



HAL
open science

Analyse des caramels liquides : développement et validation de nouvelles méthodes basées sur la chromatographie en phase liquide bidimensionnelle (LC-LC)

Cédric Moretton

► **To cite this version:**

Cédric Moretton. Analyse des caramels liquides : développement et validation de nouvelles méthodes basées sur la chromatographie en phase liquide bidimensionnelle (LC-LC). Autre. Université Claude Bernard - Lyon I, 2009. Français. NNT : 2009LYO10279 . tel-00675449

HAL Id: tel-00675449

<https://theses.hal.science/tel-00675449v1>

Submitted on 1 Mar 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD – LYON 1

ECOLE DOCTORALE DE CHIMIE

pour l'obtention

du **DIPLOME DE DOCTORAT**

(arrêté de 7 août 2006)

Spécialité : Chimie

présentée et soutenue publiquement le

11 décembre 2009

par

Cédric MORETTON

**Analyse des caramels liquides :
développement et validation de nouvelles méthodes
basées sur la chromatographie en phase liquide
bidimensionnelle (LC-LC)**

Directeur de thèse : Monsieur Gérard CRETIER

JURY :

Madame C. ELFAKIR, Rapporteur

Monsieur S. RUDAZ, Rapporteur

Monsieur B. HERBRETEAU

Monsieur G. CRETIER

Monsieur H. NIGAY

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Vice-président du Conseil Scientifique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

Secrétaire Général

M. le Professeur L. Collet

M. le Professeur J-F. Mornex

M. le Professeur G. Annat

M. le Professeur D. Simon

M. G. Gay

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine Lyon Sud – Charles Mérieux

UFR d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de Réadaptation

Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur J. Etienne

Directeur : M. le Professeur F-N. Gilly

Directeur : M. le Professeur D. Bourgeois

Directeur : M. le Professeur F. Locher

Directeur : M. le Professeur Y. Matillon

Directeur : M. le Professeur P. Farge

COMPOSANTES SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire de Lyon

Institut des Sciences et des Techniques de l'Ingénieur de Lyon

Institut Universitaire de Technologie A

Institut Universitaire de Technologie B

Institut de Science Financière et d'Assurance

Institut Universitaire de Formation des Maîtres

Directeur : M. Le Professeur F. Gieres

Directeur : M. C. Collignon

Directeur : M. B. Guiderdoni

Directeur : M. le Professeur J. Lieto

Directeur : M. le Professeur C. Coulet

Directeur : M. le Professeur R. Lamartine

Directeur : M. le Professeur J-C. Augros

Directeur : M R. Bernard

Remerciements

Ce travail a été réalisé en partenariat entre le Laboratoire des Sciences Analytiques de l'Université Claude Bernard Lyon 1 et la société Nigay SA, spécialiste de la fabrication de caramels liquides.

Je tiens donc à remercier Monsieur Jean-Louis Rocca, responsable du Laboratoire des Sciences Analytiques, et Messieurs Henri et Yves Nigay, respectivement directeur technique et directeur commercial de la société Nigay SA, de m'avoir permis d'effectuer cette thèse dans leur laboratoire respectif.

J'adresse mes plus sincères remerciements à Monsieur Gérard Crétier, qui a dirigé cette thèse, pour son encadrement, sa présence et ses conseils tout au long de ces trois années.

Je remercie Madame Claire Elfakir et Monsieur Serge Rudaz d'avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteur, ainsi que Monsieur Bernard Herbreteau pour avoir accepté de présider ce jury.

Une pensée particulière est adressée à l'ensemble du personnel du Laboratoire des Sciences Analytiques ainsi qu'à celui de la société Nigay SA pour leur bonne humeur et leur soutien.

Titre en français

Analyse des caramels liquides : développement et validation de nouvelles méthodes basées sur la chromatographie en phase liquide bidimensionnelle (LC-LC)

RESUME en français

Le caramel liquide est couramment utilisé pour modifier le goût ou la couleur des produits agroalimentaires. Il est obtenu par le traitement thermique des sucres, souvent en présence de promoteurs de caramélisation.

Parmi ces promoteurs introduits lors de la cuisson des sucres, l'ammoniaque (pour les caramels colorants de classe III) et les sels d'ammonium (pour ceux de classe IV) sont source de composés néoformés indésirables (CNI) comme le 2-acétyl-4-(1,2,3,4-tétrahydroxybutyl)imidazole (THI) et le 4-méthylimidazole (4MeI). Ces molécules, respectivement immunosuppresseur et agent convulsif, ont des teneurs limitées par la réglementation Européenne à 10 et 250 ppm respectivement.

Pour améliorer, d'une part, la connaissance de la chimie du caramel, d'autre part, la qualité des caramels colorants en contrôlant la formation des CNI (par d'éventuelles modifications des recettes de fabrication), il est nécessaire de développer des méthodes analytiques qui soient à la fois fiables, rapides et faciles à mettre en œuvre. Ce travail de thèse présente le développement et la validation de nouvelles méthodes pour quantifier ces CNI ainsi que les mono- et disaccharides caractéristiques du caramel. Basées sur la chromatographie en phase liquide à deux-dimensions (LC-LC), ces méthodes très sélectives permettent de minimiser le temps d'analyse. En effet, la préparation de l'échantillon se réduit à une simple dilution dans l'eau et les deux séparations chromatographiques en cascade sont réalisées sur un système totalement automatisé. La validation des méthodes par les profils d'exactitude a permis d'assurer que 90 % des résultats sont à moins de 20 % de la valeur vraie dans le domaine de concentration 10 à 50 ppm pour le THI, 20 à 500 ppm pour le 4MeI, 200 à 2500 ppm pour le fructose, saccharose, lactose, maltose et maltotriose et 500 à 2500 ppm pour le glucose.

Ces méthodes validées sont enfin appliquées au suivi de la réaction de caramélisation et au contrôle qualité des produits finis (caramels colorants de classe III et IV).

Mots clés en français

Caramels colorants – Chromatographie en phase liquide à deux-dimensions (LC-LC) – Validation par les profils d'exactitude – Composés néoformés indésirables (CNI)

Intitulé du laboratoire

Université Claude Bernard – Lyon 1

Laboratoire des Sciences Analytiques (UMR CNRS 5180)

Bâtiment Curien (CPE), 43 boulevard du 11 novembre 1918, 69622 Villeurbanne Cedex

Intitulé de l'entreprise

Nigay SA

Z.I. La gare - La féculerie - B.P. 2 - 42110 Feurs

Titre en anglais

Analysis of liquid caramels: development and validation of new methods by two-dimensional liquid chromatography (LC-LC)

RESUME en anglais

Caramel liquid is commonly used to alter the taste or colour of food products. It is obtained by heat treatment of sugars, often in the presence of promoters of caramelization.

Among these promoters introduced during the cooking of sugars, ammonia (for caramel colours of class III) and ammonium salts (for those of class IV) are a source of neoformed contaminants (NFC) such as 2-acetyl-4-(1,2,3,4-tetrahydroxybutyl)imidazole (THI) and 4-methylimidazole (4MeI). These molecules, respectively immunosuppressive agent and convulsive agent, have contents limited by the European regulations to 10 and 250 ppm, respectively.

To improve, on the one hand, knowledge of the chemistry of caramel, on the other hand, the quality of caramel colours by controlling the formation of NFC (by possible changes in manufacturing recipe), it is necessary to develop analytical methods that are both reliable, fast and easy to implement. This thesis presents the development and validation of new methods to quantify these NFC and the mono- and disaccharides characteristics of caramel. Based on two-dimensional liquid chromatography (LC-LC), these very selective methods can minimize analysis time. Indeed, the sample preparation is reduced to a simple dilution with water and the two consecutive chromatographic separations are performed on a fully automated system. The method validation by the accuracy profiles allowed to show that 90 % of obtained results correspond to the agreement value more or less 20 %, in the field of concentration 10 to 50 ppm for THI, 20 to 500 ppm for 4MeI, 200 to 2500 ppm for fructose, sucrose, lactose, maltose and maltotriose and 500 to 2500 ppm for glucose.

These validated methods are finally applied to monitor the reaction of caramelization and to control the quality of finished products (class III and IV caramel colours).

Mots clés en anglais

Caramel colours – Two-dimensional liquid chromatography (LC-LC) – Accuracy profile validation – neoformed contaminants (NFC)

Sommaire

INTRODUCTION GENERALE..... 1

CHAPITRE I : LE CAMEL 7

Introduction 9

I.1 Présentation générale du caramel 10

I.1.1 Classification du caramel 10

I.1.2 Procédés de fabrication 11

I.1.2.1 Les matières premières 11

I.1.2.2 Les procédés de cuisson..... 12

I.1.3 Caractéristiques physiques du caramel..... 13

I.2 La chimie du caramel..... 14

I.2.1 Etudes sur le caramel..... 15

I.2.1.1 Les prémices de l'analyse du caramel 15

I.2.1.2 Travaux de Truhaut..... 16

I.2.2 Processus de caramélisation 17

I.2.2.1 Les réactions de déshydratation..... 17

a) en milieu neutre ou acide..... 19

b) en milieu basique..... 21

I.2.2.2 Les réactions de polymérisation 22

I.2.2.3 Cas particulier des caramels à l'ammoniaque..... 24

I.2.3 Composés néoformés indésirables 28

Conclusion 30

Références bibliographiques 31

CHAPITRE II : OUTILS ET METHODES..... 39

Introduction 41

II.1 Validation des méthodes d'analyse dans l'agroalimentaire..... 42

II.1.1. L'approche classique de la validation 42

II.1.2 Apport de l'approche SFSTP	44
II.1.3 Principe de la validation par les profils d'exactitude.....	45
II.1.4 Etude de la sélectivité	49
II.2 Les techniques de chromatographie liquide à deux-dimensions (LC-2D)...	50
II.2.1 Principes et domaines d'application de la LC-2D	50
II.2.1.1 Séparation de tous les constituants de l'échantillon.....	50
II.2.1.2 Analyse de quelques molécules.....	55
II.2.2. Préconcentration en tête de la deuxième colonne du système LC-2D...	56
II.2.3. Autres contraintes associées aux techniques LC-2D	59
II.3 La colonne Hypercarb PGC	61
II.3.1 Historique des colonnes à base de carbone.....	61
II.3.2 Structure du PGC	62
II.3.3 Propriétés du PGC	63
II.3.4 Les mécanismes de rétention sur PGC	63

CHAPITRE III : ANALYSE DU 2-ACETYL-4-(1,2,3,4-TETRAHYDROXYBUTYL)IMIDAZOLE (THI) DANS LES CARAMELS COLORANTS DE CLASSE III..... 71

Introduction.....	74
III.1 Bibliographie sur l'analyse du THI.....	75
III.2 Développement de la méthode d'analyse en LC-LC.....	76
III.2.1 Utilisation du PGC pour la séparation du THI.....	77
III.2.2 Choix des colonnes de première dimension	78
III.2.2.1 Première solution	78
III.2.2.2 Deuxième solution	81
III.2.3 Volume maximal injectable sur la colonne PGC de seconde dimension	82
III.2.4 Application des méthodes LC-LC aux caramels	84
III.3 Validation des méthodes SCX-PGC et C18-PGC par les profils d'exactitude	86

III.4 Etude de la sélectivité des méthodes	92
Conclusion	94
Références bibliographiques	95

**CHAPITRE IV : ANALYSE DU 4-METHYLIMIDAZOLE (4MEI) DANS LES
CARAMELS COLORANTS DE CLASSE III ET IV 97**

Introduction	99
IV.1 Bibliographie sur l'analyse du 4MeI.....	100
IV.1.1 Dosage par chromatographie en phase gazeuse	100
IV.1.2 Dosage par chromatographie en phase liquide.....	101
IV.1.3 Conclusion.....	101
IV.2 Validation de la méthode de dosage par chromatographie en phase gazeuse	102
IV.2.1 Présentation du protocole d'analyse.....	102
IV.2.2 Résultats de la validation par les profils d'exactitude.....	104
IV.2.3 Conclusion.....	107
IV.3 Développement et validation d'une méthode LC-LC pour le dosage du 4MeI.....	108
IV.3.1 Choix des colonnes.....	108
IV.3.2 Validation de la méthode XBridge-PGC par les profils d'exactitude .	115
IV.3.3 Conclusion.....	119
IV.4 Etude de la sélectivité de la méthode XBridge-PGC	120
IV.5 Essai de développement d'une méthode unique pour le dosage simultané des deux imidazoles (THI et 4MeI).....	121
Conclusion	125
Références bibliographiques	126

CHAPITRE V : ANALYSE DES SUCRES DANS LE CAMEL 129

Introduction.....	131
V.1 Bibliographie sur l'analyse des sucres dans les matrices agroalimentaires	132
V.1.1 Dosage par chromatographie en phase liquide.....	132
V.1.1.1 Préparation d'échantillon	132
V.1.1.2 Séparation chromatographique	133
V.1.1.3 Détection des molécules.....	134
V.1.2 Dosage par chromatographie en phase gazeuse	134
V.1.2.1 Préparation d'échantillon	134
V.1.2.2 Séparation chromatographique	135
V.1.2.3 Détection des molécules.....	135
V.1.3 Dosage par électrophorèse capillaire.....	135
V.1.4 Conclusion.....	136
V.2 Mise au point de la méthode d'analyse	136
V.2.1 Recherche d'une colonne pour purifier le caramel.....	136
V.2.2 Séparation sélective des sucres récupérés	139
V.3 Validation de la méthode par les profils d'exactitude	142
V.4 Etude de la sélectivité de la méthode LC-LC	147
Conclusion	148
Références bibliographiques.....	149

CHAPITRE VI : APPLICATION DES METHODES D'ANALYSE AU SUIVI DE PRODUCTION..... 155

Introduction.....	157
VI.1 Evolution de la composition en sucre au cours de la caramélisation.....	158
VI.2 Evolution des teneurs en 4MeI et en THI.....	161
Conclusion	165
Références bibliographiques.....	166

CONCLUSION GENERALE..... 169

ANNEXES 175

LISTE DES ABREVIATIONS..... 183

TABLES DES ILLUSTRATIONS..... 187

Liste des figures 189

Liste des tableaux..... 197

Introduction générale

Pour la plupart d'entre nous, le caramel désigne une confiserie ou un bonbon. Les pâtisseries utilisent largement le caramel sous forme liquide pour napper les desserts et les pâtisseries. Mais, le caramel est également un produit industriel. Il est très abondamment utilisé dans le monde de l'agroalimentaire pour apporter une coloration et/ou une saveur, dans le but d'améliorer la perception visuelle et/ou sensorielle du consommateur. Son utilisation est, par exemple, indispensable pour apporter la couleur à certaines boissons telles que le cola ou la bière.

Le caramel est issu du traitement thermique des sucres dans des conditions définies (absence de composés aminés). La caramélisation appartient au groupe des réactions de brunissement non enzymatique des aliments, au même titre que la réaction de Maillard (traitement thermique d'un composé carbonyle en présence d'une amine) responsable de la saveur caractéristique de la viande grillée.

La caramélisation comprend une multitude de réactions chimiques commençant par la déshydratation des sucres et se poursuivant par la condensation et la polymérisation des molécules formées. Le caramel est donc un mélange très complexe de molécules de faible masse moléculaire, plutôt volatiles, et de polymères. Ce mélange est responsable à la fois des caractères aromatique et colorant du caramel.

Dans certains caramels, des analyses toxicologiques ont démontré la présence de composés néoformés indésirables (CNI). A ce sujet, l'Union Européenne a ouvert, en janvier 2006, un programme de recherche collective, nommé ICARE, sur l'étude des CNI dans les aliments. La fabrication de caramels colorants en présence de composés ammoniacaux nécessaires pour obtenir un produit stable dans les bières ou les boissons acides par exemple, conduit à la formation d'imidazoles appartenant aux CNI. Il est donc important de pouvoir quantifier rapidement et précisément ces molécules lors de la caramélisation et d'essayer d'améliorer le processus de fabrication des caramels pour diminuer leur teneur.

Ce rapport présente tout d'abord le caramel, son utilisation, les réactions chimiques permettant la transformation des sucres en molécules aromatiques et colorantes et enfin les composés néoformés indésirables du caramel (chapitre I).

Le chapitre II expose les méthodes utilisées pour réaliser, rapidement et précisément, le dosage des molécules d'intérêt, ainsi qu'un protocole de validation des méthodes d'analyse répondant à la norme ISO 17025.

Les chapitres III, IV et V montrent le développement et la validation des nouvelles méthodes de quantification du 2-acétyl-4-(1,2,3,4-tétrahydroxybutyl)imidazole (THI), du 4-méthylimidazole (4MeI) et des sucres (glucose, fructose, saccharose, maltose, lactose et maltotriose), respectivement.

Le chapitre VI présente les premiers essais de suivi de réaction de la caramélisation pour améliorer la connaissance de la chimie du caramel. Des modifications de recettes de fabrication sont essayées pour diminuer la formation des CNI dans les caramels colorants.

Chapitre I :

Le caramel

Introduction

Le caramel est le produit issu du traitement thermique des sucres, en milieu plus ou moins aqueux, souvent en présence de promoteurs de caramélisation (acides, sels, ions...sauf composés aminés). Il est connu depuis l'antiquité. Lors du développement de l'industrie sucrière, il était initialement considéré comme un défaut ou une perte. Il permettait de définir la qualité d'un sucre : les sucres les plus colorés étaient estimés comme de mauvaise qualité [1]. Son caractère colorant est ensuite venu donner de la valeur ajoutée au caramel qui est fabriqué industriellement aux Etats-Unis à partir de 1863 [2].

Le caramel, en tant que produit alimentaire intermédiaire, est maintenant décliné sous deux formes principales :

- le caramel aromatique qui est un ingrédient alimentaire utilisé pour l'aromatisation des aliments,
- le caramel colorant qui est considéré comme un additif de coloration des produits alimentaires : ce colorant est le plus ancien et le plus utilisé dans l'industrie agroalimentaire.

I.1 Présentation générale du caramel

I.1.1 Classification du caramel

La déshydratation des sucres sous l'effet de la chaleur en absence d'eau ou en solution aqueuse, seuls ou en présence d'additifs, conduit au processus de caramélisation. Cette réaction nécessite soit une forte température ($T > 120\text{ °C}$), soit des conditions de pH extrêmes ($\text{pH} < 3$ ou > 9).

Deux types de caramels sont reconnus par la norme AFNOR NF V00 – 100 (1988) :

- Le caramel aromatique, décrit comme un « *liquide ou solide de couleur brun pâle à brun foncé, soluble dans l'eau, obtenu par l'action contrôlée de la chaleur sur des sucres alimentaires et dont la destination principale est l'aromatisation des denrées alimentaires. De faibles quantités d'acides organiques peuvent être rajoutées au cours de la fabrication pour promouvoir l'hydrolyse des sucres. L'acidité naturelle du caramel peut éventuellement être neutralisée après caramélisation. La présentation et la dénomination du caramel pourront se référer à la matière première d'origine si elle constitue la seule substance glucidique mise en œuvre* ».

La gamme des aromatiques est composée de caramels différents selon leur couleur (blonds, standards, forts ou corsés), selon leur texture (addition d'épaississants alimentaires autorisés), et selon leur acidité (neutralisation de certains caramels afin d'éviter toute coagulation dans les produits laitiers). Ils sont utilisés pour l'aromatisation ou le nappage de flans, crèmes desserts, entremets, glaces, boissons...

- Le caramel colorant, décrit comme un « *liquide ou solide, de couleur brun plus ou moins foncé, soluble dans l'eau, obtenu par action contrôlée de la chaleur sur des sucres alimentaires, en présence ou non de composés chimiques promoteurs de caramélisation, et dont la destination principale est la coloration des denrées alimentaires* ». Ce type de caramel est fabriqué à des températures plus élevées (140 – 180 °C) que le caramel aromatique pour obtenir un caractère colorant plus important.

Quatre classes de caramels colorants sont répertoriées en fonction des promoteurs chimiques utilisés (Tableau I-1). Ces promoteurs de caramélisation déterminent la charge colloïdale du caramel et donc sa stabilité dans les différents milieux à colorer.

Tableau I-1 : Caractéristiques des quatre classes de caramels colorants.

	Classe I E 150a	Classe II E 150b	Classe III E 150c	Classe IV E 150d
Promoteur de caramélisation	Bases ou acides (KOH, NaOH, Na ₂ CO ₃ , H ₃ PO ₄)	Composés sulfités (Na ₂ SO ₃ , SO ₂ , H ₂ SO ₃)	Composés ammoniacaux (NH ₄ OH, (NH ₄) ₂ CO ₃)	Composés sulfités et ammoniacaux ((NH ₄) ₂ SO ₃)
Nuance de teinte	jaune - orange		brun - gris	
Charge colloïdale	peu marquée	négative	positive	négative
Stabilité dans	Alcool Tanin Acide	+ + -	- - +	- + +
Exemples d'utilisation	Alcools forts (Rhum, Whisky)	Vins cuits, apéritifs anisés	Bières, sauces, gâteaux, vinaigre	Boissons acides sans alcool, boissons gazeuses

I.1.2 Procédés de fabrication

Le caramel est fabriqué chez soi en chauffant dans une casserole du sucre, de l'eau et éventuellement du vinaigre (acide acétique) ou du jus de citron (acide citrique) pour promouvoir l'hydrolyse du sucre. La fabrication industrielle nécessite les mêmes ingrédients mais utilise une gamme de sucres plus importante et des promoteurs de caramélisation.

Les procédés de cuisson se sont améliorés au fil du temps pour augmenter la productivité et la maîtrise de la fabrication avec, à l'heure actuelle, des processus totalement automatisés.

I.1.2.1 Les matières premières

Divers glucides sont utilisés pour fabriquer le caramel : saccharose, glucose, fructose, sucre inverti (saccharose hydrolysé en milieu acide pour former le mélange glucose – fructose), sirops de glucose (hydrolysats d'amidon), des oligosaccharides comme le lactose ou des polysaccharides comme l'inuline. Chaque sucre permet d'obtenir des caractéristiques physiques différentes du caramel.

Plusieurs types de promoteurs de caramélisation sont autorisés pour fabriquer les divers caramels colorants :

- des acides : phosphorique, sulfureux, sulfurique ou carbonique.
- des bases : ammoniacale, hydroxydes de sodium, potassium ou calcium.
- des sels : carbonates, hydrogénocarbonates, sulfates, sulfites, phosphates d'ammonium, sodium, potassium ou calcium.

Les diverses combinaisons permettent d'obtenir de nombreux caramels différents pour répondre à l'utilisation souhaitée par les clients.

I.1.2.2 Les procédés de cuisson

La cuisson utilise la plupart du temps des procédés discontinus avec un cuiseur (casserole) et un système de chauffage. Le sucre est versé dans le cuiseur chauffé entre 50 et 70 °C. Les réactifs (promoteurs de caramélisation) sont ajoutés à différentes températures. Le mélange est chauffé à une température définie pendant un temps donné suivant le caramel souhaité et la réaction de caramélisation est stoppée par ajout d'eau froide. Le caramel liquide est refroidi jusqu'à 80 °C et transféré dans une cuve.

Les sources de chaleur utilisées par l'entreprise Nigay SA sont de trois types :

- le four à fuel : le cuiseur est encastré dans un four en brique dans lequel sont fixés deux brûleurs à fuel. Il est utilisé pour la fabrication des caramels aromatiques et des caramels colorants de classe I et II.

- le four autoclave : muni d'une double enveloppe dans laquelle circule de la vapeur, ce cuiseur est utilisé pour une cuisson sous pression. L'action de la température et de la pression permet la fabrication des caramels les plus foncés (caramels colorants de classe III et IV).

- le four électrique : ce système utilise la cuisson par induction. Le cuiseur est chauffé par effet Joule grâce aux trois ou quatre inducteurs (enroulements de fils de cuivre de fortes sections) placés autour du cuiseur. Le rendement énergétique du cuiseur électrique (90 %) est beaucoup plus élevé que celui des autres cuiseurs. Ce procédé garantit une maîtrise parfaite de la montée et du maintien en température avec une précision de $\pm 0,5$ °C. Le refroidissement du cuiseur est également plus rapide. Ce procédé de fabrication du caramel a été mis en place par la société Nigay SA en partenariat avec EDF (1993).

Des brevets [3, 4] revendiquent également des procédés de fabrication continus du caramel, où, dans un tube, le flux de sucre traverse successivement une zone de chauffage, une zone d'extraction de vapeur et une zone de refroidissement du caramel. La cuisson par extrusion [4] est aussi utilisée pour la fabrication en continu de caramel. Le sucre se déplace entre deux vis d'axes parallèles, divisées en différents tronçons comportant chacun un chauffage réglable. L'addition d'eau en aval permet d'obtenir le caramel liquide souhaité.

Le degré de caramélisation dépend de la maîtrise du couple temps / température pendant tout le procédé (phase de chauffe, palier de caramélisation et refroidissement). La variation de ces paramètres permet de produire une large gamme de produits dans chaque classe de caramels : des caramels blonds (peu cuits) très sucrés aux caramels foncés (très cuits) apportant une forte amertume.

Des ajouts après cuisson sont possibles pour apporter un goût complémentaire (arôme vanille, chocolat, rhum...), un caractère sucré (glucose, saccharose) ou pour changer la texture (épaississant) et neutraliser le caramel (soude ou autre base).

I.1.3 Caractéristiques physiques du caramel

Le caramel est caractérisé par plusieurs paramètres physico-chimiques. Ces grandeurs sont déterminées sur chaque caramel fabriqué et doivent entrer dans un domaine défini suivant les exigences du client.

- Degré Brix : cette grandeur correspond au taux de sucre dans un liquide, elle est généralement équivalente à la fraction de matière sèche soluble. Elle est mesurée à l'aide d'un réfractomètre sur le caramel pur et est généralement non représentative pour les caramels très cuits (colorants) et plus importante pour les caramels peu cuits (aromatiques).

- pH : il est mesuré directement sur une solution de caramel dilué à 50 % en masse dans l'eau.

- Couleur : la mesure de l'absorbance est effectuée à 520 nm pour les caramels aromatiques sur une solution à 100 g/L et à 610 nm pour les caramels colorants sur une solution à 1 g/L.

- Densité : la mesure s'effectue sur le caramel pur à 20 °C à l'aide d'un densimètre à tube vibrant en comparaison avec l'air.
- Viscosité : la viscosité de l'échantillon à 20 °C est obtenue à l'aide d'un rhéomètre rotatif cylindrique.

D'autres paramètres sont également régulièrement déterminés comme le taux de cendres sulfatées, le taux d'azote ou de soufre dans le caramel...

Des études microbiologiques sont également effectuées sur les caramels microbiologiquement sensibles, utilisés notamment dans les laitages.

I.2 La chimie du caramel

La cuisson des sucres en présence d'eau et/ou de promoteurs de caramélisation engendre un brunissement du produit. Ce brunissement est également présent et souhaité lors du traitement thermique des aliments tels que le pain, les viennoiseries ou le café. A l'inverse, ce phénomène s'avère indésirable pour des produits tels que les fruits frais découpés, les jus de fruits ou le lait.

Trois sources de brunissement ont été décrites. Tout d'abord, nous pouvons citer le brunissement enzymatique qui est une réaction d'oxydation catalysée par une enzyme. La deuxième est la caramélisation qui a lieu lorsque l'on chauffe à haute température des sucres réducteurs en absence de composés aminés. Il nécessite soit une température élevée (> 120°C), soit des conditions de pH extrêmes (pH < 3 ou > 9) [5]. Enfin, la plus répandue est issue d'une réaction entre une amine et un composé carbonyle, autrement dit la réaction de Maillard. Cette réaction est présente à des températures supérieures à 50 °C et dans des conditions de pH classiques pour les aliments (pH compris entre 4 et 7) [5]. Chaque type de brunissement forme des composés caractéristiques. Mais un grand nombre de molécules obtenues sont communes à tous les types de brunissement : seul le chemin réactionnel est différent d'un brunissement à l'autre.

I.2.1 Etudes sur le caramel

I.2.1.1 Les prémices de l'analyse du caramel

C'est au début des années 1800 que les premières études du caramel de saccharose sont rapportées par Péligré [6]. En 1838, il montre le caractère acide du caramel, par la présence d'acide acétique dans l'eau de condensation émise lors de la préparation du produit. En 1858, Gélis [7] fractionne le caramel en trois composants de masse molaire élevée qui diffèrent par leur différence de solubilité dans un mélange alcool-eau :

- le caramélane : premier produit formé lors de la combustion du sucre, il correspond à une perte d'eau d'environ 10 % de la masse des sucres. Peu coloré, il est soluble dans l'éthanol. Sa formule brute est $C_{12}H_{18}O_9$.
- le caramélène : formé après le caramélane, il correspond à une perte d'eau de 14 à 15 %. Il est insoluble dans l'éthanol, soluble dans l'eau froide et est environ six fois plus coloré que le premier produit. Sa formule brute est $C_{36}H_{50}O_{25}$.
- le caraméline : dernier produit formé dans le caramel, il correspond à une perte d'eau de 25 %. Il est soluble uniquement dans l'eau chaude et est dix fois plus coloré que le caramélane. Sa formule brute est $C_{96}H_{102}O_{51}$.

L'étude du caramel obtenu par chauffage du sucre de canne à 210-220 °C réalisée par Graham [8] en 1862 montre que le caramélane et le caramélène de Gélis diffusent à travers une membrane de dialyse. Le produit restant sur la membrane, de formule $C_{24}H_{26}O_{13}$, présente un pouvoir colorant cinq fois plus élevé que le caramel brut. Graham a donc prouvé que les grosses molécules sont responsables du caractère colorant du caramel.

La détermination de la masse molaire de ces trois composants du caramel fut étudiée jusqu'au début des années 1900, mais leurs structures chimiques restent inconnues. Plus tard, la séparation du caramel en trois composants a été remise en cause et le caractère polymérique du caramel a été mis en évidence.

En 1936, Von Elbe [9] établit une relation plus précise entre le caramel et des composants glucidiques en indiquant que ces constituants ne sont en fait que des mélanges « *de produits incolores étroitement apparentés au saccharose et de substances humiques à caractère colloïdal* ».

I.2.1.2 Travaux de Truhaut

Les premières études de Truhaut *et al.* [10] concernent le dosage chromatographique de quelques sucres (saccharose, glucose, fructose, maltose) contenus dans le caramel. Après dépôt sur une feuille de papier chromatographique d'une solution de chaque sucre et d'un caramel dilué au dixième dans l'eau, un liquide éluant (mélange de butanol, eau, acide acétique et pyridine) permet de séparer correctement les sucres étudiés. La révélation des spots au phtalate d'aniline permet l'identification des sucres contenus dans le caramel mais également de déterminer un ordre de grandeur de leur concentration par mesure opacimétrique de la tâche. Truhaut constate également des différences de composition de sucres suivant la matière première utilisée et l'ajout ou non d'ammoniaque.

Truhaut découvre par la suite l'influence du pH sur la couleur du caramel [11]. L'ajout d'ammoniaque lors de la caramélisation donne un pouvoir colorant plus important au produit fini. L'ajout d'acide chlorhydrique dans les caramels ammoniacaux montre leur remarquable stabilité en milieu acide par rapport aux autres caramels qui flocculent très souvent.

L'étude des caramels par électrophorèse sur papier [12] a permis de montrer une différence entre les caramels ammoniacaux et les caramels classiques : la charge colloïdale des premiers est positive, alors qu'elle est essentiellement négative pour les seconds, avec une faible fraction positive.

La revue bibliographique sur le caramel de Truhaut *et al.* [1] présente les premiers mécanismes de réaction du sucre pour former le caramel. La formation de dérivés furaniques (furfural appelé furfurol dans la publication et hydroxyméthylfurfural appelé oxyméthylfurfurol) lors de la caramélisation est démontrée, de même que la présence d'imidazoles ou de pyrazines lors de la combustion en présence de catalyseurs aminés.

