately limiting the range of recording of the mass fragments and thus increasing the frequency of acquisition of the spectra. For any given material it is also useful to eliminate from this range those fragments that remain below the detection threshold. This avoids introducing noise into the regression and classification operations that are

frequently carried out from this type of signal. This further demonstrates that a thorough study of spectral noise is necessary before undertaking to build predictive statistical models. Lastly, according to the fragment masses the maximum  $S/Nb$  ratios are not localised at the same ionisation energies, especially for the wine and the cheese. It is

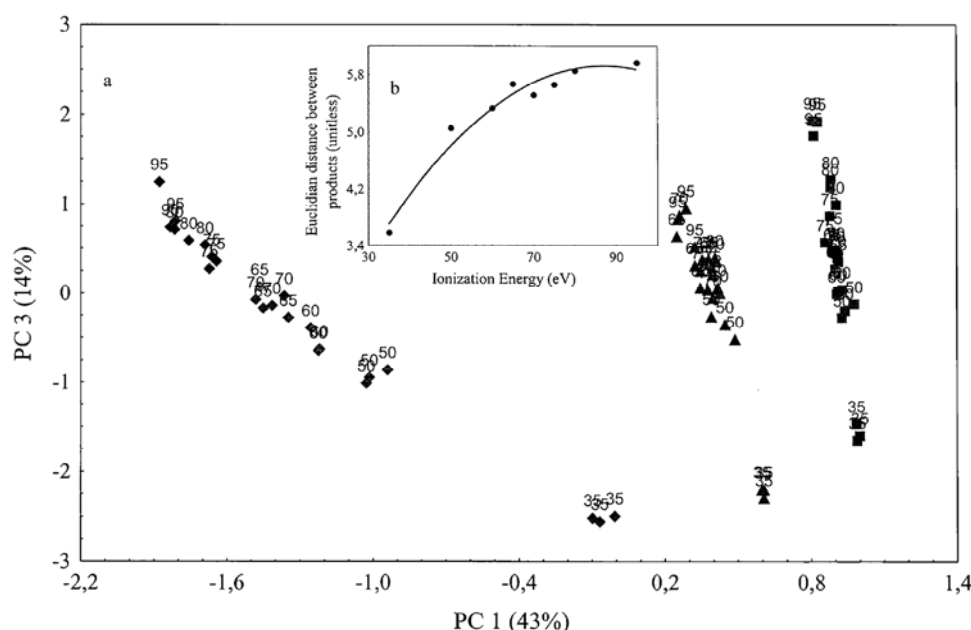


Fig. 5. Plane 1–3 of the principal components analysis (PCA) obtained from the 148 mass fragments of each of the 72 spectra (three materials  $\times$  eight ionisation energy levels  $\times$  three repeats). This plane (part a) visualises (i) the evolution of the shape of the spectra between materials ( $\blacktriangle$ ) cheese, ( $\blacksquare$ ) wine, ( $\blacklozenge$ ) soda) as a function of the ionisation energy, and (ii) the evolution of the distances between materials as a function of ionisation energy. The evolution of the Euclidean distance (part b) was calculated in the space defined by the first three components of the PCA.

therefore impossible, for these materials, to establish a rule to localise maximum  $\mathcal{A}/\text{Nb}$  ratios for a given ionisation energy. However, for the soda, whatever the masses of the fragments studied, the best  $\mathcal{A}/\text{Nb}$  ratios always appeared at high ionisation energies.

### 3.4. Estimation of the discriminating power of the spectral fingerprints as a function of ionisation energy

Regardless of the ionisation energy it was possible to discriminate the materials by PCA (Fig. 5a), which was unsurprising given their widely differing compositions. The calculation of the Euclidean distance in the space of the first three principal components shows how the discriminating power of the fingerprints depend on the ionisation energy (Fig. 5b). Specifically, the calculated Euclidean distance between the materials increased strongly between 35 and 70 eV and then more moderately up to 95 eV. Experimentally, this means that the discriminating power of the fingerprints was best between 70 and 95 eV. It is important to note that as the PCA was performed from normalised spectra the observed increase in distances was not linked to modifications of signal intensity but to modifications of signal shape. These changes in the shape of the spectra are the cause of the tailing observed in plane 1–3 of the PCA. A more detailed study of the evolution of the shape of the normalised spectra was conducted by following the evolution of the ratio of the abundances of heavy fragments

( $110 < m/z < 150$ ) to the abundances of light fragments ( $50 < m/z < 80$ ). The study showed no simple relationship between ionisation energy and this ratio. The complexity of the evolution of the shape of the spectra for gaseous mixtures is probably closely linked to the mechanisms of fragmentation and rearrangement of the ions produced in the source.

## 4. Conclusion

This study shows that the ionisation energy influences the quality of the spectra recorded by SHS-MS. In general the total abundance of the mass fragments and the discriminating power of the mass spectra increase with the ionisation energy level. However, the behaviour of the spectra with respect to certain quality criteria remains specific to the material being analysed. Thus, the energy level yielding the best signal-to-noise ratios varied according to the material studied. Even so, the improvement in the recorded signal was not sufficient to overcome the difficulties met in analysing materials with weakly concentrated head spaces. Whatever the level of ionisation energy the cheese spectrum was always much poorer than those of the wine and the soda. Finally, a thorough study of the spectral noise present in the mass spectra helps to optimise the acquisition parameters (range of mass fragments recorded) and the variables introduced in the predictive statistical models.

## References

- [1] V. Shiers, A.D. Squibb, A new mass spectrometry-based electronic nose for head space characterisation, in: Proceedings of the 5th Symposium on Olfaction and Electronic Nose, Hunt Valley, Baltimore, USA, 1998.
- [2] F. Begnaud, C. Viallon, C. Denoyer, P. Tournayre, C. Cuinier, D. Picque, J.L. Berdagué, Use of fast analytical methods based on mass spectrometry to characterize wine's origin. Application to Beaujolais, Gaillac and Touraine's wines, in: Proceedings of the 15th International Mass Spectrometry Conference, Barcelona, Spain, 2000.
- [3] F. Begnaud, C. Viallon, C. Denoyer, P. Tournayre, C. Cuinier, D. Picque, J.L. Berdagué, Caractérisation de l'origine des vins par deux méthodes d'analyses rapides application aux vins du Beaujolais, de Gaillac et de Touraine, in: Proceedings of the XXVème Congrès Mondial de la Vigne et du Vin, Paris, 2000.
- [4] F. Begnaud, C. Viallon, D. Picque, J.L. Berdagué, Caractérisation rapide de produits agro-alimentaires par spectrométrie de masse: application au vin et au fromage, submitted for publication.
- [5] J.L. Berdagué, C. Viallon, F. Begnaud, J.P. Frencia, Stérilisation des farines de viandes: prédiction des barèmes de cuisson par la méthode d'espace de tête statique-spectrométrie de masse, *Viandes et Produits Carnés* 21 (1) (2000) 3–10.
- [6] G. Vernat, J.L. Berdagué, Dynamic Head Space-Mass Spectrometry (DHS-MS): A New Approach to Real-Time Characterisation of Food Products, Bioflavour 95, Dijon, INRA, Paris, 1995.
- [7] C. Peres, C. Viallon, J.L. Berdagué, Solid phase microextraction-mass spectrometry: a new approach to rapid characterization of cheeses, in: Proceedings of the 15th International Mass Spectrometry Conference, Barcelona, Spain, 2000.
- [8] C. Peres, C. Viallon, J.L. Berdagué, Solid phase microextraction-mass spectrometry: a new approach to rapid characterization of cheeses, *Anal. Chem.* 73 (5) (2001) 1030–1036.
- [9] H.D. Belitz, W. Grosch, *Food Chemistry*, 2nd Edition, Springer, Germany, 1999, pp. 508–512.
- [10] H.D. Belitz, W. Grosch, *Food Chemistry*, 2nd Edition, Springer, Germany, 1999, pp. 857–860.
- [11] H.D. Belitz, W. Grosch, *Food Chemistry*, 2nd Edition, Springer, Germany, 1999, pp. 796–800.
- [12] H. Kienitz, *Massenspektrometrie*, Verlag Chemie gmbh, Weinheim, 1968, pp. 44–45.
- [13] *Statistica*, Version 5.5 for Windows Statsoft: Charenton-le-Pont, France, 2000.
- [14] STATITCF, 8 avenue du Président Wilson, Paris, France, 1989.

## Biographies

*F. Begnaud* is an engineer in the Flavour Laboratory, INRA of Clermont-Ferrand-Theix, France. He was awarded the degree of engineer at ENSCR (Rennes, France) in 1997, and is actually in the first year of his doctoral studies. His work is focused on the new ways to characterise and authenticate foodstuffs origin.

*J.L. Berdagué* is the scientific manager of the Flavour Laboratory, INRA of Clermont-Ferrand-Theix, France. He was awarded the degree of engineer at ENSBANA (Dijon, France) in 1979 and a doctorate in food science and nutrition in 1982. His main topics of interest are focused on flavour analysis of food products and olfactometry.

## 2.2 Bilan

Deux résultats importants émergent de cette étude.

1- D'une manière générale l'intensité du signal a augmenté avec l'énergie d'ionisation. La forme des signaux a évolué aussi, et l'information qui en a été extraite s'est accrue avec l'intensité de l'ionisation. Cependant, dans les conditions expérimentales imposées par l'analyse non séparative, la limitation de l'énergie des électrons n'a pas permis d'accroître la proportion de fragments de masse élevés par rapport aux fragments de masse légers. 70eV est apparu comme un consensus acceptable aboutissant à des empreintes spectrales spécifiques et a été appliqué dans l'ensemble des travaux qui ont suivi. Les réglages du MS établis pour des analyses séparatives pourront donc être conservés. Les liens entre les fragments de masse issus de NSA-MS et les molécules détectées lors de l'analyse séparative seront dès lors plus simples à établir.

2- Une nouvelle technique de mesure du bruit spectral a été proposée. La connaissance de ce bruit permettra d'optimiser la gamme de masse à acquérir, autorisant ainsi une fréquence d'acquisition plus élevée et donc une meilleure précision des mesures. Par ailleurs, le filtrage du bruit contenu dans les empreintes spectrales limitera l'introduction de signaux parasites dans les modèles de régression ou de classification employée pour exploiter les mesures, ce qui est susceptible d'accroître les performances des modèles élaborés.

# 3

**Mise en œuvre de l'analyse  
non séparative d'espaces de  
tête par spectrométrie de  
masse**



### **Partie 3 : Mise en œuvre de l'analyse non séparative d'espaces de tête par spectrométrie de masse**

---

Les conditions d'acquisition étant déterminées, l'échantillonnage des fractions volatiles et l'exploitation des empreintes spectrales peuvent être abordés.

L'échantillonnage doit aboutir à l'obtention d'échantillons caractéristiques des produits analysés pour répondre aux principaux problèmes rencontrés : le contrôle de procédés, la classification d'échantillons et l'estimation de descripteurs sensoriels. Il doit être adapté aux différentes problématiques rencontrées.

La stratégie de traitement des données spectrales à appliquer dépendra à la fois de la complexité de la question posée et de l'importance de la corrélation entre l'information contenue dans l'empreinte spectrale et le(s) facteur(s) de variation étudié(s). Plus les compositions des espaces de tête des échantillons seront proches et plus les techniques de traitement de données mises en œuvre devront être élaborées. La stratégie devra donc elle-aussi être adaptée au cas par cas.

Trois études mettant en œuvre les principales méthodes d'échantillonnage et de traitement des empreintes spectrales ont été menées.

- La première étude a permis d'évaluer la capacité de la technique de SHS-MS pour le contrôle *a posteriori* d'un procédé de fabrication. Une méthode de contrôle des barèmes de cuisson de farines de viandes animales par SHS-MS a été développée et un modèle prédictif non-linéaire basé sur l'emploi de réseaux neuromimétiques a été élaboré.

- La seconde étude a mis en évidence les potentialités de la SPME-MS pour la classification d'échantillons. Après avoir sélectionné le type de phase le plus performant pour la préconcentration des effluves et la génération d'empreintes spectrales, quatre atmosphères de bâtiments d'élevage ont été échantillonnées par SPME. La classification des échantillons d'atmosphère à partir des empreintes spectrales générées par SPME-MS a été réalisée.

- Enfin, la troisième étude a permis d'étudier la mise en relation des signaux analytiques obtenus par SPME-MS avec des données sensorielles. L'estimation de paramètres sensoriels à partir de résultats d'analyse non séparative par spectrométrie de masse n'a en effet jusqu'ici

pas été réalisée. Seuls Sohn *et al.* (Sohn *et al.*, 2003) ont proposé une méthode d'estimation de données olfactométriques à partir de mesures réalisées avec un nez électronique équipé de 32 senseurs. Cependant, leurs résultats se sont heurtés aux limites des senseurs de gaz décrites dans la première partie de ce mémoire. Des modèles d'estimation des caractéristiques olfactives d'effluves d'élevages porcins à partir de données de SPME-MS ont été élaborés .

Ces trois études ont fait l'objet de publications dans respectivement *Viande et Produits Carnés* (2000), *International Journal of Analytical and Environmental Chemistry* (2003) et *International Journal of Analytical and Environmental Chemistry* (2004). Ces articles sont reproduits ci-après

### 3.1 Contrôle *a posteriori* du traitement thermique des farines de viandes : évaluation des potentialités de la méthode d'espace de tête statique - spectrométrie de masse

La réglementation européenne impose une stérilisation systématique des farines de viandes destinées à l'alimentation animale. Le barème de stérilisation minimum défini par cette réglementation est de "133 °C pendant 20 minutes sans interruption à la pression de 3 bars". Le respect de ce barème de stérilisation est un paramètre fondamental pour l'inactivation des germes pathogènes et des agents transmissibles non conventionnels; notamment les protéines prions anormales qui sont suspectées d'être à l'origine de l'encéphalopathie spongiforme bovine. À ce jour, la détermination de la température de chauffage des viandes et des produits carnés a fait l'objet d'un certain nombre d'études, notamment dans un but sanitaire, pour vérifier l'application de barèmes thermiques ou de valeurs de pasteurisation réglementaires. En revanche, l'étude bibliographique montre qu'il n'existe pas actuellement de méthode de détermination des températures de cuisson utilisable au-delà de 90 °C. Ceci est dû au fait qu'au-delà de 100 °C, une grande partie des protéines perdent leurs propriétés fonctionnelles, rendant les approches immunochimiques ou enzymatiques imprécises ou inopérantes. Plusieurs approches analytiques ont déjà été envisagées pour déterminer la température de chauffage des viandes et des produits carnés. Citons parmi celles-ci :

- la méthode du test de coagulation qui consiste à mesurer la température à partir de laquelle les protéines d'un extrait de viande cuite précipitent au cours d'un chauffage. Dans ce cas, la température d'apparition d'une turbidité dans le filtrat est considérée comme la température maximale à laquelle la viande a été chauffée en cours de cuisson (méthode USDA-FIS 1986a),
- les méthodes enzymatiques qui regroupent les tests de l'activité phosphatase acide (USDA-FIS 1986b) et de l'activité catalase (EYE 1982), basés sur le principe de la thermorésistance de ces enzymes,
- la spectrométrie dans le visible à 584 nm ou dans le proche infrarouge,
- l'électrophorèse des protéines ou l'analyse enthalpique différentielle,
- et les méthodes immuno chimiques parmi lesquelles il faut mentionner les travaux de ANSFIELD (1994) et HOFMANN (1998) pour évaluer le traitement thermique des farines de viandes (utilisation du kit ELISA CORTECS réf. 902012N).

Comme nous l'avons déjà indiqué, ces techniques ne permettent pas d'estimer des températures de chauffage supérieures à 90 °C et leur précision d'estimation est comprise entre 1 et 5 °C si l'on se réfère aux données de la littérature. D'autre part, aucune des approches décrites ne permet de contrôler *a posteriori* les valeurs des couples "durées et températures" de cuisson appliquées aux denrées alimentaires.

Étude financée par le Ministère de l'Agriculture et de la Pêche  
(Direction Générale de l'Alimentation)

Stérilisation des farines de viande

## Prédiction des barèmes de cuisson par la méthode d'espace de tête statique-spectrométrie de masse

La technique d'espace de tête statique - spectrométrie de masse permet de caractériser *a posteriori* les couples durée-température appliqués lors de la stérilisation des farines de viande.

Science et technique

BERDAGUÉ J.L.<sup>1</sup>, VIALON C.<sup>1</sup>,  
BEGNAUD F.<sup>1</sup>, FRENCIA J. P.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire Flaveur/SRV,  
INRA de Clermont-Ferrand Theix  
63122 Saint-Genès Champanelle

<sup>2</sup>ADIV  
2 rue Chappe  
63039 Clermont-Fd cedex 2

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### Définition du protocole expérimental

Trois lots différents de farines de viandes industrielles ont été soumis à 30 barèmes de stérilisation distincts (6 températures X 5 durées). Ces barèmes s'intégraient dans un plan d'expérience en blocs complets équilibrés à trois facteurs.

- Le facteur "température de stérilisation" correspondait aux températures stationnaires atteintes à cœur dans les lots de farines. 6 températures ont été étudiées : 100, 110, 120, 133, 140 et 145 °C.
- Le facteur "durée de stérilisation" correspondait à la durée pendant laquelle les farines étaient chauffées à une des températures précédemment décrites. Ce facteur a été étudié pour les 5 durées : 0, 10, 20, 30 et 40 minutes. La durée "0 min" correspondait simplement à la phase de montée en température des farines jusqu'à obtention des différentes températures cibles.
- Le facteur "lot de farines" précédemment cité.
- Chaque analyse a été répétée 3 fois. Au total, 270 analyses des farines ont donc été réalisées : 6 températures de stérilisation X 5 durées de stérilisation X 3 lots de farine X 3 répétitions par farine thermisée.

### Nature, origine et mode de stérilisation des farines

Les trois lots de 100 kilogrammes de farines de viandes ont été prélevés dans une entreprise industrielle à 3 périodes distinctes, de manière à ce que leur composition soit différente et intègre une partie de la dimension "hétérogénéité des matières premières". À ce stade, les farines de viandes collectées étaient cuites mais encore non stérilisées. La stérilisation des échantillons a été réalisée en utilisant un stérilisateur pilote HYDROLOCK (constructeur A.C.B. : Ateliers et Chantiers de Bretagne) alimenté par de la vapeur d'eau surchauffée. Les échantillons de farine (3 kilogrammes) ont été placés dans des boîtes de conserve métalliques percées afin d'assurer le passage de la vapeur d'eau ainsi que celui des sondes de mesures de la température (pt 100) permettant la régulation à cœur des températures. Pour chaque barème de stérilisation appliqué, les trois lots de farines ont été traités simultanément dans le stérilisateur pilote. La pression à laquelle étaient effectuées toutes les stérilisations était fixée à 3 bars. Les différents paramètres de la stérilisation : température et durée ont été suivis et enregistrés par une centrale de mesure multivoies AOIP

(modèle SA70). Les figures 1A à E présentent les différents barèmes de cuisson expérimentalement appliqués aux farines. La figure 1F présente les courbes d'iso réponses de la durée de la montée à la température de stérilisation observée lors des 30 barèmes expérimentaux en fonction des durées et températures de stérilisation appliquées.

### Analyses par "espace de tête statique - spectrométrie de masse"

Cette technique consiste en une injection directe des effluves volatiles extraites des farines de viandes dans la chambre d'ionisation d'un spectromètre de masse (par injection directe, il faut entendre "sans étape chromatographique préalable"). L'analyse par "espace de tête spectrométrie de masse" permet d'obtenir un spectre ou diagramme en barre des fragments de masse ionisés positivement qui est stocké informatiquement. Celui-ci contient généralement plus d'une centaine de fragments qui représentent autant de descripteurs potentiellement utilisables pour caractériser les produits (figure 2). L'instrumentation utilisée correspondait à un couplage direct entre un échantillonneur "d'espace de tête statique" Hewlett-Packard 7694 et un spectromètre de masse Hewlett-Packard 5973 fonctionnant en impact électronique à 70 électron - Volt. L'ensemble instrumental est commercialisé sous le nom de "ChemSensor Hewlett - Packard 4440". La plage de balayage du spectromètre de masse (m/z) était comprise entre 33 et 205 unités de masse atomique (u.m.a.), soit 177 fragments.

Sur un plan pratique, 3 g de farines ont été pesés et placés dans des tubes en verre de 20 ml (Hewlett-Packard, réf. 5182-0837) sertis à l'aide d'une capsule en aluminium (Hewlett - Packard, réf. 9301-0721) et d'un septum butyl-téflon (Hewlett-Packard, réf. 9301-0976). Les tubes ont été placés dans le passeur automatique d'échantillons et l'extraction des composés volatils a été réalisée dans l'enceinte d'un four thermostaté à 70 °C pendant 20 minutes. La phase de mise en pression des tubes (10 Psi) avant injection des composés volatils dans la boucle d'injection a duré 0,3 min grâce à un apport d'hélium (Air Liquide pureté N55). Le transfert des composés dans la boucle d'injection (volume : 3 ml) a été effectué en 0,3 min. par dépressurisation. Les composés ont alors été injectés pendant 0,5 min dans le spectromètre de masse par l'intermédiaire d'une ligne de transfert en nickel rendu inerte par un revêtement de Silcosteel® (longueur : 1 m, diamètre interne : 0,10 mm) chauffée à 110 °C et balayée par un flux d'hélium de 1 ml.min<sup>-1</sup> (Air Liquide, N55). La fuite à l'injection était de 30 ml.min<sup>-1</sup>. Pour chaque échantillon, la durée d'acquisition était fixée à 1.7 min.

L'objectif de cette étude est de tester les potentialités offertes par la technique "d'espace de tête statique - spectrométrie de masse" pour caractériser a posteriori les couples "durées - températures" stérilisation appliqués lors de la fabrication des farines de viandes dans la gamme des températures réglementaires. L'application de cette technique a consisté à analyser globalement les effluves désorbés par des farines de viandes afin d'acquies des signatures

spectrales (ou spectres de masse) caractéristiques des traitements thermiques des farines.

Expérimentalement, différents barèmes de stérilisation ont été appliqués en pilote sur plusieurs lots de farines de viandes afin d'explorer l'espace des combinaisons technologiquement possibles autour de la valeur réglementaire fixée au minimum à "20 minutes de stérilisation à 133 °C". L'utilisation de l'information contenue dans les signaux analy-

tiques a donc été utilisée pour élaborer un modèle de prédiction des couples durée-température de stérilisation des farines. Finalement, la description des performances des résultats de la modélisation, appréciée par prédiction simultanée de la durée et de la température de stérilisation d'un lot test de farines va permettre d'estimer la faisabilité d'un contrôle a posteriori des barèmes de stérilisation par la méthode "d'espace de tête statique - spectrométrie de masse".

**Analyse des données et construction du modèle de prédiction**

L'ensemble des analyses a permis d'obtenir une matrice de données M1 contenant les 177 fragments de masse acquis (variables) et les 270 observations - ou analyses - faites sur les lots de farines 1, 2 et 3. Dans un premier temps, la sous-matrice M2 regroupant les 180 analyses effectuées sur les lots de farines 1 et 2 a été utilisée afin de sélectionner un sous ensemble de variables pertinentes pour modéliser les valeurs des températures et des durées de stérilisation. Les 90 analyses restantes correspondant au lot de farines 3 ont été utilisées par la suite pour construire la matrice de test M3selection. Cette étape de sélection était nécessaire pour faciliter la convergence ultérieure des modèles et pour éviter un risque élevé de "sur-lissage" des données. Deux procédures indépendantes de sélection des fragments de masse ( $p < 0,01$ ) ont été conduites par régression linéaire multiple ascendante (STATISTICA, 1999). Ainsi, 9 et 11 variables ont été retenues pour prédire des valeurs des températures ( $r^2$  multiple = 0,82) ou des durées de stérilisation ( $r^2$  multiple = 0,64). Deux variables étaient communes aux sous ensembles de 9 et 11 variables précédemment sélectionnés, l'union de ces sous ensembles a donné une matrice M2selection contenant seulement 17 variables et 180 observations. La matrice M2selection a été utilisée comme base de données pour effectuer la modélisation neuronale des barèmes de stérilisation des farines de viandes.

Le réseau utilisé pour prédire les couples "température/durée" de stérilisation comportait trois couches : 17 neurones dans la couche d'entrée (pour les 17 fragments de masse sélectionnés), 9 neurones dans la couche cachée et deux neurones dans la couche de sortie (l'un pour prédire la température et l'autre pour prédire la durée de cuisson).

L'architecture du réseau était donc de type 17-9-2 (figure 3). L'algorithme utilisé pour faire converger le réseau était du type "rétro propagation du gradient de l'erreur" (Mac CLELLAND et RUMELHART, 1988). L'entraînement de ce type de réseau a consisté à calculer itérativement les poids des connexions entre les neurones de sortie (durée et température de stérilisation) et les neurones d'entrée (données de spectrométrie de masse) permettant de minimiser les erreurs d'estimation de la durée et de la température de stérilisation. Les paramètres de réglage du réseau expérimentalement retenus pour assurer une bonne convergence étaient les suivants : rétro-propagation du gradient de l'erreur = 0,3; taux d'apprentissage = 0,8; introduction d'un bruit additionnel décroissant progressivement de 0,10 à 0,05.