I.2.2 Processus de caramélisation

Greenshields [13] résume le processus de caramélisation en deux étapes :

- dans un premier temps, la déshydratation des glucides entraîne la formation d'aldéhydes et de composés dicarbonylés. Il y a alors apparition de composés non colorés ou jaunes absorbant fortement dans l'ultra-violet,
- dans un deuxième temps, des réactions de condensation et de polymérisation se produisent et aboutissent à la formation de composés fortement colorés et de masse molaire élevée.

Nous présentons ici les réactions qui se produisent lors de la caramélisation du saccharose.

I.2.2.1 Les réactions de déshydratation

Sous l'effet de la chaleur, la molécule de saccharose se scinde en une molécule de glucose et un cation fructosyle (Figure I-1) [14, 15] :

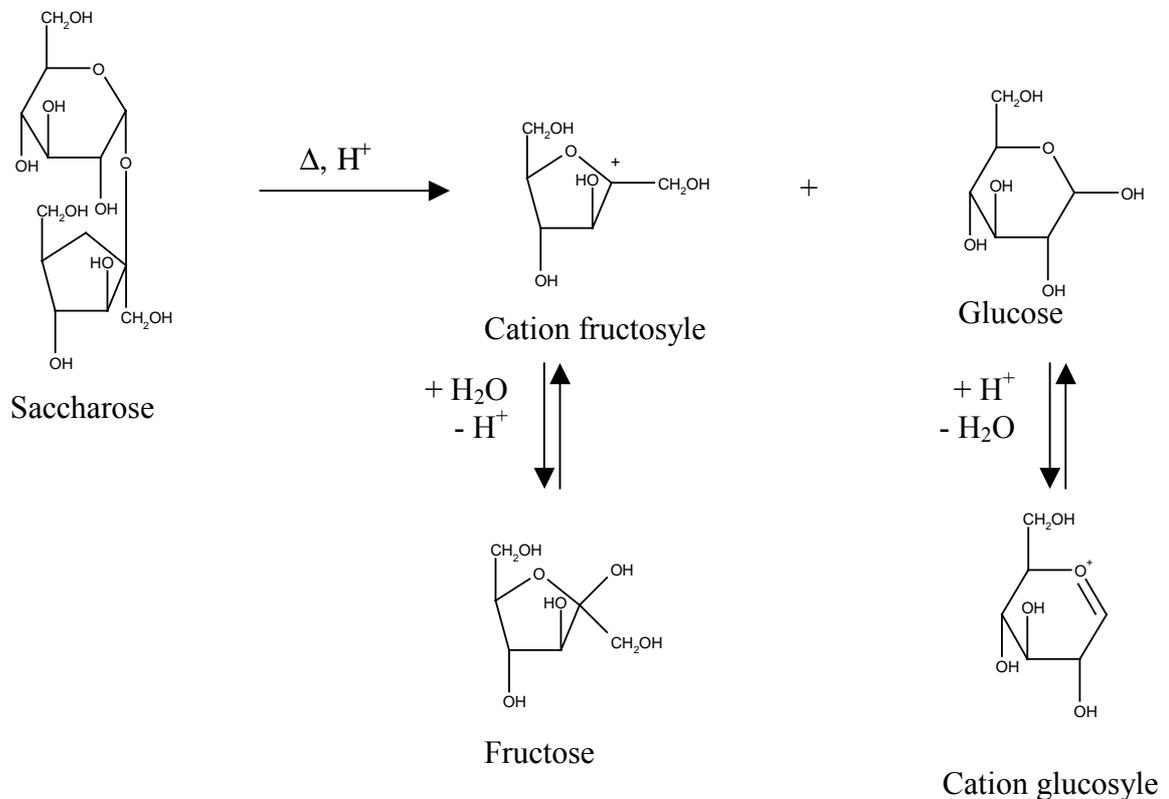


Figure I-1 : Décomposition du saccharose en glucose et fructose [14, 15].

Cette réaction nécessite une température supérieure à 100 °C (l'acidité de l'eau à cette température ($pK_a = 12,2$) permet la décomposition du saccharose), ou la présence d'acide pour catalyser l'hydrolyse. Cette réaction est ensuite autocatalysée par les acides formés lors de la déshydratation des sucres sous l'effet de la chaleur [14]. Un équilibre est observé, d'une part, entre le cation fructosyle et le fructose, d'autre part, entre le cation glucosyle et le glucose.

Le réarrangement de Lobry de Bruyn – Alberda Van Ekenstein permet de former du fructose à partir du glucose (Figure I-2) [15, 16]. Un caramel de pur glucose peut donc contenir, en faible quantité, du fructose et des produits de déshydratation et de polymérisation spécifique du fructose.

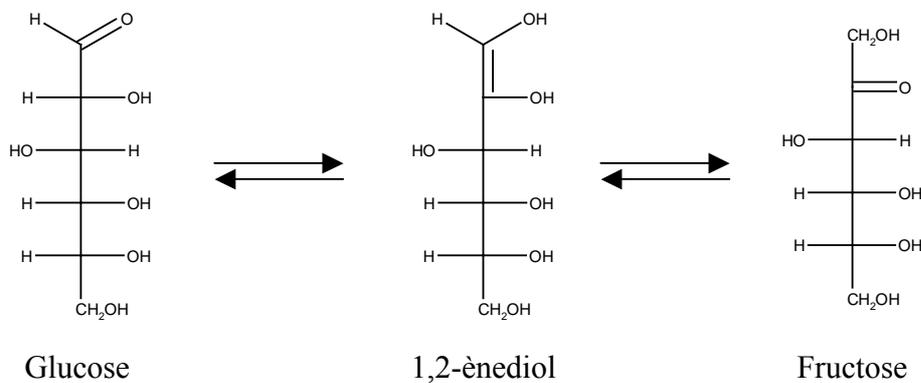


Figure I-2 : Transformation du glucose en fructose avec le réarrangement de Lobry de Bruyn – Alberda Van Ekenstein pour former l'intermédiaire 1,2-enediol [15].

La caramélisation ne se produit donc pas directement sur le saccharose (sucre non réducteur) mais sur ses produits d'hydrolyse, le glucose et le fructose (sucres réducteurs). Les sucres se dégradent sous l'effet de la chaleur à partir de leur forme linéaire. Le fructose, dont la forme linéaire est plus présente en solution aqueuse (0,7 % à 27 °C), caramélise donc plus facilement (température plus faible) et plus rapidement que le glucose (0,002 % de forme linéaire à 31 °C) [17, 18].

Le pH du milieu réactionnel peut différer suivant le promoteur de caramélisation utilisé. Le schéma de dégradation des sucres varie suivant que le milieu est acide, neutre ou basique [19].

a) en milieu neutre ou acide

Les produits de dégradation du glucose et du fructose sont formés par simple énolesation suivie de plusieurs déshydratations avec un intermédiaire dicétonique (réductone) (Figure I-3) [15, 17, 19-21].

L'énolesation du glucose, de part sa configuration, ne peut donner que le 1,2-énolesol alors que le fructose peut former le 1,2-énolesol mais aussi minoritairement le 2,3-énolesol. Ensuite, ces intermédiaires se déshydratent sous l'effet de la chaleur pour former des composés dicétoniques, les osuloses. Ces molécules continuent à se déshydrater, se scindent et se cyclisent pour former des molécules de faible poids moléculaire présentes dans le caramel : le 5-hydroxyméthylfurfural (HMF), le 2-hydroxyacétylfurane (HAF), le 2-furanone, le maltol, le 5-hydroxymaltol ou encore l'isomaltol. Le HMF formé peut se réhydrater pour former l'acide lévulinique et l'acide formique, de même que l'isomaltol peut s'hydrater en formant l'acide acétique et l'acide formique [17].

Tomasik *et al.* [15] montre également que le glucose, par l'intermédiaire d'un anhydroglucose, peut former le furfural.

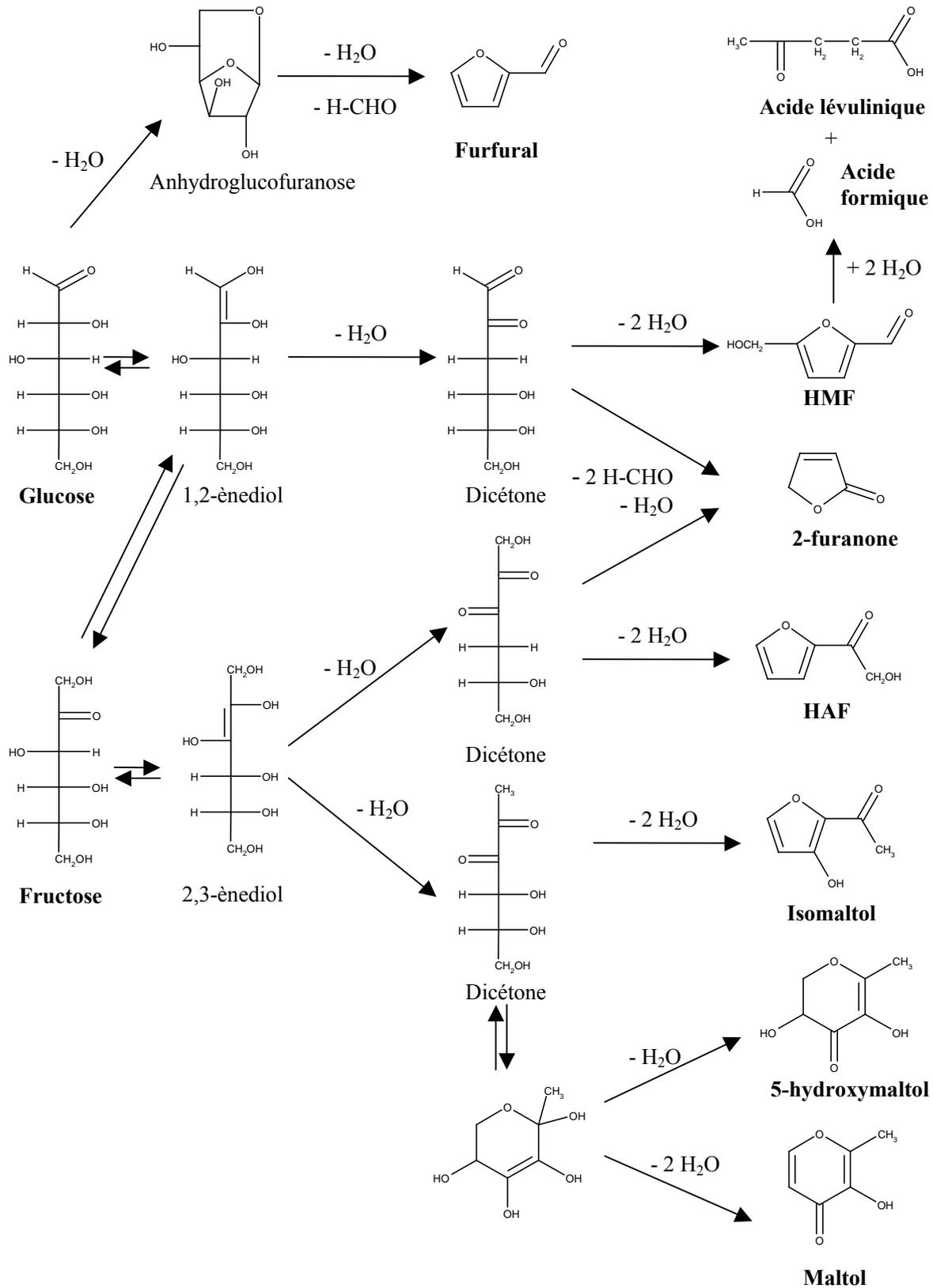


Figure I-3 : Dégradation du glucose et du fructose sous l'effet de la chaleur en milieu neutre ou acide [15, 17, 19-21].

b) en milieu basique

En milieu basique (hors promoteur de caramélisation comme l'ammoniaque ou les sels d'ammonium abordé au paragraphe I.2.2.3), les sucres se dégradent en énediol de la même manière qu'en milieu neutre ou acide. L'énolisation est cependant plus rapide en milieu basique [14]. Le processus de caramélisation est donc identique avec la formation des osuloses [15]. La plupart des molécules de faible poids moléculaire sont donc identiques quelque soit le pH [15].

Par contre, en milieu basique, l'énediol formé peut se décomposer en glycéraldéhyde puis en pyruvaldéhyde et en acide lactique (Figure I-4) [19].

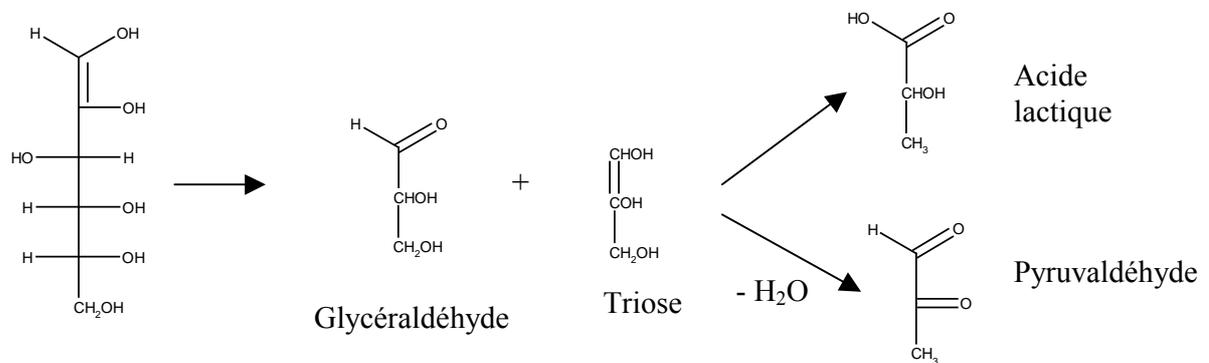


Figure I-4 : Dégradation spécifique du glucose et du fructose en milieu basique [19].

Les produits de dégradation thermique des sucres étant plutôt acides, le mélange a donc tendance à s'acidifier au cours de la caramélisation si aucune base n'est ajoutée pendant la cuisson.

Ces molécules de dégradation des sucres sous l'effet de la chaleur quelque soit le pH correspondent, pour la plupart d'entre elles, à la fraction responsable du caractère aromatique de celui-ci. Cette fraction peut être privilégiée suivant le temps et la température de cuisson choisis. Elle caractérise les caramels aromatiques, caramels peu cuits mais est moins importante dans les caramels colorants, caramels très cuits.

Cette fraction, très étudiée et donc très connue, est composée de plusieurs classes de molécules [19, 21, 22] :

- des acides : acide formique, acide acétique, acide lévulinique...
- des aldéhydes : méthanal, propanal, butanal...
- des cétones : propanone, acétone, butanedione...
- des aromatiques : phénol...
- des furanes : furane, 2-méthylfurane, 3-méthylfurane, 2-éthylfurane, 2-acétylfurane, alcool furfurlique...
- des furanes oxygénés : HMF, furfural, HAF...
- des pyrones : maltol, 5-hydroxymaltol, 5,6-dihydromaltol...

I.2.2.2 Les réactions de polymérisation

Les molécules précédemment formées peuvent se condenser et polymériser pour former des molécules de haut poids moléculaire. Deux types sont présents dans le caramel : des polymères de sucres ou oligosaccharides et des polymères issus des produits de déshydratation des sucres.

Premièrement, les oligosaccharides retrouvés dans le caramel sont listés ci-dessous :

- des dianhydrides de fructose (DAFs) : ces molécules se forment par double déshydratation intermoléculaire de deux molécules de fructose [14, 23-25]. Elles se caractérisent par la présence d'un pont spirodioxanique. Il existe 13 isomères de DAFs [24].
- des dianhydrides de fructose glucosylés (DAFs glucosylés) : des cations glucosyles peuvent réagir sur les groupements hydroxyles libres des DAFs pour former des oligosaccharides avec des degrés de polymérisation supérieurs à 2 [25, 26].
- des glucobioses : ces disaccharides de glucose se forment à partir d'un cation glucosyle et d'un glucose, il en existe plusieurs comme l'isomaltose, le cellobiose, le kojibiose, le nigerose ou le gentobiose [26]. Ces polymérisations continuent pour former le maltotriose (trisaccharide de glucose) et d'autres oligosaccharides.
- des kestoses, trisaccharides avec deux unités de fructose et une de glucose : le cation fructosyle réagit avec les groupes hydroxyles d'une molécule de saccharose (attaque nucléophile prépondérante des atomes d'oxygène des fonctions alcool primaire (au nombre de 3 dans le saccharose) sur le cation fructosyle) [14, 27].

- un fructoglucan : c'est un polymère de monosaccharides contenant une unité de fructose pour deux unités de glucose [28].

Les DAFs et les DAFs glucosylés ont un effet prébiotique [26]. En effet, ils échappent à la digestion dans l'intestin grêle et sont des substrats potentiels pour l'hydrolyse et la fermentation par les bactéries intestinales, assurant ainsi la croissance de ces bactéries bénéfiques de la flore intestinale.

La déshydratation intramoléculaire du cation glucosyle et du cation fructosyle permet également de former respectivement des anhydroglucoses et des anhydrofructoses dans le caramel [23].

Les schémas réactionnels de la production de ces divers oligosaccharides lors de la caramélisation du saccharose sont résumés sur la Figure I-5.

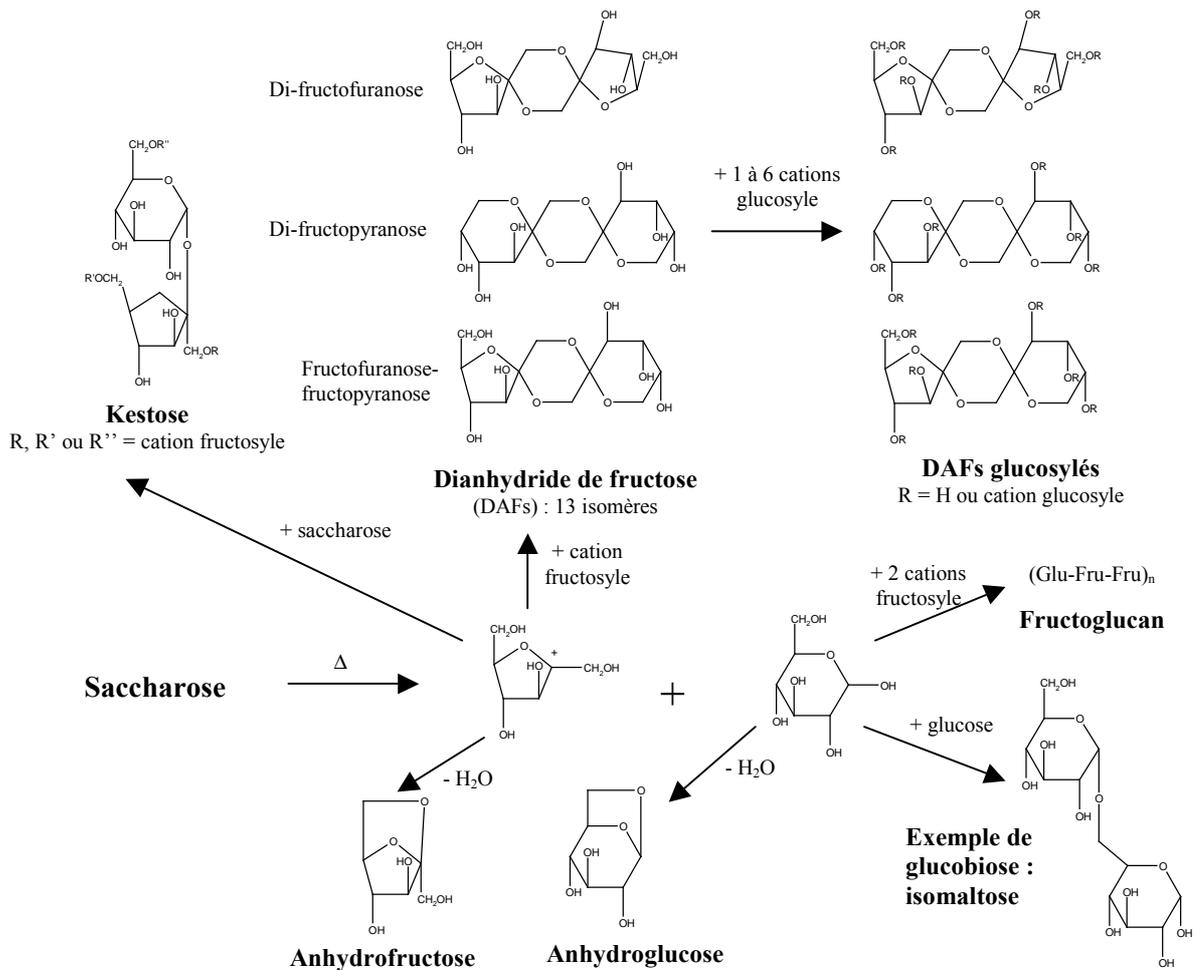


Figure I-5 : Formation des oligosaccharides lors de la caramélisation du saccharose [24-28].

Les molécules de dégradation du glucose et du fructose peuvent également polymériser pour former les produits de haut poids moléculaire responsables du caractère colorant du caramel. Les dérivés du furane (furfural, HMF), les osuloses et le pyruvaldéhyde sont des précurseurs des molécules colorantes du caramel [15, 17, 29] et peuvent polymériser entre elles ou avec des molécules de glucose et fructose. Ces réactions, ainsi que l'hydratation du HMF en acide formique et acide lévulinique (Figure I-3), permettent d'expliquer l'évolution de la concentration en HMF au cours de la caramélisation présentée par Van Dam *et al.* [17], où l'on observe une augmentation de sa teneur en début de caramélisation (correspondant à la déshydratation des sucres) avant une diminution lorsque la quantité de sucres restant à déshydrater est faible et que le HMF polymérise.

De même que pour la réaction de Maillard, la structure des polymères et le chemin réactionnel pour former ces molécules colorantes ne sont pas élucidés à l'heure actuelle [5].

Toutes ces molécules issues de la polymérisation font partie de la fraction non volatile du caramel. Elles représentent environ 90-95 % de la masse du caramel et sont responsables du caractère colorant de celui-ci [25].

1.2.2.3 Cas particulier des caramels à l'ammoniaque

Les caramels colorants de classe III et IV utilisent un promoteur de caramélisation contenant de l'azote (ammoniaque ou sulfite d'ammonium). La réaction de caramélisation se rapproche donc de la réaction de Maillard (chauffage du sucre en présence de composés aminés). Parmi les composés formés dans ces caramels, on retrouve les mêmes que pour les autres caramels mais viennent s'ajouter des molécules spécifiques comme les hétérocycles azotés : imidazole, pyrazine et pyridine [30]. Les intermédiaires de la formation de ces molécules sont la glucosylamine ou la fructosylamine, caractéristiques de la première étape de la réaction de Maillard [30] (Figure I-6).

Les dérivés de l'imidazole et de la pyrazine sont formés par cyclisation et déshydratation des sucres dont une fonction -OH est remplacée par une fonction -NH₂ (aminodeoxyglucose et aminodeoxyfructose (Figure I-6)). Les dérivés de la pyridine proviennent plutôt de la réaction de l'ammoniac sur les dérivés du furfural. La formation des hétérocycles est également possible par le remplacement d'un atome d'oxygène des furanes ou pyranes par un atome d'azote [15].

Le nombre de molécules différentes de faible poids moléculaire est donc beaucoup plus important dans un caramel utilisant l'ammoniaque ou un sel d'ammonium comme précurseur de caramélisation que dans les autres classes de caramel.

Les schémas réactionnels d'obtention de la glucosylamine et de la fructosylamine, des pyrazines, et des imidazoles sont présentés sur les Figures I-6, I-7 et I-8, respectivement.

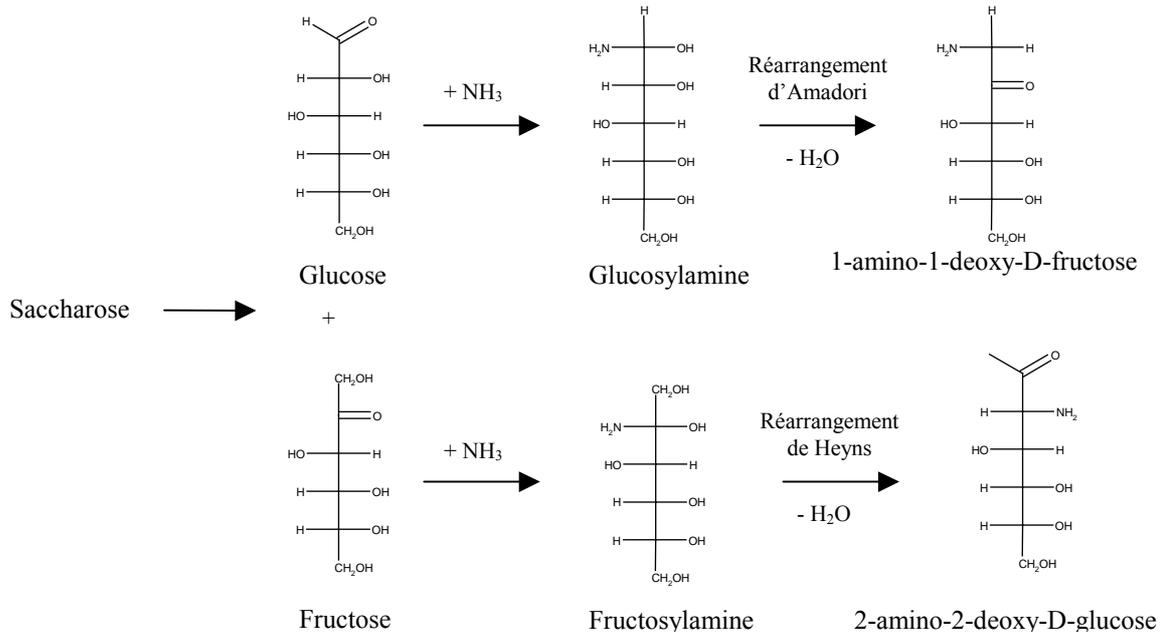


Figure I-6 : Schéma de formation des glucosylamine et fructosylamine et des aminodeoxyfructose et aminodeoxyglucose [30].

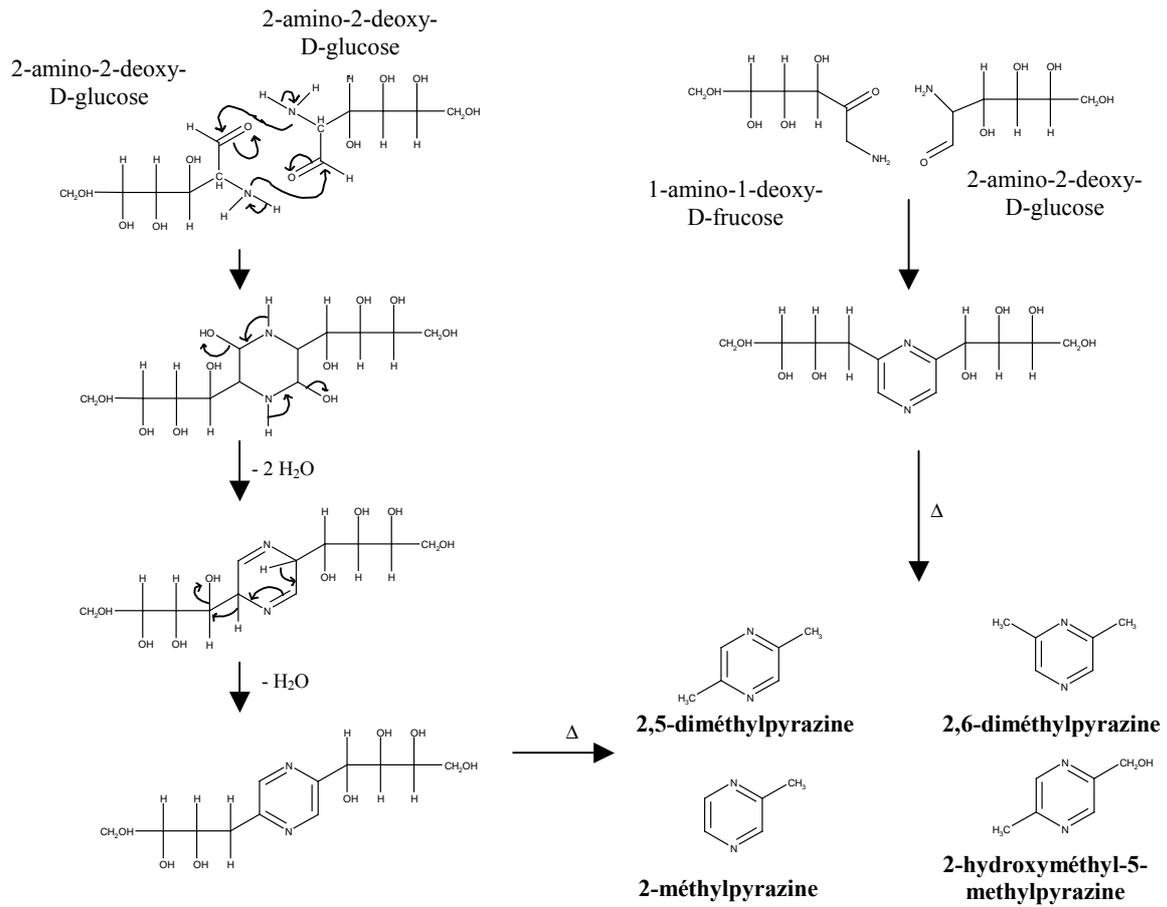


Figure I-7 : Schéma de formation des pyrazines dans le caramel [15].

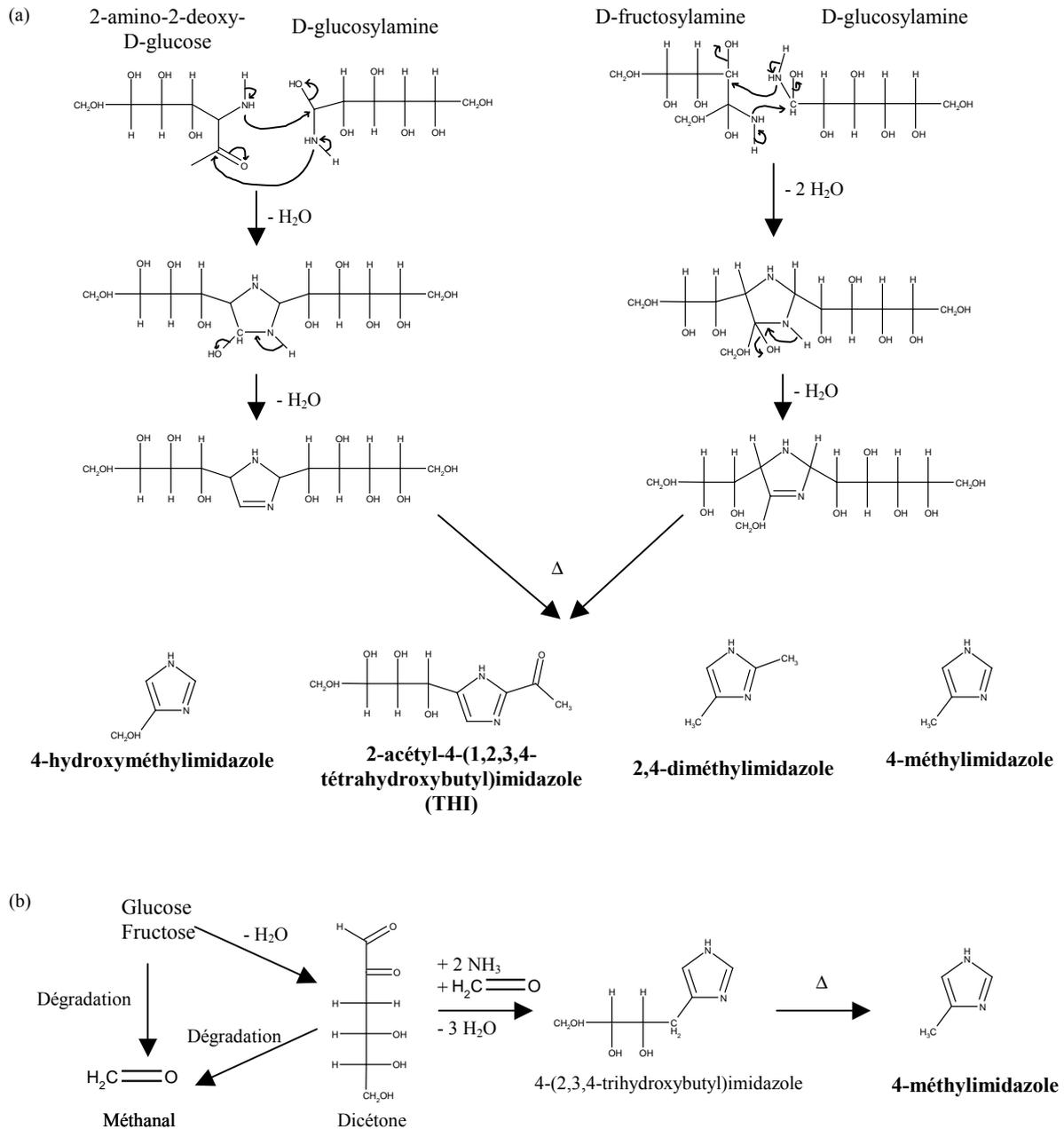


Figure I-8 : Schémas de formation des imidazoles dans le caramel : (a) à partir des sucres aminés ; (b) à partir des produits de dégradation dicétoniques [15].

Les polymères colorants formés sont également plus proches des mélanoïdines retrouvés dans les produits issus de la réaction de Maillard (poids moléculaire plus important que les polymères issus de la caramélisation sans ammoniac [29]). Les analyses des spectres RMN des mélanoïdines montrent la présence de fragments aliphatiques, de groupements alkyles liés à des hétéroatomes, des esters, des amides, des aldéhydes et des cétones, mais pas d'atomes d'azote présents dans des groupements

pyrazines et pyridines [15]. Ces composés ne sont donc présents que dans la fraction des molécules de bas poids moléculaire.

Toutes ces réactions de dégradation et de polymérisation lors du traitement thermique des sucres conduit à un mélange odorant et colorant très complexe, le caramel.

I.2.3 Composés néoformés indésirables

Le traitement thermique des sucres en présence de promoteur de caramélisation conduit à la formation de composés néoformés indésirable (CNI).

Les recherches sur la toxicité des caramels [31-39] ont permis de montrer que les caramels colorants de classe III et IV sont plus dangereux que les autres caramels par la présence d'azote dans leurs promoteurs de caramélisation. Ceux-ci permettent notamment la formation d'imidazoles reconnus toxiques : le 4-méthylimidazole (4MeI) présent dans les caramels colorants de classe III et IV et le 2-acétyl-4-(1,2,3,4-tétrahydroxybutyl)imidazole (THI) présent uniquement dans les caramels colorants de classe III.

Les premières études de toxicité du 4MeI montrent un effet convulsif de la molécule, capable de causer des états d'hyperexcitation chez des animaux comme les souris et les lapins [40] ou les bovins [41]. Cette molécule est également capable d'inhiber une enzyme (cytochrome P450) capable d'oxyder de nombreux cancérigènes connus ou soupçonnés de faible masse moléculaire [42]. Une récente étude confirme les résultats précédents et montre une perte de poids chez les souris et les rats due à l'administration de 4MeI [43].

Le THI est, quant à lui, responsable de l'immunotoxicité des caramels. Il a tendance à diminuer le nombre de lymphocytes, spécialement pour les êtres vivants avec une diète déficiente en vitamine B6 (essais effectués sur des rats) [35, 36, 44-47]. Cette diminution est par contre réversible. Le taux de THI pour lequel aucun effet n'est détecté est de 0,38 mg/kg de poids corporel pour les rats males et de 0,12 mg/kg pour les rats femelles [35]. Des tests sur des hommes volontaires déficients en vitamine B6 ont montré que l'absorption de caramel colorant de classe III (contenant 23 ou 143 ppm en THI) à raison de 200 mg/kg de poids corporel par jour pendant 7 jours n'a aucun effet sur le nombre de lymphocytes dans le sang [36, 39]. Le THI a également d'autres effets sur le système

immunitaire des rongeurs, comme la perturbation des fonctions immunitaires et la modification de la résistance aux infections [48].

En tant qu'additif alimentaire, le caramel colorant doit donc répondre à des critères de pureté définis par la directive européenne 2008/128. Parmi ces critères de pureté figurent des normes sur la teneur en THI et en 4MeI qui sont respectivement de 10 et 250 mg/kg de caramel.

Il existe également quelques études sur la toxicité des dérivés du furane [49] et des pyrazines [50] sans la mise en place d'une norme à respecter dans les caramels.

Les études toxicologiques des différents caramels sont standardisées par l'International Technical Caramel Association (ITCA). Ces recherches ont permis d'établir une dose journalière admissible (DJA) de 200 mg/kg de poids corporel pour les caramels colorants de classe II, III et IV [2] et une DJA non spécifiée pour les caramels colorants de classe I.

Conclusion

Le caramel est un ingrédient ou un additif alimentaire fréquemment utilisé pour aromatiser ou colorer des aliments ou des boissons. La transformation des sucres en caramel s'effectue grâce à la décomposition thermique des molécules, souvent en présence d'un promoteur de caramélisation pour catalyser le processus.

Les caramels colorants sont les caramels les plus cuits. L'utilisation de différents promoteurs lors de leur fabrication permet d'obtenir des pouvoirs colorants variés et des stabilités dans différents milieux suivant l'utilisation souhaitée du caramel.

L'utilisation de l'ammoniaque ou de sels d'ammonium pour favoriser la caramélisation des sucres permet d'obtenir respectivement les caramels colorants de classe III stables dans les milieux acides (vinaigre) et les caramels colorants de classe IV stables dans les milieux à la fois acides et tanniques (boissons gazeuses). Ces promoteurs impliquent la formation de composés néoformés dans le caramel : le 4MeI dans les caramels de classe III et IV et le THI dans les caramels de classe III uniquement.

Le développement de nouvelles méthodes d'analyse des composés spécifiques du caramel est indispensable pour améliorer la connaissance de la chimie de la caramélisation et diminuer la formation des CNI.

Références bibliographiques

1. Truhaut, R.; Vitte, G.; Lassalle-Saint-Jean, V., Etude bibliographique du caramel. *Bulletin de la Société de pharmacie de Bordeaux* **1962**, 101, 97-120.
2. Chappel, C. I.; Howell, J. C., Caramel colours-A historical introduction. *Food and Chemical Toxicology* **1992**, 30, (5), 351-357.
3. Ramaswamy, S. R. Procédé de cuisson continue et rapide pour la fabrication de colorant caramel dit à l'ammoniac. EP0213266, 1987.
4. Bussière, G.; Delaitre, J.-M.; Herail Fousereau, C.; Gervais, P.; Monceaux, P. Procédé de préparation de caramel liquide à l'aide d'un cuiseur-extrudeur. FR2733122, 1996.
5. Kroh, L. W., Caramelisation in food and beverages. *Food Chemistry* **1994**, 51, (4), 373-379.
6. Peligot, E., Recherches sur la nature et les propriétés chimiques des sucres. *Annales de Chimie et de Physique* **1838**, LXXVII, 172.
7. Gélis, M. A., Action de la chaleur sur les substances neutres organiques; étude du caramel et des produits torréfiés. *Annales de Chimie et de Physique* **1858**, 52, 352-404.
8. Graham, T., Liquid diffusion applied to analysis. *Journal of Chemical Society* **1862**, 15, 216-268.
9. Von Elbe, G., The nature of sucrose caramel. *Journal of the American Chemical Society* **1936**, 58, 600-601.
10. Truhaut, R.; Castagnou, R.; Larcebau, S.; Lassalle-Saint-Jean, V., Contribution à l'étude du caramel: Technique de dosage chromatographique de quelques sucres. *Bulletin de la Société de pharmacie de Bordeaux* **1961**, 100, 78-86.
11. Truhaut, R.; Castagnou, R.; Larcebau, S.; Lassalle-Saint-Jean, V., Contribution à l'étude du caramel: Technique de détermination du pouvoir colorant: Application à la détermination de la résistance acide. *Bulletin de la Société de pharmacie de Bordeaux* **1961**, 100, 145-158.

12. Truhaut, R.; Castagnou, R.; Larcebau, S.; Lassalle-Saint-Jean, V., Contribution à l'étude du caramel: Application de l'électrophorèse sur papier à l'étude des caramels. *Bulletin de la Société de pharmacie de Bordeaux* **1961**, 100, 261-268.
13. Greenshields, R. N., Caramel - Part 2. Manufacture, Composition and Properties. *Process Biochemistry* **1973**, 8, 17-20.
14. Edye, L. A.; Clarke, M. A., Sucrose loss and color formation in sugar manufacture. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **1998**, 434, 123-133.
15. Tomasik, P.; Palasinski, M.; Wiejak, S., The thermal decomposition of carbohydrates. Part I. The decomposition of mono-, di-, and oligo-saccharides. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* **1989**, 47, 203-277.
16. Kort, M. J., Colour in the Sugar Industry. In *Sugar science and technology*, Birch, G. G.; Parker, K. J., Eds. London, 1979; pp 97-130.
17. van Dam, H. E.; Kieboom, A. P. G.; van Bekkum, H., The conversion of fructose and glucose in acidic media: Formation of Hydroxymethylfurfural. *Starch* **1986**, 38, (3), 95-101.
18. Hayward, L. D.; Angyal, S. J., A Symmetry rule for the Circular Dichroism of reducing sugars, and the proportion of Carbonyl forms in Aqueous solutions thereof. *Carbohydrate Research* **1977**, 53, (1), 13-20.
19. Adrian, J., Nature et propriétés des produits de grillage. *IAA* **1987**, 449-458.
20. Shaw, P. E.; Tatum, J. H.; Berry, R. E., Acid-catalyzed degradation of -fructose. *Carbohydrate Research* **1967**, 5, (3), 266-273.
21. Fagerson, I. S., Thermal degradation of carbohydrates; a review. *J. Agric. Food Chem.* **1969**, 17, (4), 747-750.
22. Cottier, L.; Descotes, G.; Neyret, C.; Nigay, H., Pyrolyse de sucres, analyse des vapeurs de caramels industriels. *Industrie alimentaire et agricole* **Juillet-Août 1989**, 567-570.

23. Manley-Harris, M.; Richards, G. N., Anhydro sugars and oligosaccharides from the thermolysis of sucrose. *Carbohydrate Research* **1994**, 254, 195-202.
24. Manley-Harris, M.; Richards, G. N., Di--fructose dianhydrides and related oligomers from thermal treatments of inulin and sucrose. *Carbohydrate Research* **1996**, 287, (2), 183-202.
25. Defaye, J.; Garcia Fernandez, J. M.; Ratsimba, V., Les molécules de la caramélisation: structure et méthodologies de détection et d'évaluation. *L'actualité chimique* **Novembre 2000**, 24-27.
26. Defaye, J.; García Fernández, J. M., Protonic and thermal activation of sucrose and the oligosaccharide composition of caramel. *Carbohydrate Research* **1994**, 256, (2), C1-C4.
27. Manley-Harris, M.; Richards, G. N., Formation of trisaccharides (kestoses) by pyrolysis of sucrose. *Carbohydrate Research* **1991**, 219, 101-113.
28. Manley-Harris, M.; Richards, G. N., A novel fructoglucan from the thermal polymerization of sucrose. *Carbohydrate Research* **1993**, 240, 183-196.
29. Coca, M.; Teresa Garcia, M.; Gonzalez, G.; Pena, M.; Garcia, J. A., Study of coloured components formed in sugar beet processing. *Food Chemistry* **2004**, 86, (3), 421-433.
30. Kort, M. J., Reactions of free sugars with aqueous ammonia. *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry* **1970**, 25, 311-349.
31. Allen, J. A.; Brooker, P. C.; Jones, E.; Adams, K.; Richold, M., Absence of mutagenic activity in salmonella and of clastogenic activity in cho cells of caramel colours I, II, III and IV. *Food and Chemical Toxicology* **1992**, 30, (5), 389-395.
32. Adams, K.; Allen, J. A.; Brooker, P. C.; Jones, E.; Proudlock, R. J., Assessment of the genotoxic potential of caramel colour I in four short-term tests. *Food and Chemical Toxicology* **1992**, 30, (5), 397-402.

33. Brusick, D. J.; Jagannath, D. R.; Galloway, S. M.; Nestmann, E. R., Genotoxicity hazard assessment of Caramel Colours III and IV. *Food and Chemical Toxicology* **1992**, 30, (5), 403-410.
34. MacKenzie, K. M.; Carter, J. L.; Petsel, S. R. W.; Chappel, C. I.; Emerson, J. L.; Stanley, J., Subchronic toxicity study of Caramel Colour II in F344 rats. *Food and Chemical Toxicology* **1992**, 30, (5), 411-416.
35. MacKenzie, K. M.; Boysen, B. G.; Field, W. E.; Petsel, S. R. W.; Chappel, C. I.; Emerson, J. L.; Stanley, J., Toxicity studies of Caramel Colour III and 2-acetyl-4(5)-tetrahydroxybutylimidazole in F344 rats. *Food and Chemical Toxicology* **1992**, 30, (5), 417-425.
36. Houben, G. F.; van Dokkum, W.; van Loveren, H.; Penninks, A. H.; Seinen, W.; Spanhaak, S.; Ockhuizen, T., Effects of Caramel Colour III on the number of blood lymphocytes: A human study on Caramel Colour III immunotoxicity and a comparison of the results with data from rat studies. *Food and Chemical Toxicology* **1992**, 30, (5), 427-430.
37. MacKenzie, K. M.; Boysen, B. G.; Field, W. E.; Petsel, S. R. W.; Chappel, C. I.; Emerson, J. L.; Stanley, J., Toxicity and carcinogenicity studies of Caramel Colour IV in F344 rats and B6C3F1 mice. *Food and Chemical Toxicology* **1992**, 30, (5), 431-443.
38. Selim, S.; Chappel, C. I.; Schoenig, G. P., Absorption, distribution and excretion of the colour fraction of Caramel Colour IV in the rat. *Food and Chemical Toxicology* **1992**, 30, (5), 445-451.
39. Houben, G. F.; Abma, P. M. H.; van den Berg, H.; van Dokkum, W.; van Loveren, H.; Penninks, A. H.; Seinen, W.; Spanhaak, S.; Vos, J. G.; Ockhuizen, T., Effects of the colour additive Caramel Colour III on the immune system: A study with human volunteers. *Food and Chemical Toxicology* **1992**, 30, (9), 749-757.
40. Nishie, K.; Waiss, A. C.; Keyl, A. C., Toxicity of methylimidazoles. *Toxicology and Applied Pharmacology* **1969**, 14, (2), 301-307.
41. Fairbrother, T. E.; Kerr, L. A.; Essig, H. W., Effects of 4-methylimidazole in young calves. *Veterinary and human toxicology* **1987**, 29, (4), 312-315.

42. Hargreaves, M. B.; Jones, B. C.; Smith, D. A.; Gescher, A., Inhibition of p-nitrophenol hydroxylase in rat liver microsomes by small aromatic and heterocyclic molecules. *Drug Metab Dispos* **1994**, 22, (5), 806-810.
43. Chan, P.; Hills, G.; Kissling, G.; Nyska, A., Toxicity and carcinogenicity studies of 4-methylimidazole in F344/N rats and B6C3F1 mice. *Archives of Toxicology* **2008**, 82, (1), 45-53.
44. Gaunt, I. F.; Lloyd, A. G.; Grasso, P.; Gangolli, S. D.; Butterworth, K. R., Short-term study in the rat on two caramels produced by variations of the 'Ammonia process'. *Food and Cosmetics Toxicology* **1977**, 15, (6), 509-521.
45. Evans, J. G.; Butterworth, K. R.; Gaunt, I. F.; Grasso, P., Long-term toxicity study in the rat on a caramel produced by the 'half open-half closed pan' ammonia process. *Food and Cosmetics Toxicology* **1977**, 15, (6), 523-531.
46. Gobin, S. J. P.; Paine, A. J., Effect of oral and parenteral administration of B6 vitamers on the lymphopenia produced by feeding ammonia caramel or 2-acetyl-4(5)-(1,2,3,4-tetrahydroxy)butylimidazole to rats. *Food and Chemical Toxicology* **1989**, 27, (10), 627-630.
47. Gobin, S. J. P.; Phillips, J. A., Immunosuppressive effects of 2-acetyl-4-tetrahydroxybutyl imidazole (THI) in the rat. *Clinical & Experimental Immunology* **1991**, 85, (2), 335-340.
48. Houben, G. F.; Penninks, A. H., Immunotoxicity of the colour additive Caramel Colour III; A review on complicated issues in the safety evaluation of a food additive. *Toxicology* **1994**, 91, (3), 289-302.
49. Janzowski, C.; Glaab, V.; Samimi, E.; Schlatter, J.; Eisenbrand, G., 5-Hydroxymethylfurfural: assessment of mutagenicity, DNA-damaging potential and reactivity towards cellular glutathione. *Food and Chemical Toxicology* **2000**, 38, (9), 801-809.

50. Adams, T. B.; Doull, J.; Feron, V. J.; Goodman, J. I.; Marnett, L. J.; Munro, I. C.; Newberne, P. M.; Portoghese, P. S.; Smith, R. L.; Waddell, W. J.; Wagner, B. M., The FEMA GRAS assessment of pyrazine derivatives used as flavor ingredients. *Food and Chemical Toxicology* **2002**, 40, (4), 429-451.

Chapitre II :

Outils et méthodes

Introduction

Après avoir présenté, dans le chapitre I, le caramel et sa complexité, nous détaillons ici l'ensemble des outils analytiques que nous utilisons dans cette étude.

Dans le but d'améliorer la connaissance de la réaction de caramélisation, de nouvelles méthodes d'analyse doivent être développées pour quantifier les molécules caractéristiques et les composés néoformés indésirables du caramel. Ces méthodes devront être rapides, précises et leurs limites de quantification devront être suffisamment faibles pour répondre aux différentes normes. L'objectif est aussi de diminuer le temps d'analyse en minimisant la préparation d'échantillon et en augmentant le nombre de molécules dosées par analyse. L'injection directe (après une simple dilution dans l'eau) d'un échantillon complexe comme le caramel impose l'utilisation de méthodes séparatives très résolutive. La chromatographie bidimensionnelle qui permet justement d'augmenter fortement le nombre de composés séparés par analyse (capacité de pics) est un outil possible. Des colonnes chromatographiques très sélectives avec des profils de rétention spécifiques sont aussi indispensables pour réaliser la séparation souhaitée : à ce titre, la colonne Hypercarb PGC (Porous Graphitic Carbon, Carbone graphitique poreux) est réputée pour la séparation des petites molécules polaires par chromatographie à polarités des phases inversées.

D'autre part, afin de s'assurer de la validité des résultats obtenus, un nouveau protocole de validation développé pour l'industrie pharmaceutique sera mis en œuvre pour caractériser et étudier les performances des méthodes d'analyse mises au point pour le caramel.

II.1 Validation des méthodes d'analyse dans l'agroalimentaire

Les constituants des denrées alimentaires sont quantifiés pour améliorer la connaissance des aliments ainsi que la sécurité du consommateur. Pour cela, les méthodes d'analyse doivent être validées pour garantir la fiabilité des résultats fournis.

La norme ISO 17025 définit la validation comme « *la confirmation par examen et l'apport de preuves objectives du fait que les exigences particulières en vue d'une utilisation prévue déterminée sont remplies* ».

II.1.1. L'approche classique de la validation

Les méthodes de validation classiquement utilisées correspondent plutôt à la caractérisation du processus d'analyse. La sélectivité, la linéarité, la fidélité et les limites de quantification et de détection sont les principaux paramètres nécessaires à la connaissance de la performance d'une méthode [1]. Des paramètres additionnels comme la robustesse et l'effet de matrice sont également souvent déterminés ainsi que le rendement d'extraction ou le taux de purification. Le calcul de toutes ces grandeurs spécifiques de la méthode étudiée ne permet en aucun cas de répondre à la question de l'adaptation de la méthode à son objectif analytique.

De plus, ces méthodes de validation reposent sur un raisonnement erroné. Le protocole d'analyse est considéré comme valide quand la valeur vraie est comprise dans la dispersion des résultats obtenus (cette dispersion suit la loi normale, définie par une moyenne m et un écart-type σ). Donc, moins la méthode d'analyse est précise, c'est à dire plus la dispersion des résultats est élevée, plus il y a de chance que la valeur vraie et la valeur moyenne des résultats apparaissent comme non significativement différentes, c'est à dire que les résultats soient considérés comme exacts (Figure II-1).

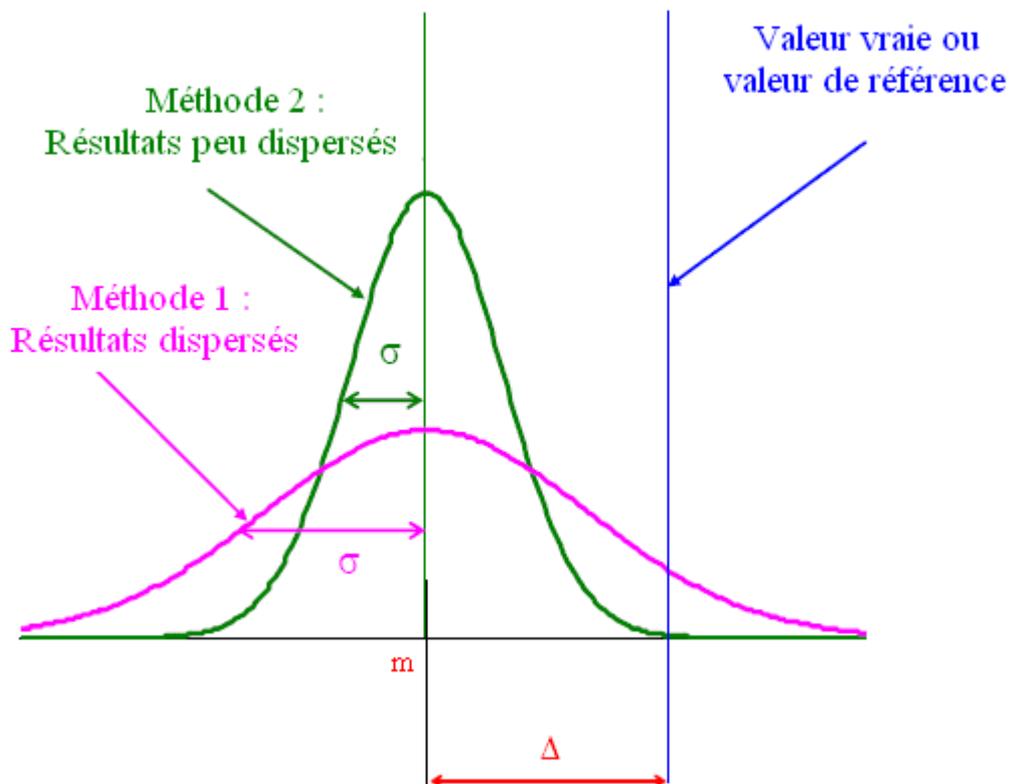


Figure II-1 : Illustration d’une anomalie possible avec les méthodes classiques de validation. La valeur vraie est comprise dans la distribution des résultats de la méthode 1 mais pas dans celle de la méthode 2. Bien que les deux méthodes aboutissent à la même erreur moyenne Δ , la méthode 1 moins précise est considérée comme juste.

Pour éviter de telles anomalies, une réflexion a été portée sur la validation des méthodes dans différents domaines, notamment dans l’industrie pharmaceutique. La Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques (SFSTP) a développé une nouvelle procédure de validation basée sur un outil statistique, les profils d’exactitude [2-5]. En complément d’une étude de sélectivité de la méthode d’analyse, cette procédure permet de minimiser le risque d’accepter une procédure incorrecte, ou de refuser une procédure répondant correctement à son objectif.

II.1.2 Apport de l'approche SFSTP

Par rapport aux méthodes classiques, l'approche de calcul préconisée par la SFSTP répond mieux à la définition de la validation selon la norme ISO. En effet, les critères d'acceptation de la méthode d'analyse sont tout d'abord définis, puis des preuves (analyses d'échantillons dans des conditions fixées) sont récoltées et examinées pour accepter ou refuser la méthode d'analyse suivant les critères préalablement fixés.

Contrairement aux autres méthodes de validation, cette méthode dite des profils d'exactitude tient compte simultanément de la justesse (« *étroitesse de l'accord entre la valeur moyenne obtenue à partir d'une large série de résultats d'essais et une valeur de référence acceptée* ») et de la fidélité (« *étroitesse de l'accord (mesure de la dispersion) entre une série de mesures provenant de multiples prises d'essai d'un même échantillon homogène dans des conditions précises* »), regroupées sous le nom d'erreur totale ou exactitude (« *étroitesse de l'accord entre le résultat d'essai et la valeur de référence acceptée* »).

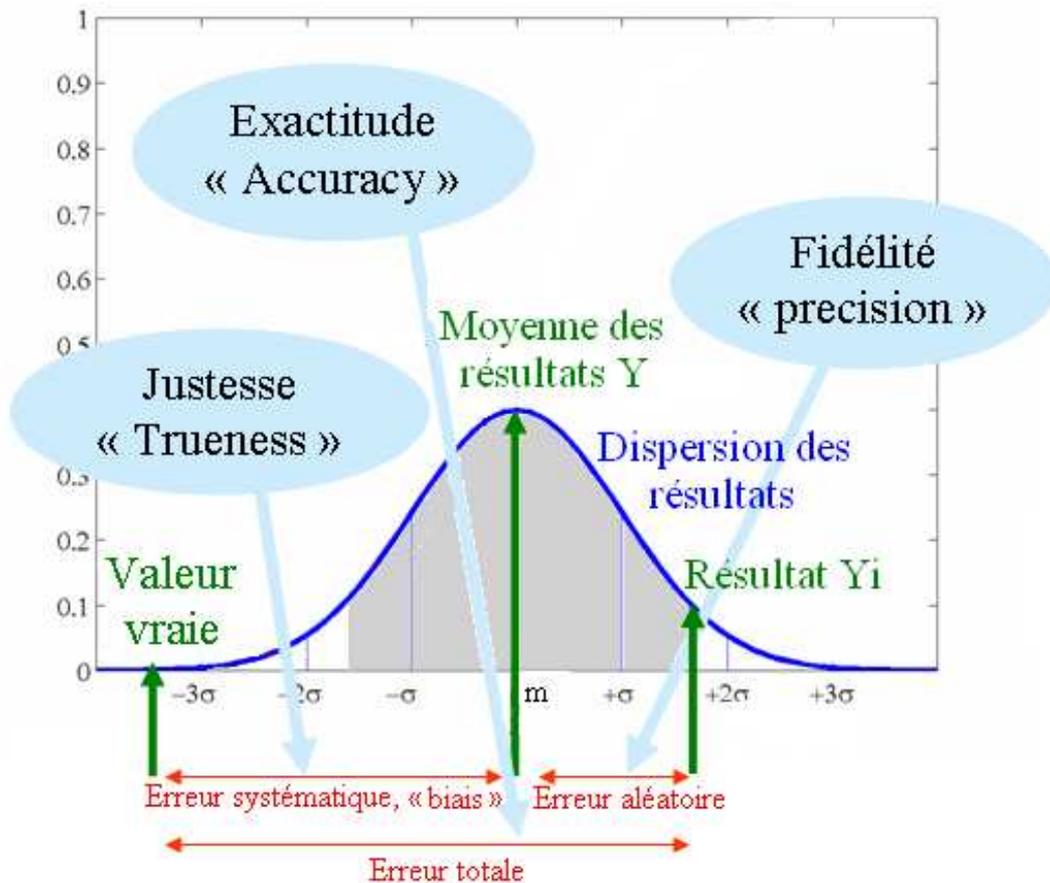


Figure II-2 : Représentation graphique de l'exactitude, de la justesse et de la fidélité des résultats d'une méthode d'analyse. Ces résultats suivent la loi normale, définie par la moyenne m et l'écart-type σ .

D'après la Figure II-2, la différence entre une valeur expérimentale Y_i et la valeur vraie définit l'erreur totale de la méthode d'analyse. Cette erreur est une combinaison de l'erreur systématique (définie par le biais) et de l'erreur aléatoire (définie par la variance des différents résultats obtenus pour un même échantillon).

II.1.3 Principe de la validation par les profils d'exactitude

Une méthode d'analyse doit être capable de quantifier aussi exactement que possible la teneur d'un soluté dans une matrice. La valeur Z déterminée par la méthode diffère plus ou moins de la valeur vraie inconnue μ_T . Cet écart ne doit pas dépasser une limite d'acceptation λ et définit donc un domaine de validité de la méthode [2] :

$$\left| \frac{Z}{\mu_T} - 1 \right| < \lambda \quad (\text{II-1})$$

Le choix de la valeur de λ dépend largement du contexte de l'application et peut être la valeur d'un critère de performance exigée par la réglementation. Pour l'analyse de constituants dans les denrées alimentaires, un écart maximum de 20 % entre la valeur mesurée et la valeur vraie est demandé ($\lambda = 20\%$).

Pour valider la méthode d'analyse, la probabilité que l'équation II-1 soit juste doit être prise en compte [2] :

$$P \left(\left| \frac{Z}{\mu_T} - 1 \right| < \lambda \right) \geq \beta \quad (\text{II-2})$$

β correspond à la probabilité que l'écart entre la valeur déterminée par la méthode et la valeur vraie tombe à l'intérieur de la limite d'acceptation. Cette grandeur est le deuxième critère à fixer pour valider une méthode par les profils d'exactitude ($\beta = 90\%$ pour les méthodes étudiées).

Si la méthode est validée dans un domaine de concentration donné, il est alors possible d'affirmer que 90 % des résultats obtenus par la méthode sont à plus ou moins 20 % de la valeur vraie. Ces paramètres λ et β correspondent à l'objectif que l'on se fixe pour considérer une méthode de quantification valable ou pas.

En se référant à la Figure II-2, une méthode d'analyse est considérée juste par les profils d'exactitude si 90 % des résultats (partie grisée correspondante au domaine $[- 1,6 \sigma ; + 1,6 \sigma]$ d'après les caractéristiques de la loi normale) sont à moins de 20 % de la valeur vraie. Ce protocole de validation nécessite le calcul de la moyenne et de l'écart-type de la dispersion des résultats pour chaque concentration étudiée puis les limites du domaine représentant 90 % des résultats (intervalle de tolérance).

La méthode des profils d'exactitude consiste à utiliser les critères de validation (justesse et fidélité) mesurés en condition de fidélité intermédiaire (même opérateur, même appareillage mais jours différents) pour obtenir les limites des intervalles de tolérance [3]. Il est indispensable de faire ces calculs à plusieurs niveaux de concentration pour couvrir l'ensemble du domaine de validation de la méthode.

Pour tracer ces intervalles de tolérance en fonction de la concentration en soluté, il est nécessaire de faire plusieurs analyses sur plusieurs jours avec la méthode à valider (comprenant l'étape de préparation d'échantillon, l'extraction ou la purification et l'analyse proprement dite avec l'appareil analytique). D'après le protocole V2 de la stratégie de validation proposée par la SFSTP [3], il faut d'abord préparer une gamme d'étalonnage sans matrice qui sert à calculer la fonction de réponse de la méthode. Cette gamme d'étalonnage porte sur j niveaux de concentration représentant le domaine de concentration à étudier. Pour calculer les caractéristiques de la méthode, on prépare aussi une gamme de validation sur des échantillons de caramels avec les mêmes niveaux de concentration que la gamme d'étalonnage. Comme il est impossible d'obtenir des caramels vierges des composés à analyser ou de reconstituer une matrice à l'identique sans les composés d'intérêt, la gamme de validation est préparée par ajouts dosés dans les caramels.