La phase d'apprentissage du réseau a été réalisée sous contrainte de validation en temps réel à chaque itération de l'algorithme de convergence et celle-ci a été stoppée lorsque l'erreur de validation a cessé significativement de décroître. Cette procédure est classique pour éviter un apprentissage trop poussé des données conférant en revanche au réseau un faible pouvoir de généralisation. L'entraînement a été effectué à partir de 120 observations tirées au hasard parmi les 180 de la matrice M2selection et les validations à partir des 90 observations restantes.

Pour tester les performances de prédiction des températures et des durées de stérilisation par le réseau de neurones, ce sont les données spectrales correspondant au lot de farines 3 (matrice M3selection contenant les 17 variables sélectionnées et 90 observations) qui ont été utilisées. Finalement, ce sont les valeurs médianes des températures et des durées de stérilisation estimées obtenues grâce aux 3 répétitions de chacun des 30 barèmes de stérilisation qui ont été considérées pour présenter graphiquement les valeurs prédites en fonction des valeurs consignées expérimentales.

**PRÉSENTATION DES BARÈMES DE STÉRILISATION**

Les figures 1A à 1E décrivent l'évolution de la température des farines lors des 30 barèmes de stérilisation (6 températures allant de 100 à 145 °C, croisées avec 5 durées de stérilisation allant de 0 à 40 minutes). Ces figures indiquent que les montées en température pour atteindre les températures de stérilisation les plus basses ont généralement été les plus lentes. Cette observation s'explique car une montée en température plus réduite lors de la phase de réchauffage a permis, compte tenu des moyens de régulation thermique mis en œuvre, d'éviter un dépassement systématique de la valeur consigne des températures de stérilisation les plus basses. On peut ainsi facilement distinguer assez indépendamment de la durée de stérilisation (figures 1A à 1E), les montées en température les plus lentes : stérilisation à 100, 110 et 120 °C et les montées en température les plus rapides : stérilisation à 133, 140 et 145 °C. La figure 1F,

qui représente la modélisation par courbes d'iso réponses de la durée de montée à la température de stérilisation en fonction des différents barèmes de cuisson, montre que les durées de montée en température les plus longues étaient associées aux durées de stérilisation inférieures à 40 minutes ainsi qu'aux températures de stérilisation inférieures à 140 °C.

**UNE MÉTHODE POTENTIELLEMENT APPLICABLE EN LIGNE**

Compte tenu de sa rapidité (2 minutes par analyse) et de la simplicité de préparation des échantillons, cette technique est appropriée pour effectuer des mesures en ligne sur des chaînes de fabrication ou pour assurer des opérations de contrôle qualité variées. Le signal acquis dans les spectres de masse des farines était faible au-delà des masses 130-140 U.M.A. (figure 2), malgré une désorption des effluves volatils des farines augmentée par chauffage à 70 °C avant analyse. L'expérience

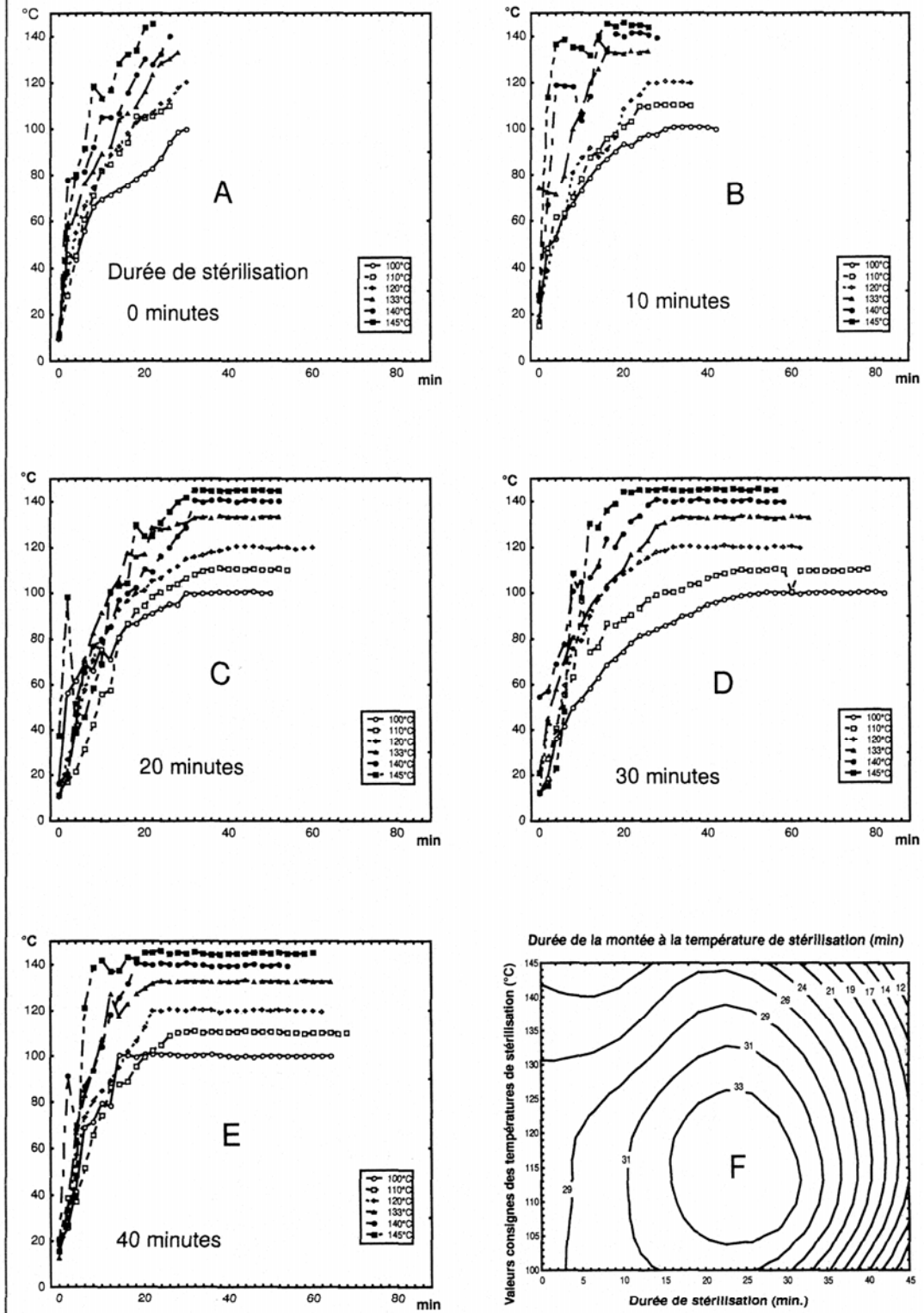
acquise au laboratoire dans le domaine des couplages "Espaces de tête - Spectrométrie de Masse" indique que la seule solution existante pour augmenter le signal (sur toute la gamme de masse étudiée et plus particulièrement au-delà de 130 u.m.a.) consisterait à effectuer une opération de pré-concentration des effluves avant leur injection dans la source du spectromètre de masse. Cette opération de pré-concentration des effluves peut être effectuée par piégeage rapide sur adsorbant suivi d'une désorption éclair avant injection dans la source du spectromètre de masse (VERNAT et BERDAGUE, 1995)

**SÉLECTION DE L'INFORMATION PERTINENTE**

La procédure de sélection par régression pas à pas ascendante utilisée pour diminuer le nombre de variables des modèles est une procédure linéaire.

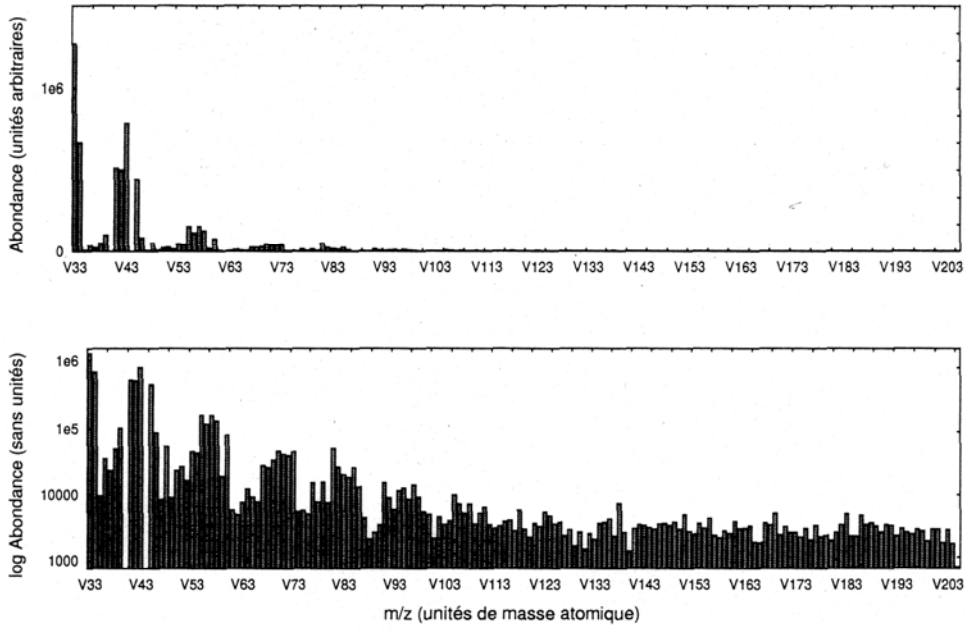
Celle-ci est probablement sous optimale par rapport à d'autres procédures de sélection (algorithmes

Figure 1 : DE FORTES VARIATIONS DANS LA DURÉE DE LA MONTÉE EN TEMPÉRATURE



Traitements thermiques appliqués aux farines de viande

Figure 2 : **CHAQUE SPECTRE EST UNE SIGNATURE DES BARÈMES DE CUISSON DES FARINES**

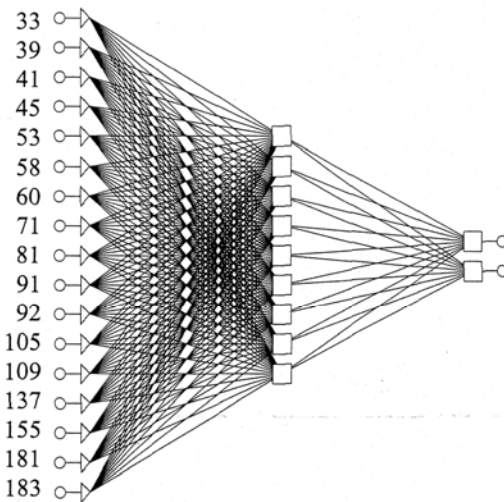


*Exemple de spectre obtenu par espace de tête statique – spectrométrie de masse*

*Pour des problèmes d'échelle liés aux grandes différences d'abondance des fragments selon leur poids moléculaire, une représentation logarithmique est également présentée.*

*Les fragments de masses 40 (argon issu du gaz vecteur) et 44 (gaz carbonique issu des farines, de l'atmosphère du laboratoire et du gaz vecteur) qui étaient relativement abondants ont été considérés comme des contaminants et éliminés des spectres.*

Figure 3 : **SCHÉMA DU MODÈLE NEURONAL**



*L'architecture du réseau de neurones utilisé comporte trois couches. Elle est de type 17-9-2 avec 17 fragments de masse sélectionnés comme variables d'entrée, 9 éléments cachés et 2 neurones de sortie pour prédire indépendamment les valeurs des températures et des durées de stérilisation expérimentalement appliquées aux farines.*

génétiques par exemple; Mitchell, 1996) dans le cas d'une modélisation ultérieure par réseaux de neurones. Cette procédure a cependant été retenue en raison de sa vitesse d'exécution et du fait que les perfor-

mances des modèles étaient meilleures après sélection des variables. La sélection a permis de retenir 17 fragments de masse (figure 3) parmi les 177 contenus dans chacun des spectres de masse.

Compte tenu du fait que les ions produits par la technique d'espace de tête spectrométrie de masse sont le résultat de la fragmentation simultanée de nombreux composés volatils en mélange, il est a priori difficile (mais pas impossible) de relier les masses des fragments sélectionnés à des substances volatiles particulières provenant des farines. Dans ce travail, les spectres ont seulement été considérés comme des empreintes des produits sans chercher à expliciter l'origine chimique des différences observées entre les différentes farines analysées.

### **PRÉDICTION DES BARÈMES DE CUISSON.**

Les figures 4 et 5 présentent les résultats de la modélisation des températures (figure 4A) et des durées de stérilisation (figure 5A) ainsi que les surfaces de réponse de l'erreur d'estimation des températures (figure 4B) ou des durées de stérilisation (figure 5B) en fonction des barèmes de cuisson appliqués. Le tracé des valeurs estimées des températures de stérilisation en fonction des valeurs consigne présente une allure sigmoïde quelle que soit la durée de stérilisation (figure 4A).



Figures 4 : LA PRÉCISION D'ESTIMATION EST MEILLEURE AU-DELÀ DE 133 °C

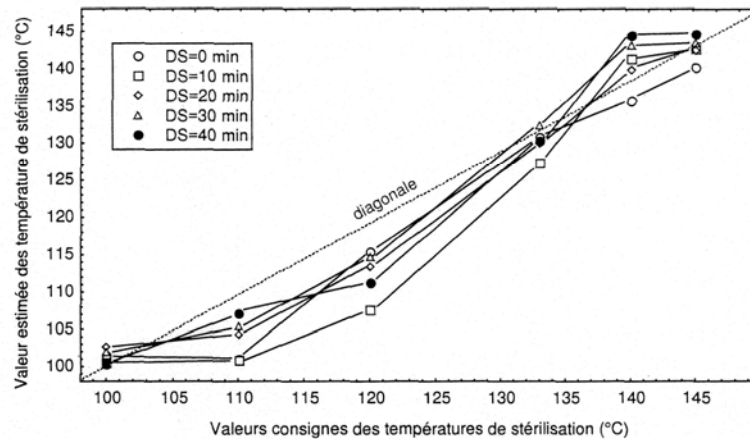


Figure 4A

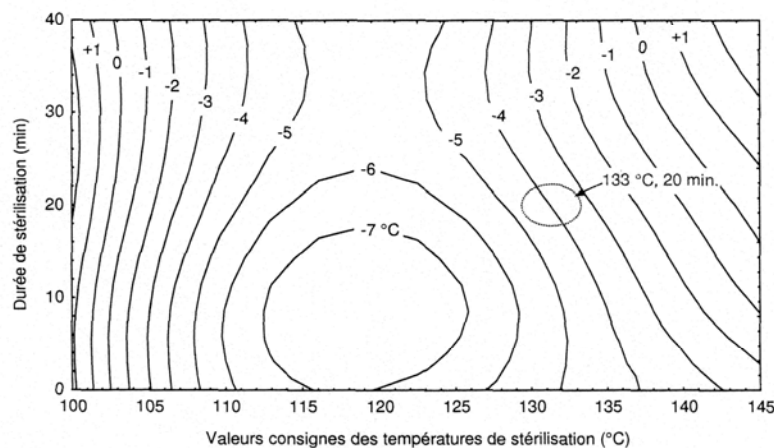


Figure 4B

4A - Prédiction de la température de stérilisation des farines de viandes par espace de tête spectrométrie de masse.

4B - Surface de réponse de l'erreur d'estimation des températures de stérilisation (°C) appliquées lors des 30 barèmes.

Les erreurs d'estimation les plus fortes (sous-estimations moyennes de 7 °C) correspondent (figure 4B) aux barèmes de cuisson dont les températures étaient comprises entre 110 et 130 °C avec des durées de stérilisation inférieures à 30 minutes. La projection de la valeur minimale réglementaire des barèmes de cuisson (133 °C durant 20 minutes) sur la surface de réponse de l'erreur d'estimation des températures de cuisson situe celle-ci sur la courbe d'iso réponse "-4 °C" (figure 4B). Cela signifie que le modèle de prédiction a fourni une valeur estimée moyenne de la température réglementaire de 129 °C au lieu de 133 °C.

Le tracé des valeurs estimées des durées de stérilisation en fonction des valeurs consigne de stérilisation (figure 5A) montre que les prédictions sont les meilleures entre 30 et 40 minutes plutôt qu'entre 0 et 20 minutes de stérilisation. L'étude plus détaillée de la surface de réponse de l'erreur d'estimation de la durée de stérilisation montre l'existence d'une courbe d'iso réponse "+2,2 minutes" allant des coordonnées "134 °C, 0 minute" à "100 °C, 35 minutes". Cette courbe sépare diagonalement la surface de réponse en deux domaines regroupant d'une part les basses températures (< à 130 °C) et courtes durées de stérilisation (< à 35 minutes) qui

sont associées à une forte erreur d'estimation et d'autre part les températures élevées (> à 130 °C) et longues durées de stérilisation (> à 35 minutes) qui sont associées à une faible erreur d'estimation (figure 5B). Il est important de noter que l'erreur de prédiction de la durée de stérilisation la plus élevée (figure 5B) s'est située dans la zone où la durée de la montée de température des farines était relativement longue (figure 1F). Cette observation conduit à faire l'association logique selon laquelle ce sont très probablement les barèmes de stérilisation réalisés à faible température sur une courte durée qui risquent d'être les plus perturbés par



Figures 5 : LA PRÉCISION D'ESTIMATION EST MEILLEURE AU-DELÀ DE 133 °C

Figure 5A

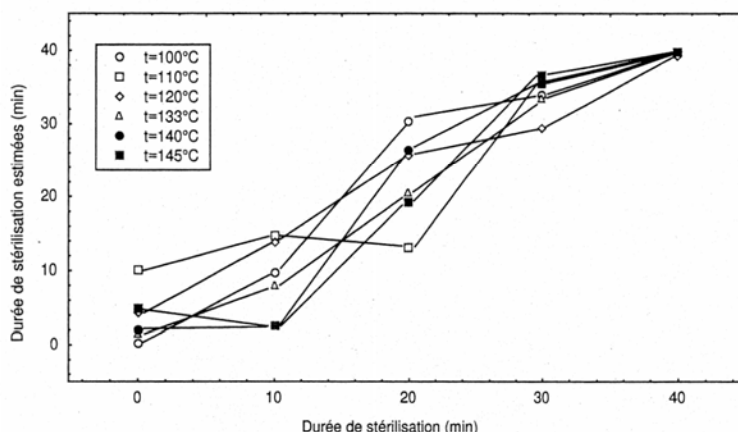
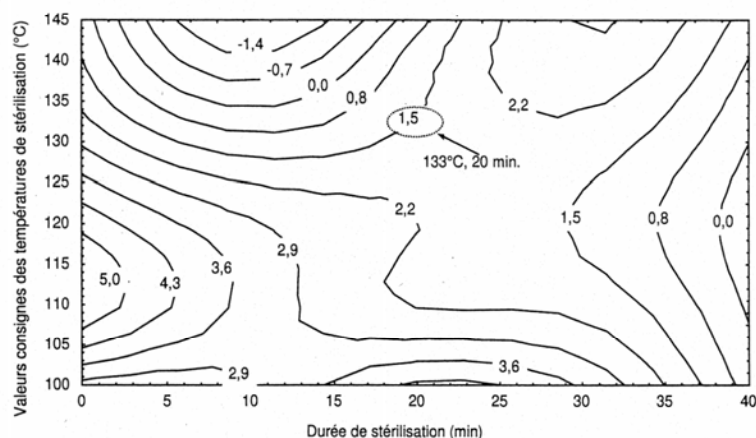


Figure 5B



5A - Prédiction de la durée de stérilisation des farines de viandes par espace de tête spectrométrie de masse.  
5B - Surface de réponse de l'erreur d'estimation des durées de stérilisation (°C) appliquées lors des 30 barèmes.

la durée de montée en température des farines. C'est en effet dans la zone des faibles durées et températures de stérilisation que les transferts totaux d'énergie aux farines sont le plus affectés par des cinétiques variables de montée en température. La variabilité des cinétiques de montées en températures s'explique ici par la difficulté à maîtriser le réchauffage des farines. Le rôle important de la durée de montée en température de stérilisation a été confirmé en élaborant un second modèle neuronal prenant en compte les 17 fragments de masse sélectionnés et la variable "durée de montée à la température de stérilisation". En effet, l'introduction de ce para-

mètre a permis d'améliorer considérablement les performances des modèles (erreurs de moins de 2 degrés sur toute la gamme des températures prédites et erreur inférieure à 3 minutes sur toute la gamme des durées de stérilisation prédites). Ce modèle qui n'a pas de valeur pratique, puisque la "durée de montée à la température de stérilisation" n'est bien sûr jamais connue lorsque l'on désire effectuer un contrôle inopiné!, n'est pas présenté. La projection des valeurs minimales réglementaires des barèmes de cuisson sur la surface de réponse de l'erreur d'estimation des durées de cuisson situe celle-ci sur une ligne d'iso réponse de "+1,5 °C".

Comme précédemment, cela signifie que le modèle de prédiction a fourni une valeur estimée moyenne de la durée réglementaire de 21,5 minutes au lieu de 20 minutes. Pour synthétiser, les échantillons test du lot de farines 3 stérilisés selon le barème réglementaire de "133 °C durant 20 minutes" ont été estimés par le modèle comme ayant subi une stérilisation à "129 °C durant 21,5 minutes".

L'étude globale des figures 4 et 5 montre que les précisions d'estimation des barèmes de stérilisation des farines ont été les meilleures au-delà de 133 °C, quelque soit la durée de stérilisation appliquée.

## DES RÉSULTATS PROMETTEURS

Pour évaluer les potentialités du contrôle a posteriori du traitement thermique des farines de viandes par espace de tête statique - spectrométrie de masse, les essais ont été insérés dans un protocole expérimental le plus rigoureux possible (échantillonnage, mise en œuvre instrumentale, modélisation avec validation et test des résultats...) compte tenu des limitations expérimentales liées à la difficile maîtrise de la cuisson en pilote des farines de viandes.

Les résultats montrent que l'analyse directe des effluves des farines a permis d'obtenir rapidement un signal pertinent contenant une information suffisante pour prédire les barèmes de cuisson des farines avec une précision relativement bonne compte tenu de l'hétérogénéité de ce type de produit. En conclusion, la méthode d'espace de tête - spectrométrie de masse présente une réelle capacité à prédire les barèmes de stérilisation des produits analysés. Il serait cependant important de valider cette tech-

nique dans un contexte industriel avec une plus grande diversité de farines pour émettre un jugement définitif sur ses performances.

À ce stade des recherches, l'introduction de connaissance dans les modèles (par explication moléculaire de la raison du fonctionnement des modèles) pourrait permettre d'effectuer un choix plus pertinent des fragments de masse sélectionnés et d'affiner ainsi les performances des prédictions. □

### Remerciements

Nous remercions le Ministère de l'Agriculture et de la Pêche (Direction Générale de l'Alimentation) pour son aide financière dans le cadre du programme de recherche développement "Farines de viandes et ESB" ainsi que la région Auvergne pour sa contribution au financement de l'équipement de spectrométrie de masse. Nous remercions également H. DAMETTO et X. ALEYRANGUES de l'ADIV pour leur collaboration technique.

## B I B L I O G R A P H I E

**AMSFIELD M. 1994** Production of sensitive immunoassay for detection of ruminant proteins in rendered animal material heated to > 130 °C. Food and Agricultural Immunology, 6 (4).

**EYE J.G.A. 1992** Rapid procedure for the detection of underprocessing of roast beef. Ann. Meet. Food res. Inst., W1, Madison.

**HOFMAN K. 1998** The ELISA meat and bone meat test. Die Fleischerei, 11, III - IV.

**MC CLELLAND J.L., RUMELHART D.E. 1988** In Explorations in parallel distributed processing; a handbook of models, programs and exercises, MIT Press Ed., Cambridge.

**MITCHELL M. 1996** In An introduction to genetic algorithms; MIT Press Ed : Cambridge.

**STATISTICA 1999** A comprehensive system for statistics, graphics and application development, 5.1 for Windows; Statsoft : Charenton-le-Pont, France.

**USDA - FIS 1986a** Determination of internal cooking temperatures (coagulation). Revised basis chemistry laboratory guidebook 3.019, 3-55; Science Chemistry Division, Food Safety and Inspection Service, Washington DC.

**USDA - FIS 1986b** Determination of internal cooking temperatures (acid phosphatase activity). Revised basis chemistry laboratory guidebook 3.018, 3-49; Science chemistry division, Food Safety and Inspection Service, Washington DC.

**VERNAT G., BERDAGUÉ J.L. 1995** Dynamic Headspace-Mass Spectrometry (DHS-MS) : A new approach to real-time characterization of food product, Bioflavour 95, INRA Ed., Paris, Les Colloques, 75, 59-62.