Pour déterminer la fonction de réponse, l'analyse de la gamme d'étalonnage est répétée deux fois [3] en suivant le protocole complet de la méthode à valider. Trois analyses de la gamme de validation [3] permettent d'étudier la variabilité. Si le rendement d'extraction est de 100 % et si aucun effet de matrice n'est observé, les droites (pour un détecteur avec une fonction de réponse linéaire) obtenues avec, d'une part, la gamme d'étalonnage, et d'autre part, la gamme de validation sont parallèles. Pour connaître la fidélité de la méthode, ces analyses sont répétées sur trois jours différents (i) avec la préparation, chaque jour, d'une nouvelle gamme d'étalonnage et d'une nouvelle gamme de

validation dans un caramel différent [3]. Cette étude permet d'étudier l'influence du jour et du caramel (fidélité intermédiaire).

Dans le détail, la procédure pour tracer les profils d'exactitude est la suivante [4] :

- **Etape 1 : Fonction de réponse** : les résultats de la gamme d'étalonnage de chaque jour permettent de tracer la fonction de réponse :

$$Y = a_i X + b_i \quad (\text{II-3})$$

avec X la concentration en soluté et Y la réponse du détecteur.

- **Etape 2 : Prédiction inverses** : à l'aide de la fonction précédente, les résultats de la gamme de validation journalière sont transformés en concentration

calculée Z :
$$Z = \frac{Y - Y_0 - b_i}{a_i} \quad (\text{II-4})$$

Comme la gamme de validation est préparée par ajouts dosés, il faut tenir compte de l'analyte initialement présent dans le caramel en soustrayant, à chaque réponse Y, la réponse du détecteur Y_0 obtenue pour le caramel non dopé (ajout nul).

- **Etape 3 : Calcul de la répétabilité intra-jour** : la variance sur un jour σ^2_W des concentrations prédites Z est calculée pour chaque niveau de concentration (moyenne de la variance obtenue chaque jour de la validation).

- **Etape 4 : Calcul de la répétabilité inter-jour** : la variance entre les jours et entre les différents caramels σ^2_B des concentrations prédites Z est calculée pour chaque niveau de concentration (variance de la moyenne obtenue chaque jour de la validation).

- **Etape 5 : Calcul du biais** : la concentration moyenne prédite $\overline{Z_{ij}}$ et le biais par rapport à la concentration vraie ajoutée :

$$\delta_M = \frac{\overline{Z_{ij}} - X_i}{X_i} * 100 \quad (\text{II-5})$$

sont calculés pour chaque niveau de concentration.

- **Etape 6 : Calcul de la variance de fidélité** : pour chaque niveau de concentration, la variance de fidélité est calculée à partir des variances de répétabilité intra-jour et inter-jour :

$$\sigma^2_{IP} = \sigma^2_B + \sigma^2_W \quad (\text{II-6})$$

- **Etape 7 : Calcul des limites de l'intervalle de tolérance** : ces différentes grandeurs permettent de calculer pour chaque niveau de concentration :

- le rapport R : $R = \frac{\sigma_B^2}{\sigma_W^2}$ (II-7)

- le paramètre B : $B = \sqrt{\frac{R+1}{nR+1}}$ (II-8)

où n est le nombre de répétition (n = 3)

- le facteur d'expansion k_s : $k_s = \sqrt{1 + \frac{1}{pnB^2}}$ (II-9)

où p est le nombre de séries (p = 3),

- le degré de liberté de la méthode : $\nu = \frac{(R+1)^2}{\frac{(R+\frac{1}{n})^2}{p-1} + \frac{1-\frac{1}{n}}{pn}}$ (II-10)

- et le quantile $Q_t(\nu; \frac{1-\beta}{2})$ de la distribution selon la loi de Student avec ν degrés de liberté et $\frac{1-\beta}{2}$ % comme intervalle de confiance.

Les limites de l'intervalle de confiance sont alors données, pour chaque niveau de concentration, par :

$[\delta_M \pm Q_t(\nu; \frac{1-\beta}{2}) k_s \sigma_{IP}]$ (II-11)

- **Etape 8 : Tracé des profils d'exactitude** : pour chaque niveau de concentration, on place les points correspondant au biais (◆) et aux limites basse (▲) et haute (▲) de l'intervalle de tolérance (Figure II-3).

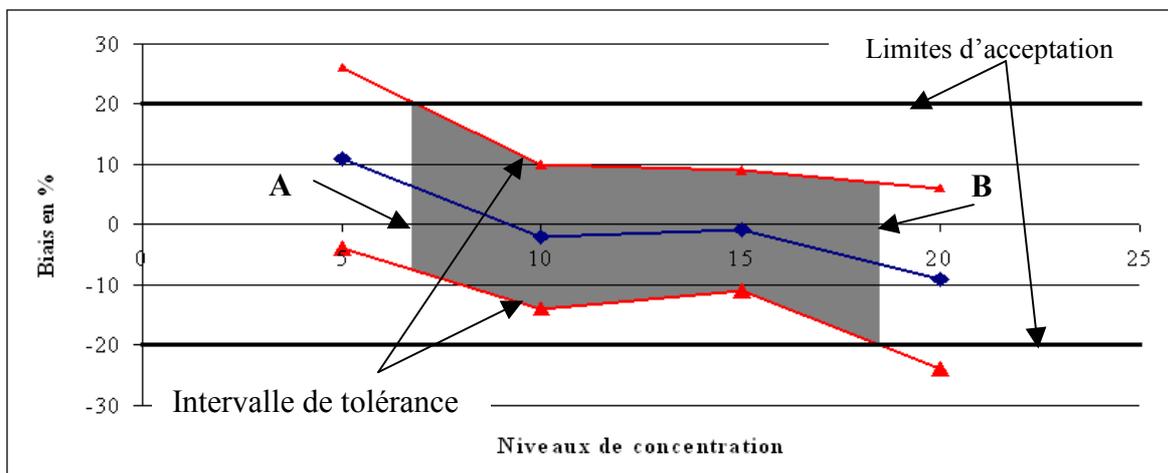


Figure II-3 : Exemple de profils d'exactitude.

Les variations du biais et des limites de l'intervalle de tolérance sont supposées linéaires entre les différents points de concentration étudiés. Dès que l'intervalle de tolérance dépasse les limites d'acceptation, la méthode utilisée ne répond plus aux objectifs fixés initialement : elle n'est plus valide. Dans l'exemple de la Figure II-3, la méthode d'analyse n'est plus applicable à des niveaux de concentration inférieurs à A et supérieurs à B. Elle est donc validée dans le domaine de concentration [A,B].

Une augmentation de la probabilité β que le résultat soit juste implique un élargissement des intervalles de tolérance et par suite une restriction du domaine de concentration où la méthode est considérée comme valide.

II.1.4 Etude de la sélectivité

Pour valider la méthode, il faut s'assurer de la sélectivité de l'analyse. Une méthode chromatographique est dite sélective lorsqu'elle permet de mesurer l'analyte avec la garantie que le résultat ne provient que de l'analyte. Pour contrôler la sélectivité d'une analyse en chromatographie, la solution la plus simple consiste à utiliser un détecteur sélectif. Le détecteur évaporatif à diffusion de lumière est moins sélectif que le détecteur à barrette de diodes, qui l'est moins que le spectromètre de masse simple qui l'est lui-même moins que le spectromètre de masse en tandem. Par suite, l'évolution du spectre de masse tout au long du pic chromatographique est souvent utilisée pour visualiser la pureté du pic avec précision. La détermination de la pureté du pic basée sur l'évolution des spectres UV-Visible à l'aide d'un détecteur à barrette de diodes a été largement étudiée [6-8] mais la matrice ne doit pas être trop complexe pour pouvoir conclure sur la sélectivité de la séparation (analyse pharmaceutique pour la pureté d'un médicament par exemple). Dans le cas de matrices agroalimentaires, le nombre de molécules et la ressemblance des spectres UV-Visible de ces molécules compliquent l'utilisation de ces méthodes.

Dans le cas où la sélectivité du détecteur mis en œuvre est insuffisante, la sélectivité de l'analyse peut alors être vérifiée en comparant les résultats du dosage de la même molécule par deux méthodes d'analyse orthogonales, c'est-à-dire basées sur des technologies différentes (chromatographie en phase liquide et chromatographie en phase gazeuse), ou des principes différents (chromatographie à polarités des phases normales et chromatographie à polarités des phases inversées). Il est alors peu probable de ne pas détecter la coélution de deux molécules présentes dans la matrice avec une des méthodes en comparant simplement les deux résultats obtenus. L'écart entre les résultats des deux analyses devra être inférieur à l'exactitude du résultat de chaque méthode.

II.2 Les techniques de chromatographie liquide à deux-dimensions (LC-2D)

Le chapitre I a montré que le traitement thermique des sucres en présence de promoteurs de caramélisation conduit à la formation de nombreuses molécules appartenant à des familles différentes : des molécules de faible masse moléculaire polaires et volatiles, des polysaccharides et des polymères, des molécules anioniques, cationiques ou neutres... L'analyse de cette matrice nécessite donc l'utilisation de méthodes séparatives très performantes.

II.2.1 Principes et domaines d'application de la LC-2D

Le développement de nouvelles méthodes d'analyse pour les échantillons complexes peut s'orienter de deux manières différentes : séparation du plus grand nombre de constituants pour obtenir une représentation totale de l'échantillon ou séparation de quelques molécules contenues dans le mélange pour les doser individuellement. Dans les deux cas, l'utilisation de protocoles d'analyse très sélectifs est indispensable pour séparer les solutés entre eux.

II.2.1.1 Séparation de tous les constituants de l'échantillon

La séparation complète des constituants d'un mélange complexe, tout en limitant la préparation d'échantillon, nécessite une capacité de pics importante de la méthode chromatographique. La capacité de pics est le nombre de pics séparables avec une résolution fixée entre le premier pic et le dernier pic du chromatogramme [9]. Mais, cette capacité de pics ne représente pas du tout les possibilités de la méthode car l'expérience montre que, si le nombre de solutés à séparer excède 37 % de la capacité de pics de la colonne, la résolution entre les pics est statistiquement compromise [10]. Il faut donc travailler avec une capacité de pics bien supérieure au nombre de solutés à séparer.

Une solution possible pour augmenter significativement la capacité de pics d'une méthode séparative est l'utilisation des systèmes multidimensionnels. A l'instar de ce qui se fait en chromatographie sur couche mince [11] ou en chromatographie en phase gazeuse

[12], les molécules d'un mélange sont séparées une première fois par chromatographie liquide sur une phase stationnaire donnée. Les fractions issues de cette séparation sont alors de nouveau séparées sur une nouvelle colonne pour apporter une sélectivité différente à celle obtenue avec la première dimension : c'est la LC-2D « comprehensive » ou LCxLC.

L'utilisation de colonnes aux principes de séparation orthogonaux permet d'augmenter significativement la capacité de pics de la méthode (au maximum, si les séparations sont parfaitement orthogonales, la capacité de pics obtenue en LCxLC est égale au produit des capacités de pics mesurées pour chacune des dimensions). Le nombre important de mécanismes de rétention en chromatographie liquide (polarités des phases normales ou inversées, exclusion stérique, échange d'ions, appariement d'ions) laisse envisager de nombreuses combinaisons. La première application de la LC-2D « comprehensive » date de la fin des années 1970 [13] et utilise une colonne de chromatographie d'exclusion stérique couplée à une colonne de chromatographie à polarités des phases inversées.

La LCxLC [14] peut être appliquée selon trois schémas différents :

- « on-line » : la seconde séparation est effectuée en même temps que la première, sur toutes les fractions issues de cette dernière [15, 16]. Elle doit donc être très rapide puisque le temps de l'analyse est équivalent au temps de collection en sortie de première dimension. En général, la capacité de pics est donc plus faible sur la deuxième colonne que sur la première et le débit de la phase mobile est plus important sur la deuxième séparation. Seeley [17] a montré que la période d'échantillonnage optimale, pour ne pas perdre la résolution de la première dimension, doit être égale à la déviation standard des pics élués de la première colonne. Ainsi, la largeur d'un pic gaussien étant évalué à quatre fois sa déviation standard, chaque pic de la première séparation est injecté en quatre fois dans la deuxième colonne. La première séparation ne doit donc pas être trop rapide (largeur de pic et déviation standard en temps plus importantes) pour augmenter le temps de séparation sur la deuxième colonne [14]. Schoenmakers et son équipe ont établi un protocole pour aider à configurer un système de séparation multidimensionnelle [18].

Cette technique nécessite l'utilisation d'une pompe supplémentaire au système HPLC classique et d'une vanne 10 voies 2 positions, installée entre les deux colonnes chromatographiques (Figure II-4).

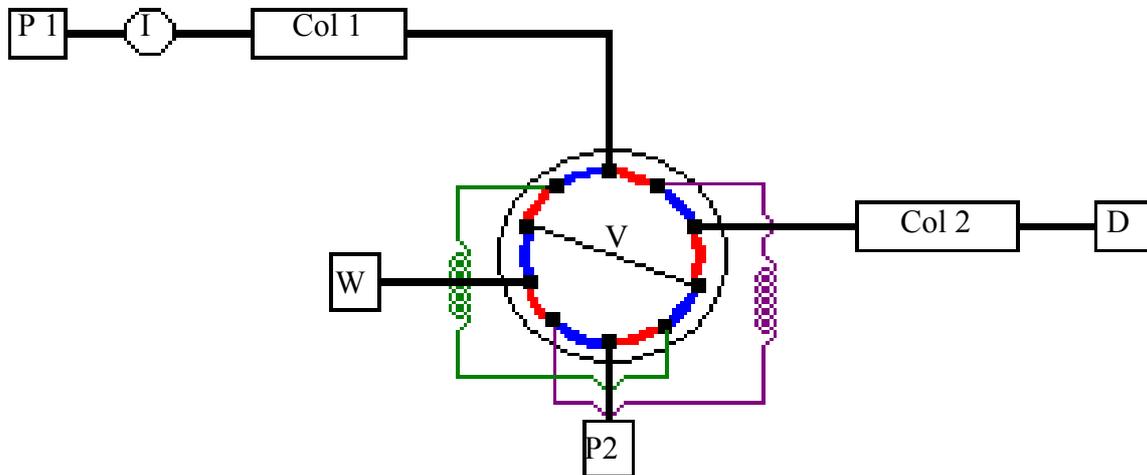


Figure II-4 : Représentation schématique du montage de LC-2D « comprehensive » : P1, I, Col 1 : respectivement pompe, injecteur et colonne de la première dimension ; P2, Col 2, D : respectivement pompe, colonne et détecteur de la deuxième dimension ; W: la poubelle ; V : la vanne 10 voies, 2 positions avec deux boucles de récupération. Quelle que soit la position de la vanne (rouge ou bleue), la phase mobile sortant de la colonne de séparation 1 est récupérée dans une des boucles pendant que la fraction contenue dans l'autre boucle est envoyée vers la deuxième colonne par la pompe 2.

Ce système à deux boucles de récupération est indispensable pour séparer sur la deuxième colonne toutes les fractions issues de la première dimension. Le changement de position de la vanne 10 voies permet de récupérer alternativement les fractions dans l'une des boucles de récupération pendant que la fraction contenue dans l'autre boucle est transférée à contre-courant par la pompe P2 dans la deuxième colonne.

Pour l'analyse d'un échantillon, cette technique permet d'obtenir autant de chromatogrammes que de fractions différentes issues de la première séparation. La représentation du résultat en trois-dimensions est illustrée par la Figure II-5.

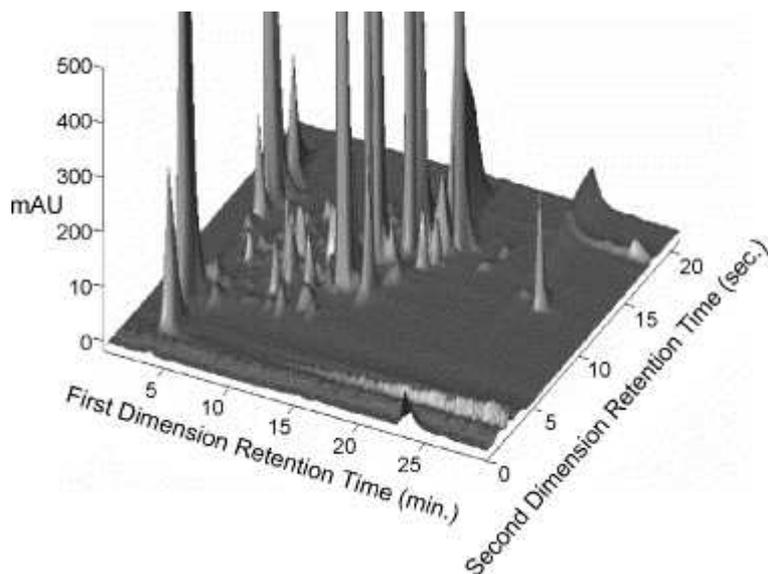


Figure II-5 : Chromatogramme d'un extrait de maïs mutant. Première colonne : Discovery HS-F5 (5 cm), gradient (20 min) d'acétonitrile (5-40 %) dans un mélange de phosphate de sodium 20 mM et de perchlorate de sodium 20 mM dans l'eau (pH 5,7) à 40 °C, 0,10 mL/min. Seconde colonne : ZirChrom-CARB (5 cm) ; gradient (17,4 s) d'acétonitrile (0-70 %) dans de l'acide perchlorique 20 mM dans l'eau à 110 °C, 3 mL/min. (Reproduction de la référence [16]).

- « stop-and-go » : la phase mobile permettant l'élution en première dimension est stoppée pendant la séparation en deuxième dimension [19]. Ce schéma permet d'éliminer la contrainte sur le temps d'analyse de la deuxième dimension. L'utilisation d'une deuxième colonne avec une capacité de pics importante est alors possible, le système 2D devient très performant. Par contre, ce schéma implique une augmentation importante du temps d'analyse total.

Sur le montage de la Figure II-4, la vanne 10 voies peut être remplacée par une vanne 6 voies avec une seule boucle puisque la récupération d'une fraction et la séparation sur la deuxième colonne ne se font pas simultanément. On obtient alors une suite de chromatogrammes (Figure II-6) qui pourrait également être représentée en trois-dimensions.

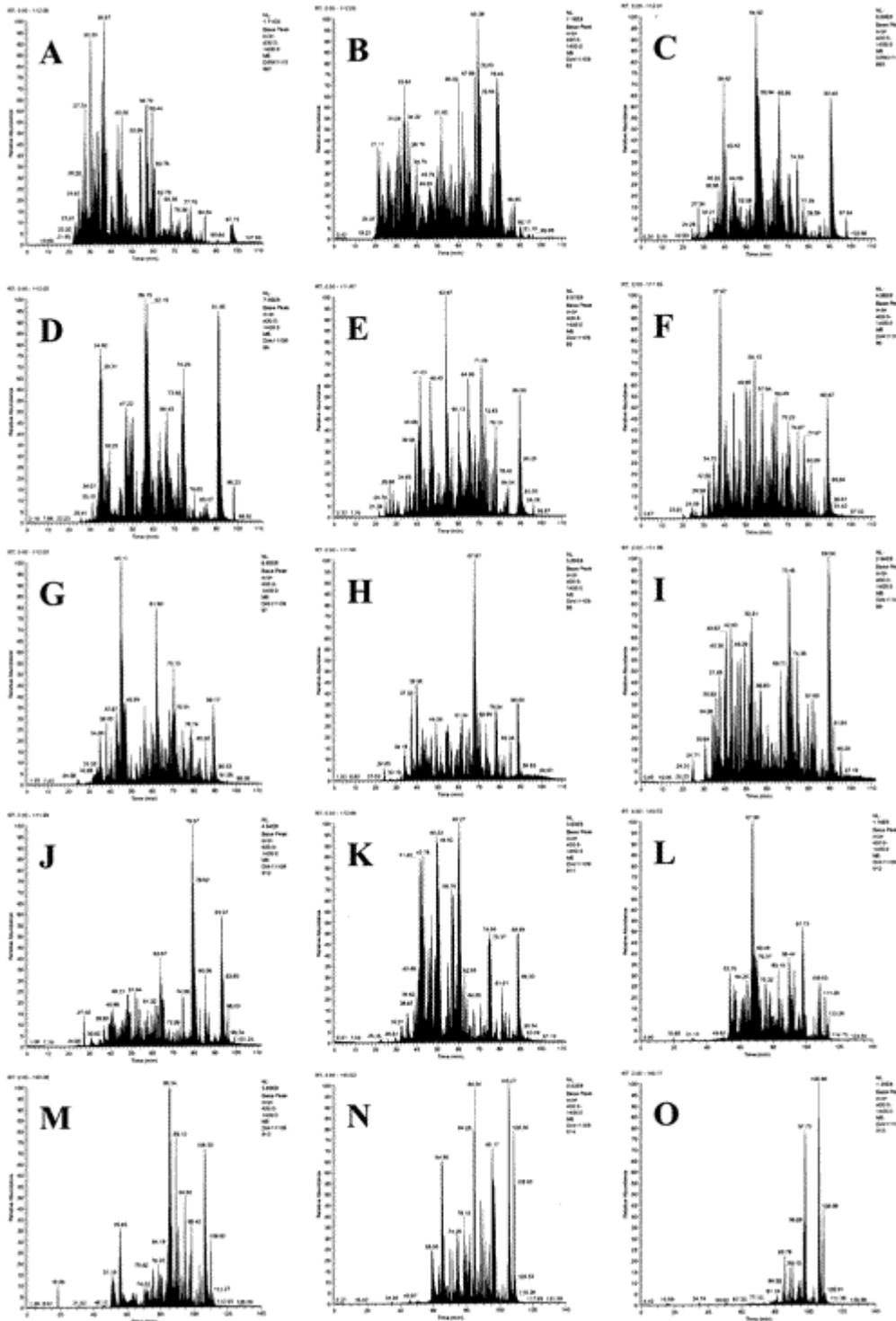


Figure II-6 : Chromatogrammes successifs de l'analyse de la fraction insoluble de *S. cerevisiae*. Première colonne : SCX Partisphere (4 cm), élution par palier successifs de chlorure d'ammonium 250 mM avec arrêt de la phase mobile entre chaque palier. Deuxième colonne : Zorbax Eclipse XDB C18 (10 cm), gradient d'élution acétonitrile / eau. (Reproduction de la référence [19]).

- « off-line » : les fractions éluées de la première colonne sont collectées et stockées pour être injectées par la suite dans une seconde colonne chromatographique [20]. Il est alors possible de ne pas injecter la totalité des fractions ou de les injecter dans un ordre différent de celui de sortie de la première dimension. Par contre, le temps d'analyse total est très long et la gestion du nombre important de fractions collectées peut poser problème.

La mise en place de ce mode de séparation nécessite un collecteur de fraction à la fin de la première séparation.

II.2.1.2 Analyse de quelques molécules

Pour la détection et la quantification d'un faible nombre de molécules, l'échantillon complexe est tout d'abord simplifié. Une préparation d'échantillon adaptée permet d'isoler les solutés d'intérêt dans une seule fraction qui est ensuite injectée sur une colonne chromatographique pour finaliser la séparation des solutés visés. Cette étape de préparation peut être réalisée soit séparément de l'analyse chromatographique, soit en ligne de façon automatique pour diminuer le temps d'analyse et éviter les contaminations.

- « off-line » : différentes préparations sont possibles : extraction liquide-liquide, extraction liquide-solide, Depuis de nombreuses années, l'extraction sur phase solide (SPE) s'est beaucoup développée [21]. Elle est généralement mise en œuvre sur des cartouches jetables remplies d'une phase stationnaire de grosse granulométrie, donc peu efficace. L'application d'une série de lavages par des phases mobiles adaptées permet de collecter une fraction relativement enrichie en solutés d'intérêt.

- « on-line » : pour simplifier les manipulations, la cartouche d'extraction SPE peut être remplacée par une colonne chromatographique courte, remplie de la même phase stationnaire et couplée à la colonne de séparation par l'intermédiaire d'une vanne six voies [21].

Dans le cas d'un échantillon très complexe, afin que la fraction d'intérêt injectée sur la colonne de séparation soit très simple (très riche en solutés d'intérêt et contenant peu d'interférents), il faut que l'étape de préparation devienne une véritable étape chromatographique qui soit efficace et sélective, par la mise en œuvre, respectivement, d'une véritable colonne chromatographique (faible granulométrie de phase stationnaire et longueur de colonne raisonnable) et d'un programme d'élution adapté (gradient). Dans ces

conditions, on parle de LC-2D « heart-cutting » ou LC-LC [22, 23]. Le dispositif expérimental utilisé est donné par la Figure II-7. L'unique chromatogramme obtenu correspond à la séparation des solutés à doser sur la deuxième colonne.

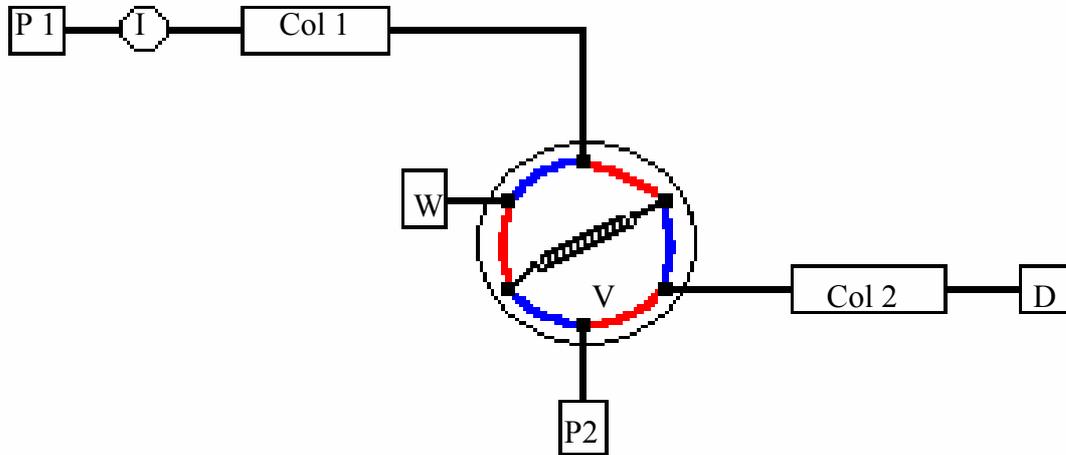


Figure II-7 : Représentation schématique du montage de LC-2D « heart-cutting » : P1, I, Col 1 : respectivement pompe, injecteur et colonne de la première dimension ; P2, Col 2, D : respectivement pompe, colonne et détecteur de la deuxième dimension ; W : poubelle ; V : vanne 6 voies 2 positions. La vanne en position rouge permet de récupérer les solutés souhaités dans la boucle de récupération en sortie de la colonne 1. Lors du passage en position bleue, le contenu de la boucle est envoyé sur la deuxième colonne pendant que la première est nettoyée et équilibrée pour l'analyse suivante.

II.2.2. Préconcentration en tête de la deuxième colonne du système LC-2D

En LC-2D, la qualité de la séparation obtenue dépendant directement de la dispersion qui se produit dans la deuxième colonne, il faut veiller à ce que le volume transféré de la première colonne vers la deuxième n'engendre pas un élargissement des pics. Pour cela, on pourrait envisager de minimiser le volume transféré en miniaturisant la première colonne. Mais ceci conduirait inévitablement à limiter la quantité d'échantillon injectée dans le système et par suite à sacrifier la sensibilité de la méthode. La seule solution possible est de se placer dans des conditions de préconcentration en tête de la deuxième colonne. Le processus est schématisé sur la Figure II-8. Il comprend deux étapes : une étape d'analyse frontale (étape a) suivie d'une étape d'élution par « step gradient » (étape b).

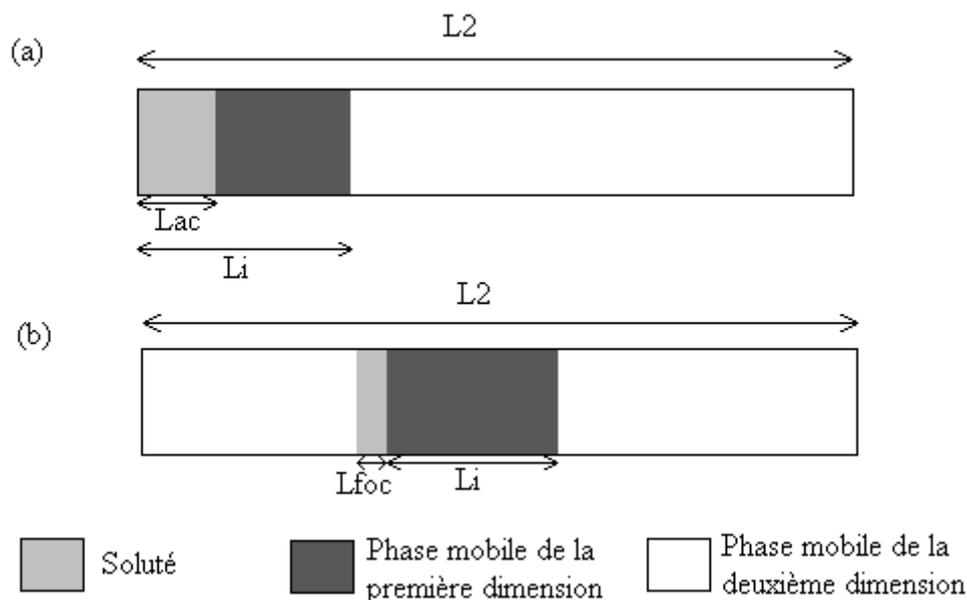


Figure II-8 : Processus de préconcentration en tête de la deuxième colonne : (a) accumulation du soluté en tête de colonne pendant l'étape d'analyse frontale. (b) focalisation de la bande de soluté pendant l'étape d'éluion par « step gradient ». L_2 = longueur de la deuxième colonne. L_{ac} = longueur de la bande de soluté après accumulation en tête de la deuxième colonne. L_i = longueur occupée par le volume de phase mobile de la première dimension transféré vers la deuxième dimension. L_{foc} = longueur de la bande de soluté après focalisation.

Durant l'étape a, le volume transféré de la première colonne vers la deuxième colonne contient le soluté d'intérêt dilué et solubilisé dans la phase mobile de la première dimension qui a une très faible force éluante pour la deuxième dimension. D'après la théorie de la chromatographie, la vitesse linéaire du soluté est donnée par la relation :

$$u_s = u_0 / (1 + k^*) \quad (\text{II-12})$$

où u_0 est la vitesse linéaire de la phase mobile dans la deuxième colonne et k^* est le facteur de rétention du soluté à son entrée sur la deuxième colonne, c'est à dire lorsque la phase mobile de la première dimension lui sert de phase éluante sur la deuxième colonne. Lorsque la valeur de k^* est élevée, le soluté progresse beaucoup moins vite que la phase mobile et les molécules de soluté à l'entrée de la deuxième colonne s'accumule dans une zone relativement étroite de largeur L_{ac} donnée par :

$$L_{ac} = L_i / (1 + k^*) \quad (\text{II-13})$$

Dans cette expression, L_i représente la longueur occupée par le volume de phase mobile de la première dimension transféré vers la deuxième dimension. L'équation (II-13) montre que le phénomène d'accumulation du soluté transféré en tête de la deuxième colonne est d'autant plus important que la rétention du soluté sur la deuxième colonne avec la phase mobile de la première dimension est grande.

Après cette étape d'accumulation sur la deuxième colonne, les molécules de soluté sont poussées par la phase mobile de la deuxième dimension qui possède une force éluante bien plus élevée que la phase mobile de la première dimension (étape b). Dans ces conditions, la vitesse de migration de l'arrière de la bande de soluté est toujours supérieure à celle de l'avant de la bande, si bien que la zone de soluté subit une focalisation due au changement de phase éluante (« step gradient »). Comme la longueur de la bande de soluté après accumulation, L_{ac} , la longueur de la bande de soluté après focalisation, L_{foc} , dépend aussi étroitement des forces éluantes des phases mobiles des première et deuxième dimensions vis à vis de la deuxième colonne et du volume transféré entre les deux dimensions.