## 3.2 Caractérisation des effluents volatils de bâtiments d'élevage par microextraction en phase solide

# CHARACTERIZATION OF VOLATILE EFFLUENTS OF LIVESTOCK BUILDINGS BY SOLID-PHASE MICROEXTRACTION

FRÉDÉRIC BEGNAUD\*, CHRISTOPHE PÉRÈS  
and JEAN-LOUIS BERDAGUÉ\*

*SRV/Flaveur, INRA de Theix, F 63122 Saint-Genès-Champanelle, France*

*(Received 3 March 2003; In final form 5 June 2003)*

This article presents two examples of the application of SPME to the characterisation of gaseous effluents from animal sheds. In the first example the volatile fraction of swine manure was analysed by solid-phase microextraction combined with gas-phase chromatography–mass spectrometry (SPME-GC-MS). To find the best extraction conditions for volatile components, six types of SPME fibre were tested. Carboxen-PDMS fibre performed best, enabling us to extract and identify 101 compounds of varying polarity and molecular weight. The second example shows that it is possible to concentrate the volatile components in various animal shed atmospheres by simple exposure of a fibre inside the building. Direct injection into a mass spectrometer ionisation source (SPME-MS) of the volatile components thus trapped provided signatures characteristic of the four different animal shed atmospheres studied. The practical simplicity of the SPME-MS method makes it a good candidate for rapid identification and monitoring of animal shed atmospheres.

*Keywords:* SPME; Odour analysis; Spectral signature; Swine manure

## INTRODUCTION

The adverse environmental effects of the expansion of high-productivity animal farming are now widely recognised. These effects concern the soil and groundwater but also the air [1]. Foul-smelling gaseous emissions are a particular nuisance to nearby residential areas, and can even be a health hazard for exposed persons [2]. The characterisation of these volatile effluents is thus important both to determine their composition and to develop rapid monitoring methods. For this purpose analytical methods that combine rapidity and simplicity have had to be developed or adapted. Solid-phase microextraction (SPME) is a recent trapping method for volatile organic compounds (VOCs) already applied to environmental monitoring [3]. Coupled to gas-phase chromatography and mass spectrometry (SPME-GC-MS), this method provides detailed information on the volatile fractions of matrices or atmospheres [4–6]. Directly coupled to the mass spectrometer, without prior chromatographic separation, SPME-MS provides

---

\*Corresponding authors. Fax: +33-473-624731. E-mail: frederic.begnaud@clermont.inra.fr;  
E-mail: berdague@clermont.inra.fr

mass spectra or signatures characteristic of the global composition of gas mixtures. SPME-MS has already been successfully used in agrifood applications, e.g., for rapid classification/recognition operations [7–9] and prediction of the aromatic characteristics of foodstuffs [10].

This article presents two examples of the application of SPME to the characterisation of gaseous effluents from animal sheds. First, the performance of six types of SPME fibre for the analysis of liquid pig manure by SPME-GC-MS is compared. The second example shows that it is possible to concentrate the volatile components of various animal shed atmospheres by simple exposure of a fibre inside the building, and offers a new method for the rapid characterisation of these atmospheres by SPME-MS.

## EXPERIMENTAL

### Nature and Origin of Samples

#### *Pig Manure*

The pig manure came from Large White piglets weaned three weeks previously and raised on concrete full-slatted floors (Romillé Experimental Station, Ille-et-Vilaine, France). Three litres of fresh manure were collected in 1-L glass containers, cooled to +4°C and immediately brought to the laboratory. To compare the extraction performance of six types of SPME fibre with no change in the manure composition, several aliquots of manure were placed in 20-mL glass flasks of the type used classically to generate a VOC headspace (flask ref. 5182-0837, butyl/teflon septum cap ref. 9301-0976, crimp ring ref. 9301-0721, Agilent Technologies, Les Ulis, France) and frozen at –20°C. The flasks were thawed for 90 min at ambient temperature before fibre extraction of the VOCs.

#### *Animal Shed Atmospheres*

The atmospheres were those of four animal housing facilities: a piggery (48 pigs in a fattening shed on concrete full-slatted floors), a cattle shed (12 steers on straw), a sheep shed (32 lambs on straw) and an animal house (250 mice raised in a ventilated facility).

### Analysis of the Volatile Fraction of Pig Manure

#### *Extraction of Volatile Components*

The six SPME fibres tested were those most readily commercially available at the time of the study; Carboxen-polydimethylsiloxane (C-PDMS, thickness 75 µm, Supelco, Saint-Quentin-Fallavier, France), polydimethylsiloxane (PDMS, thickness 100 µm, Supelco), polydimethylsiloxane-divinylbenzene (PDMS-DVB, thickness 65 µm, Supelco), polyacrylate (PA, thickness 85 µm, Supelco), Carbowax-divinylbenzene (CW-DVB, thickness 65 µm, Supelco) and divinylbenzene-Carboxen/polydimethylsiloxane (DVB-C-PDMS, thicknesses 50/30 µm, Supelco). After conditioning (30 min in the injector at the optimal temperature required according to the phase), each

SPME fibre was introduced into the flask containing the liquid manure and exposed in the headspace for 15 min at 21°C.

#### *Desorption–Injection of the Volatile Components*

The desorption of the compounds adsorbed on the SPME fibre took place in the splitless injector of the chromatograph. The optimal injection temperature set according to the nature of each fibre type was 280°C for C-PDMS and PA, 260°C for PDMS, DVB-C/PDMS and PDMS-DVB, and 250°C for CW-DVB. To eliminate interference from compounds inherent to the fibre or flasks (septum cap, walls), a blank from a 15-min fibre extraction in an empty closed flask was run before each analysis.

#### *Separation and Identification of Volatile Components*

The analysis line was composed of a gas-phase chromatograph (model 6890 A, Agilent Technologies, Palo Alto, CA) coupled to a quadrupole mass spectrometer (model 5973, Agilent Technologies, with ionisation by electron impact at 70 eV). The chromatograph was equipped with a 60-m long capillary column (SPB5, 60 m × 0.32 mm × 1 µm, Supelco). The entry flow rate into the mass spectrometer was 1 mL min<sup>-1</sup> (99.9995% pure helium, Messer, France). The mass range used was 33 to 250 atomic mass units (amu) and the analysis duration was 70 min. Molecules were identified by comparison of experimental spectra with those of data banks Wiley 275 K [11] and MassLib 406 K [12], and by comparison of experimental retention indices with those in the data bank of Kondjoyan and Berdagué [13]. For each molecule, the area of the chromatographic peak was obtained by integration of the corresponding ion current. The resulting areas were expressed in arbitrary units of area (aua).

### **Rapid Analysis of the Volatile Fractions of the Animal Shed Atmospheres**

#### *Extraction of Volatile Compounds*

For these experiments, the C-PDMS fibre, which performed best during separative analysis, was used. Three C-PDMS fibres were simultaneously exposed for 120 min inside each of the four animal facilities. The fibres were placed in the buildings 1 m from the ground, away from areas of turbulence such as doorways and ventilation openings. After exposure, the fibres were isolated from the atmosphere by inserting the metal needle of the SPME syringe system into an inert septum cap (ref. 5181-3383, Agilent Technologies). The fibres were then brought to the laboratory. Altogether 12 samples (3 fibres × 4 animal sheds) were taken.

#### *Desorption and Injection of Volatile Components*

Like the volatile components of the manure, the compounds adsorbed on the C-PDMS fibres were desorbed in the splitless injector of the chromatograph at the temperature prescribed by the supplier. However, the volatile compounds were not separated by gas-phase chromatography, but directly transferred into the mass detector through a short transfer line (HP-retention gap ref. 19091-60620, Agilent. length 3 m, diameter 0.10 mm). In these conditions, one analysis took 5 min. The signal (total ion current)

obtained took the form of an asymmetric peak and had a total duration of 5 min, for a half-height width ranging between 0.25 and 0.5 min. The average mass spectrum, resulting from the simultaneous ionisation and fragmentation of all the injected molecules, formed the crude instrumental signature of the atmospheres analysed. The mass range used was  $33 < m/z < 150$  amu.

### *Analysis of Spectral Signatures*

The initial spectra thus obtained contained 118 mass fragments. The mass fragments smaller than 45 amu were ignored because of their multiple and ill-defined origin (ambient air, carrier gas). Also, only the mass fragments above the detection threshold ( $10^5$  abundance units as determined by Begnaud and Berdagué [14]) were considered as informative and so only these were subsequently used. The final refined spectra containing only 96 mass fragments were then processed. Before statistical analysis these spectra were normalised (each fragment was expressed as a percentage of the total abundance of the mass fragments). This operation emphasises the shape of the spectrum rather than the intensity of the signal. This mode of expression eliminates the variations in response level linked to fluctuations of the mass detector sensitivity, or to varying adsorption levels of the volatile components on the SPME fibre [7]. The influence of the “type of atmosphere” factor on the intensity of each mass fragment was estimated using the Fisher  $F$  value calculated after analysis of variance using the model

$$I_{Fj,n} = \beta_0 + TE_j + \varepsilon_n$$

where  $I_{Fj,n}$  = intensity of the mass fragment considered;  $\beta_0$  = mean effect;  $TE_j$  = effect of the “type of atmosphere” with  $j=4$ ;  $\varepsilon_n$  = residual variance with  $n=3$ . Selection of the four most discriminant mass fragments from the shed atmospheres made after exhaustively testing all the combinations of four possible fragments among all the available fragments (criterion for the selection of the most discriminant combination: Wilks’ lambda). A hierarchical cluster classification (based on calculation of Euclidean distances and on aggregation of individuals by Ward’s method [15]) was then established from the four mass fragments selected. All the calculations were carried out with Statistica software.

## RESULTS AND DISCUSSION

### **Comparison of the Performance of Different SPME Fibres for the Analysis of the Volatile Fraction of Pig Manure**

The individual performance of each fibre was evaluated on the basis of the range and quantity of substances extracted. Table I gives the results of the SPME-GC-MS analysis of pig manure headspace extracted with the six fibres tested. The C-PDMS fibre gave signals that were markedly richer and more intense than the other fibres. The total abundance (intensity) of the ion current measured for all the chromatographic peaks obtained with the C-PDMS fibre was  $4.7 \times 10^9$  against  $3.6 \times 10^8$  aua for the PDMS and  $1.1 \times 10^9$  aua for the DVB-C-PDMS fibre (Table I). These results confirm the

TABLE I SPME-GC-MS analyses of the volatile fraction of the slurry sample. Qualitative and semi-quantitative comparison between the six different SPME phases

Compound <sup>a</sup>	RI	RT	Rel	Total ionic current/10 <sup>-4</sup> (aua)						
				Carboxen-PDMS	PDMS-DVB	DVB-Carboxen-PDMS	Carbowax-DVB	Polyacrylate	PDMS	
<b>Alkanes</b>										
Cyclohexane	657	11.61	b	427	-	-	-	-	-	-
Methylcyclohexane	719	14.96	c	161	-	-	-	-	-	-
<b>Alkenes</b>										
Octene	800	19.47	a	3016	-	-	-	-	-	-
<i>p</i> -Cymene	1031	33.44	a	602	-	-	-	-	-	-
Limonene [19]	1036	33.71	a	3392	1668	2113	1974	264	653	
<b>Alcohols</b>										
2-Propanol	nd	5.78	a	718	-	-	-	-	-	-
2-Butanol	602	8.66	a	1223	-	-	-	-	-	-
2-Methyl-1-propanol [3]	623	9.77	a	633	-	-	-	-	-	-
1-Butanol [4]	654	11.45	a	5053	50	44	63	-	-	-
3-Pentanol	690	13.36	a	679	-	-	-	-	-	-
2-Methyl-2-pentanol	724	15.22	b	97	-	-	-	-	-	-
3-Methyl-1-butanol	726	15.38	a	781	-	-	-	-	-	-
2-Methyl-1-butanol	731	15.61	b	753	-	-	-	-	-	-
1-Pentanol	761	17.32	a	1784	-	-	35	-	-	-
3-Hexanol	793	19.09	a	105	-	-	-	-	-	-
1-Hexanol	866	23.63	b	141	-	-	-	-	-	-
2-Heptanol [14]	897	25.57	a	50	-	-	-	-	-	-
Phenol [17]	977	30.33	a	26686	2932	3735	4761	3590	292	
3-Octanol	994	31.35	a	470	80	68	103	23	17	
2-Ethyl-1-hexanol	1028	33.25	a	211	25	25	34	-	8	
3,5,5-Trimethyl-1-hexanol	1049	34.43	c	160	-	-	10	-	-	
<i>p</i> -Cresol [20]	1073	35.77	a	83340	163	20935	20438	15294	3318	
Diethylstyrol [21]	1096	37.07	c	1093	-	-	-	-	-	-
4-Ethylphenol [24]	1165	40.70	a	7808	1886	2129	2187	1779	782	
4-Ethylphenol [25]	1216	43.29	b	92	-	-	-	-	-	-
2-Phenoxy-ethanol	1226	43.80	b	44	-	-	-	-	-	-
Dibutyl- <i>p</i> -cresol [29]	1526	57.36	c	218	-	40	52	-	60	
Bisphenol	nd	64.72	b	1144	474	-	218	1462	-	-

(continued)

TABLE I Continued

Compound <sup>a</sup>	RI	RT	Rel	Total ionic current/10 <sup>4</sup> (aua)					
				Carboxen-PDMS	PDMS-DVB	DVB-Carboxen-PDMS	Carbowax-DVB	Polyacrylate	PDMS
<b>Aldehydes</b>									
3-Methylbutanal	648	11.09	a	155	—	—	—	—	—
Benzaldehyde	964	29.59	a	378	—	—	—	567	32
Nonanal	1104	37.51	a	14	—	—	14	—	14
Dodecanal	1411	52.47	a	—	200	—	—	—	—
<b>Ketones</b>									
Acetone	nd	5.72	a	1013	—	—	—	—	—
2-Butanone [2]	nd	8.51	a	2980	—	—	8	—	—
2-Pentanone	678	12.69	a	256	—	—	—	—	—
3-Pentanone [6]	688	13.23	a	1117	—	—	9	—	—
3-Hexanone	782	18.46	a	284	—	—	—	—	—
2-Hexanone	786	18.72	a	112	—	—	—	—	—
Cyclopentanone	788	18.82	b	70	—	—	—	—	—
2-Methylcyclopentanone	840	22.04	b	257	—	—	—	—	—
3-Methylcyclopentanone	846	22.41	b	101	—	—	—	—	—
3-Heptanone	884	24.79	a	43	—	—	—	—	—
2-Heptanone	888	25.01	a	225	—	—	23	—	—
3-Octanone	986	30.85	a	2536	332	364	546	43	75
2-Octanone	990	31.09	a	243	30	38	53	—	8
2-Nonanone	1091	36.81	a	240	45	55	80	—	25
2-Undecanone	1294	47.12	a	109	29	38	42	21	29
2,6-bis- <i>tert</i> -Butylbenzoquinone	1485	55.65	c	159	—	—	—	—	—
<b>Acids</b>									
Carbon dioxide	nd	3.97	a	10735	22235	39068	3049	10822	15212
Acetic acid [5]	nd	8.20	a	2277	—	—	244	—	—
Propanoic acid	681	12.83	a	1613	—	—	135	—	—
2-Methyl-propanoic acid	744	16.38	a	1432	—	—	111	—	—
Butanoic acid [9]	779	18.30	a	4424	98	—	259	70	39
Isovaleric acid [11]	833	21.57	a	7115	—	—	95	—	—
2-Methylbutanoic acid [12]	843	22.20	a	1051	—	—	48	—	—
Pentanoic acid [13]	872	24.04	a	1285	—	—	37	—	—
4-Methylpentanoic acid	935	27.86	b	51	—	—	—	—	—





TABLE I Continued

Compound <sup>a</sup>	RI	RT	Rel	Total ionic current/10 <sup>4</sup> (aua)						
				Carboxen-PDMS	PDMS-DVB	DVB-Carboxen-PDMS	Carbowax-DVB	Polyacrylate	PDMS	
1,2,4-Trithiolane	1107	37.67	b	81	—	—	—	—	—	
2,4,5-Trithiahexane [22]	1139	39.33	c	168	34	43	47	—	9	
2-(Methylthio)-phenol	1175	41.20	b	46	—	—	—	—	—	
Hexathiapane	1220	43.48	b	54	—	—	—	—	—	
1,4-Dimethyltetrasulfide [26]	1237	44.31	b	6806	692	1428	2925	—	2220	
<b>Aromatics</b>										
Toluene [8]	766	17.58	a	10977	621	1428	453	81	69	
<i>p</i> -Xylene	864	23.53	b	48	—	—	—	—	—	
Styrene	893	25.38	a	71	—	—	—	—	—	
<b>Furans</b>										
2-Methylfuran	606	8.87	a	181	—	—	—	—	—	
3-Methylfuran	614	9.27	b	650	—	—	—	—	—	
2,5-Dimethylfuran	700	13.90	a	63	—	—	—	—	—	
$\gamma$ -Butyrolactone	911	26.43	a	—	4754	—	—	—	1699	
<b>Total ionic current of the peaks</b>				$4.9 \times 10^9$	$6.6 \times 10^8$	$1.1 \times 10^9$	$6.9 \times 10^8$	$4.9 \times 10^8$	$3.6 \times 10^8$	

RI = retention index on SPB-5 (nd = not determined); RT = retention time (min); Rel = reliability of the identification or structural proposal (a = mass spectrum and Kovats index in agreement with the corresponding literature data, b = mass spectrum consistent with spectra found in the literature, c = tentative of identification by mass spectrum). The numbers between square brackets located after the name of the compounds correspond to the labelled peaks on Fig. 1. <sup>a</sup>Only compounds with abundance > 10<sup>4</sup> aua are considered.

TABLE II Number of compounds extracted and identified according to the type of fibre

Compounds <sup>a</sup>	Carboxen- PDMS	PDMS- DVB	DVB- Carboxen- PDMS	Carbowax- DVB	Polyacrylate	PDMS	Total count <sup>b</sup>
Alkanes	2	—	—	—	—	—	2
Alkenes	3	1	1	1	1	1	3
Alcohols	23	7	7	10	5	6	23
Aldehydes	3	1	—	1	1	2	4
Ketones	16	4	4	7	2	4	16
Acids	11	3	2	8	2	2	11
Esters	2	—	—	—	—	—	2
Amines and nitrogen heterocycles	9	3	2	4	2	4	9
Sulfides and thiols	26	10	14	12	7	8	26
Aromatics	3	1	1	1	1	1	3
Furans	3	1	0	0	0	1	4
Number of extracted molecules	101	31	31	44	21	29	103

<sup>a</sup>Only compounds with abundance  $> 10^4$  aua are considered; <sup>b</sup>total count = total number of compounds collected on all fibres.

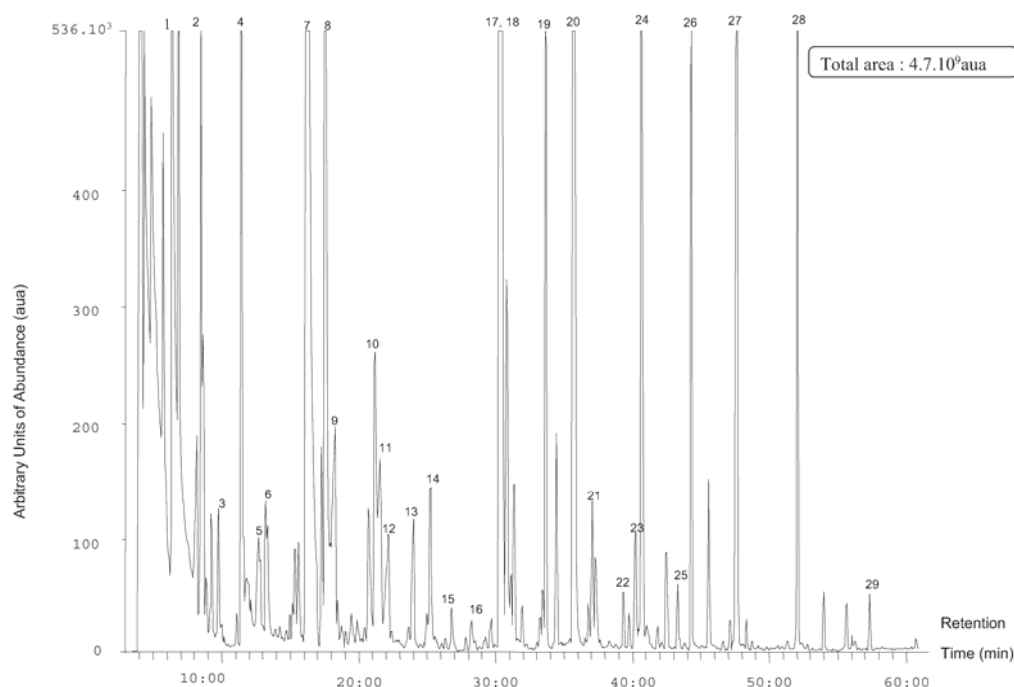


FIGURE 1 Chromatogram of volatile compounds of pig slurry obtained by SPME-GC-MS, using a C-PDMS fibre. See Table I for identities of the labelled peaks.

observations of Popp and Paschke [16] and Shirey [17], who found the C-PDMS fibre performed best for the analysis of volatile fractions extracted from air or water. This fibre extracted 101 substances of widely ranging polarity and molecular weight belonging to 11 chemical families (Table II). An example of a chromatogram obtained with this fibre is presented in Fig. 1. The main chemical families implicated in odorous emissions from pig farms [18,19] were extracted: volatile aliphatic branched-chain fatty acids, nitrogen heterocycles (pyrrole, indole and scatole derivatives), thiols and mercaptans. These compounds mostly stem from the catabolism of amino acids, either directly or after a series of secondary reactions [18,20]. The C-PDMS phase

showed a particular affinity for volatile fatty acids (11 acids, from C2 to C6) and sulfur compounds (26 identified), consistent with the findings of Abalos *et al.* [6] for volatile fatty acids and Pérès *et al.* [7] for sulfur compounds. The affinity properties of the C-PDMS phase are especially useful if the composition of the headspace has to be correlated with odour nuisance levels, because several sulfur compounds and volatile fatty acids identified here are implicated in smells from pig farms [21]. Among the 103 compounds extracted by the six fibres, only dodecanal and  $\gamma$ -butyrolactone were absent from the compounds extracted by the C-PDMS fibre. These two compounds (neither are responsible for odour nuisance) were extracted by the PDMS-DVB and PDMS fibres, known for their affinity for high molecular weight volatile compounds [22]. The different SPME fibres tested included both homogeneous polymer phases (PA and PDMS) and biphasic systems composed of porous particles embedded in a polymer phase (C-PDMS, PDMS-DVB, CW-DVB and DVB-C/PDMS). For the biphasic systems the trapping of the VOCs involved processes of absorption (mainly limited by the affinity of the compounds for the absorbing phase and their concentration in it) and of adsorption (limited by surface area and pore size). The better performance of the C-PDMS fibre is attributable to the preferential involvement of adsorption processes in the pores of Carboxen, which because of their small diameter (10 Å on average) are better suited to the trapping of small chemical entities [22–24].