Pour ne pas engendrer un élargissement du pic chromatographique, il est clair que le volume transféré ne doit pas dépasser une certaine limite. Pour des conditions données (phase mobile de la première dimension donnée, phase mobile de la deuxième dimension donnée et deuxième colonne donnée), il existe donc un volume maximal transférable qu'il convient de déterminer dans chaque cas de figure.

Lorsque le phénomène de préconcentration est très intense, il est possible d'augmenter la sensibilité de la méthode sans être obligé d'augmenter le volume de la première colonne, en accumulant plusieurs fractions issues d'injections successives de l'échantillon sur la première colonne, avant de les éluer globalement. Ce protocole a été réalisé en pratique avec un système à trois colonnes : la boucle de récupération de la Figure II-7 était remplacée par une colonne très courte capable de retenir fortement les solutés d'intérêt lors de leur passage avec la phase mobile de la première dimension [24]. Mais ceci est tout à fait envisageable avec le dispositif de base comportant les deux colonnes et la boucle de récupération intermédiaire.

II.2.3. Autres contraintes associées aux techniques LC-2D

Une autre contrainte se situe au niveau de la compatibilité des deux phases mobiles utilisées. La LC-2D impose l'utilisation de solvants miscibles entre la première et la deuxième dimension pour ne pas dégrader la forme des pics et la séparation. Par exemple, le couplage de la chromatographie à polarités des phases inversées (phase mobile aqueuse) et de la chromatographie à polarités des phases normales (phase mobile organique) est limité par ce problème d'immiscibilité partielle des solvants.

La différence de viscosité des phases mobiles peut aussi poser problème : elle provoque une instabilité des flux appelée digitation visqueuse (en anglais « viscous fingering ») [25, 26]. En LC-2D, comme le volume de solvant transféré de la première vers la deuxième colonne est important (plusieurs fois le volume d'injection habituel), le flux de la phase mobile dans la deuxième dimension peut devenir instable s'il existe une différence de viscosité entre les deux liquides. Par exemple, les viscosités du méthanol et de l'acétonitrile sont suffisamment différentes pour créer ces perturbations. Celles-ci apparaissent lorsque le liquide de plus faible viscosité pousse celui de plus haute viscosité [26] (Figure II-9). Elles entraînent une déformation des pics et une perte importante de l'efficacité de la deuxième colonne donc de la résolution.

Le système 2D nécessite donc l'utilisation de phases mobiles miscibles et de viscosité proche entre les deux dimensions de séparation pour obtenir une forme de pics normale.

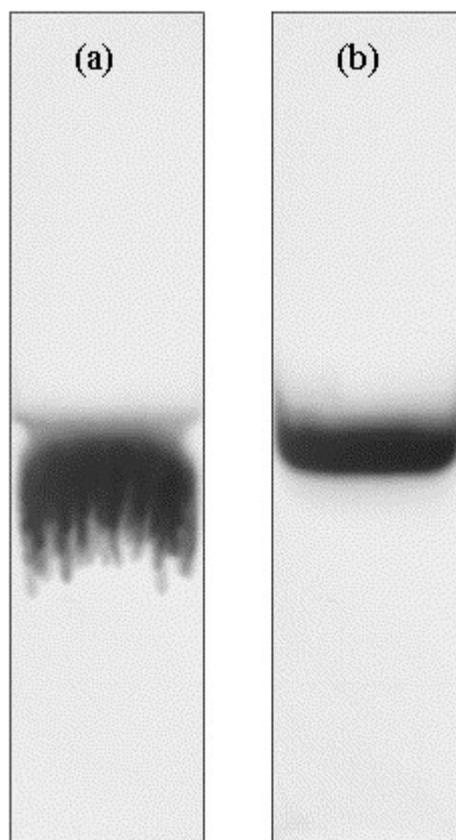


Figure II-9 : Illustration de la déformation de la bande lorsque l'échantillon migre (de haut en bas) dans la colonne chromatographique : (a) différence de viscosité entre l'échantillon et la phase mobile de 0,48 cP (0,38 cP pour le solvant de l'échantillon et 0,86 cP pour la phase mobile) : problème de digitation visqueuse lorsque le solvant de l'échantillon, de plus faible viscosité, pousse la phase mobile ; (b) aucune différence de viscosité : pas de perturbations. (Reproduction de la référence [26]).

II.3 La colonne Hypercarb PGC

La LC-2D impose l'utilisation d'une deuxième colonne qui soit très rétentive dans les conditions de phase mobile de la première dimension. Ceci permet la préconcentration des solutés en tête de la deuxième colonne et la minimisation de la dispersion lors de l'élution dans la deuxième dimension.

Les solutés d'intérêt sont des petites molécules polaires. La phase stationnaire PGC (Carbone Graphitique Poreux) est réputée pour la forte rétention de telles molécules en chromatographie à polarités des phases inversées [27]. Cette phase peut donc être utilisée en deuxième dimension pour la séparation LC-2D des caramels.

II.3.1 Historique des colonnes à base de carbone

Le carbone graphitique a tout d'abord été utilisé en chromatographie en phase gazeuse dans des colonnes en verre. Cette colonne capillaire avec une large couche de carbone permettait la séparation des isotopes du benzène et du toluène [28] et des polyphényles [29]. La phase stationnaire était constituée de particules de carbone graphitique noir non-modifié totalement inadaptées à la chromatographie liquide compte tenu de leur fragilité. Au début des années 1980, le carbone graphitique poreux connu sous le sigle anglo-saxon PGC a été fabriqué pour la première fois à partir d'un gel de silice carbonisé [30]. Cette nouvelle phase carbone peut être utilisée en chromatographie en phase liquide et gazeuse : elle offre une meilleure stabilité et symétrie de pic que les précédentes.

A l'heure actuelle, il n'existe qu'une seule phase PGC commerciale, connue sous le nom d'Hypercarb et commercialisée par Thermo Fischer Scientific.

II.3.2 Structure du PGC

Le gel de silice carbonisé en plusieurs étapes jusqu'à 2500 °C forme des particules sphériques de carbone graphitique de quelques micromètres de diamètre, avec une porosité importante. Knox *et al.* [31] montre que la structure du carbone graphitique poreux est uniquement constituée de plans rigides d'atomes de carbone empilés selon un rangement bidimensionnel. La superposition des feuilles de carbone issue de l'arrangement hexagonal des atomes de carbone (Figure II-10) est une caractéristique de cette phase stationnaire, par rapport aux structures plutôt amorphes des autres phases stationnaires.

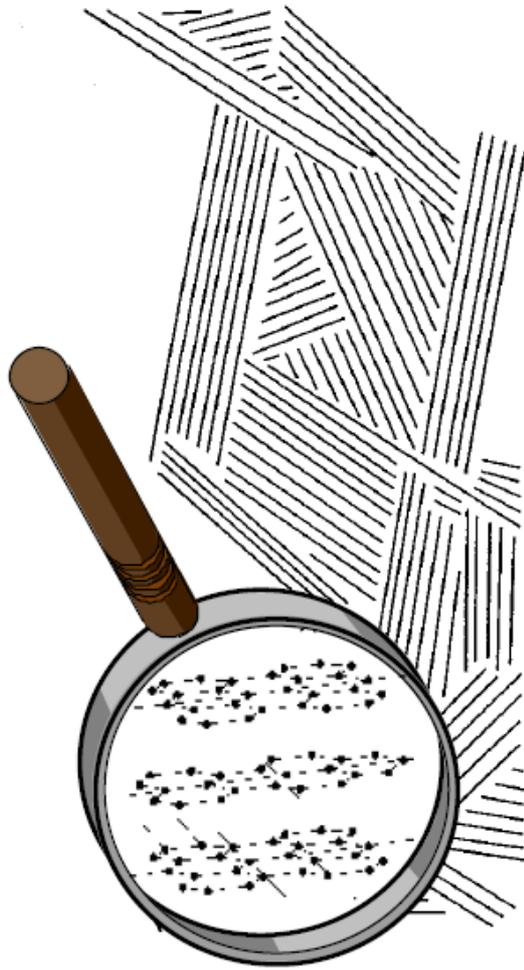


Figure II-10 : Structure bidimensionnelle du PGC.

II.3.3 Propriétés du PGC

Les caractéristiques de la phase stationnaire PGC ont été définies par Forgács [32]. Contrairement aux phases stationnaires à base de silice greffée, le PGC peut être utilisé sur tout le domaine de pH et à température très élevée. Il est aussi stable sur un large domaine de concentration en sels, résiste aux éluants très agressifs et peut être utilisé avec des éluants organiques (de chromatographie à polarités des phases normales) et aqueux (de chromatographie à polarités des phases inversées).

La synthèse du PGC selon Gilbert *et al.* [30] permet d'obtenir une phase suffisamment dure pour résister aux hautes pressions. Les pores de diamètre moyen inférieur à 10 nm et l'absence de micropores améliorent le transfert de masse des solutés dans et en dehors des particules. Sa surface spécifique élevée (150 m²/g [31]) permet une rétention importante des molécules et l'obtention d'une capacité de charge élevée.

Toutes ces caractéristiques font que la phase PGC est très robuste, souvent utilisée dans des conditions extrêmes de pH et de température avec des solvants qui peuvent être agressifs.

II.3.4 Les mécanismes de rétention sur PGC

L'absence de silanols résiduels à la surface du PGC a permis de présenter cette phase comme la phase stationnaire la plus hydrophobe du marché [32, 33]. Mais, la planéité et la présence d'électrons π libres délocalisés à sa surface lui confèrent des mécanismes de rétention particuliers [33].

Les interactions entre l'analyte et le PGC dépendent largement de la surface en contact avec la phase stationnaire. Comme cette dernière a une structure plane, les molécules planes auront des interactions plus importantes avec le PGC que les autres molécules. Le PGC est donc une phase stationnaire sélective envers les isomères des systèmes aromatiques ou conjugués [34].

Le PGC est aussi connu pour sa rétention des molécules polaires en chromatographie à polarités des phases inversées. La présence d'électrons libres à la surface du PGC rend cette phase stationnaire polarisable. Il se crée alors des forces électrostatiques de type

charge – dipôle induit entre le soluté et le PGC apportant une rétention plus ou moins importante de la molécule polaire (Figure II-11).

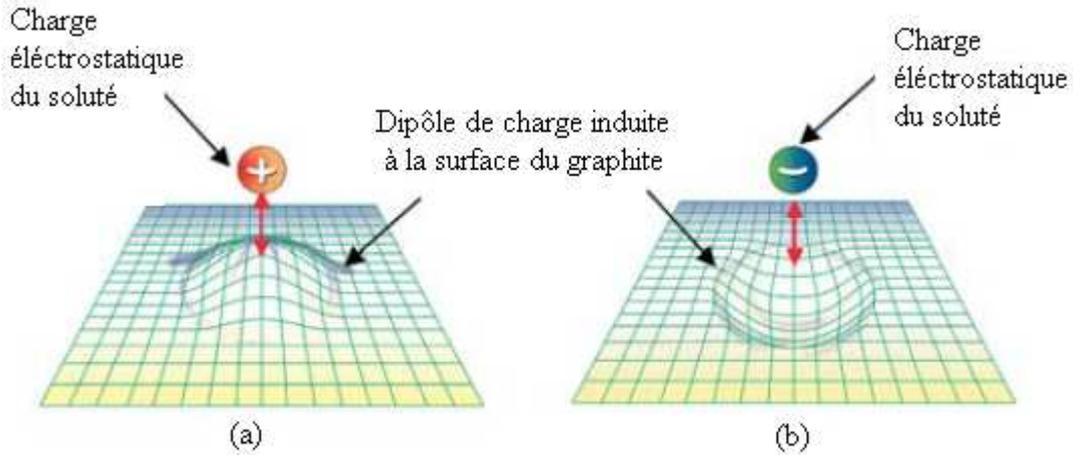


Figure II-11 : Représentation schématique des interactions électroniques entre un soluté polaire (chargé positivement en (a) et négativement en (b)) et la surface du PGC (d'après le guide de Thermo Fisher Scientific sur la colonne PGC).

Pour les molécules polaires, les interactions électroniques deviennent donc plus importantes que les interactions hydrophobes et l'augmentation de la rétention en même temps que la polarité de la molécule peut être observée sur cette phase stationnaire [35]. Ce phénomène est appelé effet de rétention polaire du graphite (PREG : polar retention effect by graphite) [32].

Le PGC est également un outil très performant pour la séparation des solutés ionisés. Les ions chargés positivement et négativement peuvent être séparés sur un même chromatogramme grâce aux interactions électroniques [36, 37].

La rétention des molécules sur le PGC est donc un équilibre entre les interactions hydrophobes et les interactions électroniques avec les groupes fonctionnels polarisés ou polarisables. L'évolution de la rétention en fonction de la phase mobile est de ce fait spécifique et difficilement prévisible.

Le caractère très rétentif de cette phase ne permet pas d'injecter directement le caramel sous peine de détérioration de la colonne par des molécules non-éluées. Cette colonne ne peut donc être utilisée uniquement comme deuxième colonne du système bidimensionnel.

Références bibliographiques

1. Peters, F. T.; Drummer, O. H.; Musshoff, F., Validation of new methods. *Forensic Science International* **2007**, 165, (2-3), 216-224.
2. Hubert, P.; Nguyen-Huu, J. J.; Boulanger, B.; Chapuzet, E.; Chiap, P.; Cohen, N.; Compagnon, P. A.; Dewé, W.; Feinberg, M.; Lallier, M.; Laurentie, M.; Mercier, N.; Muzard, G.; Nivet, C.; Valat, L., Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures: A SFSTP proposal--part I. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2004**, 36, (3), 579-586.
3. Hubert, P.; Nguyen-Huu, J. J.; Boulanger, B.; Chapuzet, E.; Chiap, P.; Cohen, N.; Compagnon, P. A.; Dewé, W.; Feinberg, M.; Lallier, M.; Laurentie, M.; Mercier, N.; Muzard, G.; Nivet, C.; Valat, L.; Rozet, E., Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures: A SFSTP proposal - Part II. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2007**, 45, (1), 70-81.
4. Hubert, P.; Nguyen-Huu, J. J.; Boulanger, B.; Chapuzet, E.; Cohen, N.; Compagnon, P. A.; Dewé, W.; Feinberg, M.; Laurentie, M.; Mercier, N.; Muzard, G.; Valat, L.; Rozet, E., Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures: A SFSTP proposal-Part III. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2007**, 45, (1), 82-96.
5. Hubert, P.; Nguyen-Huu, J. J.; Boulanger, B.; Chapuzet, E.; Cohen, N.; Compagnon, P. A.; Dewé, W.; Feinberg, M.; Laurentie, M.; Mercier, N.; Muzard, G.; Valat, L.; Rozet, E., Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures: A SFSTP proposal: Part IV. Examples of application. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2008**, 48, (3), 760-771.
6. Wiberg, K.; Andersson, M.; Hagman, A.; Jacobsson, S. P., Peak purity determination with principal component analysis of high-performance liquid chromatography-diode array detection data. *Journal of Chromatography A* **2004**, 1029, (1-2), 13-20.

7. Maeder, M., Evolving factor analysis for the resolution of overlapping chromatographic peaks. *Analytical Chemistry* **1987**, 59, (3), 527-530.
8. Liang, Y. Z.; Kvalheim, O. M.; Keller, H. R.; Massart, D. L.; Kiechle, P.; Erni, F., Heuristic evolving latent projections: resolving two-way multicomponent data. 2. Detection and resolution of minor constituents. *Analytical Chemistry* **1992**, 64, (8), 946-953.
9. Giddings, J. C., Maximum number of components resolvable by gel filtration and other elution chromatographic methods. *Analytical Chemistry* **1967**, 39, (8), 1027-1028.
10. Davis, J. M.; Giddings, J. C., Statistical theory of component overlap in multicomponent chromatograms. *Analytical Chemistry* **1983**, 55, (3), 418-424.
11. Consden, R.; Gordon, A. H.; Martin, A. J., Qualitative analysis of proteins: a partition chromatographic method using paper. *Biochem. J.* **1944**, 38, (3), 224-232.
12. McEwen, D. J., Backflushing and Two-Stage Operation of Capillary Columns in Gas Chromatography. *Analytical Chemistry* **1964**, 36, (2), 279-282.
13. Erni, F.; Frei, R. W., Two-dimensional column liquid chromatographic technique for resolution of complex mixtures. *Journal of Chromatography A* **1978**, 149, 561-569.
14. Guiochon, G.; Marchetti, N.; Mriziq, K.; Shalliker, R. A., Implementations of two-dimensional liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **2008**, 1189, (1-2), 109-168.
15. van der Horst, A.; Schoenmakers, P. J., Comprehensive two-dimensional liquid chromatography of polymers. *Journal of Chromatography A* **2003**, 1000, (1-2), 693-709.
16. Stoll, D. R.; Cohen, J. D.; Carr, P. W., Fast, comprehensive online two-dimensional high performance liquid chromatography through the use of high temperature ultra-fast gradient elution reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **2006**, 1122, (1-2), 123-137.
17. Seeley, J. V., Theoretical study of incomplete sampling of the first dimension in comprehensive two-dimensional chromatography. *Journal of Chromatography A* **2002**, 962, (1-2), 21-27.

18. Schoenmakers, P. J.; Vivo-Truyols, G.; Decrop, W. M. C., A protocol for designing comprehensive two-dimensional liquid chromatography separation systems. *Journal of Chromatography A* **2006**, 1120, (1-2), 282-290.
19. Wolters, D. A.; Washburn, M. P.; Yates, J. R., An Automated Multidimensional Protein Identification Technology for Shotgun Proteomics. *Analytical Chemistry* **2001**, 73, (23), 5683-5690.
20. Saravanabhavan, G.; Helferty, A.; Hodson, P. V.; Brown, R. S., A multi-dimensional high performance liquid chromatographic method for fingerprinting polycyclic aromatic hydrocarbons and their alkyl-homologs in the heavy gas oil fraction of Alaskan North Slope crude. *Journal of Chromatography A* **2007**, 1156, (1-2), 124-133.
21. Hennion, M.-C., Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **1999**, 856, (1-2), 3-54.
22. Matsui, T.; Tamaya, K.; Kawasaki, T.; Osajima, Y., Determination of angiotensin metabolites in human plasma by fluorimetric high-performance liquid chromatography using a heart-cut column-switching technique. *Journal of Chromatography B* **1999**, 729, (1-2), 89-95.
23. Gray, M. J.; Dennis, G. R.; Slonecker, P. J.; Shalliker, R. A., Separation of oligostyrene isomers in a complex mixture using two-dimensional heart-cutting reversed-phased liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **2004**, 1028, (2), 247-257.
24. Sweeney, A. P.; Shalliker, R. A., Development of a two-dimensional liquid chromatography system with trapping and sample enrichment capabilities. *Journal of Chromatography A* **2002**, 968, (1-2), 41-52.
25. Broyles, B. S.; Shalliker, R. A.; Cherrak, D. E.; Guiochon, G., Visualization of viscous fingering in chromatographic columns. *Journal of Chromatography A* **1998**, 822, (2), 173-187.
26. Mayfield, K. J.; Shalliker, R. A.; Catchpole, H. J.; Sweeney, A. P.; Wong, V.; Guiochon, G., Viscous fingering induced flow instability in multidimensional liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **2005**, 1080, (2), 124-131.

27. Hanai, T., Separation of polar compounds using carbon columns. *Journal of Chromatography A* **2003**, 989, (2), 183-196.
28. Goretti, G. C.; Liberti, A.; Nota, G., Gas chromatographic determination of isotopic molecules by means of open tubular thick layer graphitized carbon black columns. *Journal of Chromatography A* **1968**, 34, 96-100.
29. Onuska, F.; Janák, J.; Tesářík, K.; Kiselev, A. V., Separation of biphenyl and the terphenyls by gas--solid chromatography on graphitized carbon black and on Chromosorb coated with caesium chloride. *Journal of Chromatography A* **1968**, 34, 81-85.
30. Gilbert, M. T.; Knox, J. H.; Kaur, B., Porous glassy carbon, a new columns packing material for gas chromatography and high-performance liquid chromatography. *Chromatographia* **1982**, 16, (1), 138-146.
31. Knox, J. H.; Kaur, B.; Millward, G. R., Structure and performance of porous graphitic carbon in liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **1986**, 352, 3-25.
32. Forgács, E., Retention characteristics and practical applications of carbon sorbents. *Journal of Chromatography A* **2002**, 975, (2), 229-243.
33. Tanaka, N.; Tanigawa, T.; Kimata, K.; Hosoya, K.; Arai, T., Selectivity of carbon packing materials in comparison with octadecylsilyl- and pyrenylethylsilylsilica gels in reversed- phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **1991**, 549, 29-41.
34. Kríz, J.; Adamcová, E.; Knox, J. H.; Hora, J., Characterization of adsorbents by high-performance liquid chromatography using aromatic hydrocarbons Porous graphite and its comparison with silica gel, alumina, octadecylsilica and phenylsilica. *Journal of Chromatography A* **1994**, 663, (2), 151-161.
35. Hennion, M.-C.; Coquart, V.; Guenu, S.; Sella, C., Retention behaviour of polar compounds using porous graphitic carbon with water-rich mobile phases. *Journal of Chromatography A* **1995**, 712, (2), 287-301.

36. Emery, M. F.; Lim, C. K., Separation of cationic technetium-99m amine complexes on porous graphitic carbon. *Journal of Chromatography A* **1989**, 479, 212-215.
37. Gu, G.; Lim, C. K., Separation of anionic and cationic compounds of biomedical interest by high-performance liquid chromatography on porous graphitic carbon. *Journal of Chromatography A* **1990**, 515, 183-192.

Chapitre III :

Analyse du 2-acétyl-4-(1,2,3,4-tétrahydroxybutyl)imidazole (THI)

dans les caramels colorants

de classe III

L'étude présentée dans ce chapitre a fait l'objet d'une publication :

« Heart-cutting two-dimensional liquid chromatography methods for quantification of 2-acetyl-4-(1,2,3,4-tetrahydroxybutyl)imidazole in class III caramel colours »

C. Moretton, G. Crétier, H. Nigay, J-L. Rocca, J. Chromatogr. A, 1198-1199 (2008) 73-79.

Introduction

Les caramels colorants de classe III, fabriqués par le traitement thermique des sucres en présence d'ammoniaque, sont des produits à charge colloïdale positive et stables dans les milieux acides (principalement utilisés dans les bières). La caramélisation des sucres en présence de ce promoteur conduit à la formation d'imidazoles, comme nous avons pu le voir dans le chapitre I.

Parmi ces imidazoles, le 2-acétyl-4-(1,2,3,4-tétrahydroxybutyl)imidazole (THI) est connu pour être immunosuppresseur (cf. I.2.3). La réglementation européenne impose donc une teneur maximale de 10 ppm en THI dans les caramels colorants de classe III.

Cette molécule a également été retrouvée dans le café [1] puisque la torréfaction consiste à cuire des sucres en présence de composés azotés.

Après une étude bibliographique sur les méthodes de dosage du THI dans le caramel ou d'autres matrices agroalimentaires, la mise au point et la validation d'une nouvelle méthode d'analyse par LC-2D seront présentées. L'objectif est de créer une méthode sensible, précise et totalement automatisable pour pouvoir, par la suite, effectuer des suivis de réaction de caramélisation et améliorer le processus de fabrication pour diminuer la quantité de THI produite.

Le chromatographe utilisé pour développer cette méthode de dosage est présenté en annexe 1.

III.1 Bibliographie sur l'analyse du THI

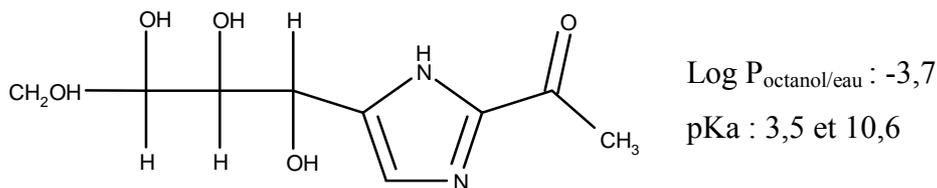


Figure III-1 : Formule développée et caractéristiques physico-chimiques du THI

Toutes les méthodes d'analyse du THI (Figure III-1) publiées sont basées sur la chromatographie en phase liquide, la faible volatilité de ce composé ne permettant pas de le doser par chromatographie en phase gazeuse.

La première publication d'une méthode d'analyse du THI dans les caramels colorants de classe III date de 1986 [2]. Le THI est extrait du caramel par deux extractions sur phase solide (SPE) successives : la première utilise un échangeur de cations fort. Seuls les amines quaternaires sont retenues sur ce support [3]. Le THI traverse donc la cartouche avec le solvant aqueux. La deuxième cartouche est un échangeur de cations faible où sont retenues les amines primaires et secondaires [3], dont le THI. La récupération du THI est alors effectuée par percolation d'acide chlorhydrique 0,5 M. L'éluat, évaporé à sec et repris par du méthanol, est dérivé par la 2,4-DNPH (2,4-dinitrophenylhydrazine) puis séparé par chromatographie à polarités des phases inversées sur une colonne LiChrosorb RP-8 par un mélange méthanol / acide phosphorique 0,05 mol/L 50/50 (v/v). La quantification par détection spectrophotométrique à 385 nm permet d'atteindre une limite de détection de l'ordre de la ppm. Une simplification de cette méthode est apportée par Lawrence [4] qui utilise une seule cartouche d'extraction échangeuse de cations faible et ne dérive pas le THI mais détecte directement la molécule à 287 nm après séparation chromatographique. La limite de détection atteinte est du même ordre de grandeur qu'avec la méthode précédente.

Plus récemment, de nouvelles méthodes d'analyse ont été publiées pour le dosage simultané du THI et du 4-méthylimidazole dans le caramel, la bière ou le café [1, 5, 6]. La purification de la matrice est faite soit par extraction sur phase solide sur une cartouche échangeuse de cations fort en milieu acide [1], soit par extraction par un fluide supercritique (le dioxyde de carbone) [6]. L'extrait est ensuite analysé par chromatographie

à polarités des phases inversées sur une colonne MetaChem Polaris C18-A [5], ou en mode HILIC (chromatographie d'interactions hydrophiles) sur une colonne Atlantis HILIC Silica [6]. Ces méthodes permettent d'obtenir des limites de détection de l'ordre de la ppm en détection UV à 287 nm et de la dizaine de ppb en spectrométrie de masse.

Tous ces procédés utilisent une préparation d'échantillon non-automatisée pour purifier la matrice avant de séparer les molécules restantes par chromatographie et de doser le THI individuellement. Elles ne sont donc pas adaptées pour effectuer des suivis de réaction de caramélisation dans le but de mieux appréhender la formation de cette molécule.

L'objectif de l'étude est de mettre au point une nouvelle méthode d'analyse du THI par chromatographie en phase liquide qui soit sélective et qui limite le temps de préparation de l'échantillon. Avec l'utilisation d'un système multidimensionnel LC-LC automatisé permettant d'augmenter fortement le pouvoir de séparation de la méthode analytique, la préparation de l'échantillon peut se limiter à une simple dilution dans l'eau.

III.2 Développement de la méthode d'analyse en LC-LC

La LC-2D « heart-cutting » ou LC-LC est utilisée pour analyser un faible nombre de solutés dans un mélange complexe. La séparation totale du THI des autres molécules présentes dans le caramel peut donc être atteinte avec ce système si le choix des colonnes est judicieux.

La quantification du THI est réalisée par détection UV avec un détecteur à barrette de diodes. Ce mode de détection ne permettant pas l'identification totale du soluté élué sous le pic présumé de THI, la mise au point de deux méthodes d'analyse orthogonales s'impose pour s'assurer de la quantification sélective du THI.

La sensibilité du détecteur lui-même permet d'atteindre une limite de détection pour le THI à 287 nm (longueur d'onde correspondant au maximum d'absorption (Annexe 3)) de l'ordre de 0,1 ppm. Pour obtenir une limite de quantification dans le caramel inférieure à la norme de 10 ppm, le facteur de dilution de la matrice doit être de 10 au maximum. Cette dilution d'un échantillon de caramel permet l'obtention d'une solution fluide, très colorée et sans particule insoluble, c'est à dire une solution injectable directement sur une colonne chromatographique sans risque de bouchage.

III.2.1 Utilisation du PGC pour la séparation du THI

La polarité de la molécule de THI (Figure III-1) limite la rétention de ce soluté sur une colonne de silice greffée apolaire en chromatographie en phase liquide à polarités des phases inversées (facteur de rétention de 0,3 sur la colonne MetaChem Polaris C18-A avec une phase mobile acétonitrile/ammoniaque 5 mmol/L 2/98 (v/v) [5]). Cette très faible rétention ne permet pas de séparer directement le THI des autres solutés contenus dans le caramel.

Pour augmenter la rétention de cette molécule, il est intéressant d'utiliser les phases stationnaires à base de carbone comme nous avons pu le voir dans le chapitre II. En effet, le PGC permet de retenir, en chromatographie à polarités des phases inversées, des molécules polaires grâce aux interactions électroniques entre la molécule et la surface de la phase stationnaire. L'évolution de la rétention du THI sur le PGC en fonction du pourcentage d'acétonitrile (Figure III-2) montre qu'une phase mobile contenant 10 % d'acétonitrile dans l'eau est suffisante pour avoir une rétention correcte de la molécule ($k = 3$). Sur une phase stationnaire de silice greffée telle que XBridge Shield RP18, le facteur de rétention du THI est seulement de 1 avec une phase mobile 100 % aqueuse.

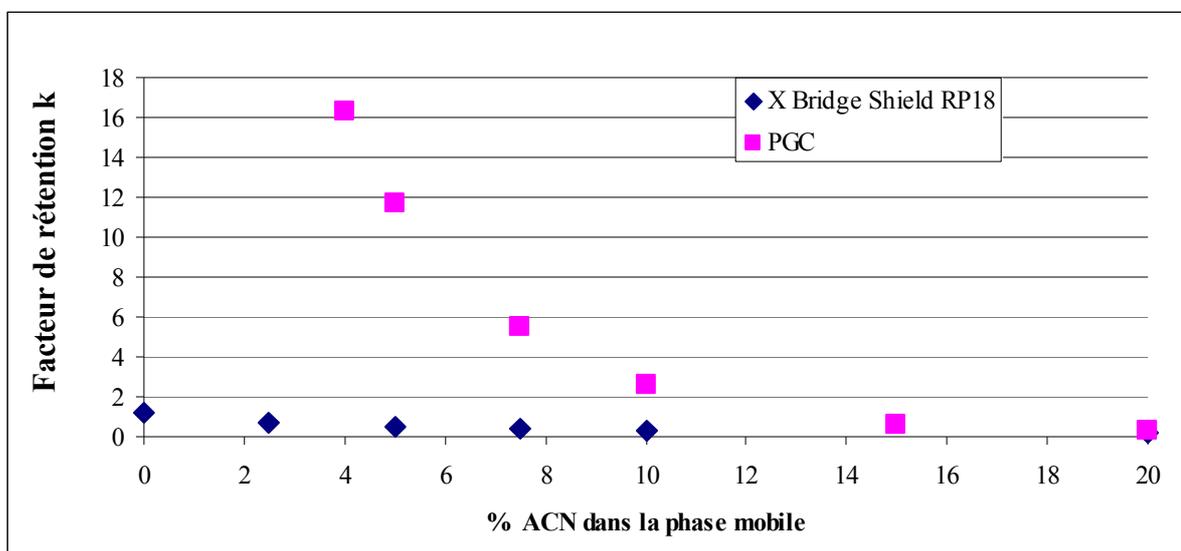


Figure III-2 : Evolution du facteur de rétention du THI en fonction de la composition de la phase mobile (acétonitrile / eau) sur la colonne XBridge Shield RP18 (3,5 μm , 4,6 x 150 mm) (◆) et sur la colonne Hypercarb PGC (5 μm , 4,6 x 100 mm) (■).