### Discrimination Between Animal Shed Atmospheres

In view of its better performance, the C-PDMS fibre was selected to concentrate the atmospheric volatile components by simple exposure inside the livestock buildings. To compare the trapping abilities of the C-PDMS fibre in an animal shed atmosphere with those described above for manure headspace analysis, we carried out a separate analysis by GC-MS after exposing the fibre for 120 min in a piggery. In these conditions the desorption of the trapped compounds gave a total ion current of  $2.6 \times 10^9$  aua with the possibility of identifying 98 compounds (data not presented). These values are close to those obtained after exposure of the fibre to manure headspace in a closed flask (total ion current  $4.7 \times 10^9$  aua and 101 compounds identified), confirming that VOC trapping by simple atmospheric contact can be efficient. The direct analysis of shed atmospheres by SPME-MS (with no chromatographic step) also gave relatively intense signals (pig shed  $11 \times 10^8$  aua, cattle shed  $5.8 \times 10^8$  aua, sheep shed  $3.3 \times 10^8$  aua, animal house  $2.5 \times 10^8$  aua), particularly for the pig shed. The mean normalised spectra or signatures of the four shed atmospheres are presented in Figs. 2A, 2B, 2C and 2D. These spectra are visually different, suggesting that the SPME-MS method is *a priori* adequately sensitive to characterise animal shed atmospheres. The fragments most significantly influenced by the type of atmosphere ( $F_{\text{Fisher}} > 4$ ;  $p < 0.05$ ) were those with  $m/z = 47, 49, 50, 59, 60, 74, 87, 91, 92, 93, 100, 107, 108$  and 121 (Fig. 2E). Separate analysis by SPME-GC-MS indicated that these fragments originated mainly from sulfur compounds ( $m/z = 47$  and 49) or phenols such as *p*-cresol and 4-ethylphenol ( $m/z = 87, 107$  and 108) from the catabolism of amino acids, or from carboxylic acids characteristic of fermentation or amino acid de-amination reactions carried out by intestinal anaerobic bacteria (fragment 60), or from terpenes (fragments  $m/z = 93$  and 121) present in the pelleted mouse feed and in litter. These VOCs are classically found in animal shed atmospheres [25] and, except for the terpenes, are recognised as contributing to odour nuisance. The selection of the most discriminant

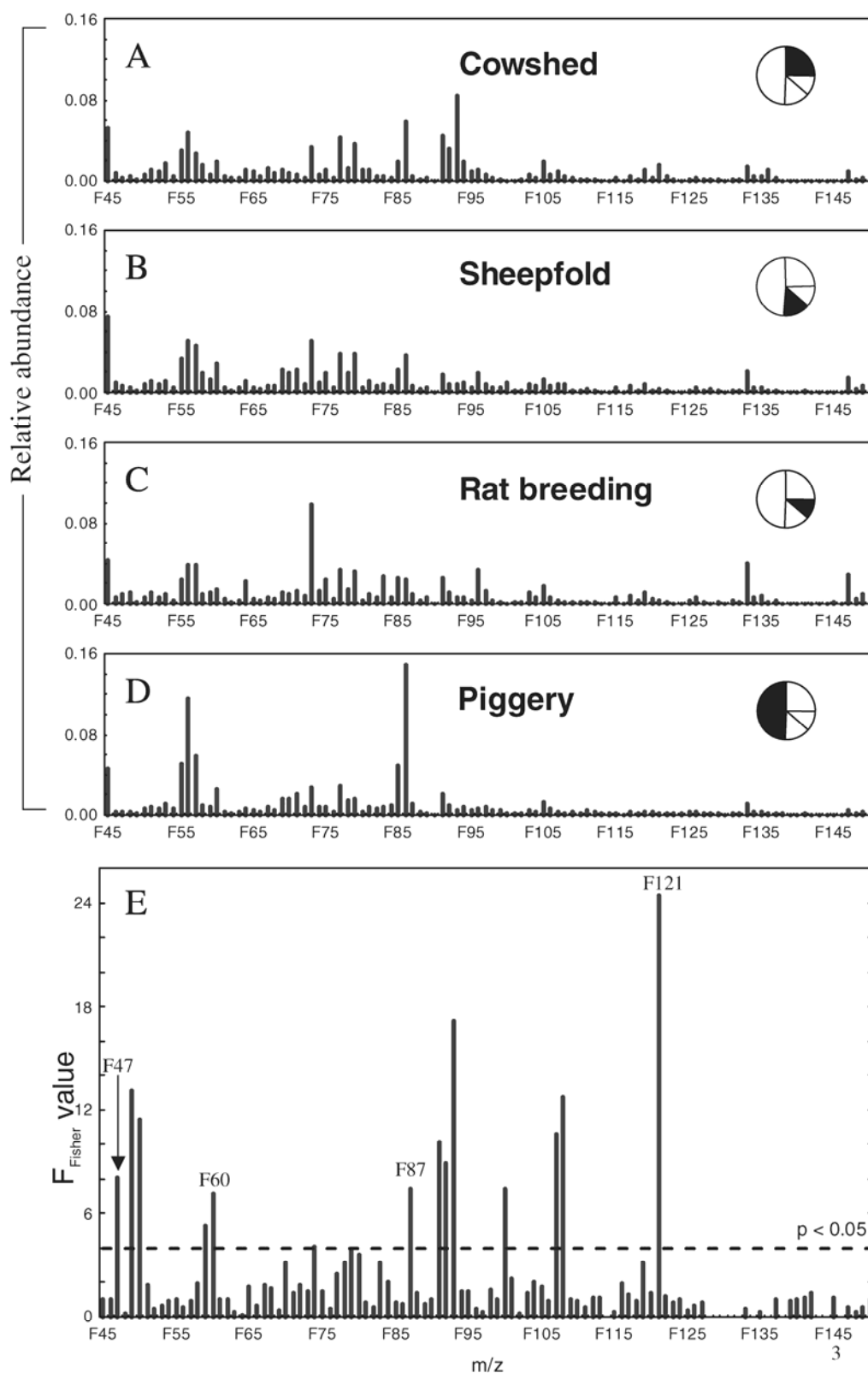


FIGURE 2 A–D: Normalised mass spectra originating from the four different types of atmosphere. The highlighted sectors represent the relative abundance of each atmosphere. E: Effect ( $F_{\text{Fisher}}$  value) of the “type of atmosphere” on the mass fragments intensity. The four mass fragments used for the computation were 47, 60, 87 and 121.

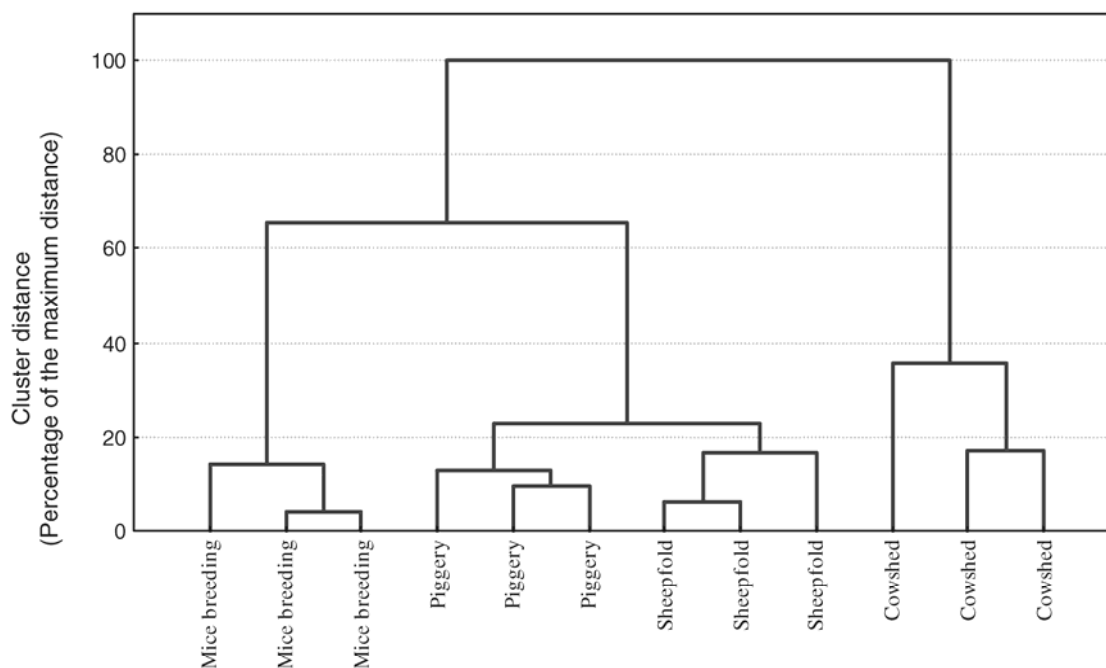


FIGURE 3 Hierarchical clustering of the four types of breeding atmospheres (computations performed from four mass fragments:  $m/z = 47, 60, 87, 121$ ).

mass fragments of the animal shed atmospheres resulted in the retention of only four fragments:  $m/z = 47, 60, 87$  and  $121$ . The most probable chemical origin of these fragments has already been described (sulfur compounds:  $m/z = 47$ , volatile fatty acids:  $m/z = 60$ , phenolic compounds  $m/z = 87$  and terpenes  $m/z = 121$ ). The ascending rank order (Fig. 3) allowed a clear distinction between the four animal shed atmospheres from a fraction of the total information contained in the spectral signatures; i.e., four mass fragments out of the 96 present in the normalised spectra.

## CONCLUSION

SPME is a simple and effective analytical tool for the sampling of volatile components both in headspace and in the atmospheres of animal sheds.

The separative SPME-GC-MS approach provides very rich information on the composition of biological effluents. The best extraction performance was obtained with the C-PDMS fibre, which displayed a strong affinity for sulfur compounds and volatile fatty acids, and also allowed analysis of nitrogen compounds such as indole and scatole. All these compounds are implicated in odour nuisance associated with animal farming, which also argues in favour of SPME/C-PDMS extraction.

The non-separative SPME-MS approach readily provides signatures characteristic of the atmospheres of animal sheds. These signatures enabled us to distinguish clearly between the four animal facilities we tested, using only a small part of the total spectral information obtained. The practical simplicity of the SPME-MS method makes it a good candidate for rapid identification and monitoring of animal shed atmospheres.

### Acknowledgements

This work was funded as part of the “Porcheric Verte” research program. The authors particularly thank the Institut Technique du Porc at Le Rheu, and Mr Bonneau and Mr Lebost from the INRA Joint Research Unit for Calf and Pig Production for their participation in this project and their valuable help in sample collection.

### References

- [1] P.E.V. Williams, *Anim. Feed Sci. Technol.*, **53**, 135–144 (1995).
- [2] S.S. Schiffman, *J. Anim. Sci.*, **76**, 1343–1355 (1998).
- [3] J. Pawliszyn (Ed.), *Application of Solid Phase Microextraction*. Royal Society of Chemistry, Cambridge (1999).
- [4] P.G. Hill and R.M. Smith, *J. Chromatogr. A*, **872**, 203–213 (2000).
- [5] X.-P. Lee, T. Kumazawa, K. Kondo, K. Sato and O. Suzuki, *J. Chromatogr. B*, **734**, 155–162 (1999).
- [6] M. Abalos, J.M. Bayona and J. Pawliszyn, *J. Chromatogr. A*, **873**, 107–115 (2000).
- [7] C. Pérès, C. Viallon and J.L. Berdagué, *Anal. Chem.*, **73**, 1030–1036 (2001).
- [8] R.T. Marsili, *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 648–654 (1999).
- [9] R.T. Marsili, *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 3470–3475 (2000).
- [10] C. Pérès, Thesis, Institut National Agronomique Paris-Grignon, Paris (2002).
- [11] Mass Spectra Database. Palisade Corporation Mass Spectrometry, Wiley 275K, Newfield, NY (1995).
- [12] Masslib. MSP Friedly & Co, Koeniz, Switzerland (1999).
- [13] N. Kondjoyan and J.L. Berdagué, *A Compilation of Relative Retention Indices for The Analysis of Aromatic Compounds*. Laboratoire Flaveur, INRA, Clermont-Ferrand (1996).
- [14] F. Begnaud and J.L. Berdagué, *Sens. Actuators B*, **4125**, 1–8 (2001).
- [15] J.H. Ward, *J. Am. Stat. Assoc.*, **58**, 236–244 (1963).
- [16] P. Popp and A. Paschke, *Chromatographia*, **46**, 419–424 (1997).
- [17] R.E. Shirey, *J. Chromatogr. Sci.*, **3**, 109–116 (2000).
- [18] R.I. Mackie, P.G. Stroot and V.H. Varel, *J. Anim. Sci.*, **76**, 1331–1342 (1998).
- [19] J. Martinez and G. Le Bozec, *Cahiers Agricultures*, **9**, 181–190 (2000).
- [20] J. Zhu, G.L. Riskowsky and M. Torremorell, *Trans. ASAE*, **42**, 175–182 (1999).
- [21] J.A. Zahn, A.A. Dispirito, Y.S. Do, B.E. Brooks, E.E. Cooper and J.L. Hatfield, *J. Environ. Qual.*, **30**, 624–634 (2001).
- [22] V. Mani, In: J. Pawliszyn (Ed.), *Application of Solid Phase Microextraction*, pp. 57–72. Royal Society of Chemistry, Cambridge (1999).
- [23] T. Gorecki, In: J. Pawliszyn (Ed.), *Applications of Solid Phase Microextraction*, p. 92. Royal Society of Chemistry, Cambridge (1999).
- [24] R.E. Shirey, V. Mani and R. Mindrup, *Am. Environ. Lab.*, **10**, 21–22 (1998).
- [25] O.H. O'Neill and V.R. Phillips, *J. Agric. Eng. Res.*, **53**, 23–50 (1992).

### 3.3 Mise en œuvre de nouvelles méthodes de caractérisation d'atmosphères d'élevages porcins

## IMPLEMENTATION OF NEW METHODS TO CHARACTERISE ATMOSPHERES IN PIGGERIES

FRÉDÉRIC BEGNAUD<sup>a,\*</sup>, CHRISTOPHE PÉRÈS<sup>a</sup>, CLÉMENTINE MURAT<sup>a</sup>,  
JACQUES LEBOST<sup>b</sup> and JEAN-LOUIS BERDAGUÉ<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>*INRA de Theix, SRV/Flaveur, F 63122 Saint-Genès-Champanelle, France;*

<sup>b</sup>*INRA, UMRVP, 35590 Saint-Gilles, France*

*(Received 26 June 2003; In final form 7 November 2003)*

Two procedures to characterise atmospheres in piggeries are presented. The first allows delocalised sensorial analysis by trapping volatiles from pig shed emissions in a lipid phase, followed by laboratory analysis of their odour characteristics. The second procedure provides instrumental odour signatures of atmospheres. The volatile compounds are concentrated by solid-phase microextraction (SPME), and analysed directly by mass spectrometry without a chromatographic step (SPME-MS). The information supplied by the two analysis methods proved rich and consistent for the 42 piggeries analysed. In addition, the odour signatures allowed a good estimation of the key dimensions of the odour of the lipid phases. This result indicates that SPME-MS is a promising instrumental method to estimate the degree of odour nuisance in livestock buildings.

*Keywords:* SPME-MS; Spectral signature; Sensorial analysis; Odour nuisance

### INTRODUCTION

The adverse environmental impact on soil, water and air of intensive pig farming is well recognised [1]. Unpleasant odour emissions, which can be a particular nuisance at up to several kilometres from the point of emission [2], are a major criterion governing the installation of new piggeries. Although there are technical solutions for constructing livestock buildings that limit and recycle their liquid and gaseous effluents with practically no environmental impact, political and economic conditions favouring their implementation are currently lacking. Consequently, a better characterisation of odour emissions is currently necessary to identify and describe those sites that present the highest nuisance risks. For this purpose sensory and instrumental approaches are parallel and complementary. The direct use of a sensorial approach comes up against numerous technical and financial limitations, e.g., on-site provision of a sensory analysis jury, dependence on weather conditions, and rapid saturation of judges in

---

\*Corresponding author. Fax: +33-473-624731. E-mail: frederic.begnaud@clermont.inra.fr



an excessively odorous atmosphere [3]. Similarly, the standardised measurement of an olfactive dilution threshold from a sample of a fraction of the atmosphere studied collected in a balloon (AFNOR Standards NF X 43-10, NF X 43-103 and NF X 43-104) presents many limitations. Besides the fact that it neglects the qualitative dimension of the atmosphere studied, its use of bagged samples brings problems of adsorption of volatiles and condensation of water, both sources of marked analytical artefacts [4]. In addition, the results of the instrumental approach have proved disappointing, and the numerous studies conducted on the subject have served only to emphasise the limits of the classical analytical approaches [3,5–10]. However, new procedures can be considered, using relatively simple and rapid methods. Solid-phase microextraction (SPME) is a recent method for the trapping of volatile organic compounds (VOCs) that has already been applied to environmental monitoring [11]. Coupled to gas-phase chromatography and mass spectrometry (SPME-CPG-SM), it provides detailed information on the volatile fractions of matrixes or atmospheres [12–14]. Coupled directly to mass spectrometry, i.e., with no prior chromatographic separation, SPME-MS rapidly yields mass spectra characteristic of the overall composition of the VOCs [15–18].

The aim of this work was to implement two simple and rapid procedures for the characterisation of piggery atmospheres. The first consisted of trapping the volatile compounds from pig sheds in a lipid phase, followed by laboratory analysis of the odour characteristics. The second method involved concentrating the volatile compounds by SPME, and then analysing them directly by mass spectrometry with no prior chromatographic step (SPME-MS). It rapidly yielded odour signatures of the atmospheres. Lastly we sought to correlate the analytical results obtained by the two atmosphere characterisation procedures.

## EXPERIMENTAL

### Selection of Piggeries and Sampling Conditions

Forty-two piggery sites distributed over north-western France were selected so as to be representative of the broad diversity of existing pig farming conditions. Two criteria of variation were studied: “animals’ physiological state” (suckling sows, weaned piglets or fattening pigs), and “type of floor used” (slatted flooring or litter). The distribution of the sites according to these criteria is presented in Table I. The sampling campaign lasted eight weeks during March and April 2002. All the samples were taken by the

TABLE I Distribution of samples according to the “animals’ physiological state” (E: fattening pigs, PS: weaned piglets, M: suckling sows) and “type of floor” (C: full concrete slatted flooring or partial slatted floor, L: straw or sawdust)

	<i>PS-C</i> ■	<i>E-C</i> ●	<i>M-C</i> ▲	<i>PS-L</i> □	<i>E-L</i> ○
Total strength	8	13	7	6	8
Mean odour intensity scores assigned by the experimenter during on-site sampling	6.8 ± 0.8	7.2 ± 1.2	5.4 ± 0.8	3.2 ± 0.8	4.6 ± 1.6

same experimenter, who also undertook a field survey on the characteristics of each installation: cleanliness of buildings, manure management, mode of ventilation and odour intensity score, from 1 (very weak) to 10 (very strong). For each piggery site the samples for sensory analysis and instrumental analysis were taken simultaneously inside buildings at 1 m above floor level and away from areas of air turbulence (doors, fans, extractors, etc.).

## Sensorial Analysis

### *Preparation of Absorbents – Absorption of Volatile Compounds*

The absorbent was made of 25 g of lipid phase (deodorised lard, SARL R. Bahier, Sceaux-sur-Huisne, France) cast in a glass Petri dish (diameter 8 cm). This deodorised fat offers the advantage of having a very weak odour and being sufficiently viscous at ambient temperature not to flow. It is also a powerful absorbent of piggery odours and does not become perceptibly rancid during analysis. For each piggery a sufficient number of Petri dishes for subsequent sensory analysis requirements were exposed for 120 min. The dishes were then sealed airtight, frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  and transferred for laboratory analysis within three days.

### *Sensory Testing*

A panel of ten assessors was formed (seven men and three women, aged 25 to 55 years). Beforehand, the assessors tested lipid phases that had been exposed in seven sites representative of the olfactive diversity of piggery atmospheres. Based on these tests an open discussion was held to eliminate non-consensual or redundant descriptors. Nine sensory descriptors were left: “Piggery”, “Faecal”, “Urine”, “Cabbage-Gas”, “Rind”, “Rancid-Fatty”, “Manure-Stable”, “Straw” and “Mushroom”. The descriptor “Global Intensity” was added to this list. The olfactive analysis of the lipid phases from the 42 piggery sites was of the profile type. Eight test sessions were organised. At each session, five or six closed Petri dishes (warmed to ambient temperature) corresponding to olfactively distinct pig farming sites were presented simultaneously and blindly to the assessors. The assessors could compare the odours of the lipid phases before scoring each descriptor on a graded scale from 1 (very weak) to 10 (very strong). The sessions lasted 10 to 15 min according to the assessors.

## Instrumental Analysis

### *Solid-phase Microextraction of Volatiles*

During each sampling procedure, three carboxen-polydimethylsiloxane (C-PDMS) type SPME fibres 75  $\mu\text{m}$  thick (ref. 57344-U, Supelco, Saint-Quentin-Fallavier, France) were simultaneously exposed for 120 min inside the building. After exposure, the fibres were isolated from the atmosphere by inserting the metal ends of their syringes in septum caps (ref. 5181-3383, Agilent Technologies). The fibres were then taken to the laboratory at ambient temperature and analysed within three days. In all, 126 samples were taken (3 fibres per site  $\times$  42 piggeries).

### ***SPME-MS Measurements***

The analytical set-up consisted of a gas-phase chromatograph (Model 6890 A, Agilent Technologies, Palo Alto, CA) coupled to a quadripolar mass spectrometer (Model 5973, Agilent Technologies, electron impact ionisation at 70 eV). The volatile compounds adsorbed on the C-PDMS fibres were desorbed in the splitless injector of the chromatograph for 2 min at 280°C and then transferred directly into the mass spectrometer ionisation chamber through a short transfer line heated to 220°C (HP-retention gap ref. 19091-60620, Agilent. Length 3 m, diameter 0.10 mm). In these conditions, the analysis time was 5 min. The range of masses acquired was  $33 < m/z < 250$  amu. The total ion current thus obtained had the form of an asymmetrical peak of duration 5 min and mid-height width between 0.25 and 0.50 min. The average mass spectrum, derived from simultaneous ionisation and fragmentation of all the molecules injected, was calculated. This average spectrum was taken as the crude odour signature of the atmospheres analysed.

### **Pre-treatments and Statistical Analysis**

All the statistical calculations were performed with Statistica software [19].

### ***Sensory Data***

To describe the variability of the nine olfactive descriptors, the mean, the median and the interquartiles of the scores of the ten assessors were calculated for the 42 pig farms considered. The pig farms were classified by ascending hierarchical clustering (AHC on Euclidian distance with aggregation of individuals by Ward's method [20]). The aggregation distance was expressed as a percentage of the greatest inter-cluster distance observed. A detailed study of the olfactive characteristics of the different piggery sites was conducted by principal components analysis (PCA). To conserve the information linked to the descriptor scores the PCA was performed from the variance-covariance matrix.

### ***Instrument Data***

Out of the 218 mass fragments that made up the spectra, those with  $m/z$  values less than 45 amu (multiple or poorly characteristic origins: ambient air, carrier gas) together with those covered by instrument noise (estimated at  $10^5$  arbitrary abundance units according to the method of Begnaud and Berdagué [21]) were discarded, leaving spectra containing only 104 mass fragments. These spectra were normalised before statistical analysis (every fragment was expressed as a percentage of the total abundance of all the mass fragments). This mode of expression eliminates variations in response level linked to fluctuations in the mass detector sensitivity or variable adsorption levels of the volatile compounds on the SPME fibre [15]. Median filtering was then applied to the three repeats of each site to stabilise the variance of the measures [22]. A synthetic representation of the data was obtained by PCA of the median spectral data (correlation matrix).

### *Estimation of Sensory Characteristics from Instrument Data*

The estimation of sensory data was made by multivariate linear regression with prior selection of a relevant subset of mass fragments per stepwise ascending procedure ( $p < 0.05$ ).

## RESULTS AND DISCUSSION

### Olfactive Analysis of Lipid Phases

The method of trapping of volatile emissions on a lipid phase proved very easy to implement; all that had to be done was to open the Petri dish and place it at a set location to trap the odours. After trapping, the odour of the phase was qualitatively very close to that of the piggeries but always less intense. Pre-tests showed that by smelling the lipid phases exposed in “strongly odorous”, “moderately odorous” and “mildly odorous” atmospheres the different piggery sites could be easily distinguished and classified. All these observations supported the choice of the lipid absorbent. One of the advantages of odour assessment on a lipid phase, besides allowing the assessment to be delocalised, is that the sampled odours are less intense than those perceived directly in the piggery atmospheres, which often saturate the assessors’ sense of smell.

The results of lipid phase odour assessment exposed in the 42 piggeries confirmed that the method is sensitive. The odour of the lipid phases differed widely according to the atmosphere. The most widely ranging descriptors (Fig. 1) were: “Global intensity” (max. 6.9, min. 1.2), “Piggery” (max. 5.2, min. 0.1) and “Faecal” (max. 5.2, min. 0). The other descriptors varied much more narrowly, in particular the

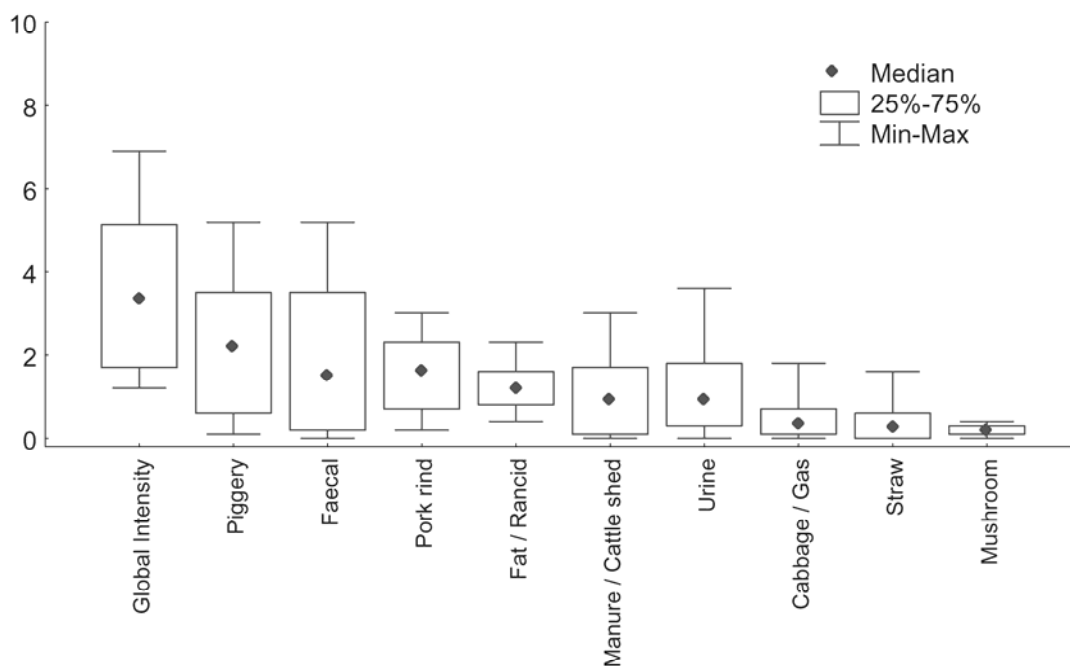


FIGURE 1 Mean, median and interquartile of sensory descriptors.

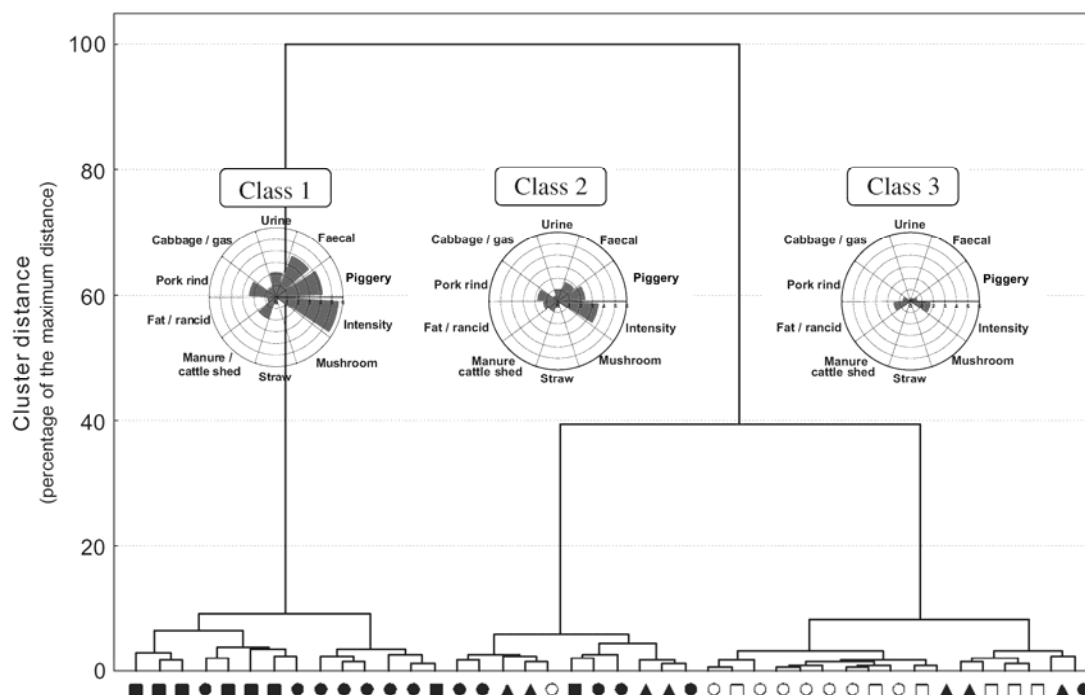


FIGURE 2 Classification tree for piggeries according to olfactory data (ascending hierarchical clustering) and sensory profiles associated with the three clusters found. The aggregation distance is expressed in percentage of the greatest inter-cluster distance measured. Rearing conditions: ■ = weaned piglets on slatted flooring, □ = weaned piglets on litter, ● = fattening pigs on slatted flooring, ○ = fattening pigs on litter, ▲ = suckling sows on slatted flooring.

“Mushroom” descriptor, the intensity and variability of which were very low. In practice this descriptor thus proved unrepresentative of the odour of fatty phases.

The ascending hierarchical clustering of the 42 odour assessments revealed three classes of olfactive perception (Fig. 2). The sensory characteristics of each class were presented in the form of polar diagrams termed “sensory profiles” (Fig. 2). These profiles corresponded to average profiles calculated from the  $n$  piggeries in each group. The classification shows that Class 1 stands out sharply from Classes 2 and 3. Class 1 groups the most strongly odorous lipid phases, and according to the observations made in the piggeries by the technician responsible for the sampling, it also corresponded to the 14 most strongly odorous piggeries (pigs on slatted floors, Table I). In contrast, the 17 piggeries grouped in Class 3 (pigs on straw litter or sawdust) corresponded to the least intense olfactive perceptions during odour assessment of lipid phases. The atmospheres in the piggeries in Class 3 were mildly odorous. Class 2 grouped the moderately odorous lipid phases. This last class corresponded to the 11 piggeries, mostly with slatted floors, that presented appreciably less intense odours than Class 1 piggeries.

The survey of the piggeries’ distribution (main plane of the principal components analysis, Fig. 3a) shows that the odour assessment on the lipid phase was able to separate the piggeries according to the nature of the flooring used for the pigs. From left to right, Axis 1 clearly differentiates most of the piggeries using slatted flooring (intense odours on site) from those using litter (mild odours on site). However, no distinction could be made between full slatted concrete flooring and part slatted flooring, or between straw litter and sawdust. It is interesting to note

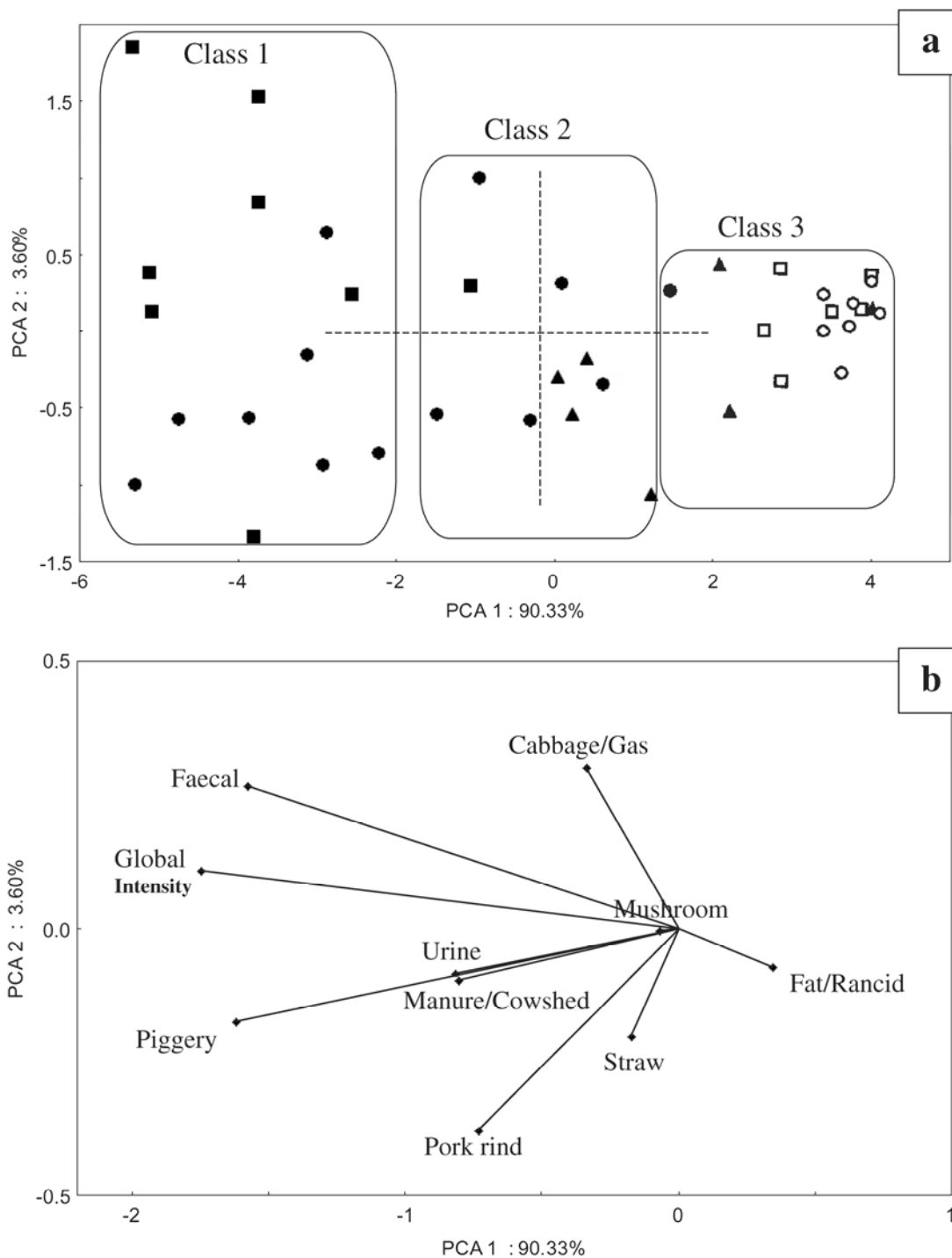


FIGURE 3 Principal components analysis (PCA) of the olfactory data: scores (a) and loadings (b). The three clusters revealed by the AHC are presented. Rearing conditions: ■ = weaned piglets on slatted flooring, □ = weaned piglets on litter, ● = fattening pigs on slatted flooring, ○ = fattening pigs on litter, ▲ = suckling suckling sows on slatted flooring.

that suckling sheds, recognised as moderately odorous, are scored close to straw litter in spite of the use of slatted floors. The field survey conducted provided an explanation for the position of several piggery buildings that were badly classified in the schematic description made above. Four piggeries on slatted floors were

assigned to Class 3, among piggeries using litter (Fig. 3a). These were three particularly clean suckling sheds and a fattening shed with a very small amount of manure in the pits when the sampling was being done. These sheds exhibited a very mild overall odour. Likewise, the piggery using litter classified among those on slatted floors (Class 2, Fig. 3a) was using a poor-quality odorous litter. Figure 3(b) shows the aromatic dimensions perceived during odour assessment of the lipid phases. As the PCA loadings were calculated from the variance-covariance matrix, the standard of the vectors associated with the descriptors is a direct measure of their intensity. Three important descriptors emerge: "Global Intensity", "Faecal" and "Piggery". The other descriptors had a smaller vectorial standard, attributable to lower scoring. The "Manure-Stable" and "Urine" descriptors were co-linear with the "Piggery" descriptor and give no real additional information. The poor representation of the descriptors "Mushroom", "Straw", "Cabbage-Gas" and "Rancid-Fatty" is linked to their low scores and narrow variances (Fig. 1). Part of the "Rancid-Fatty" descriptor corresponds in fact to the baseline odour of the lipid phase (perceptible at an intensity score of about 1), which, after exposure in an odorous site is masked by the volatile compounds that impregnate the support. The high variance of the main plane of the PCA (93.9%; more than 90% for Axis 1) reflects the one-dimensional aspect of the sensory perceptions, which are summarised by "Global Intensity" described by the terms "Piggery" and "Faecal".

### SPME-MS Measurements

The direct coupling of SPME to the mass spectrometer yielded, in under 5 min, mass spectra, or spectral signatures, characteristic of the overall composition of the VOCs. The information contained in these spectral signatures results from the simultaneous fragmentation of the VOC mixture in the mass spectrometer source. An example of an SPME-MS desorption profile and its corresponding spectral signature are presented in Fig. 4. The choice of an SPME carboxen-polydimethylsiloxane (C-PDMS) SPME fibre was made from the results of the study by Begnaud *et al.* [16], who showed its potential for characterising the atmospheres of livestock farming sites. This type of fibre extracted more than 100 compounds from pig manure emissions, some of which are directly implicated in olfactive nuisance: straight- and branched-chain volatile fatty acids, nitrogen heterocycles (derivatives of pyrrole, indole and scatole), thiols and mercaptans.

Principal components analysis of SPME-MS data (Fig. 5) shows that the main plane condenses only 55% of the variance of the data. Nine canonical axes have to be considered to condense 90%. This means that the information available in the signatures displays a relatively low redundancy, which is a valuable feature of SPME-MS spectra. Inspection of the main plane (scores) clearly distinguishes the sites of fattening and post-weaning on litter from those of post-weaning on slatted floors. The mass fragments (loadings) specific to compounds implicated in odour nuisance indicate that the sites of post-weaning on slatted floors were associated with a high proportion of ions specific to carboxylic acids ( $m/z$  60, 73 and 87: acetic, butanoic and valeric/isovaleric acid) and their corresponding ethyl esters ( $m/z$  87 and 88). Sites of fattening on litter were characterised by the spectra with the smallest proportions of ions specific to *p*-cresol and ethylphenol ( $m/z$  107

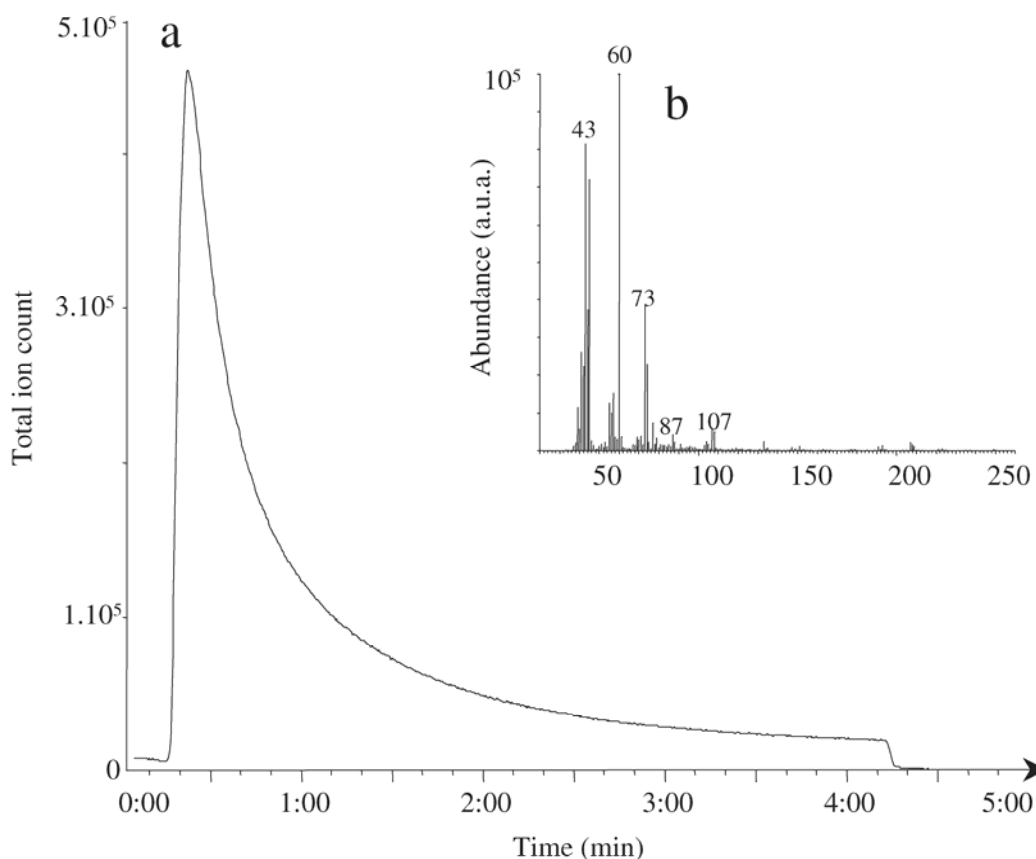


FIGURE 4 SPME-MS desorption profile of a C-PDMS fibre exposed for 120 min in a fattening shed with full concrete slatted flooring (a) and average spectrum 0–5 min (b).

and 108) and carboxylic acids, and the highest proportions of ions characteristic of terpenes ( $m/z$  93, 121 and 136).

#### Estimation of Sensory Characteristics from Instrument Data

Only the sensory descriptors best perceived by the assessors were regressed. These were the descriptors “Global Intensity”, “Piggery” and “Faecal”, which were both scored high and displayed high variance. For these three descriptors, the model coefficients of determination ( $r^2$ ) lay between 0.88 and 0.92 ( $n=42$ ,  $p<0.0001$ ) for a number of independent variables (or mass fragments) between 4 and 6 (Fig. 6). Based on separate analysis of atmosphere compositions previously carried out by Begnaud *et al.* [16], it was possible to identify the main components responsible for the occurrence of the selected fragments. They were compounds known to contribute to piggery odour [10]: sulphur compounds (dimethylsulphide, dimethyldisulphide, dimethyltrisulphide and dimethyltetrasulphide, ions 45, 79, 80, 81 and 128), volatile fatty acids (acetic, butanoic and valeric/isovaleric acids, ions 45, 60 and 87), indoles (indole and scatole, ions 87, 90 and 128), aromatic compounds (*p*-cresol and 4-ethylphenol, ions 60, 79, 80, 81, 87 and 90) and furan compounds (in particular 2-methylfuran, ion 81). The results of estimation of sensory characteristics from



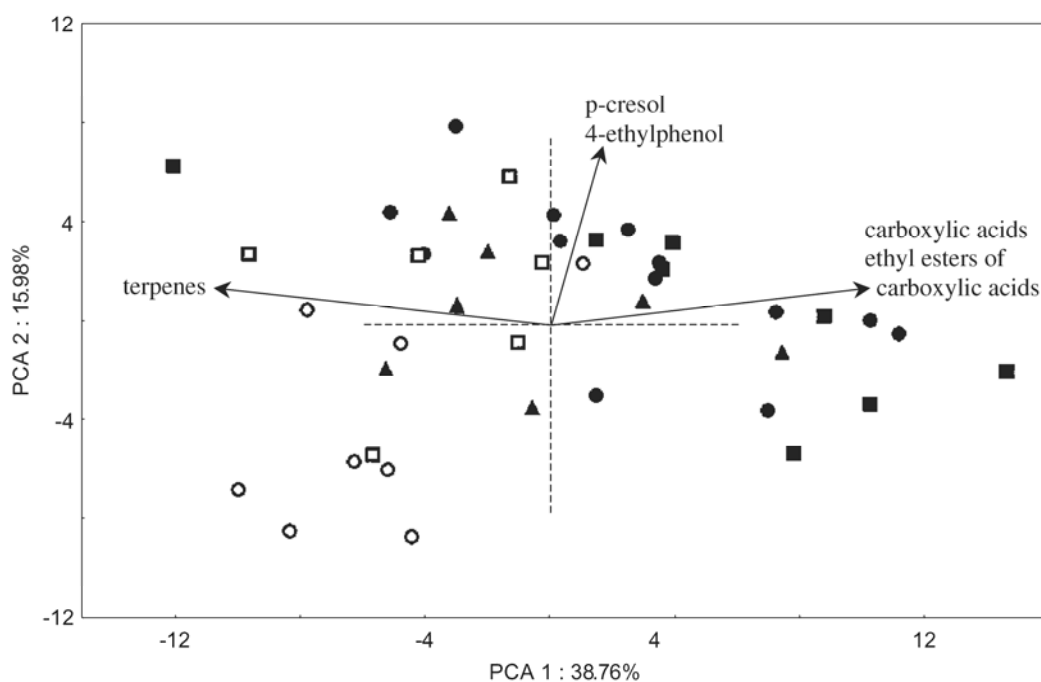


FIGURE 5 Principal component analysis (PCA) of the SPME-MS data. Biplot of scores and loadings. For simplicity, only vectors corresponding to odour-active compounds are presented. Rearing conditions: ■ = weaned piglets on slatted flooring, □ = weaned piglets on litter, ● = fattening pigs on slatted flooring, ○ = fattening pigs on litter, ▲ = suckling sows on slatted flooring.

instrument data are both highly significant and consistent with current knowledge of the molecular origins of odour nuisance. Thus odour intensity estimation by SPME-MS seems to deserve further research. Given the close links observed between subjective odour assessment data and the olfactive impressions noted on site by the experimenter (Fig. 7), it might also be interesting to attempt a direct correlation between on-site olfactive perception (using a sensory analysis assessment panel) with data acquired by SPME-MS. The ultimate aim would be to devise models for the instrumental estimation of odour nuisance in any livestock farming or industrial site.

## CONCLUSION

Two methods to characterise piggery atmospheres were implemented.

The first involved collecting emissions on piggery sites by trapping volatiles in a lipid phase. This allows the olfactive characteristics of pig farm buildings to be evaluated remotely in a sensory analysis laboratory and so obviates the presence of sensory panelists on site. This method is simple and economical, and suitable for routine regulatory inspections.

In the second method, SPME-MS yields a spectral signature characteristic of the sampled atmosphere in a few minutes. The information contained in the SPME-MS spectra was found to be closely correlated with the odour characteristics of the lipid phases.

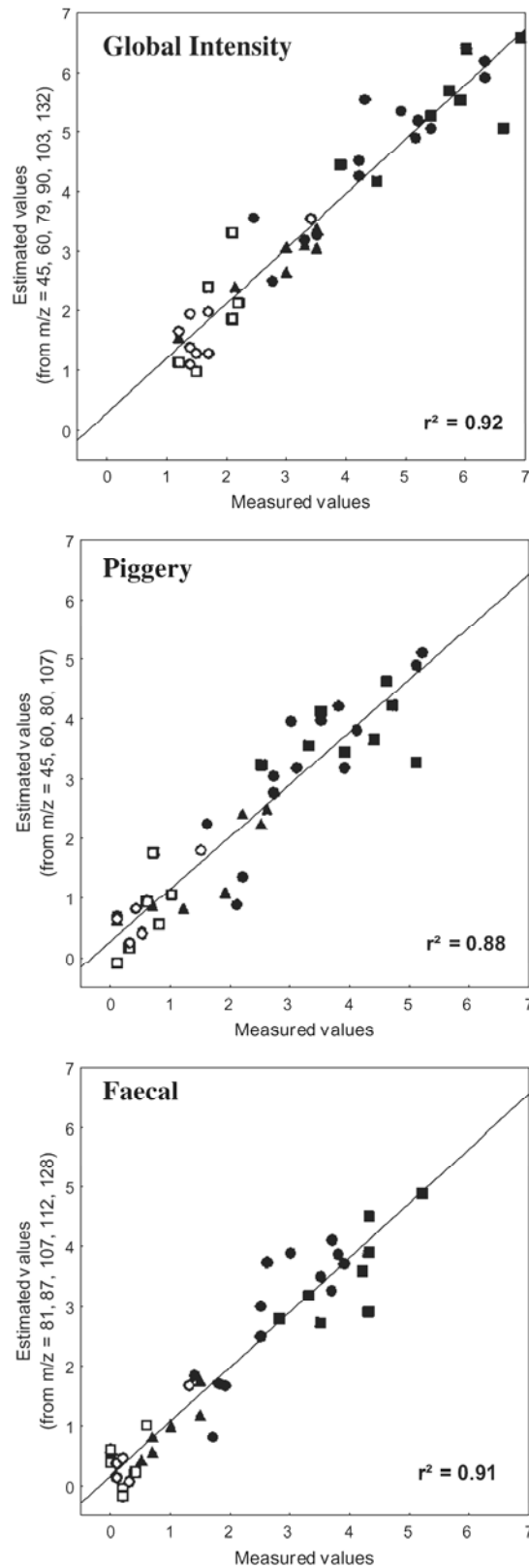


FIGURE 6 Correlations between scores estimated from SPME-MS instrument data and average scores assigned by the assessor panel for the three descriptors selected. Rearing conditions: ■ = weaned piglets on slatted flooring, □ = weaned piglets on litter, ● = fattening pigs on slatted flooring, ○ = fattening pigs on litter, ▲ = suckling sows on slatted flooring.

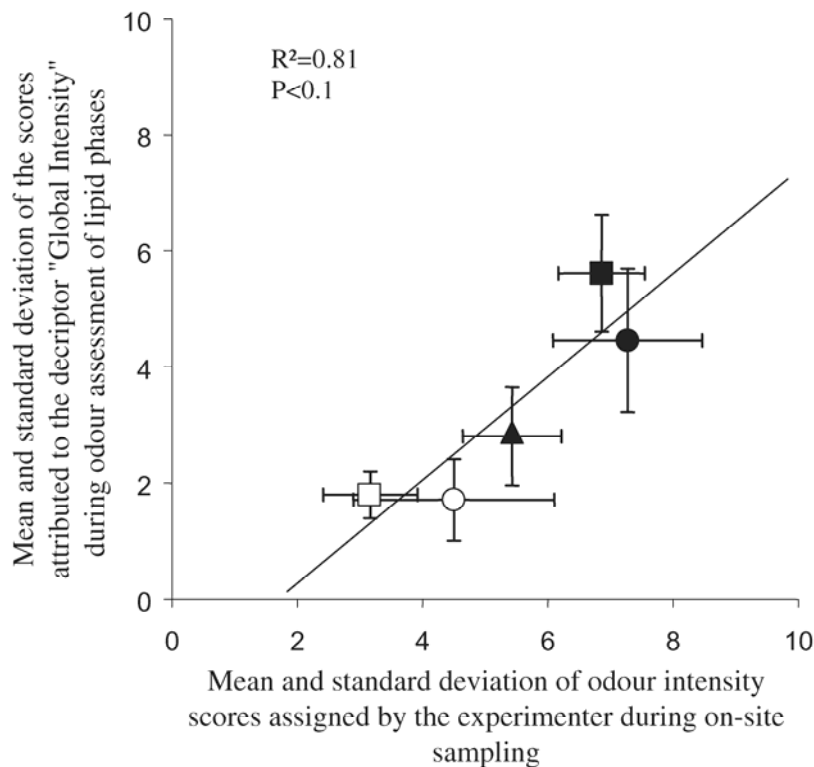


FIGURE 7 Correlations between odour intensity scores assigned by the experimenter during on-site sampling and the descriptor “Global Intensity” perceived during odour assessment of lipid phases. Each point corresponds to the mean of scores for the following five piggery sites: weaned piglets on slatted flooring (■), weaned piglets on litter (□), fattening pigs on slatted flooring, (●), fattening pigs on litter (○), suckling sows on slatted flooring (▲).