La complexité du caramel exclut l'injection directe de l'échantillon sur la colonne PGC car le risque de pollution irréversible par des molécules non éluées est important. Une séparation préalable sur une colonne chromatographique est nécessaire pour purifier l'échantillon et éliminer les molécules pouvant détériorer le PGC (polymères). Uniquement la fraction contenant le THI est alors injectée sur la colonne PGC pour finaliser la séparation : c'est le principe de la LC-2D « heart-cutting » ou LC-LC.

III.2.2 Choix des colonnes de première dimension

Pour obtenir une séparation du THI sans déformation du pic avec le système LC-2D « heart-cutting » en utilisant le PGC en seconde phase stationnaire, la séparation de première dimension doit se faire en milieu aqueux. Une préconcentration du soluté en tête de colonne sera alors observée permettant une diminution de la dilution de l'échantillon et une amélioration de la sensibilité de la méthode (II.2.2).

III.2.2.1 Première solution

Les méthodes d'analyse du THI publiées effectuent la purification « off-line » de l'échantillon par extraction sur phase solide sur des phases stationnaires échangeuses de cations, en utilisant le fait que le THI soit chargé positivement à pH acide ($pK_a = 3,5$, Figure III-1). Cette SPE peut être transformée en séparation chromatographique sur une colonne échangeuse de cations, permettant une purification plus sélective et plus efficace de la matrice et une automatisation de la méthode. De plus, la séparation par chromatographie d'échange d'ions utilise des tampons aqueux comme phase mobile, parfaitement compatible avec un système 2D utilisant le PGC comme seconde phase stationnaire.

La séparation de première dimension du système LC-LC est donc réalisée sur la colonne Polymer Laboratories SCX (8 μm , 150 x 4,6 mm), remplie d'une phase stationnaire macroporeuse à base de polystyrène-divinylbenzène avec des groupements sulfonates en surface. L'étude de la rétention du THI sur cette colonne en fonction du pH de la phase mobile composée de formiate d'ammonium 10 mM est présentée sur la Figure III-3.

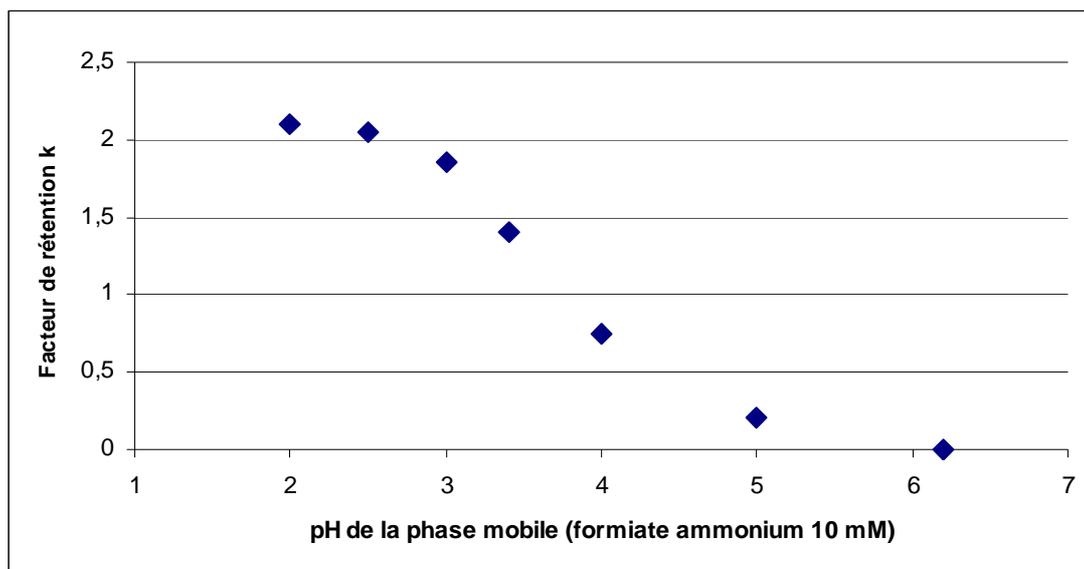


Figure III-3 : Influence du pH de la phase mobile (formiate d'ammonium 10 mM) sur la rétention du THI sur la colonne Polymer Laboratories SCX (8 μ m, 150 x 4,6 mm). Débit de la phase mobile : 0,7 mL/min. Acidifiant = acide formique.

Le pH de la phase mobile doit être inférieur à 3 pour obtenir la rétention maximale du THI ($k = 2,1$) sur la colonne échangeuse de cations. Ceci permet de fixer les conditions de phase mobile à utiliser sur la colonne SCX de première dimension. La rétention du THI est donc obtenue avec l'utilisation du formiate d'ammonium 10 mM acidifié à pH 2,5 par de l'acide formique comme phase mobile. Le rinçage de la colonne lors de l'injection de caramel est effectué par une solution de formiate d'ammonium 100 mM basifiée à pH 9 par de l'ammoniaque pour élué les molécules neutres ou anioniques à pH basique. Un second lavage à l'acétonitrile basifié par l'ammoniaque permet d'élué les molécules très hydrophobes. Les conditions du gradient d'élué sont résumées dans le Tableau III-1.

Tableau III-1 : Conditions du gradient d'éluion sur la colonne Polymer Laboratories SCX (8 μ m, 150 x 4,6 mm) pour la rétention du THI par chromatographie d'échange d'ions.

Temps (en min)	Débit (en mL/min)	% Formiate ammonium 10 mM pH 2,5	% Formiate ammonium 100 mM pH 9	% Acétonitrile pH 9	Commentaires
0	0,7	100	0	0	Séparation du THI
10	0,7	100	0	0	
11	2	0	100	0	Lavages de la colonne à haut débit
15	2	0	100	0	
16	2	0	30	70	
20	2	0	30	70	
21	2	100	0	0	Equilibrage de la colonne avec les conditions initiales
25	2	100	0	0	
26	0,7	100	0	0	
30	0,7	100	0	0	

L'analyse d'un échantillon de caramel sur cette colonne montre l'impossibilité de séparer sélectivement le THI des autres molécules du caramel en une seule dimension (Figure III-4). Il est donc nécessaire de séparer la fraction contenant le THI sur une deuxième colonne pour résoudre les problèmes de coélution.

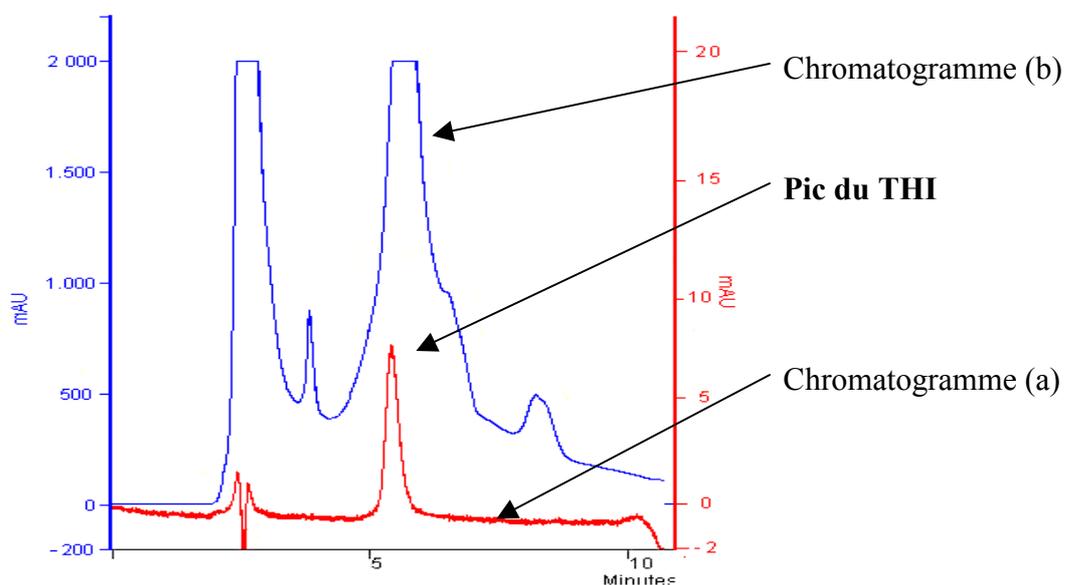


Figure III-4 : Séparation sur la colonne SCX (8 μ m, 150 x 4.6 mm). Conditions d'éluion du Tableau III-1. Longueur d'onde de détection : 287 nm. Débit de la phase mobile : 0,7 mL/min. Volume injecté : 20 μ L. Chromatogramme (a) : injection d'une solution de THI 1 ppm « zoomée » 100 fois. Chromatogramme (b) : injection d'un caramel de classe III dilué 10 fois dans l'eau.

La dimension de la colonne permet d'obtenir pour le THI un pic d'une largeur inférieure à 1 min. Un volume de collection de 0,7 mL est donc suffisant pour récupérer quantitativement le THI à la sortie de la colonne SCX (zone de prélèvement entre 5,5 et 6,5 min).

III.2.2.2 Deuxième solution

Le spectre UV du soluté d'intérêt ne permettant pas de conclure sur la sélectivité d'une méthode appliquée à un mélange complexe comme le caramel, une deuxième méthode de LC-LC utilisant un principe de rétention différent doit être développée. En conservant le PGC comme phase stationnaire de la deuxième dimension du système, le fait que la première séparation doit utiliser une phase mobile purement aqueuse pour mettre en œuvre la préconcentration en deuxième dimension, nous a conduit à envisager une première dimension en chromatographie à polarité des phases inversées sur une colonne de silice greffée C18 acceptant les phases mobiles 100 % aqueuse.

La colonne Aquasil C-18 de Thermo (5 μm , 4,6 x 150 mm), spécifiquement fabriquée (« end-capping » hydrophile) pour apporter une rétention plus importante des molécules polaires ainsi qu'une meilleure stabilité et un temps d'équilibrage plus court avec des conditions totalement aqueuses [7] a donc été expérimentée. Avec comme phase mobile de l'eau pure, le facteur de rétention du THI est de 2. Cette rétention est suffisante pour éliminer une grande partie des constituants du caramel qui sont élués au volume mort. Le lavage ultime de la colonne est réalisé par de l'acétonitrile pur. Le programme de phase mobile utilisé pour l'analyse du caramel est donné dans le Tableau III-2.

Tableau III-2 : Conditions d'élution sur la colonne Aquasil C-18 (5 μm , 4,6 x 150 mm) en chromatographie à polarités des phases inversées.

Temps (en min)	Débit (en mL/min)	% Eau	% Acétonitrile	Commentaires
0	0,7	100	0	Séparation du THI
10	0,7	100	0	
11	0,7	0	100	Lavage de la colonne
20	0,7	0	100	
21	0,7	100	0	Equilibrage de la colonne
30	0,7	100	0	

L'analyse sur la colonne Aquasil C-18 d'un échantillon de caramel dilué 10 fois (chromatogramme b de la Figure III-5) montre l'impossibilité de quantifier directement le THI. Son pic n'est pas visible dans le bruit de fond du caramel. La comparaison avec l'injection d'une solution de THI (chromatogramme a de la Figure III-5) montre que la collection et l'injection dans la deuxième dimension de la fraction comprise entre 5,3 et 6,3 min devraient permettre la séparation complète du THI.

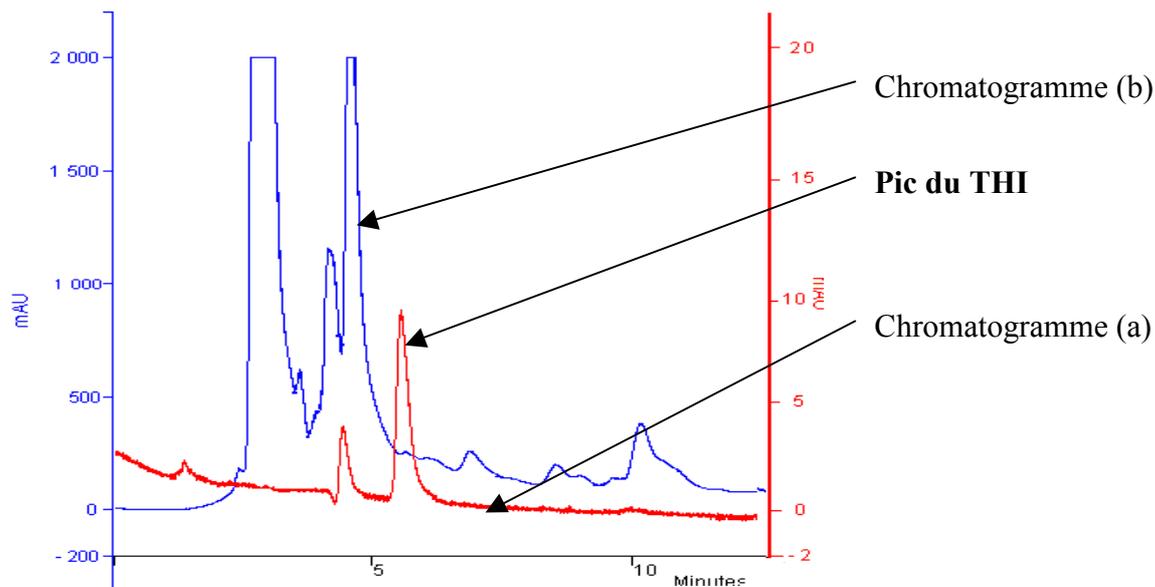


Figure III-5 : Séparation sur la colonne Aquasil C-18 (5 μm , 4,6 x 150 mm). Conditions d'élution du Tableau III-2. Débit de la phase mobile : 0,7 mL/min. Détection à 287 nm. Volume injecté : 20 μL . Chromatogramme (a) : injection d'une solution de THI 1 ppm « zoomée » 100 fois. Chromatogramme (b) : injection d'un caramel de classe III dilué 10 fois dans l'eau.

III.2.3 Volume maximal injectable sur la colonne PGC de seconde dimension

Pour espérer la séparation du THI des autres solutés collectés, la seconde dimension sur PGC fonctionne dans des conditions d'élution induisant une rétention assez importante du soluté d'intérêt : la phase mobile isocratique utilisée contient 10 % d'acétonitrile et 90 % d'eau, ce qui conduit à un facteur de rétention d'environ 3 pour le THI.

Quelle que soit la colonne utilisée en première dimension (colonne SCX ou colonne C18), la récupération quantitative du THI implique la collection de l'éluat sortant de la première dimension durant 1 min, si bien que le volume réinjecté sur la colonne PGC de

seconde dimension est de 0,7 mL. Dans le but de s'assurer que ce volume peut être injecté sur la colonne PGC sans élargissement de bande, des volumes de plus en plus grands (de 0,2 à 1,5 mL) de THI dissous soit dans le tampon formiate d'ammonium 10 mM ajusté à pH 2,5, soit dans l'eau pure, ont été injectés en suivant les variations de la hauteur du pic en fonction de sa surface (Figure III-6).

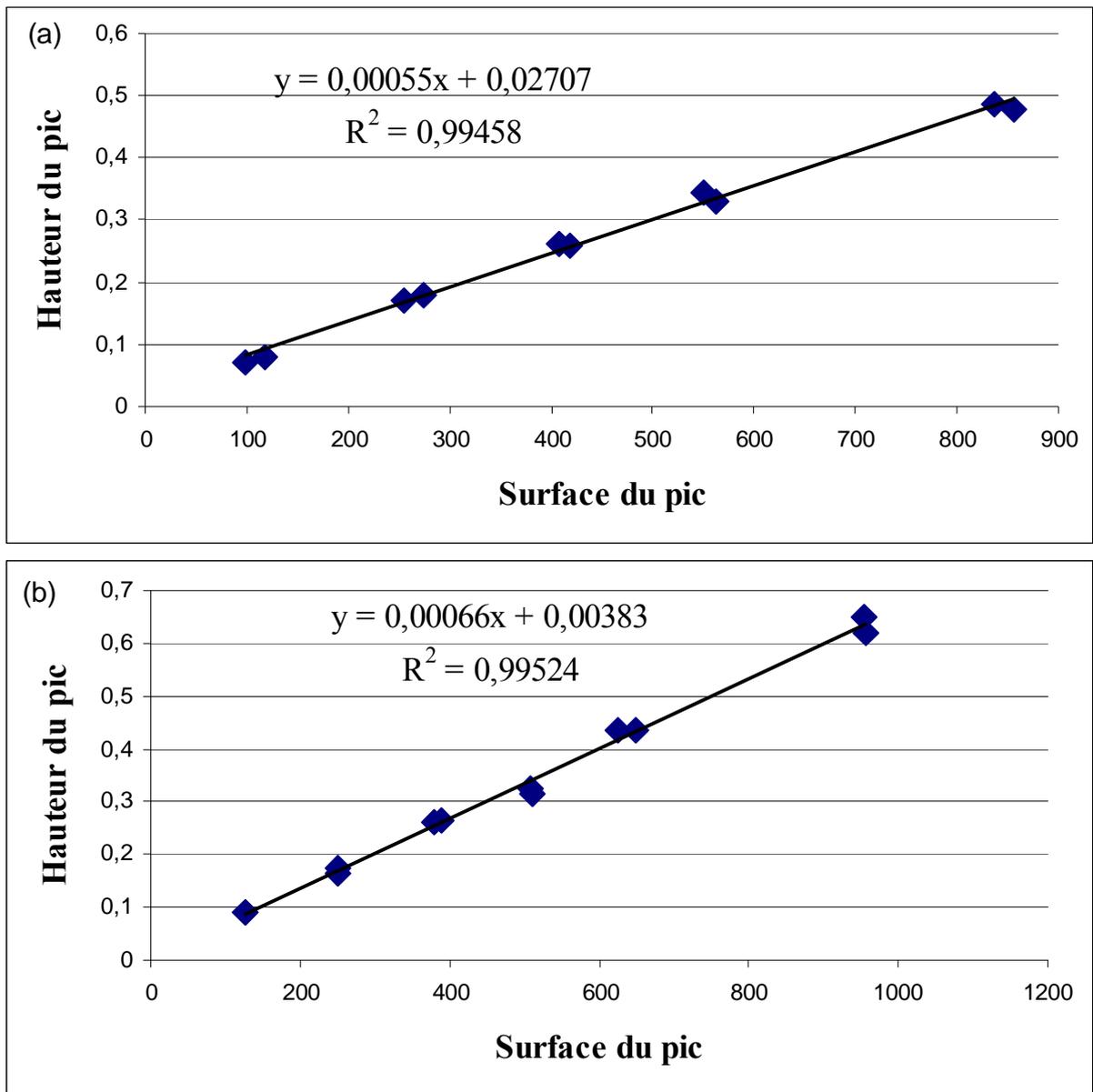


Figure III-6 : Influence du volume d'injection sur la colonne PGC (de 0,2 à 1,5 mL) : (a) THI dissout dans le formiate d'ammonium 10 mM acidifié par de l'acide formique à pH 2,5, correspondant à la fraction en sortie de la colonne SCX ; (b) THI dissout dans l'eau, correspondant à la fraction en sortie de la colonne C18.

Quel que soit le solvant de solubilisation du THI, la hauteur du pic augmente linéairement avec la surface du pic qui est directement proportionnelle au volume injecté. Ceci signifie qu'il n'y a pas d'élargissement de bande anormal, au moins jusqu'à l'injection de 1,5 mL. L'injection sur la colonne PGC de la fraction de 0,7 mL contenant le THI et éluée soit de la colonne SCX, soit de la colonne C18, est donc tout à fait possible sans risque de dégradation de la séparation.

III.2.4 Application des méthodes LC-LC aux caramels

Le dispositif et le protocole expérimental utilisés sont donnés dans l'annexe 1. Les méthodes LC-LC appliquées sont les méthodes SCX-PGC et C18-PGC. Les modes chromatographiques mis en œuvre en première dimension sont a priori complètement différents. Il s'agit, respectivement, d'échange de cations avec le programme d'élution donné par le Tableau III-1 et de chromatographie à polarités des phases inversées avec les conditions de phase mobile décrites dans le Tableau III-2. Dans les deux cas, la fraction collectée en sortie de première dimension est séparée en seconde dimension sur la colonne PGC éluee avec une phase mobile acétonitrile/eau 10/90 à un débit de 0,7 mL/min. La longueur d'onde de détection est fixée à 287 nm.

La zone collectée correspond à l'intervalle $[t_{R,THI} - 0,5 \text{ min}, t_{R,THI} + 0,5 \text{ min}]$ où $t_{R,THI}$ est le temps de rétention du THI dans la première dimension. Ce temps est régulièrement vérifié (toutes les 15 analyses) par la réalisation de 4 injections successives d'une solution standard de THI à 1 ppm. Les résultats obtenus par les deux méthodes, SCX-PGC et C18-PGC, sont représentés sur la Figure III-7. Dans chaque cas, les trois chromatogrammes superposés correspondent à l'injection d'une solution standard de THI à 2 ppm (chromatogramme a), d'un échantillon de caramel (chromatogramme b) et du même échantillon de caramel dopé avec 50 ppm de THI (chromatogramme c).

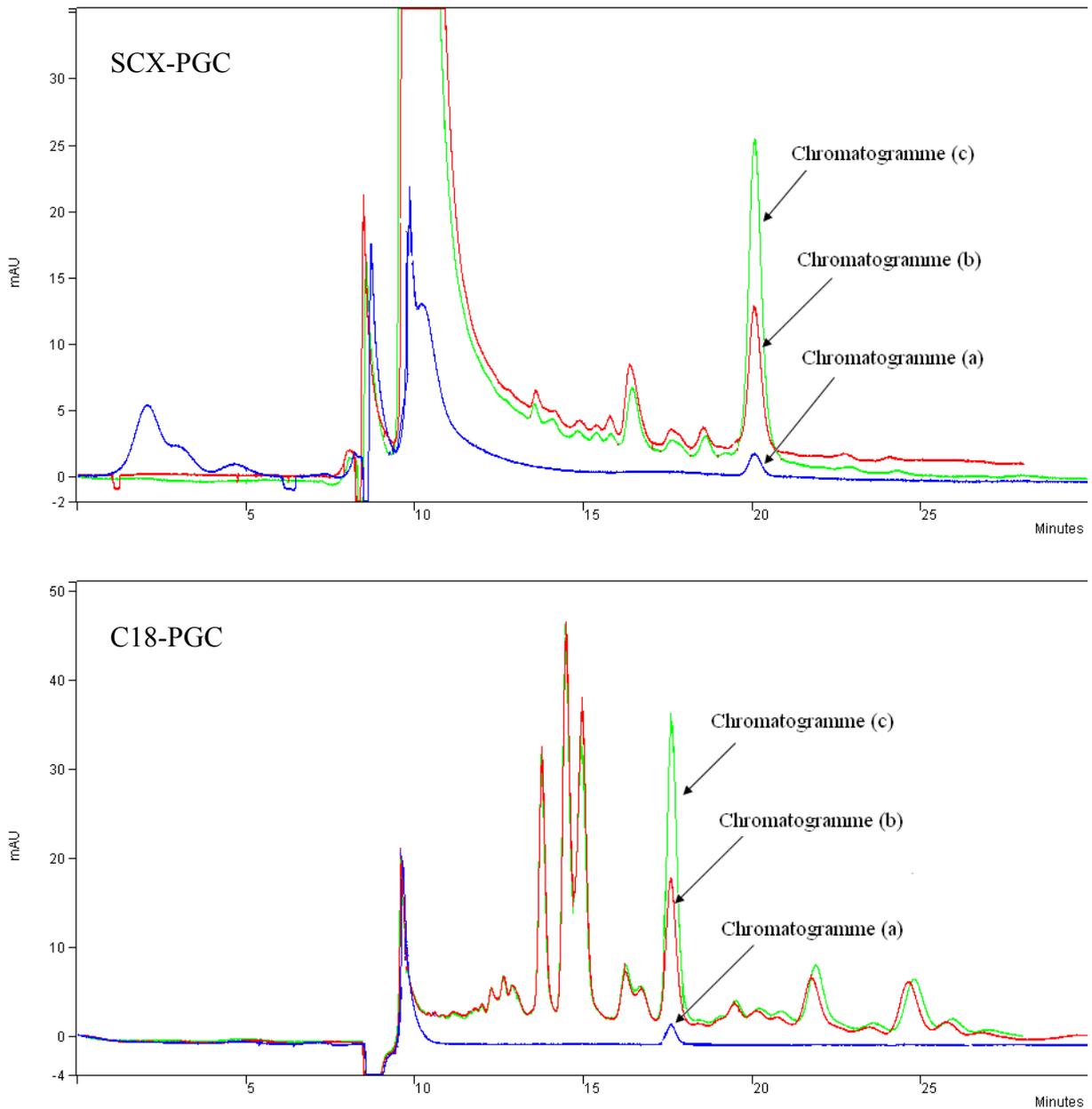


Figure III-7 : Chromatogrammes obtenus avec la méthode SCX-PGC (en haut) et la méthode C18-PGC (en bas). Chromatogramme (a) : Analyse d'une solution de THI à 2 ppm ; Chromatogramme (b) : Analyse d'un échantillon de caramel, dilué 10 fois ; Chromatogramme (c) : Analyse du même échantillon de caramel dopé à 50 ppm en THI, dilué 10 fois. Volume injecté : 20 μ L. Débit de la phase mobile : 0,7 mL/min. Longueur d'onde de détection : 287 nm.

Avec les deux méthodes, la séparation du THI obtenue est suffisante pour mesurer la surface du pic et quantifier la molécule (les pics voisins sont assez éloignés pour observer un retour à la ligne de base de part et d'autre du pic de THI). L'augmentation de la surface du pic correspondant au THI est observée lors de l'ajout du soluté dans un caramel.

Pour l'échantillon de caramel, les chromatogrammes obtenus avec les deux méthodes diffèrent totalement. Ce résultat était attendu compte tenu de l'orthogonalité des deux modes de séparation utilisés en première dimension. Cette remarque est importante pour discuter de la sélectivité des méthodes proposées qui sera étudiée après leur validation par les profils d'exactitude.

III.3 Validation des méthodes SCX-PGC et C18-PGC par les profils d'exactitude

Le protocole de validation par les profils d'exactitude de la SFSTP est utilisé pour déterminer la performance des deux méthodes. La norme européenne impose une teneur maximale en THI dans les caramels colorants de classe III de 10 ppm. Le domaine de validation choisi s'étend donc, pour encadrer cette norme, de 5 à 50 ppm en THI dans le caramel pur. Le facteur de dilution étant de 10, la teneur en THI dans les solutions analysées s'étend de 0,5 à 5 ppm.

Chaque jour et pendant trois jours, une gamme d'étalonnage (étalons externes EE) et une gamme de validation (ajouts dosés AD sur un caramel colorant de classe III) sont analysées respectivement deux fois et trois fois pour étudier la répétabilité intra-jour et inter-jour de la méthode. Les variations de la surface du pic de THI en fonction de la concentration en THI (avant dilution au dixième) sont présentées sur la Figure III-8(a) pour la méthode SCX-PGC et sur la Figure III-8(b) pour la méthode C18-PGC.

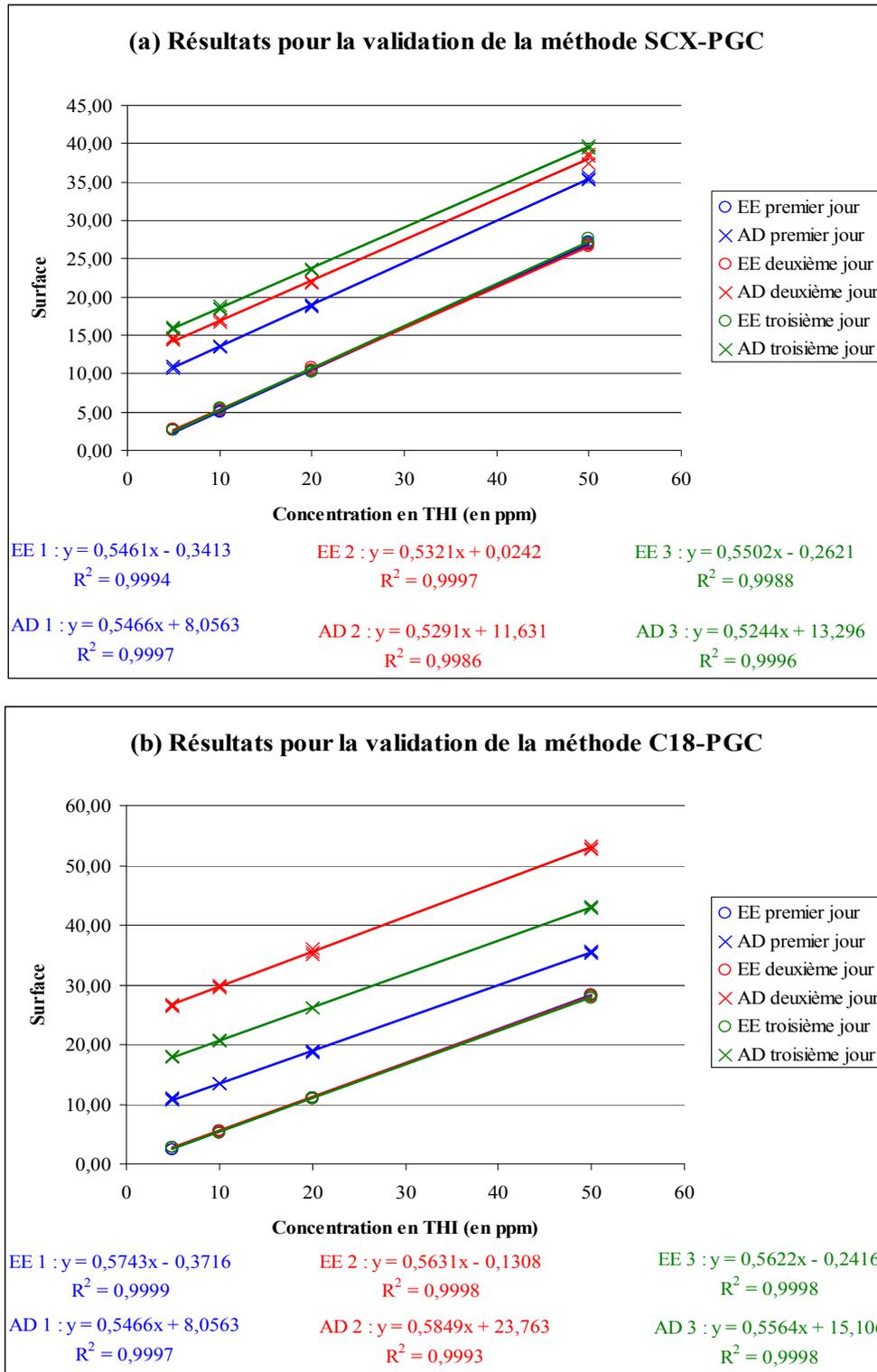


Figure III-8 : Représentation graphique des résultats pour la validation des méthodes SCX-PGC (a) et C18-PGC (b) : surface du pic de THI en fonction de la concentration en THI dans le caramel non dilué. Bleu : résultats du premier jour de validation ; Rouge : résultats du second jour de validation ; Vert : résultats du troisième jour de validation. O : points d'étalonnage (étalonnage externe EE) ; X : points de validation (ajouts dosés AD).

Pour les deux méthodes, les résultats des gammes d'étalonnage (EE) sont tout à fait superposables, quel que soit le jour de l'analyse. Les gammes de validation (AD) donnent, quant à elles, des résultats différents suivant le jour et suivant la méthode puisque les caramels utilisés pour les ajouts dosés ne sont pas les mêmes. Les droites obtenues pour les gammes d'étalonnage et les gammes de validation sont tout à fait parallèles, ce qui permet de démontrer l'absence d'effet de matrice.

Ces résultats des analyses effectuées dans les conditions définies par le protocole SFSTP permettent de calculer le biais et la fidélité à chaque niveau de concentration à partir des prédictions inverses (calculées à partir des résultats de validation en utilisant la courbe d'étalonnage).