The exploitation of the data obtained by these two methods confirmed that the odour intensity is closely linked to the type of floor used. Piggeries using litter were found to generate less odour than those using slatted flooring.

### Acknowledgements

This work was financed by GIS Porcherie Verte. We especially thank the Institut Technique du Porc de Le Rheu for help with experimental design, and all the pig farmers involved in this work.

### References

- [1] P.E.V. Williams, *Animal Feed Sci. Technol.*, **53**, 135–144 (1995).
- [2] S.S. Schiffman, *J. Animal Sci.*, **76**, 1343–1355 (1998).
- [3] J.A. Zahn, J.L. Hatfield, Y.S. Do, A.A. DiSpirito, D.A. Laird and R.L. Pfeiffer, *J. Environ. Qual.*, **26**, 1687–1696 (1997).
- [4] J. Pet'ka, P. Etievant and G. Callement, *Analisis*, **28**, 330–335 (2000).
- [5] S.F. Spoelstra, *Agric. Environ.*, **5**, 241–260 (1980).
- [6] A. Yasuhara and K. Fuwa, *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 2379–2385 (1980).
- [7] A. Yasuhara, K. Fuwa and M. Jimbu, *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 3001–3010 (1984).
- [8] J. Zhu, G.L. Riskowsky and M. Torremorell, *Trans. ASAE*, **42**, 175–182 (1999).
- [9] J.A. Zahn, J.L. Hatfield, D.A. Laird, T.T. Hart, Y.S. Do and A.A. DiSpirito, *J. Environ. Qual.*, **30**, 635–647 (2001).

- [10] O.H. O'Neill and V.R. Phillips, *J. Agric. Eng. Res.*, **53**, 23–50 (1992).
- [11] J. Pawliszyn, *Application of Solid Phase Microextraction* (Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1999).
- [12] P.G. Hill and R.M. Smith, *J. Chromatogr. A*, **872**, 203–213 (2000).
- [13] X.-P. Lee, T. Kumazawa, K. Kondo, K. Sato and O. Suzuki, *J. Chromatogr. B*, **734**, 155–162 (1999).
- [14] M. Abalos, J.M. Bayona and J. Pawliszyn, *J. Chromatogr. A*, **873**, 107–115 (2000).
- [15] C. Pérès, C. Viallon and J.L. Berdagué, *Anal. Chem.*, **73**, 1030–1036 (2001).
- [16] F. Begnaud, C. Pérès and J.L. Berdagué, *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, **83**, 837–849 (2003).
- [17] R.T. Marsili, *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 648–654 (1999).
- [18] R.T. Marsili, *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 3470–3475 (2000).
- [19] Statistica, *A Comprehensive System for Statistics, Graphics and Application Development* (Statsoft, Maisons-Alfort, France, 1999).
- [20] J.H. Ward, *Am. Stat. Assoc.*, **58**, 236–244 (1963).
- [21] F. Begnaud and J.L. Berdagué, *Sensors Actuators B*, **4125**, 1–8 (2001).
- [22] M. Feinberg and C. Ducauze, *Analisis*, **12**, 26–31 (1984).

### 3.4 Bilan

De bons résultats ont été obtenus lors de l'analyse par NSA-MS d'effluents volatils collectés selon différentes approches. Il a été montré que le contrôle *a posteriori* de paramètres de production, que la classification d'échantillons ou encore que l'estimation de caractéristiques sensorielles étaient réalisables à partir de l'analyse globale des composés volatils échantillonnés.

Le choix des techniques d'échantillonnage a été orienté par les impératifs liés aux domaines d'application considérés : contraintes de coûts en ce qui concerne le contrôle des conditions de production de farines de viandes, et contraintes de transport d'échantillons dans le cadre des études sur les porcheries.

Pour des produits proches et de même nature il a été nécessaire de faire appel à des techniques de traitement de données inférentielles (réseaux neuromimétiques, régression multivariée) alors que lorsque les produits différaient fortement ou présentaient des facteurs de variation importants, des techniques strictement descriptives se sont avérées suffisantes (analyse en composantes principales, classification hiérarchique).

Pour stabiliser la variance des empreintes liée aux fluctuations du détecteur, la normalisation interne a été employée. Cette technique couramment utilisée n'est cependant pas optimale. Le problème des dérives du détecteur étant crucial pour le développement des techniques non-séparatives, une nouvelle approche a été développée et comparée aux performances de la normalisation interne. Ces travaux font l'objet de la 4<sup>ème</sup> partie de ce mémoire.

# 4

## **Éléments de résolution des dérives instrumentales**

## **Partie 4 : Éléments de résolution des dérives instrumentales**

---

Un des buts majeur de l'analyse non séparative par spectrométrie de masse est de pouvoir émettre un diagnostic quant à l'appartenance ou non d'un échantillon à un ensemble possédant des caractéristiques particulières (propriétés physico-chimiques, présence/absence de composés, etc.). Ce diagnostic est établi par comparaison entre l'empreinte spectrale de l'échantillon et les empreintes d'échantillons de référence stockées dans une base de données spectrales. Ces bases sont longues à construire, coûteuses et doivent être régulièrement actualisées pour maintenir un haut niveau d'efficacité et de fiabilité.

La pérennité de ces bases est un élément essentiel au développement des méthodes d'analyse rapides par spectrométrie de masse. En effet, l'exploitation d'une base de données spectrales n'est envisageable que si les empreintes acquises sont indépendantes des conditions d'analyses, et notamment de l'évolution du détecteur. Ce n'est actuellement pas le cas et c'est là le principal frein au développement de l'analyse non séparative.

Différentes solutions de redressement des dérives ont déjà été présentées lors de l'étude bibliographique (paragraphe 1.3.2 ), mais aucune n'est entièrement satisfaisante.

Les travaux présentés ici font suite à une première méthode de correction des dérives du spectromètre de masse par étalonnage externe proposée en 2001 (Begnaud *et al.*, 2001, voir en annexe). Pratiquement, cette méthode consistait à insérer des échantillons de référence à intervalles réguliers dans la séquence d'analyse. La variation de réponse de ces références permettait ainsi de caractériser et de corriger la dérive de chaque fragment de masse, par une fonction linéaire. Bien qu'ayant donné des résultats satisfaisants, cette méthode entraînait une augmentation conséquente du nombre d'analyses (+30%) et donc du coût et de la durée des études. En outre, son application imposait de nombreuses contraintes liées à l'utilisation d'échantillons de référence (choix de la référence, stabilité physico-chimique, stockage), ce qui en limitait l'emploi et la généralisation.

Plutôt qu'une référence externe, l'introduction en continue d'une référence stable pourrait permettre de s'affranchir des limitations évoquées précédemment. C'est l'objet du travail présenté ici, publié dans *Analytical Chemistry* en 2002.

## 4.1 Correction des dérives temporelles des spectromètres de masse par addition de gaz standard (SGA)

# Standard Gas Addition: A Calibration Method for Handling Temporal Drifts of Mass Spectrometry-Based Sensors

Christophe Pérès,\* Frédéric Begnaud,\* and Jean-Louis Berdagué\*

Laboratoire FlavEUR, INRA de Theix, F-63122 Saint-Genès-Champagnelle, France

This work describes a new method for the correction of signal drift of a MS-based sensor by standard gas addition (SGA). It consists of introducing a gaseous He–Xe mixture continuously and independently of the carrier gas into the mass spectrometer source. To mimic the disturbances generated by periodical tuning of the mass detector, three series of adjustments were made to the main acquisition parameters. The influence of the SGA signal correction on the discriminating power of the data was evaluated from the analysis of three batches of cheeses by dynamic headspace coupled to mass spectrometry. SGA afforded a good correction of the main types of drift classically observed in mass spectrometry.

The use of rapid characterization systems based on fingerprint recognition relies heavily on the availability of robust, permanently valid databases. Robustness strongly depends on the experimenter (e.g., choice of large enough representative samples), whereas the permanence of databases is often undermined by the instability of instrument performance. New systems of characterization by mass spectrometry (MS-based sensors) have recently shown promise for rapid analysis, in particular in the agrifood sector.<sup>1–13</sup> However, the question of signal stability still arises for such systems, as signal drift can occur for many different reasons during the life of the mass detector, for example: (i) gradual fouling of the source; (ii) maintenance operations (e.g., opening and cleaning of the source, changing of the electro- or photomultiplier, replacement of the filament and repeller); (iii) impaired

vacuum quality (quality of the carrier gas, introduction of too much material, etc.)<sup>14,15</sup>

Depending on its origin, the drift can be gradual or sudden, linear or nonlinear, and very often difficult to predict. Thus, although various tuning procedures exist, if the signal goes uncorrected during a campaign of analyses, the resulting data are weakened or even made valueless. Accordingly, it is important to have procedures to monitor the state of the mass detectors and help correct drift.

Little work has so far been published on these issues. In a recent study, Marsili<sup>16</sup> advocated using an internal standard to overcome serious instrument problems in solid-phase microextraction-mass spectrometry (SPME-MS). However, although the use of such a standard has proved effective for milk samples, it is difficult for the analysis of solid samples. Haugen et al.<sup>17</sup> proposed a correction algorithm to rectify the drift observed with gas sensors. In practice, this method is achieved by inserting reference samples at regular intervals during the analysis sequence. The variation in the response to these references makes it possible to characterize the drift, which in this case was modeled by a linear function. This method has produced satisfactory results and is readily applicable to rapid mass spectrometry characterization systems generally. However, the procedure entails carrying out an increased number of analyses (generally 3 reference samples for 8–10 test samples) and can be disturbed by memory effects between successive analyses. Last, Goodacre and Kell<sup>18</sup> proposed a method of rectification by neuron networks for the correction of drift in Curie point pyrolysis-mass spectrometry spectra. Reference samples were analyzed at two different periods to set up a neuron network that would then correct the potential drift of the signal of each mass fragment between these two periods. This method proved satisfactory for lysozyme assay in glycogen. However, like the preceding method it requires analysis and management of reference samples, which is sometimes difficult, especially in the agrifood sector (choice of a reference sample, physical and chemical stability, storage, etc.).

Here, a new method for the correction of signal drift of a MS-based sensor by standard gas addition (SGA) is described. The type of MS-based sensor used in this work comprised a dynamic

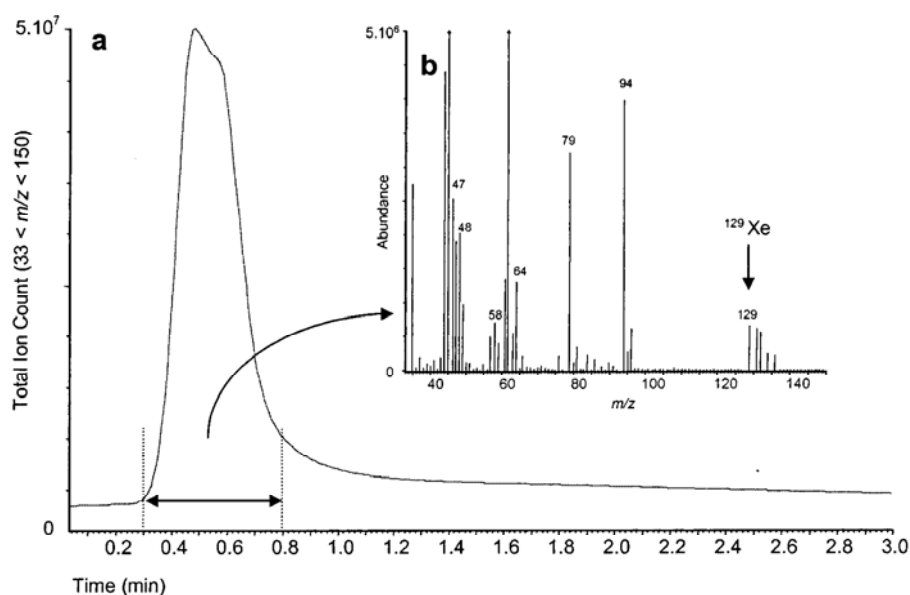
\* Corresponding authors. C.P.: cperes@clermont.inra.fr. F.B.: begnaud@clermont.inra.fr. J.-L.B.: berdague@clermont.inra.fr.

- (1) Dittmann, B.; Nitz, S.; Horner, G. *Adv. Food Sci.* **1998**, *20*, 115–121.
- (2) Dittmann, B.; Nitz, S. *Sens. Actuators, B* **2000**, *69*, 253–257.
- (3) Dittmann, B.; Zimmermann, B.; Engelen, C.; Jany, G.; Nitz, S. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 2887–2892.
- (4) Goodner, K. L.; Rouseff, R. L. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 250–253.
- (5) Pérès, C.; Viallon, C.; Berdagué, J. L. In 15th International Mass Spectrometry Conference; Barcelona, Spain, 2000.
- (6) Pérès, C.; Viallon, C.; Berdagué, J. L. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 1030–1036.
- (7) Shiers, V.; Squibb, A. D. In 5th symposium on olfaction and electronic nose; Hunt Valley, Baltimore, MD, **1998**.
- (8) Schaller, E.; Zenhäusern, S.; Zesiger, T.; Bosset, J. O.; Escher, F. *Analisis* **2000**, *28*, 743–749.
- (9) Vernat, G.; Berdagué, J. L. *Bioflavour 95 symposium*, Dijon, I.N.R.A.; 1995; pp 59–62.
- (10) Berdagué, J. L.; Viallon, C.; Begnaud, F.; Frenicia, J. P. *Viandes Prod. Carnes* **2000**, *21* (1), 3–10.
- (11) Berdagué, J. L.; Viallon, C.; Kondjoyan, N.; Denoyer, C.; Thonat, C. *Viandes Prod. Carnes* **1998**, *19* (1), 78–80.
- (12) Berdagué, J. L.; Vernat, G.; Rossi, V. *Viandes Prod. Carnes* **1993**, *14* (5), 135–138.
- (13) Marsili, R. T. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 648–654.

- (14) Cardinal, M.; Viallon, C.; Thonat, C.; Berdagué, J. L. *Analisis* **2000**, *28*, 825–829.

- (15) Pérès, C.; Viallon, C.; Berdagué, J. L. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 1030–1036.
- (16) Marsili, R. T. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 3470–3475.
- (17) Haugen, J.-E.; Tomic, O.; Kvaal, K. *Anal. Chim. Acta* **2000**, *407*, 23–39.
- (18) Goodacre, R.; Douglas, B. K. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 1–280.





**Figure 1.** (a) Desorption peak ( $m/z = 33\text{--}150$ ) of a sample of Camembert cheese obtained by DHS-MS. The extraction was performed by purging the headspace for 2 min at  $120\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . (b) Mean spectrum 0.3–0.8 min.

headspace device coupled to a mass spectrometer (DHS-MS). To mimic the disturbances generated by periodical tuning of the mass detector, three series of adjustments were made to the main acquisition parameters. The three tuning operations carried out induced variations in the sensitivity of the mass detector. The influence of the signal correction by SGA on the discriminating power of the DHS-MS was evaluated from the analysis of three batches of Camembert-type cheeses.

## MATERIALS AND METHODS

**Origin and Storage of Products.** The three cheeses analyzed were commercially available products of the “Camembert” type (ripening time 30 days). Two of the cheeses were made from raw milk (Rm1 and Rm2) and the third was from heat-treated milk (Cou). The cheeses were cut into equal 25-g portions, which were wrapped in aluminum foil, vacuum-packed in polyethylene bags, and stored at  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

**Preparation of Samples.** The packed samples were thawed at ambient temperature before analysis. To generate the headspace, 5 g of cheese was introduced into a 20-mL flask (Interchim, Montluçon, France) and immediately sealed with a butyl Teflon septum and crimped aluminum closure (Interchim).

**Dynamic Headspace-Mass Spectrometry.** The apparatus for the extraction/concentration of the volatile compounds was composed of an automated dynamic headspace system (Compact Desorber 1, INRA/SRV, Theix, France) coupled to an autosampler (HP19395A, Hewlett-Packard, Palo Alto, CA) with a capacity of 21 flasks. The system functioned sequentially: (i) stabilization of the headspace in the flask, equilibration for 20 min at  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; (ii) extraction/trapping, purging of the headspace of the cheeses for 2 min by a helium stream at  $120\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  (U quality, purity 99.995%, Air Liquide) toward an adsorbent trap (0.1 g of Tenax TA, stainless steel tube of length 18 cm, and inside diameter of 2.5 mm (Interchim)); (iii) desorption/injection, ohmic heating of

the trap at  $220\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 3 min under a stream of helium carrier (He N55, purity 99.9995%, Air Liquide) corresponding to an applied pressure at the trap head of 0.8 bar. The material thus desorbed was injected in splitless mode into the source of a mass spectrometer (MD800, Fisons Instruments) through a deactivated silica transfer line (length 0.5 m, inside diameter 0.15 mm; SGE) heated at  $180\text{ }^{\circ}\text{C}$  in the oven of a chromatograph (GC 8060, Fisons Instruments). The  $m/z$  range covered was from 33 to 150 atomic mass units (amu). The total ionic current obtained under these conditions took the form of an asymmetrical peak of width  $\sim 0.5$  min (Figure 1a). The mean abundance values of mass fragments recorded between 0.3 and 0.8 min were used in calculations (Figure 1b); (iv) cooling of the trap for 2 min (return to ambient temperature) before the following sample. Under these conditions, the autosampler provided a throughput of one sample every 7 min (extraction/trapping, 2 min; desorption/injection, 3 min; cooling of trap, 2 min), the equilibration step taking place during the preceding analytical sequences.

**Standard Gas Addition.** A He–Xe gas mixture (He 98%–Xe 2%, Air Liquide) was introduced into the mass spectrometer source continuously and independently of the carrier gas. This mixture was introduced by means of an interface consisting of a restrictor and a deactivated silica capillary column of length of 50 cm and inside diameter of 0.15 mm (Supelco, Bellefonte, PA). The pressure applied at the head of the SGA device was 1 bar, and the flow rate of gas introduced continuously into the source was  $0.2\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ .

**Disruptive Factors of MS Tunings.** Three different tuning settings corresponding to normal conditions of use of a mass spectrometer were programmed (main parameters given in Table 1). To observe the effects of these tuning settings on the signal, each of the three cheeses was analyzed five times after each tuning. In all, 45 analyses were spread over 3 days (one tuning operation per day). The cheeses were analyzed in random order.

**Table 1. Principal Tuning Settings**

	tuning a ( $T_a$ )	tuning b ( $T_b$ )	tuning c ( $T_c$ )
PM voltage (V) <sup>a</sup>	260	300	340
repeller (V)	5	6	5.5
lens1 (V)	6	5	4
lens2 (V)	50	55	60
miscellaneous			pump down 30 min before tuning

<sup>a</sup> PM voltage, photomultiplier voltage.

**Preprocessing of Data.** *Selection and Filtering of Mass Fragments.* The mass fragments lighter than 45 amu were not counted owing to their multiple nonspecific origins (ambient air, carrier gas). In addition, only those mass fragments with abundance values above the background noise threshold of the apparatus (in arbitrary units of abundance (aua), determined at 1500 for tuning A, 2500 for tuning B, and 5000 for tuning C) were counted. These fragments were then used in calculations, either as they were (noise-filtered spectra) or after one of the two correction procedures presented below.

*Internal Normalization.* Each mass fragment was expressed as a percentage of the sum of the mass fragments.

*SGA Normalization.* For each recording, the abundance of each mass fragment was divided by the abundance of <sup>129</sup>Xe. The isotope <sup>129</sup>Xe was chosen as reference in this study because of its intensity and its unequivocal origin (for the cheeses analyzed).

**Data Analysis.** Principal component analysis (PCA; Statistica software)<sup>19</sup> and factorial discriminating analysis (FDA; SAS software)<sup>20</sup> were carried out for each preprocessing step. These analyses respectively visualized the structure of the data and described their ability to discriminate between the cheeses irrespective of the tuning settings.

For the FDA, only the five most relevant variables ( $p < 0.05$  in and out, forward stepwise procedure) were kept. The discriminating power of the data according to the pretreatment applied was determined by the percentages of well-classified individuals by cross-validation ("leave-one-out") and by the sum of the Mahalanobis distances, which characterize the spatial separation of the groups (ratio of inter- to intragroup distances).

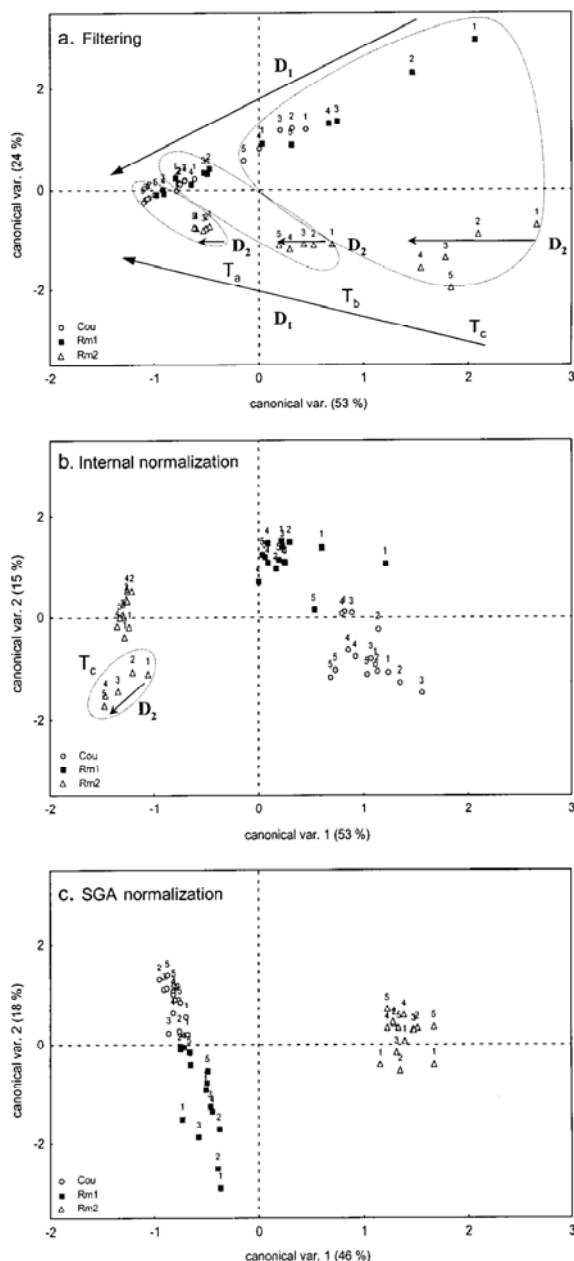
## RESULTS AND DISCUSSION

**Desorption Profile and Spectral Fingerprints.** Figure 1 shows a desorption profile obtained by DHS-MS along with the corresponding mass spectrum. Comparison with the results obtained in previous studies<sup>21</sup> shows that the addition of a standard gas does not modify the overall shape of the signal. However, owing to the continuous introduction of xenon into the spectrometer source, the level of the baseline is slightly higher. Xenon was chosen because it is an inert nontoxic, nonpolluting gas that is monatomic and so easily identified. The signal group corresponding to the five major isotopes of xenon shows up distinctly in the mass spectrum (Figure 1b) between 129 and 136 um

(19) Statistica *A comprehensive system for statistics, graphics and application development*, Statsoft, Maisons-Alfort, 1999.

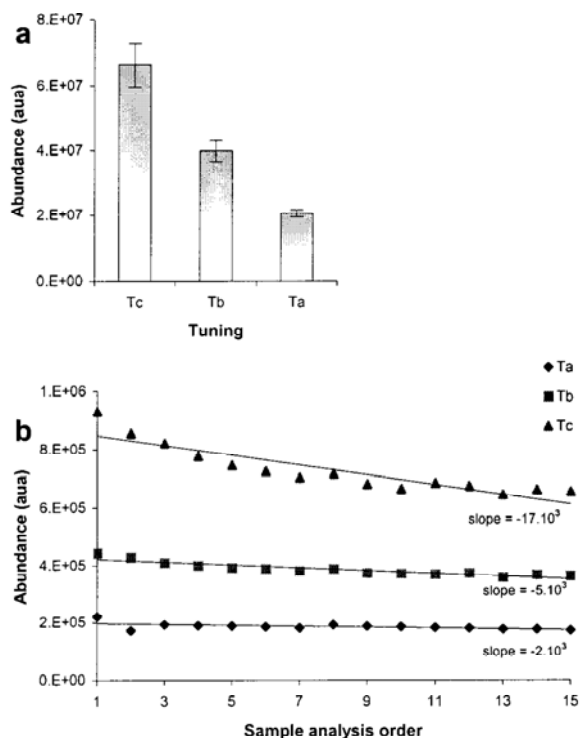
(20) Sas Institute Inc *SAS /STAT User's Guide 1988*, 902–922.

(21) Pérès, C.; Denoyer, C.; Tournayre, P.; Berdagué, J. L. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 1386–1342.



**Figure 2.** PCA carried out from the following: (a) noise-filtered data; (b) data corrected by internal normalization; (c) data corrected by SGA normalization,  $T_i$  ( $i = a-c$ ) designates a series of analyses carried out with tuning  $i$ . The numbers (1–5) designate the intratuning analysis order. Arrows  $D_1$  illustrate the modifications to the signal caused by the three tuning settings. Arrows  $D_2$  show the drift of the signal linked to the fall in the sensitivity of the system from one analysis to the next.

without interfering with the mass fragments from the cheeses. Experimentally, the ratio of the different isotopes of xenon is constant (coefficient of variation less than 0.6%), making it possible to choose any of the five signals as reference in the event of interference with a fragment from the product being analyzed. The isotope we chose to use for these experiments was <sup>129</sup>Xe.



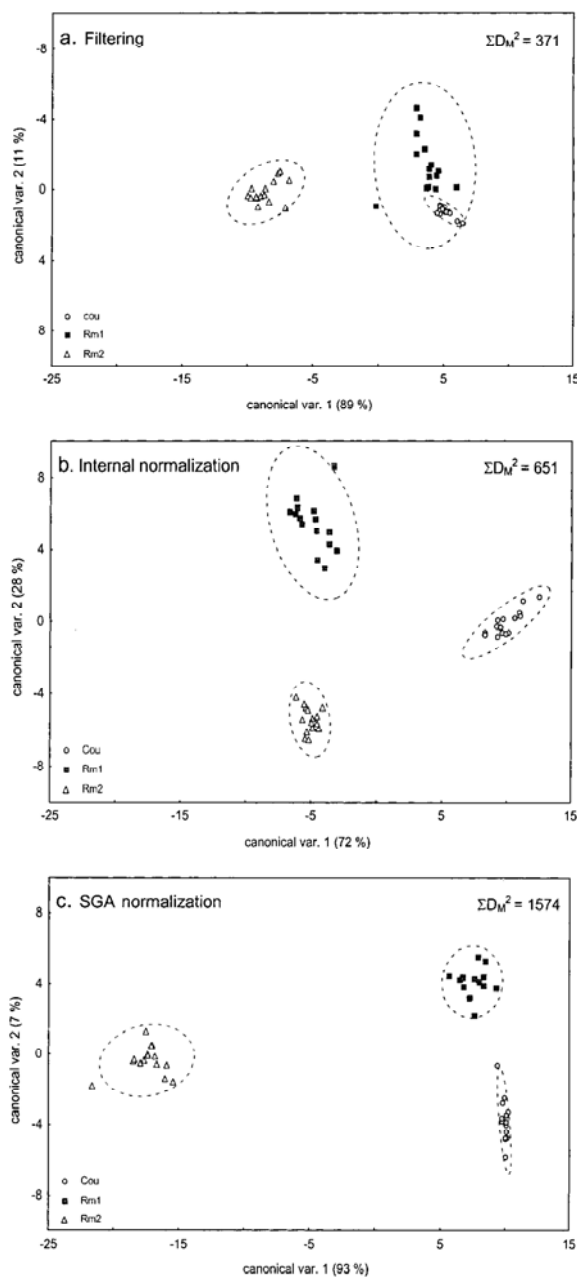
**Figure 3.** (a) Sum total of abundance values calculated for each tuning. (b) Time course of abundance of ion 129 (attributed to  $^{129}\text{Xe}$ ) in the course of the analyses.

**Effect of Different Tuning Settings.** The effect of the different tuning settings on the response of the mass detector was studied from the noise-filtered data. The three series of measurements corresponding to the three tuning settings (Ta, Tb, Tc) are separated in the main plane of the PCA (Figure 2a). The funnel effect observed in plane 1–2 of the PCA reveals the presence of two types of drift. The first drift (D1) is attributable to modifications of the signal caused by the three tuning settings (overall diminution of the abundance of mass fragments Tc to Ta, Figure 3a), while the second drift (D2) is linked to the intratuning analysis order. The time course of the abundance of the reference ion ( $^{129}\text{Xe}$ , injected at constant flow) provides information on the variations in the sensitivity of the apparatus that can be linked to gradual pollution of the source, a variation in the quality of the vacuum caused by a high analysis throughput, or a fall in the performance of the photomultiplier. The fall in the abundance of fragment 129 thus shows that the drift D2 is caused by a fall in the sensitivity of the mass spectrometer (Figure 3b).

The effects of the two drifts observed have repercussions on the discrimination between cheeses. Thus, with data that are only filtered (Figure 2a), Rm2 is distinguished from Rm1 and Cou only. Inspection of the other axes of the PCA does not afford any distinction between Rm1 and Cou. The classification of the cheeses obtained by FDA (Figure 4a) gave 93% well-classified individuals by cross-validation. Groups Rm1 and Cou are very close, with in particular a broad intragroup dispersion for Rm1, causing three Rm1 individuals to be confounded with the Cou group.

**Evaluation and Comparison of Normalization Procedures: SGA versus Internal Normalization.** The normalization

2282 *Analytical Chemistry*, Vol. 74, No. 10, May 15, 2002



**Figure 4.** Classification of the cheeses from fragments selected by stepwise discriminating analysis performed on the following: (a) noise-filtered data ( $m/z = 61, 58, 62, 64, 96$  uma); (b) data corrected by internal normalization ( $m/z = 53, 58, 106, 50, 62$  uma); (c) data corrected by SGA normalization ( $m/z = 63, 58, 72, 94, 60$  uma). The ellipses represent the 95% confidence limit for each group.  $\Sigma D_M^2$ , sum of squares of Mahalanobis distances.

procedure is a simple operation commonly used in data analysis to overcome effects due to variations in the intensity of the recorded signals (sensitivity, injected quantities). Internal normalization for a particular spectrum consists of expressing each mass fragment relative to the sum of all the mass fragments. The PCA carried out from the normalized data (Figure 2b) shows an appreciable improvement in the separation of the three batches

of cheese relative to the results obtained from the noise-filtered data. The distinction between the groups is now clearly seen in the principal plane. This preprocessing overcomes the drift D1, but the correction remains incomplete because the drift D2 associated with the intratuning analysis order can still be observed. The results of the FDA presented in Figure 4b shows that the three groups of products are correctly distinguished (100% of well-classified individuals) despite a still large intragroup variability for batch Rm1.

The PCA carried out from data normalized using SGA (Figure 2c) also shows a considerable improvement relative to the results obtained from the noise-filtered data. The different tuning settings are no longer discernible, irrespective of the combination of axes chosen. In addition, unlike the internal normalization, the SGA corrected drift D2 associated with the intratuning analysis order of the cheeses. The improvement is immediate: the results of the FDA presented in Figure 4c show that the individuals are perfectly distinguished. The intragroup variability is weak and there is a noteworthy increase in the distance between batch Rm2 and the two other batches. The percentage of well-classified cheeses is 100%, and the Mahalanobis distances are more than 4 and 2 times greater than those calculated from the noise-filtered and normalized data, respectively.

The improved results obtained from SGA relative to internal normalization are linked to the principle underlying the correction made. In internal normalization, the  $n$  individual variables have a high covariance due to the mode of expression (relative to the percentage of the sum total), which generates statistical links

among all the fragments, some of which drift strongly (in particular ions with high abundance, e.g.,  $m/z = 46, 47, 58, 62$  amu). Thus, the fall in sensitivity is directly translated on the PCA by the presence of drift D2. Unlike internal normalization, SGA normalization is carried out relative to the  $^{129}\text{Xe}$ , which is independent of the other mass fragments. Hence there are no statistical coelutions between variables, and the FDA selects more relevant variables. Consequently, the discriminating power of the data is thereby improved.

## CONCLUSION

The method of signal correction by SGA normalization shows that the controlled introduction of the standard gas  $^{129}\text{Xe}$  can correct effects arising from modifications made to the instrumental parameters of a mass spectrometer. This new technique will also correct for temporary fluctuations of ionization conditions that can arise during the direct injection of volatile compounds. SGA offers a better solution than internal normalization for the correction of spectral fingerprints obtained by DHS-MS. In addition, the very small quantity of standard gas that needs to be introduced continuously into the source makes SGA a very inexpensive method of calibration. Technically, it can be generalized to all MS-based sensor systems.

Received for review November 6, 2001. Accepted January 29, 2002.

AC0111558

## 4.2 Bilan

La méthode proposée a permis de redresser efficacement les signaux acquis par NSA-MS. Elle s'est aussi avérée plus performante que la normalisation interne des données. Simple à mettre en oeuvre et peu onéreuse, cette technique a de larges possibilités qui n'ont pour l'instant été exploitées que pour des études sur les fromages.

L'emploi de la technique SGA permet d'assurer la pérennité et l'enrichissement des bases de données sur une période équivalente à l'épuisement d'un réservoir contenant le mélange Xénon/Hélium, soit plusieurs années pour une bouteille de 2 m<sup>3</sup> de gaz pressurisé.

# **Discussion**

## Discussion

---

Les NSA-MS ont un large champ d'application. Elles permettent d'estimer des variables qualitatives discrètes (classes d'appartenance pour les vins, soda et fromage, et pour les atmosphères d'élevage) et continues (barèmes de cuisson des farines de viandes et caractéristiques sensorielles des atmosphères de porcheries).

Le principal avantage des NSA-MS réside dans le gain de temps réalisé. La durée de l'analyse et du dépouillement des spectres  $y$  est fortement réduite par rapport aux techniques séparatives conventionnelles de GC-MS. Ainsi, le temps moyen d'analyse était compris entre 2 et 7 minutes, respectivement pour les échantillons de farine de viande et pour ceux des fromages. En contrepartie, la composition moléculaire de l'échantillon est difficilement accessible et l'information pertinente doit être extraite des spectres par des traitements élaborés des données.

La connaissance de l'origine moléculaire des fragments discriminants permet de se montrer critique vis-à-vis de leur sélection statistique, souvent sous-optimale. C'est donc un paramètre utile pour la validation des modèles construits. Cette origine peut parfois être déduite de la connaissance que l'expérimentateur a de la composition de l'espace de tête, ce qui a été le cas dans les études sur les effluents volatils de porcheries. A contrario, cette démarche n'a pu être appliquée aux études sur les barèmes de cuisson des farines de viande.

Pour améliorer la spécificité des fragments obtenus et ainsi faciliter l'estimation de leur origine moléculaire, il a été proposé d'augmenter la proportion de fragments de masse élevée dans les empreintes. L'étude de l'influence de l'énergie d'ionisation sur les empreintes a cependant montré que la limitation de l'énergie d'ionisation ne permettait pas d'aboutir à ce résultat, même à des niveaux énergétiques faibles (35eV). Par conséquent, d'autres techniques doivent être envisagées, et plusieurs pistes s'offrent à l'expérimentateur. Ainsi, l'ionisation chimique positive ou négative permet d'obtenir les ions moléculaires des composés analysés. Utilisée dans le cadre de NSA-MS, une telle technique aboutirait à l'obtention de fragments caractéristiques de familles chimiques (terpènes par exemple), mais sans offrir de possibilité de spéciation. La spectrométrie de masse par réaction de transfert de proton (PTR-MS) est une autre technique qui présente l'avantage de ne pas être influencée par l'eau ou les composés de l'air, tout en fragmentant modérément les molécules (1 à 3 ions spécifiques par molécule

(Lindinger *et al.*, 1998)). Les premiers essais présentés par Biasoli *et al.* (Biasoli *et al.*, 2003) sont encourageants, mais l'appareillage reste actuellement trop coûteux pour être utilisé en routine dans l'industrie (environ 160000€). De plus, la reproductibilité des empreintes acquises et la dérive de l'instrumentation restent à vérifier. Différentes possibilités sont donc envisageables, mais demandent à être testées.

Le choix de la méthode d'échantillonnage est essentiel pour l'obtention de bons résultats. En fonction de la méthode employée, le signal lié aux composés discriminants peut être occulté par un bruit spectral important généré par des molécules présentes en grande quantité. Dans de telles situations, les techniques de traitement de données les plus avancées ne permettent pas toujours d'extraire l'information pertinente. Par exemple, la SHS-MS s'est montrée inefficace pour la discrimination de fromages les fractions volatiles étaient très proches (Péres *et al.*, 2002a). Pour améliorer la pertinence de l'information recueillie, des méthodes d'échantillonnage sélectives doivent être employées. Toutes mettent en œuvre le piégeage des composés volatils. En fonction des coefficients de partage échantillon/piège, les proportions des composés adsorbés ou absorbés pourront être très différentes de celles existant dans l'espace de tête du produit. L'échantillon ne sera pas représentatif de l'espace de tête échantillonné, mais pourra en revanche être hautement caractéristique du produit étudié. Le choix du médium adsorbant ou absorbant se fera alors de façon à favoriser le piégeage des composés pressentis comme discriminants. C'est ainsi que la grande diversité de composés piégés par la fibre SPME Carboxen/PDMS, et notamment des molécules soufrées particulièrement caractéristiques des odeurs de porcheries (O'Neill and Phillips, 1992), a imposé le choix de cette phase pour l'étude des atmosphères de porcheries.

Dans le cas où la nature des composés discriminants est connue, une grande sélectivité du piégeage peut être recherchée. La dérivation par un réactif spécifique directement sur le piège permet d'accroître spécifiquement l'affinité de la phase pour les composés ciblés. C'est une application directe du principe de Le Chatelier : l'équilibre fibre/matrice est déplacé dans le sens du piégeage des composés réagissant sur la fibre. Cette solution est néanmoins plus complexe à mettre en œuvre et augmente la durée globale de l'analyse. L'amélioration de la sélectivité et de la concentration des effluves dans le piège se fait aux dépens de la simplicité et des coûts.

Néanmoins, des techniques simples sans piégeage peuvent être suffisantes pour résoudre certains problèmes. C'était le cas pour l'étude sur les barèmes de cuisson des farines de viande



où la SHS-MS a permis d'obtenir de bons résultats. Finalement, les possibilités sont multiples pour aboutir à un signal pertinent, et le choix de la méthode d'échantillonnage est fonction de la connaissance préalable que l'expérimentateur a de la composition du produit, de la problématique à résoudre et des impératifs économiques sous-jacents.

Quelle que soit la méthode d'échantillonnage employée, la construction des différents modèles discriminants s'appuie sur des techniques de traitement de données variées. Les techniques exploratoires (ACP, classification hiérarchique) conviennent aux cas simples tandis que des techniques inférentielles (MLR, NN) doivent être utilisées pour des problèmes plus complexes. L'estimation des paramètres de cuisson des farines de viande a ainsi nécessité l'emploi de NN.

Les travaux réalisés ont montré que le pré-traitement des signaux spectraux améliore l'exploitation des données. En premier lieu, le filtrage du bruit de fond spectral limite les problèmes de sur-lissage en évitant l'intégration de signaux parasites dans les modèles. De plus, la caractérisation de ce bruit permet d'optimiser la gamme de masse à acquérir et ainsi de mobiliser les capacités du détecteur sur les signaux pertinents. En outre, la recherche de la meilleure combinaison de variables discriminantes se trouve facilitée par le nombre réduit de fragments de masse recueillis. L'utilisation manuelle de la méthode de mesure du bruit de fond spectral développée lors de l'étude sur les farines de viandes est cependant contraignante. L'automatisation de cette mesure permettrait de l'intégrer directement dans le processus de traitement des données, ce qui fournirait un gain de temps appréciable.

Dans un deuxième temps, le calcul de la médiane des empreintes spectrales a été employé pour stabiliser la variance des mesures. Les données introduites dans les modèles étant plus robustes, les performances de ces derniers ont été améliorées.

Pour accroître encore les performances des modèles, de nouvelles stratégies de sélection de variables peuvent être imaginées. Les procédures de sélection de variables écartent des modèles un certain nombre de fragments porteurs d'une partie de l'information recherchée. Il pourrait être intéressant d'employer en amont de cette sélection des techniques de condensation de l'information spectrale. Ainsi, l'introduction dans les modèles de certaines composantes principales issues d'une ACP réalisée sur les fragments de masse peut permettre de prendre en compte une plus grande partie de l'information pertinente contenue dans les fragments. D'autres techniques de condensation de l'information peuvent aussi être

envisagées, tels les réseaux de Kohonen. Des pré-essais ont déjà montré des résultats tout à fait encourageants. D'autre part, l'introduction dans les modèles de paramètres relatifs aux conditions d'échantillonnage peut aussi permettre d'en accroître les performances. Ces variables d'ajustement pourraient faciliter la convergence des modèles. Enfin, dans le cas des prédictions de paramètres sensoriels, la prise en compte d'interactions entre descripteurs peut être essentielle à la convergence d'un modèle. Le problème actuel reste d'évaluer correctement et de formaliser ce type d'interaction.

Les résultats obtenus ont mis en évidence les bonnes performances des NSA-MS pour des campagnes de mesure de courtes durées (de moins de 1 semaine pour l'étude sur l'influence de l'énergie d'ionisation sur la qualité des empreintes spectrales à 3 mois pour l'étude sur les atmosphères de porcheries). Néanmoins, l'exploitation de ces techniques sur de longues périodes n'est pas assurée et les bons résultats obtenus ne doivent pas masquer le problème crucial de la dérive instrumentale qui empêche la création de bases de données spectrales. Ainsi, les résultats obtenus sur les atmosphères de porcheries permettent d'envisager la création d'un outil d'estimation des nuisances générées par les élevages. Cet outil ne sera opérationnel que si une base de données d'empreintes spectrales d'atmosphères de porcherie devient disponible. Ceci implique nécessairement de pouvoir rendre les empreintes indépendantes de leurs conditions d'acquisitions.

Sur de courtes campagnes d'analyse, la normalisation des données est généralement efficace, mais l'expérience a déjà montré que ses performances sont insuffisantes lorsque les campagnes de mesures dépassent une année. Le recours à un standard interne (méthode SGA) est apparu plus efficace. Cependant, la technique SGA exige qu'au moins un des fragments de masse d'un des isotopes du Xénon ne soit pas commun avec ceux de l'échantillon analysé. Cette condition impérative limite son champ d'intervention. Le recours à un étalon externe a déjà été envisagé (Begnaud *et al.*, 2001) et a montré son efficacité. Elle peut être employée si les surcoûts liés aux analyses des références sont acceptables. Enfin, la correction des dérives peut aussi être réalisée par rapport au signal d'un standard interne ajouté dans l'échantillon à analyser. Le champ d'application de cette technique est limité par l'état physique de l'échantillon et les possibles interactions avec la matrice. Il est en effet beaucoup plus délicat d'ajouter un standard de façon reproductible dans un solide, une pâte ou une poudre que dans un liquide. De plus, le taux de recouvrement du standard doit être étudié pour chaque méthode d'échantillonnage envisagée, ce qui accroît la durée globale de la campagne d'analyse.

Il n'y a donc pas à l'heure actuelle de solution unique pour corriger les dérives instrumentales lors des analyses de NSA-MS. De même que pour le choix de l'échantillonnage, la méthode de redressement des dérives devra être adaptée à l'étude.

# **Conclusion et Perspectives**

## **Conclusion et Perspectives**

---

Les techniques d'analyses rapides par spectrométrie de masse offrent des potentialités de caractérisation analytique extrêmement puissantes à condition d'être intégrées dans une stratégie rigoureuse d'acquisition des empreintes et de traitement du signal.

Plusieurs aspects complémentaires ont été abordés et ont fait l'objet de développements techniques et stratégiques: l'instrumentation, l'échantillonnage, l'exploitation des données et la correction des dérives instrumentales.

Les meilleures conditions d'ionisation ont été déterminées. Les travaux ont permis de mettre en évidence les limites de l'ionisation par impact électronique pour obtenir des fragments de masse caractéristiques, et d'autres technologies d'ionisation ont été discutées.

L'effet positif du pré-traitement des données sur le résultat de la caractérisation des échantillons a été mis en évidence. Ainsi, la prise en compte du bruit de fond spectral a été proposée pour réduire le bruit introduit dans les modèles. Une méthode de détermination du bruit a été développée à cet effet.

Il a également été montré que le choix des techniques mathématiques de traitement des signaux restait ouvert, et que des méthodes simples pouvaient être efficaces. Néanmoins, l'offre logicielle d'aujourd'hui permet d'automatiser le traitement des données, facilitant ainsi l'utilisation de stratégies complexes même pour des analyses de routine.

Les possibilités de choix de la méthode d'échantillonnage et de la stratégie de traitement des données sont suffisamment étendues pour que de nombreux problèmes puissent être résolus. La principale limitation au développement de ces techniques reste la dérive de l'instrumentation qui limite l'utilisation des bases de données spectrales. Les solutions existantes ont une portée limitée et doivent être évaluées en fonction de chaque étude.

Néanmoins, les recherches conduites dans le domaine des NSA-MS offrent de nombreuses perspectives d'applications industrielles, par exemple pour la caractérisation des origines des aliments, le contrôle des modes de production/d'élaboration des matières premières et des produits transformés, ou encore l'estimation rapide de paramètres organoleptiques. L'établissement de diagnostics médicaux rapides (Peplow, 2003) ou le contrôle qualité des médicaments peuvent aussi être envisagés. Enfin, les résultats originaux obtenus sur la

caractérisation des odeurs générées par les unités de production animale et l'estimation de caractéristiques sensorielles font apparaître des possibilités d'utilisation de ces techniques pour le contrôle d'atmosphères urbaines et industrielles.

**Valorisation de ces travaux :  
publications,  
communications et rapports**

# **Valorisation de ces travaux : publications, communications et rapports**

---

## **1 - Articles ou communications dans des périodiques à comité de lecture**

- Begnaud, F.; Pérès, C.; Murat, C.; Lebost, J.; Berdagué, J. L. Implementation of new methods to characterise atmospheres in piggeries, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **2004**, 84(9), 647-659.
- Begnaud, F.; Pérès, C.; Berdagué, J. L. Characterisation of volatil effluents of livestock buildings by solid phase microextraction., *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **2003**, 83, 837-849.
- Pérès, C.; Begnaud, F.; Eveleigh, L.; Berdagué, J. L. Fast characterization of foodstuff by headspace - mass spectrometry (HS-MS), *Trends in Analytical Chemistry* **2003**, 22, 858-866
- Pérès, C.; Begnaud, F.; Berdagué, J. L. Fast characterization of Camembert cheeses by static headspace - mass spectrometry., *Sensors and Actuators B* **2002**, 87, 491-497.
- Pérès, C.; Begnaud, F.; Berdagué, J. L. Standard Gas addition : a new calibration method for handling temporal drift of mass spectrometry - sensors, *Anal. Chem.* **2002**, 74, 2279-2283.
- Begnaud, F.; Berdagué, J. L. Influence of ionisation energy on the quality of static headspace - mass spectrometry spectral fingerprints., *Sensors and Actuators B* **2001**, 4125, 1-8.
- Canac-Arteaga, D.; Begnaud, F.; Viallon, C.; Berdagué, J. L. Effect of adding hygroscopic salts on the analysis of the volatile fraction of cheese, *Analisis* **2000**, 28, 973-979.
- Berdagué, J. L.; Viallon, C.; Begnaud, F.; Frencia, J. P. Stérilisation des farines de viandes : prédiction des barèmes de cuisson par la méthode d'espace de tête statique-spectrométrie de masse, *Viandes Prod. Carnés.* **2000**, 21 (1), 3-10.

## **2 - Communications dans des congrès, symposiums**

- Begnaud, F.; Pérès, C.; Murat, C.; Lebost, J.; Berdagué, J. L. Mise en place de nouvelles méthodes de caractérisation des atmosphères de porcherie, In Journée de la Recherche Porcine, 3-5 janvier, Paris, **2004**



- Pérès, C.; Begnaud, F.; Denoyer, C.; Berdagué, J. L. Rapid characterization of cheeses by dynamic headspace - mass spectrometry (DHS-MS), In 10<sup>th</sup> Weurman Flavour Research Symposium, Beaune, France, **2002**.
- Begnaud, F.; Berdagué, J. L. Groupe « Conduite d'Élevage ». Réduire les nuisances olfactives du bâtiment à l'épandage. Réduire les nuisances olfactives – Mises au point méthodologiques (Action AC31-a), In Séminaire Porcherie Verte, La Rochelle, France, **2002**.
- Begnaud, F.; Pérès, C.; Berdagué, J. L. Static Headspace - Mass Spectrometry (SHS-MS): Handling breakdown and temporal drifts, In 6<sup>th</sup> Food Authenticity and Safety International Symposium, Nantes, France, **2001**.
- Pérès, C.; Begnaud, F.; Berdagué, J. L. Dynamic headspace - mass spectrometry applied to rapid characterization of cheeses, In 6<sup>th</sup> Food and Safety International Symposium, Nantes, France, **2001**.
- Begnaud, F.; Viallon, C.; Denoyer, C.; Tournayre, P.; Cuinier, C.; Picque, D.; Berdagué, J. L.; Caractérisation de l'origine des vins par deux méthodes d'analyses rapides ; application aux vins du Beaujolais, de Gaillac et de Touraine ; XXVeme congrès mondial de la Vigne et du Vin: Paris, **2000**.
- Begnaud, F.; Viallon, C.; Denoyer, C.; Tournayre, P.; Cuinier, C.; Picque, D.; Berdagué, J. L.; Use of fast analytical methods based on mass spectrometry to characterize wine's origin. Application to Beaujolais, Gaillac and Touraine's wines ; 15th International Mass Spectrometry Conference: Barcelona, Spain, **2000**.