Le biais (écart entre la moyenne des résultats et la concentration réelle ajoutée) est représentatif de l'erreur systématique de chaque mesure. Pour les deux méthodes d'analyse et les quatre points de concentration étudiés, le biais ne dépasse pas les 11 % (Tableau III-3). La signification de ce biais dépend de la fidélité des résultats obtenus.

La répétabilité intra-jour et inter-jour (jours et caramels différents) sont inférieures à 5 % pour toutes les concentrations des deux méthodes d'analyse (Tableau III-3). La fidélité de ces méthodes (représentatif de l'erreur aléatoire de la mesure) est donc inférieure à 7 % pour tout le domaine de concentration étudiée.

Ces valeurs permettent ensuite de calculer les limites basse et haute du domaine d'exactitude (représentant 90 % des résultats) de chaque méthode à chaque concentration étudiée (Tableau III-3). Comme le domaine d'exactitude englobe pour chaque méthode et chaque concentration la valeur 0, le biais n'est donc pas significativement différent de 0.

Tableau III-3 : Résultats de l'étude de validation par les profils d'exactitude des méthodes LC-LC pour le dosage du THI dans les caramels colorants de classe III. (a) Méthode SCX-PGC ; (b) Méthode C18-PGC.

(a)

Teneur en THI	Prédictions inverses			Moyenne	Biais (%)
	Jour 1	Jour 2	Jour 3		
5 ppm	5,45	5,13	5,12	5,52	10,34
	5,92	5,45	5,35		
	6,11	5,58	5,54		
10 ppm	10,70	10,01	9,92	10,20	1,97
	10,41	9,61	9,83		
	10,70	9,95	10,64		
20 ppm	20,59	19,27	19,24	19,61	-1,97
	20,44	19,01	19,02		
	20,11	19,33	19,44		
50 ppm	50,66	48,49	48,06	49,59	-0,82
	50,35	50,76	48,61		
	51,26	50,16	47,97		
Teneur en THI	Ecart type relatif de répétabilité intra-jour (%)	Ecart type relatif de répétabilité inter-jour (%)	Ecart type relatif de fidélité (%)	Domaine d'exactitude	
				Limite inférieure	Limite supérieure
5 ppm	4,72	4,87	6,78	-10,49	31,18
10 ppm	2,71	3,71	4,59	-14,31	18,25
20 ppm	1,06	3,43	3,59	-19,45	15,52
50 ppm	1,33	2,59	2,91	-11,20	9,57

(b)

Teneur en THI	Prédictions inverses			Moyenne	Biais (%)
	Jour 1	Jour 2	Jour 3		
5 ppm	5,18	5,32	5,49	5,36	7,24
	5,39	5,47	5,43		
	5,44	4,93	5,61		
10 ppm	10,19	11,17	10,29	10,66	6,60
	11,57	10,86	10,66		
	10,61	10,42	10,17		
20 ppm	21,79	20,97	19,97	20,87	4,36
	21,46	21,87	19,91		
	21,65	20,22	20,00		
50 ppm	51,01	52,10	50,24	51,15	2,29
	51,99	52,79	49,69		
	50,91	51,53	50,06		
Teneur en THI	Ecart type relatif de répétabilité intra-jour (%)	Ecart type relatif de répétabilité inter-jour (%)	Ecart type relatif de fidélité (%)	Domaine d'exactitude	
				Limite inférieure	Limite supérieure
5 ppm	3,14	2,57	4,06	-5,17	19,65
10 ppm	4,19	2,33	4,79	-6,84	20,04
20 ppm	1,66	4,05	4,38	-11,33	20,05
50 ppm	0,98	2,11	2,33	-6,04	10,62

Les résultats du tableau précédent permettent de tracer les profils d'exactitude pour chaque méthode (Figure III-9 (a) pour la méthode SCX-PGC et Figure III-9 (b) pour la méthode C18-PGC).

La simple lecture des graphiques permet de déterminer le domaine de concentration où la méthode répond aux critères fixés initialement : limite d'acceptation de 20 % et probabilité de résultats bons supérieure à 90 %.

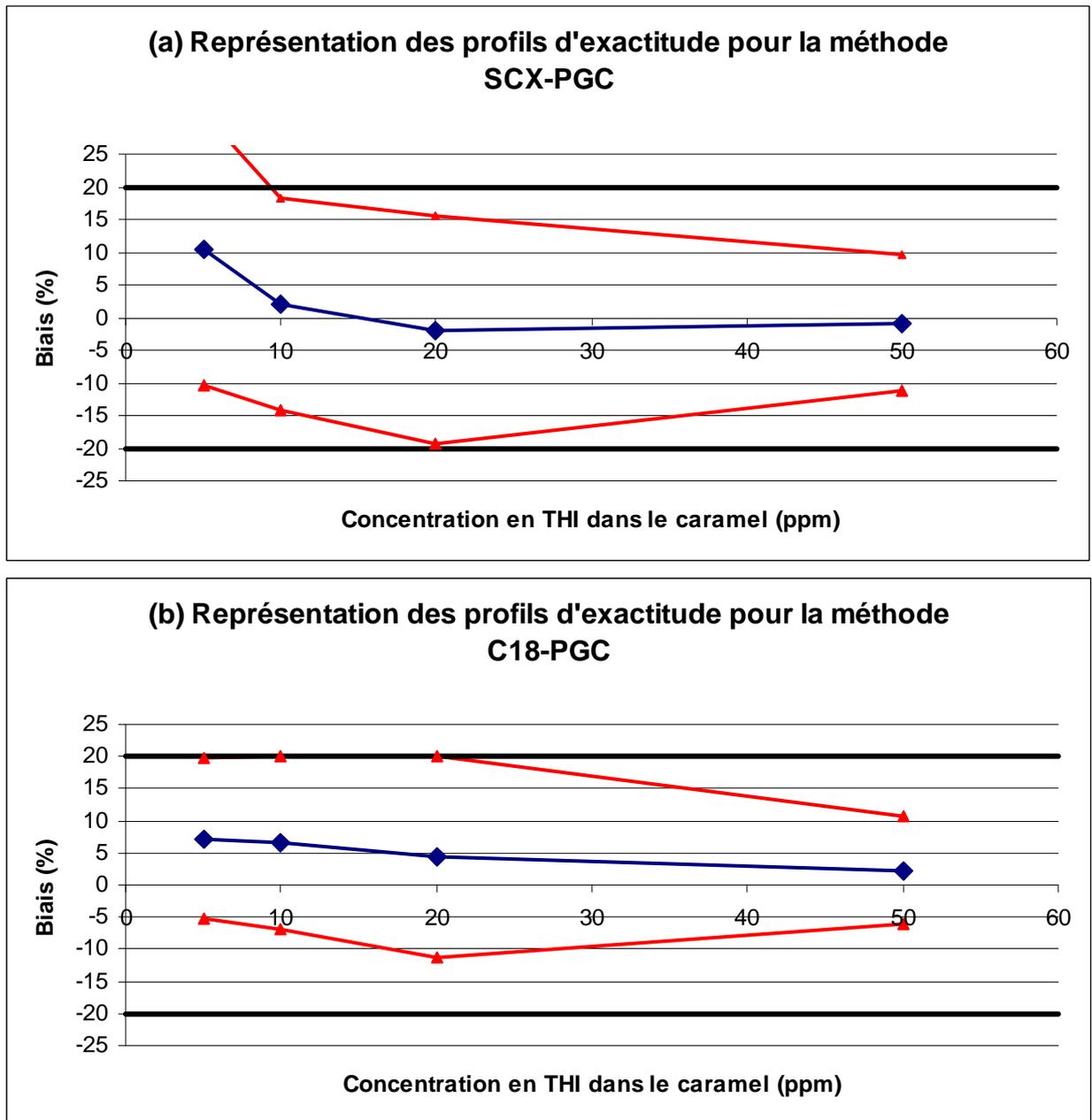


Figure III-9 : Représentation des profils d'exactitude de la méthode (a) SCX-PGC et (b) C18-PGC. ◆ : Evolution du biais ; ▲ : Evolution des limites basse et haute du domaine d'exactitude ; — : Limite du domaine de validité ($\pm 20\%$).

La méthode SCX-PGC est valide pour le domaine de concentration de 10 à 50 ppm en THI dans le caramel pur alors que la méthode C18-PGC répond aux critères pour le domaine 5 à 50 ppm. Le biais et la fidélité obtenues sur la méthode SCX-PGC à 5 ppm empêchent d'avoir 90 % des résultats à moins de 20 % de la valeur vraie. Ces valeurs élevées peuvent être dues à l'influence plus importante du bruit de fond à faible concentration ou à une coélution qui implique une erreur sur la mesure.

III.4 Etude de la sélectivité des méthodes

L'utilisation de la détection UV-Visible à l'aide d'un spectrophotomètre à barrette de diodes ne permet pas de s'assurer de la sélectivité des méthodes pour l'analyse du THI dans les caramels. Compte tenu de la similarité des spectres obtenus pour les pics voisins (solutés vraisemblablement très proches en structure), il est en effet impossible d'affirmer que le pic chromatographique utilisé pour quantifier le THI est pur.

Les deux méthodes d'analyse développées et validées précédemment utilisent des séparations en première dimension qui peuvent être considérées comme orthogonales : une chromatographie d'interactions hydrophobes pour la méthode C18-PGC et une chromatographie d'échange d'ions pour la méthode SCX-PGC. Les fractions récupérées en sortie de première dimension sont donc forcément différentes, ce que confirme l'allure des chromatogrammes obtenus pour leur séparation sur PGC (Figure III-7).

Afin de vérifier la sélectivité de chacune de ces méthodes pour le dosage du THI, elles ont été appliquées parallèlement à 10 caramels colorants de classe III choisis au hasard. La Figure III-10 montre la bonne corrélation entre les résultats obtenus avec les deux méthodes (pente de la droite de corrélation proche de 1).

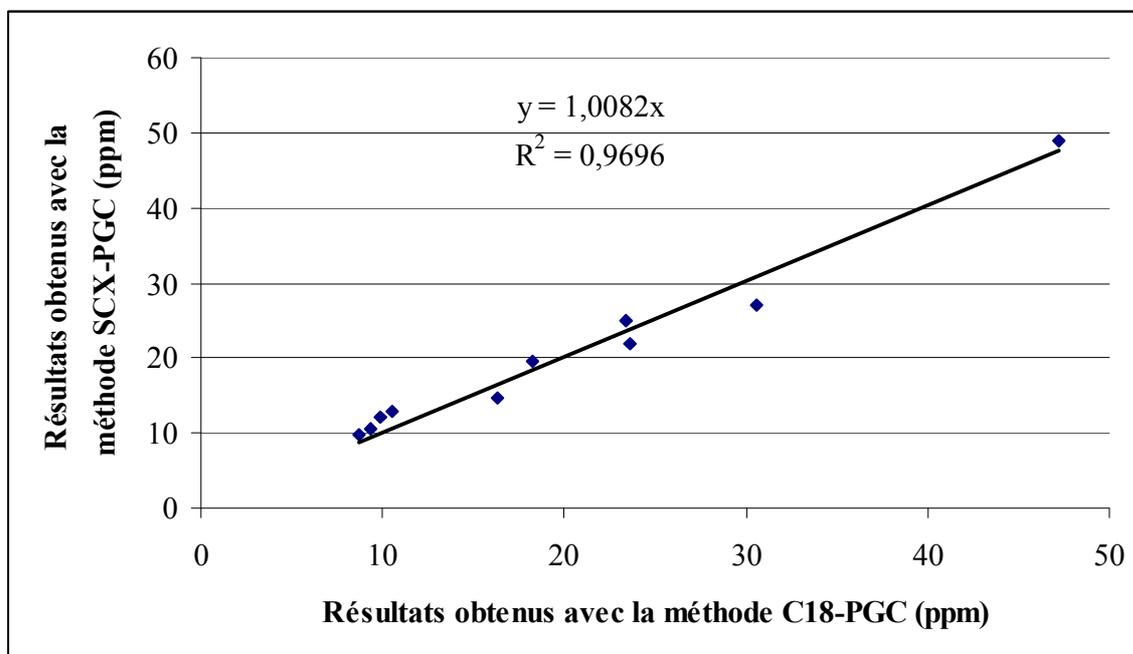


Figure III-10 : Comparaison des concentrations de THI déterminées avec les méthodes C18-PGC et SCX-PGC sur des caramels commerciaux.

Le Tableau III-4 montre que les différences entre les valeurs obtenues par chacune des méthodes sont inférieures à 20 % (domaine de validité des méthodes) et réparties aléatoirement autour de 0. Les teneurs calculées ne sont donc pas significativement différentes.

Tableau III-4 : Comparaison des résultats de l'analyse de 10 caramels différents par les méthodes C18-PGC et SCX-PGC.

Numéro du caramel	Teneur avec la méthode C18-PGC (en ppm)	Teneur avec la méthode SCX-PGC (en ppm)	Pourcentage de différence (%)
1	10,5	12,8	19,74
2	16,3	14,7	-10,32
3	18,2	19,5	6,90
4	23,4	25,1	7,01
5	23,6	21,9	-7,47
6	30,6	27,1	-12,13
7	47,2	49	3,74
8	9,3	10,5	12,12
9	8,7	9,9	12,90
10	9,9	12	19,18

Les deux méthodes peuvent donc être considérées comme sélectives. Il faut enfin noter que, parmi les échantillons de caramels analysés, peu d'entre eux satisfont à la norme européenne en THI de 10 ppm.

Conclusion

Les deux méthodes développées, SCX-PGC et C18-PGC, permettent de doser le THI dans les caramels colorants de classe III (utilisant l'ammoniaque comme promoteur de caramélisation) après une simple dilution dans l'eau. Ces méthodes simples et rapides permettent d'obtenir une quantification fiable (90 % des réponses à moins de 20 % de la valeur vraie) du THI dans le domaine de concentration 10-50 ppm pour la méthode SCX-PGC et 5-50 ppm pour la méthode C18-PGC, avec, dans les deux cas, un temps d'analyse de 30 min.

Références bibliographiques

1. Klejdus, B.; Moravcová, J.; Lojková, L.; Vacek, J.; Kubán, V., Solid-phase extraction of 4(5)-methylimidazole (4MeI) and 2-acetyl-4(5)-(1,2,3,4-tetrahydroxybutyl)-imidazole (THI) from foods and beverages with subsequent liquid chromatographic-electrospray mass spectrometric quantification. *Journal of Separation Science* **2006**, 29, (3), 378-384.
2. Kroplien, U., Quantitative analysis of 2-acetyl-4(5)-tetrahydroxybutylimidazole. *Journal of Chromatography A* **1986**, 362, 286-290.
3. Hennion, M.-C., Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **1999**, 856, (1-2), 3-54.
4. Lawrence, J. F.; Charbonneau, C. F., Direct method for the determination of 2-acetyl-4(5)-tetrahydroxy-butylimidazole in caramel colours and beers by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **1987**, 407, 405-407.
5. Klejdus, B.; Moravcová, J.; Kubán, V., Reversed-phase high-performance liquid chromatographic/mass spectrometric method for separation of 4-methylimidazole and 2-acetyl-4-(1,2,3,4-tetrahydroxybutyl)imidazole at pg levels. *Analytica Chimica Acta* **2003**, 477, (1), 49-58.
6. Lojková, L.; Klejdus, B.; Moravcová, J.; Kubán, V., Supercritical fluid extraction (SFE) of 4(5)-methylimidazole (4-MeI) and 2-acetyl-4(5)-(1,2,3,4)-tetrahydroxybutyl-imidazole (THI) from ground-coffee with high-performance liquid chromatographic-electrospray mass spectrometric quantification (HPLC/ESI-MS). *Food Additives & Contaminants* **2006**, 23, (10), 963-973.
7. Majors, R. E.; Przybyciel, M., Columns for Reversed-Phase LC Separations in Highly Aqueous Mobile Phases. *LCGC* **2002**, 20, (7), 584.

Chapitre IV :

Analyse du 4-méthylimidazole (4MeI)

dans les caramels colorants

de classe III et IV

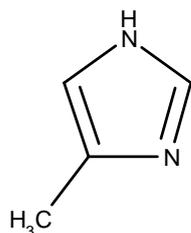
Introduction

La fabrication de caramel colorant utilisant l'ammoniaque ou un sel d'ammonium comme promoteur de caramélisation conduit à la formation de composés nocifs pour l'homme, comme le 4-méthylimidazole (4MeI). Des études toxicologiques ont montré que cette molécule est un agent de convulsion (cf 1.2.3). La Commission Européenne a donc fixée à 250 ppm la teneur maximale tolérée de 4MeI dans le caramel. Cette molécule, également retrouvée dans le café [1] ou dans les fumées de cigarettes [2], est aussi utilisée comme intermédiaire de réaction, dans le domaine pharmaceutique par exemple.

Ce chapitre présente l'étude bibliographique de l'analyse du 4MeI. La quantification de ce soluté dans le caramel est ensuite étudiée en comparant une méthode de dosage par chromatographie en phase gazeuse mise au point auparavant par l'entreprise et une nouvelle méthode utilisant la chromatographie en phase liquide à deux-dimensions. Après validation des deux méthodes par les profils d'exactitude, la comparaison des résultats de quantification sur quelques caramels permet de vérifier leur sélectivité.

Les appareils utilisés pour le dosage du 4MeI dans le caramel sont présentés en annexe 2.

IV.1 Bibliographie sur l'analyse du 4MeI



Log P_{octanol/eau} : 0,3

pKa : 7,7

Figure IV-1 : Formule développée et caractéristiques physico-chimiques du 4MeI

Le 4MeI est un dérivé de l'imidazole et a un pKa de 7,7 (Figure IV-1). Cette molécule à caractère basique est donc sous forme ionisée à pH acide et sous forme moléculaire à pH basique.

Les méthodes publiées de quantification du 4MeI dans les matrices agroalimentaires (café, caramel colorant, bières...) utilisent soit la chromatographie en phase gazeuse, soit la chromatographie en phase liquide.

IV.1.1 Dosage par chromatographie en phase gazeuse

Avant la séparation chromatographique, le 4MeI doit être isolé de la matrice. Fuchs et Sundell [3] ont extrait le soluté du caramel colorant par trois extractions liquide-liquide successives : extraction par solvant (chloroforme) de la fraction basique du caramel, puis contre-extraction des molécules basiques par de l'acide sulfurique dilué, avant une nouvelle extraction par le chloroforme de l'extrait précédent basifié (rendement proche de 100 %). L'extraction du 4MeI par un solvant organique se fait obligatoirement en milieu basique pour que la molécule ne soit pas ionisée.

Wilks *et al.* [4] récupère le 4MeI du caramel par extraction liquide-liquide sur support solide. La matrice est mélangée à de la soude pour neutraliser le 4MeI, puis un ajout de Célite 545 permet d'absorber l'eau et d'augmenter la surface spécifique de l'échantillon. Le dichlorométhane est ensuite utilisé pour extraire quantitativement le 4MeI (rendement de 100 %). Plus récemment, l'extraction du 4MeI contenu dans le caramel [5] ou dans le café [1] est effectuée par extraction d'appariement d'ions avec le bis-2-ethylhexyl-phosphate (BEHPA) dans le chloroforme.

La séparation du 4MeI par chromatographie en phase gazeuse est faite soit directement sur des colonnes de phase stationnaire polaire [4, 6], soit après dérivation par l'anhydride acétique [3] ou l'isobutylchloroformate [1, 5] sur des colonnes de phase

stationnaire apolaire. L'utilisation du 2-méthylimidazole comme standard interne est très répandue [3, 4] car, bien que sa structure chimique soit très proche du soluté d'intérêt (isomère de position), cette molécule est séparée du 4MeI et n'est pas présente dans la matrice initiale. La détection se fait principalement par spectrométrie de masse en mode SIM (Single Ion Monitoring) et la limite de quantification est inférieure à 1 ppm.

IV.1.2 Dosage par chromatographie en phase liquide

L'analyse du 4MeI nécessite une préparation d'échantillon pour purifier la matrice. En 1981, Thomsen et Willumsen [7] extraient le 4MeI du caramel par extraction d'appariement d'ions avec le BEHPA dans le chloroforme (rendement de 75 %). Cette extraction est suivie d'une séparation par chromatographie d'appariement d'ions sur une colonne de phase stationnaire apolaire en utilisant le dodecanesulfonate de sodium comme contre-ion. La limite de détection obtenue est de 4 ppm.

Plus récemment, deux méthodes de dosage simultané du THI et du 4MeI par HPLC ont été publiées : la première [8, 9] utilise l'extraction en phase solide sur une cartouche échangeuse de cations forte en milieu acide, suivie d'une séparation en milieu basique sur une colonne de phase stationnaire apolaire ; la seconde [10] extrait le 4MeI du café par le dioxyde de carbone supercritique et l'analyse est réalisée en mode HILIC sur une colonne de phase stationnaire polaire. Le rendement d'extraction est proche de 100 % pour les deux méthodes et les limites de détection sont de 0,3 ppm en détection spectrophotométrique à 215 nm et de 7 ppb en détection par spectrométrie de masse dans le caramel.

IV.1.3 Conclusion

Les méthodes publiées pour l'analyse du 4MeI dans les caramels colorants utilisent des protocoles d'extraction qui ne sont pas couplés directement avec la méthode de séparation chromatographique. Nous souhaitons donc développer une nouvelle méthode rapide et automatisée, basée sur la chromatographie en phase liquide et permettant d'alléger la préparation d'échantillon. Cette méthode de quantification sera validée par les profils d'exactitude avec des critères de performance fixés et sera utilisée pour le suivi de la réaction de caramélisation et le contrôle qualité des produits finis.

La méthode de dosage par chromatographie en phase gazeuse employée par l'entreprise sera également validée pour s'assurer de la sélectivité des méthodes d'analyse par comparaison de leurs résultats.

IV.2 Validation de la méthode de dosage par chromatographie en phase gazeuse

Actuellement, le dosage du 4MeI dans le caramel est effectué par l'entreprise avec une méthode issue de l'association de deux méthodes déjà publiées : l'extraction semi-sèche selon Wilks *et al.* [4] et la dérivation par l'anhydride acétique avant l'analyse par GCMS de Fuchs et Sundell [3].

IV.2.1 Présentation du protocole d'analyse

Tout d'abord, pour améliorer les résultats de quantification, un ajout de standard interne est nécessaire. Ce standard interne doit avoir le même comportement que le 4MeI lors de l'extraction, doit être absent de la matrice et séparé chromatographiquement du soluté recherché. Un isomère de position du 4MeI est donc choisi : le 2-méthylimidazole.

La méthode d'analyse utilise l'extraction semi-sèche du caramel par le dichlorométhane mise au point par Wilks *et al.* [4]. Cette extraction nécessite une basification du caramel pour neutraliser le 4MeI ($pK_a = 7,7$) et le rendre soluble dans un solvant organique. 3 g de soude 3N sont donc mélangés à 5 g de caramel. Le standard interne est ajouté au caramel ainsi que 10 g de Célite 545 qui permettent d'assécher l'échantillon et d'améliorer le rendement d'extraction en augmentant la surface spécifique de l'échantillon.

Ce mélange est alors extrait à chaud par du dichlorométhane avec le système d'extraction liquide-solide de Büchi. L'immersion de l'échantillon dans le solvant chaud dure 20 min, puis un rinçage de l'échantillon pendant 40 min permet de récupérer quantitativement le 4MeI. Le dichlorométhane est alors évaporé et l'extrait sec est repris par 1 mL d'anhydride acétique. Cette solubilisation permet de dériver l'imidazole pour former le 4-méthylimidazole acétylé [3] qui est un composé plus volatil.

La séparation de l'extrait acétylé est effectuée par chromatographie en phase gazeuse (HP 6890) avec une injection à 240 °C en mode split avec un ratio de 30 pour 1. La colonne capillaire utilisée est une colonne HP5MS (colonne apolaire composée de (5%)-phényle-(95%)-méthylpolysiloxane, de 30 m de longueur, 250 μm de diamètre interne et 0,25 μm d'épaisseur de film). La température est fixée à 75 °C pendant 10 min pour séparer correctement les deux imidazoles (Figure IV-2). Une montée en température

rapide à 320 °C permet ensuite l'éluion des molécules les moins volatiles et un nettoyage de la colonne.

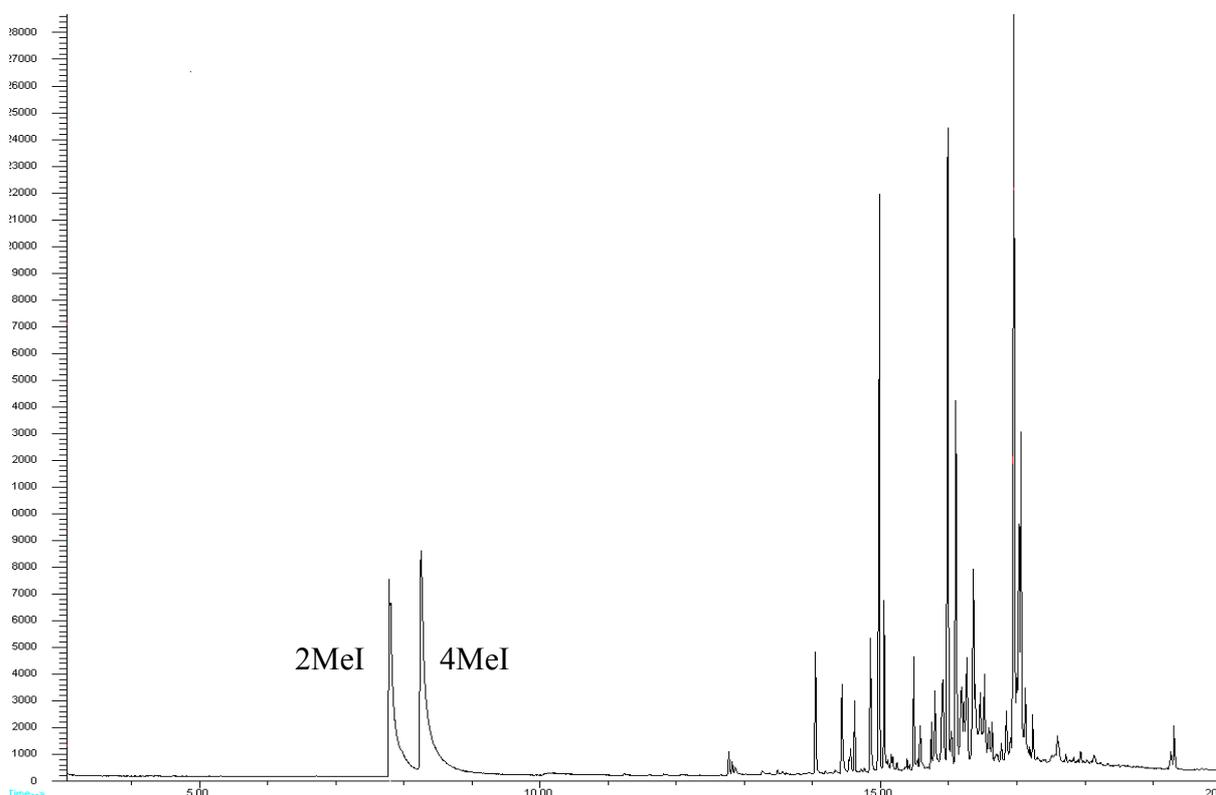


Figure IV-2 : Chromatogramme de la séparation du 2MeI et du 4MeI par GCMS. Conditions de séparation décrite en IV.2.1. Volume d'injection : 2 µL. Split 30 pour 1.

La détection est effectuée par spectrométrie de masse (HP5972) avec une ionisation par impact électronique et une détection en mode SIM positif aux masses 54, 81 et 124 (pic de l'ion moléculaire) (Figure IV-3).

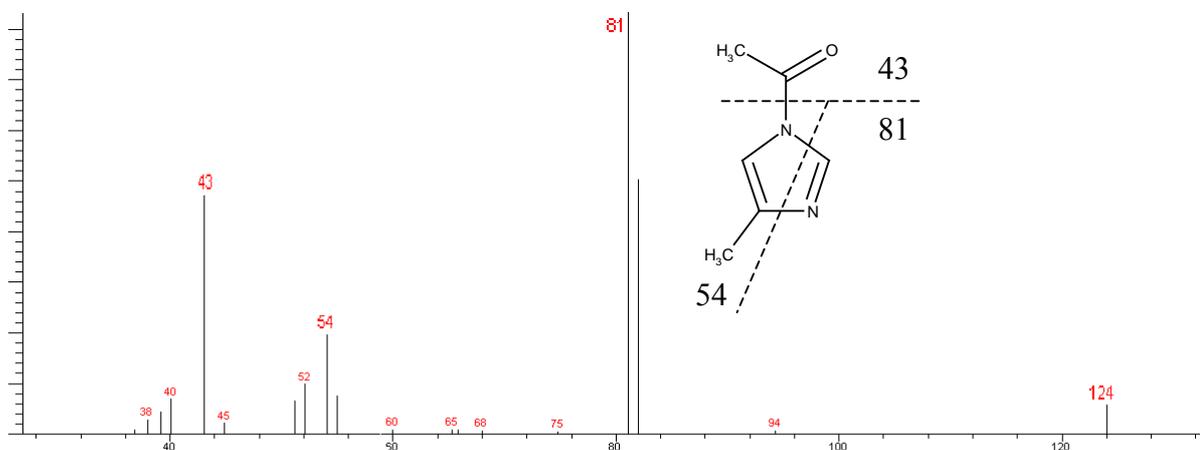


Figure IV-3 : Spectre de masse du 4MeI et du 2MeI.

IV.2.2 Résultats de la validation par les profils d'exactitude

Les performances de cette méthode de quantification du 4MeI par chromatographie en phase gazeuse sont étudiées pour la validation par les profils d'exactitude. La teneur maximale de 4MeI dans le caramel autorisée par la norme européenne est de 250 ppm. Des analyses sur des caramels colorants de classe III et IV ont montré une teneur en 4MeI comprise généralement entre 50 et 150 ppm. L'extracteur Büchi utilisé dispose de 4 postes. Les gammes d'étalonnage et de validation comprendront donc 4 points : 25, 50, 100 et 200 ppm dans le caramel pur (25, 50, 100 et 200 μ L d'une solution de 4MeI à 5000 ppm dans l'eau déposés dans 5 g de caramel).

Le standard interne est ajouté à une concentration de 100 ppm (100 μ L d'une solution de 2MeI à 5000 ppm dans l'eau déposés dans les 5 g de caramel). Pour tracer la fonction de réponse (échantillons d'étalonnage), les 5 g de caramel sont remplacés par 2 mL d'eau, ce qui correspond environ à la fraction aqueuse des 5 g de caramel.

La validation par les profils d'exactitude nécessite trois jours d'analyse. Chaque jour, une série d'extractions de matrice aqueuse et une série d'extraction de caramel colorant, de classe III ou IV, sont effectuées. La gamme d'étalonnage issue des extractions de matrice aqueuse est analysée deux fois par GCMS et la gamme de validation issue des extractions de caramel est analysée trois fois. Entre les différents jours, les ajouts dosés de la gamme de validation sont effectués sur des caramels différents.

Les résultats obtenus sont représentés par le tracé du rapport de la surface du pic du 4MeI à la surface du pic du 2MeI en fonction du rapport des concentrations (Figure IV-4).