### **3 - Activités de transfert - Rapports écrits de fin de contrat de recherche**

- Begnaud, F.; Berdagué, J. L.; Murat, C.; Guingand, N.; Tournayre, P.; Lebest, L.; Groupe « Conduite d'Élevage ». Réduire les nuisances olfactives du bâtiment à l'épandage. Réduire les nuisances olfactives – Mises au point méthodologiques (Action AC31-a) ; GIS Porcherie Verte, **2002**.
- Begnaud, F.; Cheminade, I.; Berdagué, J. L.; Suivi de l'altération du saumon fumé par étude de la composition de sa fraction volatile. Influence de l'origine géographique de la matière première; CEE, **1999**.
- Begnaud, F.; Kondjoyan, N.; Berdagué, J. L.; Étude de la composition de la fraction volatile du saumon fumé. Incidence de l'origine de la matière première sur la qualité de fumage du saumon; CEE, **1999**.

#### **4 – Cours magistraux**

- École Nationale Supérieure d'Agronomie de Rennes (ENSAR), troisième année du cycle ingénieur : « Caractérisation des produits agroalimentaires par analyse des composés volatils. » (1,5h). **2001** et **2002**

# **Références bibliographiques**

## Références bibliographiques

---

### A

---

- Abalos, M.; Bayona, J. M.; Pawliszyn, J. Development of a headspace solid-phase microextraction procedure for the determination of free volatile fatty acids in waste waters, *J. Chromatogr. A* **2000**, *873*, 107-115.
- Ampuero, S.; Bogdanov, S.; Bosset, J. O. Classification of unifloral honeys with an MS-based electronic nose using different sampling modes: SHS, SPME and INDEX, *Eur Food Res Technol* **2004**, *218*, 198-207.
- Arora, G.; Cormier, F.; Lee, B. Analysis of Odor-Active volatiles in Cheddar cheese headspace by multidimensional GC/MS/Sniffing, *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 748-752.
- Augusto, F.; Valente, A. L. P.; Tada, E. D.; Rivellino, S. R. Screening of Brazilian fruit aromas using solid-phase microextraction - gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* **2000**, *873*, 117-127.

### B

---

- Balaban, M. O.; Korel, F.; Odabasi, A. Z.; Folkes, G. Transportability of data between electronic noses: mathematical methods, *Sensors and Actuators B* **2000**, *71*, 203-211.
- Begnaud, F.; Pérès, C.; Berdagué, J. L. Static Headspace - Mass Spectrometry (SHS-MS): Handling breakdown and temporal drifts, In 6<sup>th</sup> Food Authenticity and Safety International Symposium, Nantes, France, **2001**.
- Berdagué, J. L.; Vernat, G.; Rossi, V. Caractérisation instrumentale de la qualité des matières premières et des aliments par analyse des composés volatils, *Viandes prod. carnés.* **1993**, *14,5*, 135-138.
- Berna, A. Z.; Lammertyn, J.; Saevels, S.; Di Natale, C. Electronic nose systems to study shelf life and cultivar effect on tomato aroma profile, *Sensors and Actuators B* **2004**, *97*, 324-333.

- Biasoli, F.; Gasperi, F.; Aprea, E.; Colato, L.; Boscaini, E.; Märk, T. D. Fingerprinting mass spectrometry by PTR-MS: heat treatment vs. pressure treatment of red orange juice - a case study, *International Journal of Mass Spectrometry* **2003**, 223-224, 343-353.
- Boudaoud, N.; Eveleigh, L. A new approach to the characterization of volatile signatures of cork wine stoppers, *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, 1530-1533.
- Burle Electron multiplier handbook for mass spectrometry applications; Burle ed., **2002**.
- Burns, W. F.; Tingey, D. T.; Evans, R. C. Effect of water on retention time on a fused silica column, *HRC&CC* **1982**, 5, 504-505.

## C

---

- Canac-Arteaga, D. Contribution à l'amélioration de l'analyse de la fraction volatile de produits riches en eau par espace de tête dynamique couplé à la chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse, Thesis, Université Blaise Pascal, Clermont-Fd II, France, **2001**.
- Canac-Arteaga, D.; Begnaud, F.; Viallon, C.; Berdagué, J. L. Effect of adding hygroscopic salts on the analysis of the volatile fraction of cheese, *Analusis* **2000**, 28, 973-979.
- Canac-Arteaga, D.; Viallon, C.; Berdagué, J. L. Effect of a condenser on the analysis by dynamic headspace-GC-MS of the volatile fraction of a cheese, *Analusis* **1999a**, 27, 864-870.
- Canac-Arteaga, D.; Viallon, C.; Berdagué, J. L. Effect of a dry purge step on the analysis by dynamic headspace - GC-MS of the volatile fraction of a cheese, *Analusis* **1999b**, 27, 780-785.
- Cardinal, M.; Viallon, C.; Thonat, C.; Berdagué, J. L. Pyrolysis-mass spectrometry for rapid classification of oysters according to rearing area, *Analusis* **2000**, 28, 825-829.
- Christensen, K. R.; Reineccius, G. A. Gas chromatographic analysis of volatile sulfur compounds from heated milk using static headspace sampling, *Journal of Dairy Science* **1992**, 75, 2098-2104.
- Ciccioli, P.; Cecinato, A.; Brancaleoni, E.; Frattoni, M.; Liberti, A. Use of carbon adsorption traps combined with high resolution gas chromatography - mass spectrometry for the analysis of polar and non-polar C4-C14 hydrocarbons involved in photochemical smog formation, *J. High Resol. Chromatogr.* **1992**, 15, 75-84.

Cochran, J. W.; Henson, J. M. Analysis of volatile organic chemicals in aqueous samples by purge/GC with selective water removal, *J. High Resolution Chromat. & Chromat. Communic.* **1988**, *11* (12), 869-873.

## D

---

Dittmann, B.; Nitz, S. Strategies for the development of reliable QA/QC methods when working with mass spectrometry-based chemosensory systems, *Sensors and Actuators* **2000**, *69*, 253-257.

Dittmann, B.; Nitz, S.; Horner, G. A new chemical sensor on a mass spectrometric basis, *Adv. food. sci.* **1998**, *20*, 115-121.

Dittmann, B.; Zimmermann, B.; Engelen, C.; Jany, G.; Nitz, S. Use of the MS-Sensor to discriminate between different dosages of garlic flavoring in tomato sauce, *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 2887-2892.

## F

---

Feldhoff, R.; Saby, C. A.; Bernadet, P. Detection of perfumes in diesel fuels with semiconductor and mass-spectrometry based electronic noses, *Flavour and Fragrance Journal* **2000**, *15*, 215-222.

Fenaille, F.; Visani, P.; Fumeaux, R.; Milo, C.; Guy, P. A. Comparison of mass spectrometry-based electronic nose and solid phase microextraction gas chromatography-mass spectrometry technique to assess infant formula oxidation, *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 2790-2796.

Fernandez-Garcia, E. Use of headspace sampling in the quantitative analysis of artisanal spanish cheese aroma, *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 1833-1839.

## G

---

Gallois, A.; Langlois, D. New results in the volatile odorous compounds of French cheeses, *Le Lait* **1990**, *70*, 89-106.

Goodacre, R.; Kell, D. B. On correcting mass spectral drift using artificial neural networks., *Anal. Chem.* **1996**, 271-280.

Goodner, K. L.; Rouseff, R. L. Using an Ion-trap MS sensor to differentiate and identify individual components in grapefruit juice headspace volatiles, *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 250-253.

## H

---

Harper, M. Sorbent trapping of volatiles organic compounds from air, *J. Chromatogr. A* **2000**, *885*, 129-151.

Heatherbell, D. A.; Wrolstad, R. E.; Libbey, L. M. Isolation, concentration, and analysis of carrot volatiles using on-column trapping and gas-liquid chromatography-mass spectrometry, *J. Agric. Food Chem.* **1971**, *19* (6), 1069-1073.

Hill, P. G.; Smith, R. M. Determination of sulphur compounds in beer using headspace solid-phase microextraction and gas chromatographic analysis with pulsed flame photometric detection, *J. Chromatogr. A* **2000**, *872*, 203-213.

Hinshaw, J. V. Purge-and-trap sampling system, *LC-GC International* **1990**, *3*, 22,24-26.

## J

---

Johnson, E.; Madden, A. Finnigan corporation: San Jose, California, USA, **1990**.

## K

---

Kolb, B.; Ettre, L. S. Static headspace-gas chromatography. Theory and practice; Wiley - VCH; New York - Chichester - Weinheim - Brisbane - Singapore - Toronto, **1997**.

Kotiaho, T.; Ketola, R. A.; Ojala, M.; Mansikka, T.; Kostianen, R. Membrane inlet mass spectrometry in environmental analysis, *Am. Environ. Lab.* **1997**, *3*, 19-21.

Kubickova, J.; Grosch, W. Evaluation of potent odorants of camembert cheese by dilution and concentration techniques, *Int. Dairy Journal* **1997**, *7*, 65-70.

## L

---

Lauritsen, F. R.; Kotiaho, T. Advances in membrane inlet mass spectrometry (MIMS), *Rev. Anal. Chem* **1996**, *15*, 237-264.

- Laye, I.; Karleskind, D.; Morr, C. V. Dynamic headspace analysis of accelerated storage commercial whey protein concentrate using four different adsorbent traps, *Milchwissenschaft* **1995**, *50* (5), 268-272.
- Lee, X.-P.; Kumazawa, T.; Kondo, K.; Sato, K.; Suzuki, O. Analysis of methanol or formic acid in body fluids by headspace solid-phase microextraction and capillary gas chromatography, *J. Chromatogr. B* **1999**, *734*, 155-162.
- Lindinger, W.; Hansel, A.; Jordan, A. On-line monitoring of volatile organic compounds at pptv levels by means of proton-transfer-reaction mass spectrometry (PTR-MS) medical applications, food control and environmental research., *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **1998**, *173*, 191-241.

## M

---

- Mariaca, R.; Gauch, R.; Berger, T.; Bosset, J. O.; Schär, W. Volatile compounds of swiss processed cheeses, *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.* **1999**, *89*, 625-638.
- Marilley, L.; Ampuero, S.; Zesiger, T.; Casey, M. G. Screening of aroma-producing lactic acid bacteria with an electronic nose, *Int. Dairy Journal* **2004**, *14*, 849-856.
- Marsili, R. T. SPME-MS-MVA as an Electronic Nose for the study of off-flavors in milk, *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 648-654.
- Marsili, R. T. Shelf-Life prediction of processed milk by solid-phase microextraction, mass spectrometry, and multivariate analysis, *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 3470-3475.
- Mendes, M. A.; Sparrapan, R.; Eberlin, M. N. Headspace membrane introduction mass spectrometry for trace level analysis of VOCs in soil and other solid matrixes, *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 2166-2170.

## N

---

- Noij, T.; Van Es, A.; Cramers, C.; Rijks, J. Selective removal of water in purge and cold-trap capillary gas chromatographic analysis of volatile organic traces in aqueous samples, *J. High Resolution Chromat. & Chromat. Communic.* **1987**, *10* (2), 60-66.
- Núñez, A. J.; Gonzalez, L. F.; Janak, J. Pre-concentration of headspace volatiles for trace organic analysis by gas chromatography, *J. Chromatogr.* **1984**, *300*, 127-162.



## O

---

O'Neill, O. H.; Phillips, V. R. A review of the control of odour nuisance from livestock buildings : part 3. Properties of the odorous substances which have been identified in livestock wastes or in the air around them., *J.Agric.Eng. Res.* **1992**, *53*, 23-50.

## P

---

Page, D.; Lacroix, G. Analysis of volatile contaminants in vegetable oils by headspace solid-phase microextraction with Carboxen-based fibres, *J. Chromatogr. A* **2000**, *873*, 79-94.

Pankow, J. F. Technique for removing water from moist headspace and purge gases containing volatile organic compounds. Application in the purge with whole-column cryotrapping (P/WCC) method, *Environ. Sci. Technol.* **1991**, *25 (1)*, 123-126.

Pearce, T. C.; Gardner, J. W. Predicting organoleptic scores of ppm flavour notes. Part II. Computational analysis and results., *Analyst* **1998**, *123*, 2057-2066.

Peplow, M. Secret paths., *NewScientist* **2003**, *2393*, 37-39.

Pérès, C.; Begnaud, F.; Berdagué, J. L. Fast characterization of Camembert cheeses by static headspace - mass spectrometry., *Sensors and Actuators B* **2002a**, *87*, 491-497.

Pérès, C.; Denoyer, C.; Tournayre, P.; Berdagué, J. L. Fast Characterization of Cheeses by Dynamic Headspace - Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* **2002b**, *74*, 1386-1392.

Pérès, C.; Viallon, C.; Berdagué, J. L. Solid phase microextraction - mass spectrometry: A new approach to rapid characterization of cheeses, In 15th International Mass Spectrometry Conference, Barcelona, Spain, **2000**.

Pérès, C.; Viallon, C.; Berdagué, J. L. Solid phase microextraction - mass spectrometry: A new approach to rapid characterization of cheeses, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 1030-1036.

Perez Pavon, J. L.; Del Noyal Sanchez, M.; Pinto, C. G.; Laespada, M. E. F.; Cordero, B. M. Calibration transfer for solving the signal instability in quantitative headspace-mass spectrometry, *Anal. Chem.* **2003a**, *75*, 6361-6367.

Perez Pavon, J. L.; Del Noyal Sanchez, M.; Pinto, C. G.; Laespada, M. E. F.; Cordero, B. M.; Pena, A. G. A method for the detection of hydrocarbon pollution in soils by headspace mass spectrometry and pattern recognition techniques, *Anal. Chem.* **2003b**, *75*, 2034-2041.

- Pillonel, L.; Altieri, D.; Tabacchi, R.; Bosset, J. O. Comparison of efficiency and stability of two preconcentration techniques (SPME and INDEx) coupled to an MS-based "Electronic Nose", *Mitt.Lebensm Hyg.* **2004**, *95*, 85-98.
- Pillonel, L.; Bosset, J. O.; Tabacchi, R. Rapid preconcentration and enrichment techniques for the analysis of food volatile: a review, *Lebensm. - Wiss. +Technol.* **2002**, *35*, 1-14.
- Pugh, J.; Yang, Q. Y.; Zhu, W. H. Confirmation of identities of volatile flavour constituents in 2 samples of edible mushrooms using TOF MS AP+ Nose, *Micromass Application brief* **1999**, *AB213*.

## S

---

- Saevels, S.; Lammertyn, J.; Berna, A. Z.; Veraverbeke, E. A.; Di Natale, C.; Nicolai, B. M. An electronic nose and a mass spectrometry-based electronic nose for assessing apple quality during shelf life, *Postharvest Biology and Technology* **2004**, *31*, 9-19.
- Schaller, E. Applications and limits of "electronic noses" in the evaluation of dairy products, Thesis, Swiss Federal Institute of Technology (ETH), Zürich, **2000**.
- Schaller, E.; Bosset, J. O.; Escher, F. Instability of conducting polymer sensors in an electronic nose system, *Analusis* **2000a**, *28*, 217-227.
- Schaller, E.; Zenhäusern, S.; Zesiger, T.; Bosset, J. O.; Escher, F. Use of preconcentration technique applied to MS-based "Electronic Nose", *Analusis* **2000b**, *28*, 743-749.
- Simmonds, P. G. Analysis of trace halocarbons in natural waters by simplified purge and cryotrap method, *J. Chromatogr.* **1984**, *289*, 117-127.
- Sohn, J. H.; Smith, R.; Yoong, E.; Leis, J.; Galvin, G. Quantification of odours from piggery effluent ponds using an electronic nose and an artificial neural network, *Biosystems Engineering* **2003**, *86*, 399-410.
- Stevenson, R. J.; Chen, X. D.; Mills, O. E. Modern analyses and binding studies of flavour volatiles with particular reference to dairy protein products, *Food Research International* **1996**, *29*, 265-290.
- Sturges, W. T.; Elkins, J. W. Use of adsorbents to collect selected halocarbons and hydrohalocarbons of environmental interest from large air volumes, *J. Chromatogr.* **1993**, *642*, 123-134.
- Supriyadi, S.; Shimizu, K.; Suzuki, M.; Yoshida, K.; Muto, T.; Fujita, A.; Tomita, N.; Watanabe, N. Maturity discrimination of snake fruit (*Salacca edulis* Reinw.) cv. Pondoh based on volatiles analysis using an electronic nose device equipped with a

sensor array and fingerprint mass spectrometry, *Flavour and Fragrance Journal* **2004**, *19*, 44-50.

## T

---

Tienpont, B.; David, F.; Bicchi, C.; Sandra, P. Headspace sorptive extraction (HSSE), In 23<sup>rd</sup> International symposium on capillary chromatography, Riva del Garda, Italy, **2000**; I.O.P.M.S., Kortrijk, Belgium.

## U

---

Ulberth, F. Headspace gas chromatographic estimation of some yogurt volatiles, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1991**, *74* (4), 630-634.

## W

---

Wampler, T. P. Analysis of food volatiles using headspace - gas chromatographic techniques, In *Techniques for analyzing food aroma*; Inc., Marcel Dekker, Ed.; Marsili, R.: New York, **1997**, 27-58.

Westendorf, R. Managing water in purge-and-trap GC/MS, *environmental lab.* **1992**, *24*, 36-39.

## Z

---

Zhang, Z.; Pawliszyn, J. Headspace solid-phase microextraction, *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 1843-1851.

Zhang, Z.; Pawliszyn, J. Sampling volatile organic compounds using a modified solid phase microextraction device, *Journal of High Resolution Chromatography* **1996**, *19*, 155-160.

**Annexe**

### Static Headspace - Mass Spectrometry (SHS-MS): handling breakdown and temporal drifts

6th Food Authenticity and Safety International Symposium – Nantes, France - November 2001

F. Begnaud, C. Pérès and J.L. Berdagué

Static Headspace – Mass Spectrometry is a promising technique for rapid analysis, and could be employed in particular in the agrifood sector. However, the question of signal stability still arises for such system, as signal drift can occur for many different reasons during the life of the mass detector, for example:

- (i) Gradual fouling of the source.
- (ii) Maintenance operations (e.g., opening and cleaning of the source, changing of the electro- or photo-multiplier, replacement of the filament and repeller).
- (iii) Impaired vacuum quality (quality of the carrier gas, introduction of too much material, etc.)

This stability problem influences the quality of the spectral fingerprints acquired (changes in the shape of the fingerprints, and/or in their intensity) and thus reduces the discrimination capability of the analytical technique.

A simple linear interpolation method is proposed to overcome these problems. The introduction of reference samples within the analytical sequence allowed the calculation of correction coefficients specific to each mass fragment of each sample. The correction coefficients applied to mass fragments of the sample S is calculated using its two surrounding references  $R_i$  and  $R_{i+1}$ , using the following formula:

$$k_{Fi(S)} = \left( \frac{n-x}{n} \right) \times \frac{A_{FiR_i}}{A_{FiR_0}} + \left( \frac{x}{n} \right) \times \frac{A_{FiR_{i+1}}}{A_{FiR_0}}$$

where  $k_{Fi(S)}$  is the fragment i correction coefficient for the sample S, n equals 1+ the number of sample analyzed between the two references  $R_i$  and  $R_{i+1}$ ,  $x$  is the position of the sample S relative to the closest previous reference  $R_i$ ,  $A_{FiR_i}$  is the fragment i abundance for the reference  $R_i$ ,  $A_{FiR_{i+1}}$  is the fragment i abundance for the reference  $R_{i+1}$ , and  $A_{FiR_0}$  is the fragment i abundance for the first reference  $R_0$ .

The corrected mass fragment abundance is then calculated using the following the formula :

$$A_{Fi(S)\text{corrected}} = k_{Fi(S)} \times A_{Fi(S)\text{uncorrected}}$$

where  $A_{Fi(S)\text{corrected}}$  is the corrected mass fragment abundance for the sample S and  $A_{Fi(S)\text{uncorrected}}$  is the uncorrected mass fragment abundance for the sample S.

This method has been applied to the data acquired to recognize the geographical origin of red wine coming from the three “Appellation d’Origine Contrôlée” Gaillac, Touraine and Beaujolais. The reference was a red wine from Anjou (1 reference per 5 samples). Two experiments have been done. In the first one (59 wines), the procedure eliminated the temporal drift and finally about 95% of the wines were well placed into their own geographical areas. In the second one (106 wines), the correcting method discarded the effect of the mass spectrometer parameters changes induced by filament replacement. Finally, the percentage of well recognized wine's origin was greater than 85%.

# Static Headspace - Mass Spectrometry (SHS-MS) : handling breakdown and temporal drifts

F. Begnaud, C. Pérès and J.L. Berdagué

Institut National de la Recherche Agronomique, Laboratoire Flavour,  
F-63122 Saint-Genès-Champagnelle, France

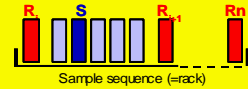
frederic.begnaud@clermont.inra.fr

## Potential troubles occurring during SHS-MS analyses

- Temporal drift
  - Instrument breakdown requiring changes in instrument parameters
- Changes in fingerprints
- Poor Discrimination Power
  - Incompatibility with Database setting up

## A solution

Use of reference samples to correct changes in fingerprints



To correct the fingerprint of a sample  $S$ , a ponderate correction coefficient  $k_{Fi}$  is applied to each fragment  $F_i$ . This coefficient depends on the two references  $R_i$  and  $R_{i+1}$  that surrounded  $S$ .

## Application : Characterization of wine's origin

### Aim of the experiment

To recognize the **geographical origin** of **red wine** coming from the three "Appellation d'Origine Contrôlée" **Beaujolais, Gaillac and Touraine**.

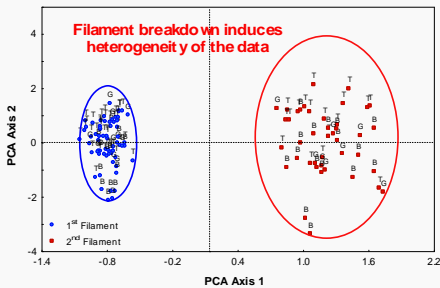


"Chemical Sensor"

Chemical Sensor (Agilent Technologies, Les Ulis, France)

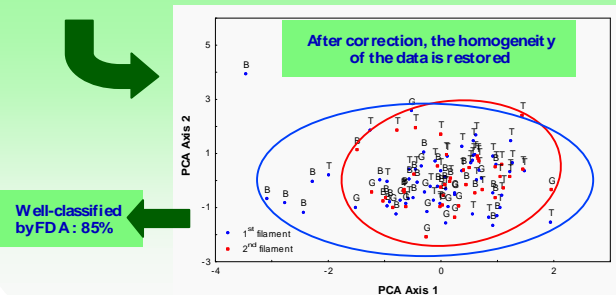
- $V_{\text{sample}} = 5 \text{ ml}$
- 3ml injection loop
- Heating: 45°C - 10 min
- Mass range: 33 - 200 uma
- Analysis length: 3,2 minutes
- 3 repeats per sample
- Automated sequences up to 44 samples

## Effect of filament breakdown correction



**Experimental material**

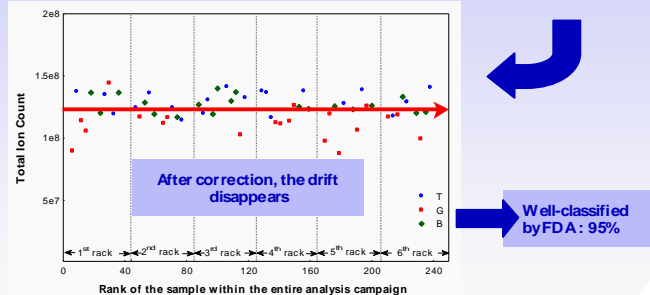
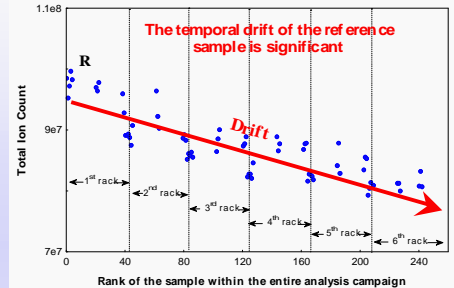
- 34 Beaujolais (B)
- 19 Gaillac (G)
- 53 Touraine (T)
- 1 Reference (R = red wine from Anjou) for 5 samples.



## Drift correction

**Experimental material**

- 19 Beaujolais (B)
- 20 Gaillac (G)
- 20 Touraine (T)
- 1 Reference (R = red wine from Anjou) for 5 samples.



## Conclusion

- This simple method is effective to correct temporal drift and to eliminate the effect of modifications of mass-spectrometer's parameters → the applied corrections are crucial to achieve a good classification of the three red wines according to their geographical origin.
- Such correction is essential to allow long-term analytical campaigns. To be suitable, it needs the use of stable reference samples.