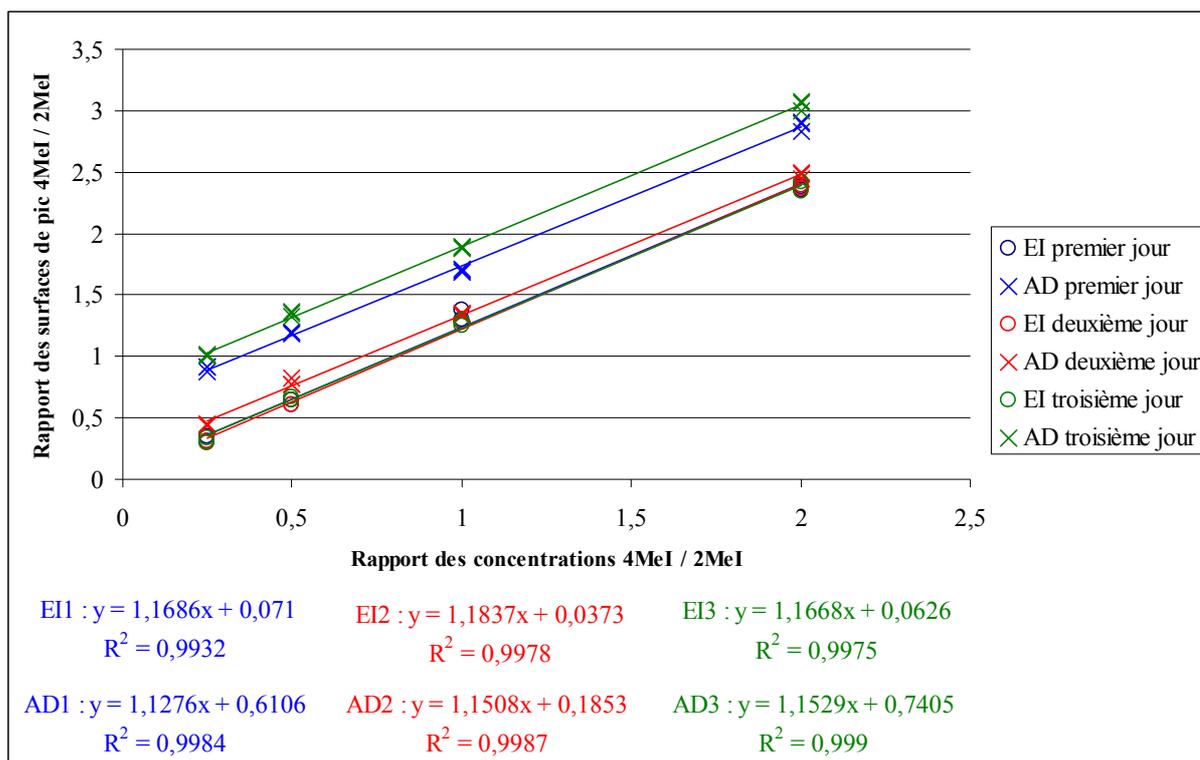


Figure IV-4 : Représentation graphique des résultats pour la validation de la méthode extraction à chaud – GCMS pour la quantification du 4MeI. Concentration du standard interne dans les caramels non dilués : 100 ppm. Bleu : résultats du premier jour de validation ; Rouge : résultats du second jour de validation ; Vert : résultats du troisième jour de validation. O : points d'étalonnage (étalonnage interne EI) ; X : points de validation (ajouts dosés AD).

Les trois droites obtenues avec les échantillons d'étalonnage (étalonnage interne EI) sont superposées. Sur les trois jours de l'étude, elles sont parallèles aux droites de validation (ajouts dosés AD). Aucun effet de matrice n'est donc observé. Pour les ajouts dosés, le caramel utilisé le deuxième jour contient moins de 4MeI (16 ppm) que les deux autres caramels (55 ppm pour celui du premier jour et 65 ppm pour celui du troisième jour).

La pente des droites d'étalonnage et de validation permet également de déterminer le facteur de réponse entre le 2MeI et le 4MeI qui est de 1,15. L'emploi du standard interne permet de quantifier le 4MeI dans le caramel sans avoir à tracer chaque jour une droite d'étalonnage puisque le facteur de réponse et la teneur en 2MeI ajouté dans le caramel sont connus. La formule utilisée pour le calcul de la teneur en 4MeI est la suivante :

$$C_{(4MeI)} \text{ (ppm)} = \text{Rapport des surfaces} \times \text{teneur en 2MeI (ppm)} / \text{Facteur de réponse} \quad (\text{IV-1})$$

Le biais et la fidélité obtenus pour chaque niveau de concentration sont consignés dans le Tableau IV-1.

Tableau IV-1 : Résultats de l'étude de validation par les profils d'exactitude de la méthode Extraction à chaud – GCMS pour le dosage du 4MeI dans les caramels colorants de classe III et IV.

Teneur en 4MeI	Prédictions inverses			Moyenne	Biais (%)
	Jour 1	Jour 2	Jour 3		
25 ppm	23,75	22,55	20,39	23,16	-7,34
	26,58	23,29	20,89		
	26,61	22,51	21,90		
50 ppm	50,59	52,00	48,95	51,93	3,86
	51,56	51,67	52,19		
	52,10	56,86	51,44		
100 ppm	97,31	102,43	99,02	99,17	-0,83
	95,67	102,10	97,74		
	95,82	103,39	99,00		
200 ppm	196,70	200,50	188,80	198,77	-0,62
	203,28	203,67	194,65		
	202,61	204,73	193,94		
Teneur en 4MeI	Ecart type relatif de répétabilité intra-jour (%)	Ecart type relatif de répétabilité inter-jour (%)	Ecart type relatif de fidélité (%)	Domaine d'exactitude	
				Limite inférieure	Limite supérieure
25 ppm	3,97	7,29	8,30	-34,55	24,66
50 ppm	3,38	1,10	3,55	-5,00	13,75
100 ppm	0,77	2,22	2,35	-12,56	10,32
200 ppm	1,50	0,51	1,58	-4,32	4,48

Le biais est inférieur à 8 % pour les quatre points de concentration. L'erreur systématique est donc faible. L'écart type relatif de fidélité est inférieur à 5 % pour les trois plus hautes concentrations et est égale à 8 % pour la concentration de 25 ppm.

Les limites du domaine représentant 90 % des résultats peuvent être calculées à partir des valeurs précédentes. La représentation graphique de ce domaine est donnée par la Figure IV-5.

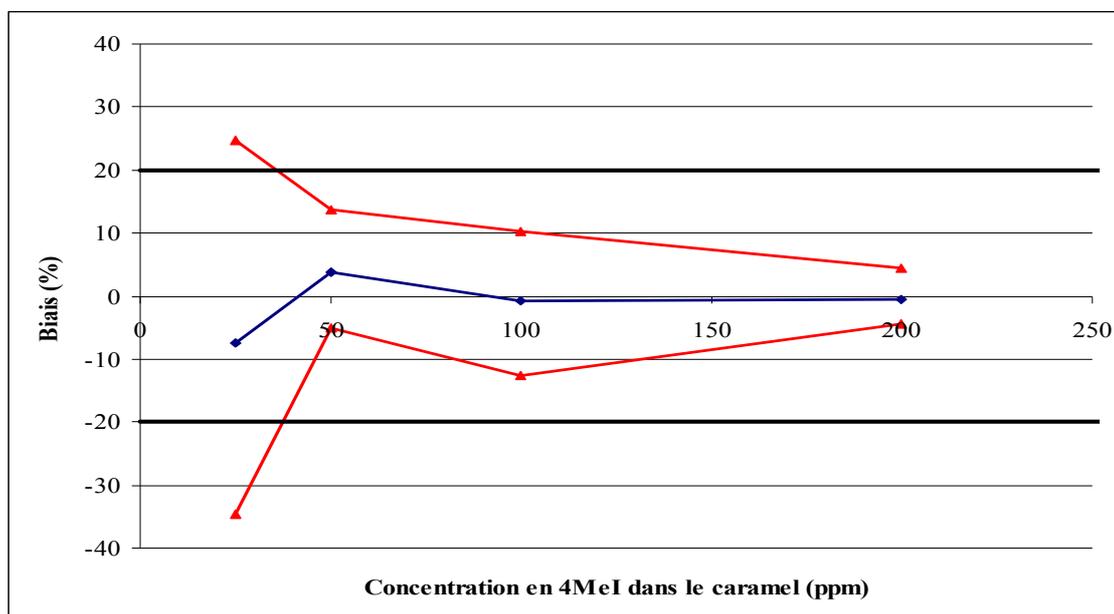


Figure IV-5 : Représentation des profils d'exactitude de la méthode de dosage du 4MeI par l'extraction à chaud puis analyse GCMS. ◆ : Evolution du biais ; ▲ : Evolution des limites basse et haute du domaine d'exactitude ; — : Limite du domaine de validité ($\pm 20\%$).

Cette représentation des profils d'exactitude permet de conclure que la méthode de dosage du 4MeI avec extraction à chaud et quantification par GCMS répond aux exigences fixées (90 % des résultats à moins de 20 % de la valeur vraie) dans le domaine de concentration de 50 à 200 ppm.

L'utilisation du détecteur de spectrométrie de masse en mode SIM permet d'obtenir une sélectivité importante et d'assurer que le composé dosé correspond bien au 4MeI.

IV.2.3 Conclusion

La méthode de dosage du 4MeI par extraction à chaud suivie d'une quantification par GCMS, actuellement utilisée à l'entreprise, est validée par les profils d'exactitude dans le domaine de 50 à 200 ppm. Elle pourra ainsi être utilisée pour vérifier la sélectivité de la nouvelle méthode d'analyse utilisant la chromatographie en phase liquide avec détection par spectrophotométrie UV.

IV.3 Développement et validation d'une méthode LC-LC pour le dosage du 4MeI

Pour obtenir le meilleur rapport signal sur bruit, la détection spectrophotométrique du 4MeI s'effectue à 217 nm (annexe 3). A une longueur d'onde plus basse, la phase mobile commence souvent à absorber et le bruit augmente.

La complexité du caramel et la faible sélectivité du mode de détection utilisé nécessite la mise au point d'une méthode de séparation très sélective. De la même manière que pour le THI, un système de chromatographie en phase liquide multidimensionnelle LC-LC est envisagé pour séparer le 4MeI dans le caramel.

IV.3.1 Choix des colonnes

La colonne de première séparation a pour rôle de purifier le caramel afin de récupérer le soluté souhaité dans un mélange beaucoup moins complexe qu'initialement. Pour augmenter l'efficacité de cette purification, le facteur de rétention du soluté d'intérêt doit être maximum.

Le 4-méthylimidazole est une molécule polaire à caractère basique ($\log P = 0,3$; $pK_a = 7,7$, Figure IV-1). La rétention de ce type de molécule en chromatographie à polarités des phases inversées nécessite l'utilisation d'une phase stationnaire spécifique : d'une part, celle-ci doit accepter les phases mobiles purement aqueuses permettant d'obtenir un facteur de rétention important ; d'autre part, elle doit être spécialement conçue pour générer des largeurs de pic correctes avec les molécules basiques.

La phase stationnaire de première dimension choisie est la phase XBridge Shield RP18 (Waters) qui utilise des particules hybrides permettant de travailler à des pH élevés (jusqu'à $pH = 11$). Cette phase contient aussi un groupement carbamate inséré entre le pont siloxane et le greffon alkyl : ce groupement fait écran aux interactions silanophyles, ce qui permet de réduire la traînée des pics des composés basiques. Avec cette phase, il est également possible de travailler avec des phases mobiles 100 % aqueuses tout en gardant une mouillabilité suffisante des pores et donc des rétentions stables.

La Figure IV-6 donne le facteur de rétention k et l'efficacité (nombre de plateaux théoriques N) obtenus pour le 4MeI sur la colonne XBridge Shield RP18 avec différentes phases mobiles aqueuses.

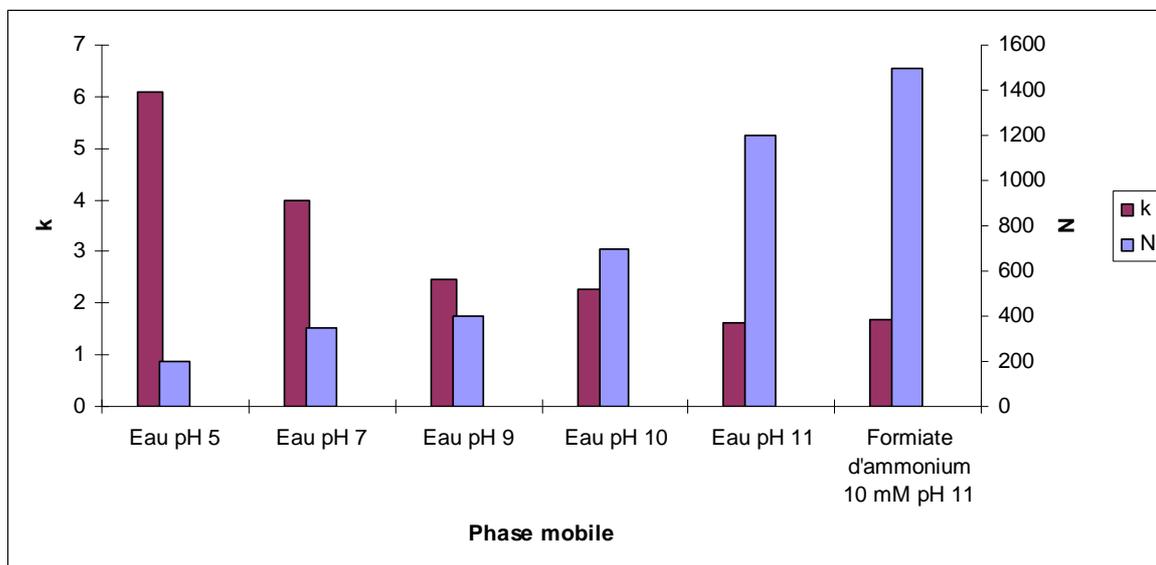


Figure IV-6 : Evolution du facteur de rétention k et du nombre de plateaux théoriques N du pic de 4MeI obtenu sur la colonne XBridge Shield RP18 (3,5 μm , 4,6 x 150 mm) en fonction de la phase mobile utilisée. pH : ajusté avec l'ammoniaque. Débit de la phase mobile : 0,7 mL/min.

Plus la phase mobile est basique, plus la rétention diminue et plus le nombre de plateaux théoriques augmente. Une augmentation de la force ionique de la phase mobile (ajout de formiate d'ammonium) permet encore d'améliorer la forme du pic (légère augmentation de N). Par contre, au delà de 10 mM, la concentration en formiate d'ammonium n'a pas d'influence significative sur la rétention et la forme du pic du 4MeI.

Pour le 4MeI, la phase mobile composée de formiate d'ammonium 10 mM basifiée à pH = 11 avec de l'ammoniaque, permet d'atteindre un facteur de rétention de 1,7 et un nombre de plateaux théoriques de 1500, ce qui correspond à une largeur de pic inférieure à 1,2 min à un débit de 0,7 mL/min.

Lors de l'injection d'un caramel dilué au dixième dans l'eau, l'utilisation d'une colonne de garde (XBridge Shield RP18 3,5 μm , 4,6 x 20 mm) est indispensable pour protéger la colonne de séparation. Il est aussi nécessaire d'effectuer un lavage de la colonne au méthanol. Le programme de phase mobile utilisé est donné par le Tableau IV-2.

Tableau IV-2 : Conditions d'élution sur la colonne XBridge Shield RP18 (3,5 µm, 4,6 x 150 mm) en chromatographie à polarités des phases inversées.

Temps (en min)	Débit (en mL/min)	% Formiate ammonium 10 mM pH 11	% Méthanol	Commentaires
0	0,7	100	0	Séparation du 4MeI
10	0,7	100	0	
11	0,7	0	100	Lavage de la colonne
20	0,7	0	100	
21	0,7	100	0	Equilibrage de la colonne
30	0,7	100	0	

La comparaison des chromatogrammes obtenus pour l'injection du 4MeI et d'un caramel dilué dix fois dans l'eau (Figure IV-7) montre l'impossibilité de doser directement le 4MeI qui est coélué avec d'autres solutés présents dans le caramel.

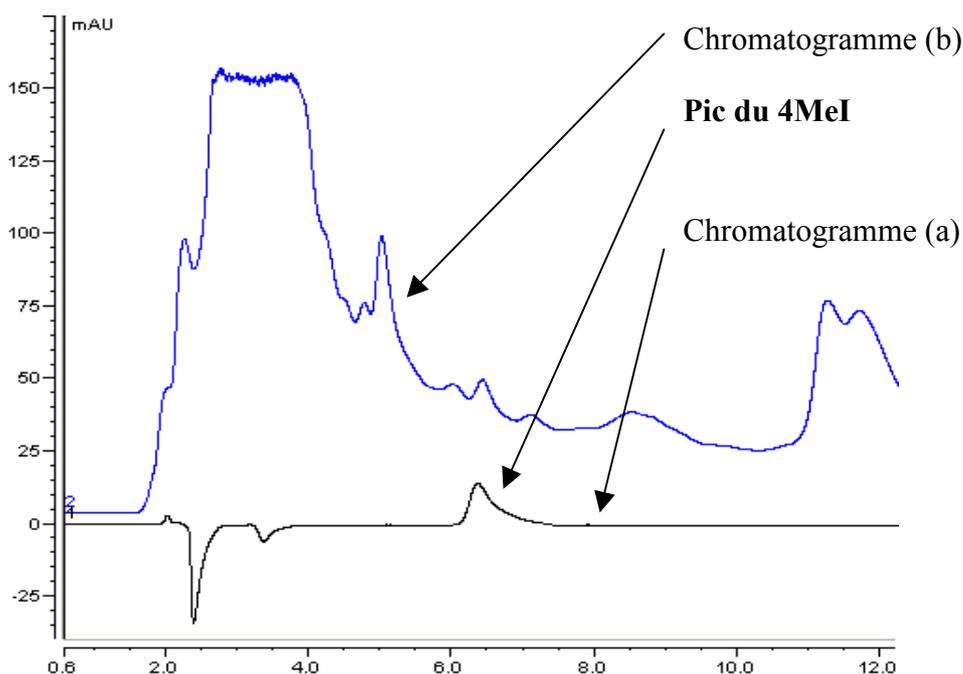


Figure IV-7 : Séparation sur la colonne XBridge Shield RP18 (3,5 µm, 4,6 x 150 mm). Conditions d'élution du Tableau IV-2. Longueur d'onde de détection : 217 nm. Volume injecté : 20 µL. Débit de la phase mobile : 0,7 mL/min. Chromatogramme (a) : injection d'une solution de 4MeI à 5 ppm « zoomée » 10 fois. Chromatogramme (b) : injection d'un caramel de classe III dilué 10 fois dans l'eau.

En sortie de la colonne XBridge, la fraction contenant le 4MeI (entre 5,8 et 7,3 min) doit donc être récupérée dans une boucle de collection pour être séparée en deuxième dimension (le dispositif utilisé est présenté en annexe 2). Comme nous avons pu le voir dans le chapitre II, le deuxième système de séparation doit être choisi en tenant compte de la phase mobile de la première dimension. Les solvants des deux dimensions doivent être compatibles pour ne pas observer de déformation de pic. De plus, pour le soluté d'intérêt et sur la deuxième colonne, la phase mobile de première dimension doit être moins éluante que la phase mobile de deuxième dimension, de manière à observer une préconcentration et une focalisation du soluté en tête de la deuxième colonne.

Comme pour le THI, la colonne de deuxième dimension choisie est la colonne Hypercarb remplie d'une phase stationnaire de carbone graphitique poreux (PGC). Dans le but de cerner les meilleures conditions d'éluion du 4MeI sur cette colonne, le nombre de plateaux théoriques N du pic de 4MeI a été évalué pour différentes phases mobiles qui contiennent toutes 5 % d'acétonitrile, mais qui diffèrent par la composition de leur partie aqueuse (Figure IV-8). Les 5 % d'acétonitrile permettent d'obtenir approximativement le même facteur de rétention k pour le 4MeI que sur la colonne XBridge Shield RP18 ($k \approx 1,7$) et donc de comparer la forme des pics à rétention quasiment constante.

Le plus grand nombre de plateaux théoriques (la largeur de pic la plus faible) est obtenu lorsque le pH de la partie aqueuse de la phase mobile est au moins égal à 11. La force ionique semble ne pas avoir d'influence : des parties aqueuses de phase mobile composées d'eau basifiée à pH = 11 avec de l'ammoniaque ou d'une solution de formiate d'ammonium à 10 mM tamponnée pH = 11 par l'ammoniaque, donnent des nombres de plateaux équivalents.

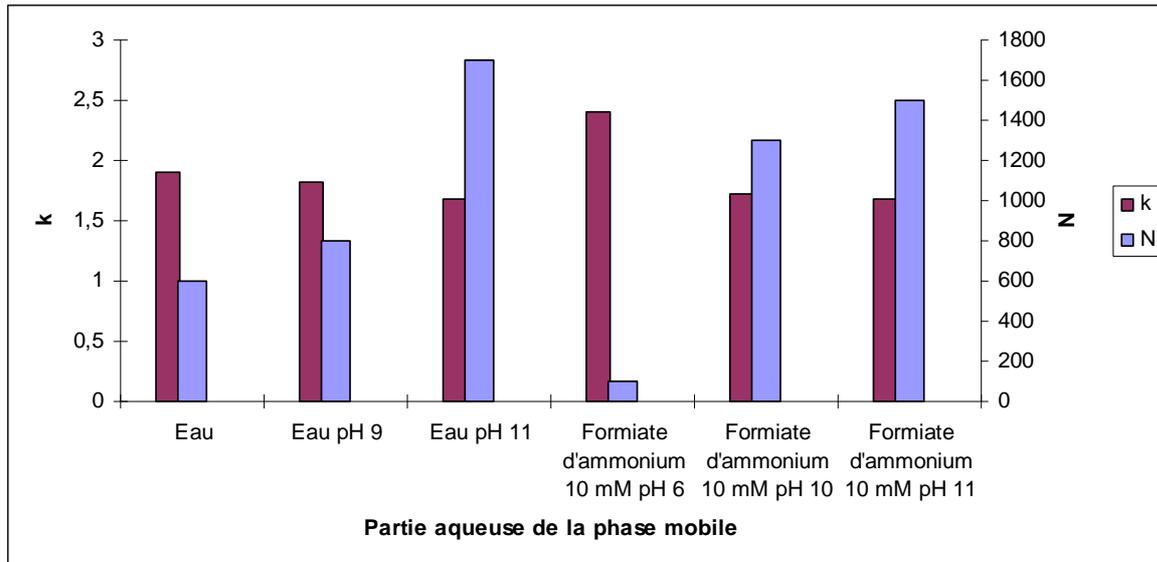


Figure IV-8 : Evolution du facteur de rétention k et du nombre de plateaux théoriques N suivant la partie aqueuse de la phase mobile sur la colonne Hypercarb PGC (5 μm , 4,6 x 100 mm). Toutes les phases mobiles contiennent 5 % d'acétonitrile. pH : ajusté par ajout d'ammoniaque. Débit de la phase mobile : 0,7 mL/min.

Pour compléter la comparaison, l'évolution du facteur de rétention k du 4MeI en fonction du pourcentage d'acétonitrile a été étudiée pour les deux compositions de la partie aqueuse (Figure IV-9).

Le comportement en rétention du 4MeI sur la phase PGC est le même, que la phase mobile soit à base simplement d'eau à pH = 11 ou de formiate d'ammonium 10 mM à pH = 11. Dans les deux cas, le facteur de rétention du 4MeI est voisin de 1,7 pour 5 % d'acétonitrile et de 8 pour 0 % d'acétonitrile. Quelle que soit la phase mobile choisie pour la deuxième dimension sur PGC (eau pH = 11 / acétonitrile ou formiate d'ammonium 10 mM pH = 11 / acétonitrile), le 4MeI élué de la première dimension sur XBridge Shield RP18 avec une solution de formiate d'ammonium 10 mM pH = 11, subira une focalisation en tête de colonne PGC, ce qui devrait minimiser l'élargissement du pic induit par l'augmentation du volume injecté.

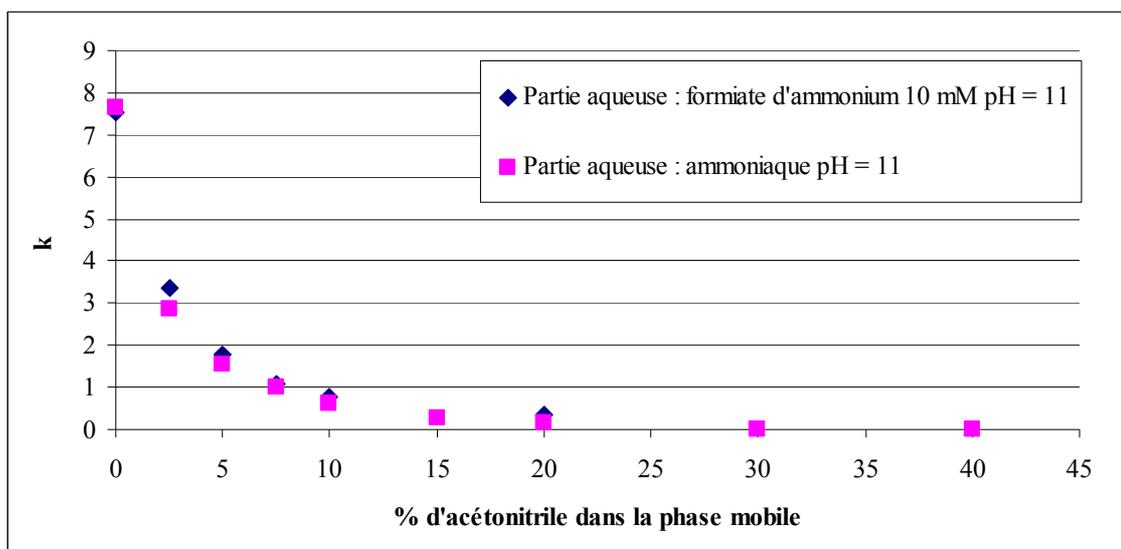


Figure IV-9 : Evolution du facteur de rétention k du 4MeI en fonction de la composition de la phase mobile (acétonitrile / ammoniaque pH = 11 ou acétonitrile / formiate d'ammonium 10 mM pH = 11) sur la colonne Hypercarb PGC (5 μ m, 4,6 x 100 mm).

Pour alléger la préparation de la partie aqueuse de la phase mobile, l'eau basifiée à pH = 11 avec de l'ammoniaque a été choisie et le programme d'élution mis en œuvre sur la colonne PGC de deuxième dimension est donné par le Tableau IV-3.

Tableau IV-3 : Conditions d'élution pour la séparation de la fraction récupérée à la sortie de la colonne XBridge Shield RP18 sur la colonne PGC.

Temps (en min)	Débit (en mL/min)	% Ammoniaque pH 11	% ACN	% Méthanol	Commentaires
0	0,7	95	5	0	Equilibrage, puis injection du contenu de la boucle à 7,3 min, puis séparation du 4MeI
20	0,7	95	5	0	
21	0,7	0	0	100	Lavage de la colonne
27	0,7	0	0	100	
28	0,7	95	5	0	Equilibrage de la colonne
30	0,7	95	5	0	

Le protocole final pour la séparation et la quantification du 4MeI dans les caramels colorants de classe III et IV se compose donc d'une première séparation sur la colonne XBridge Shield RP18 (3,5 μ m, 4,6 x 150 mm) avec du formiate d'ammonium 10 mM basifié à pH = 11 comme phase mobile. La fraction contenant le 4MeI (de 5,8 à 7,3 min) est collectée dans une boucle de récupération, puis transférée en tête de la colonne Hypercarb PGC (5 μ m, 4,6 x 100 mm). La séparation sur la colonne PGC s'effectue avec une phase mobile contenant 95 % d'ammoniaque pH = 11 et 5 % d'acétonitrile.

Les chromatogrammes obtenus à 217 nm pour l'injection d'une solution de 4MeI à 10 ppm (a) et de deux caramels colorants de classe III (b et c) sont superposés sur la Figure IV-10

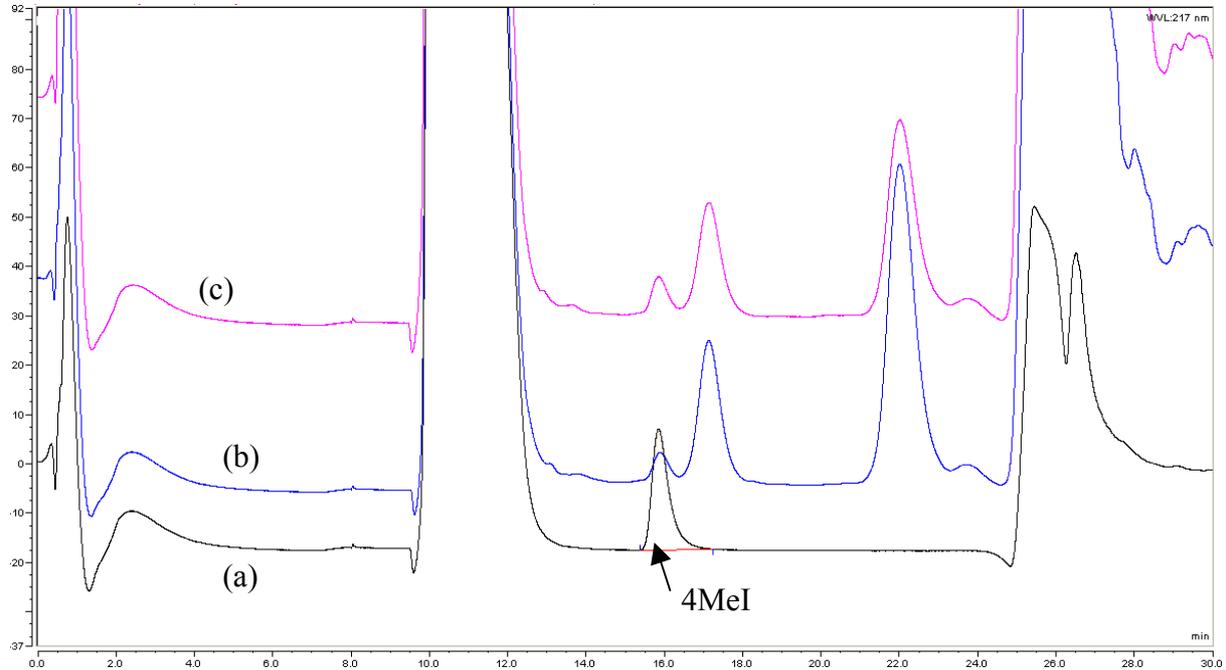


Figure IV-10 : Chromatogrammes obtenus avec la méthode XBridge-PGC. Chromatogramme (a) : Analyse d'une solution de 4MeI à 10 ppm ; Chromatogramme (b) et (c) : Analyse de deux échantillons de caramel, dilué 10 fois. Longueur d'onde de détection : 217 nm. Volume injecté : 20 μ L. Débit de la phase mobile : 0,7 mL/min.

Le 4MeI semble séparé des autres constituants de la matrice caramel. Le test de sélectivité de l'analyse par comparaison des résultats avec ceux obtenus par la méthode d'extraction à chaud suivie d'une quantification par GCMS, permettra de confirmer la séparation totale du 4MeI.

IV.3.2 Validation de la méthode XBridge-PGC par les profils d'exactitude

La validation de la méthode XBridge-PGC pour le dosage du 4MeI dans les caramels colorants de classe III et IV est effectuée en suivant le protocole des profils d'exactitude mis au point par la SFSTP. Les critères de validation utilisés sont les mêmes que lors de la validation du dosage du 4MeI par extraction à chaud puis quantification par GCMS : 90 % des résultats doivent être situés à moins de 20 % de la valeur vraie.

La norme impose la fabrication de caramels avec une teneur inférieure à 250 ppm. Pour analyser les produits finis et effectuer des suivis de réaction, la gamme de validation de la méthode doit couvrir un large domaine. Les concentrations choisies sont donc de 10, 20, 50, 100, 200 et 500 ppm en 4MeI dans le caramel non dilué, soit 1, 2, 5, 10, 20 et 50 ppm dans les solutions analysées.

Le protocole de validation impose de préparer une gamme d'étalonnage (étalonnage externe EE) et une gamme de validation préparée par ajouts dosés (AD) sur des caramels colorants de classe III et IV. Ces gammes sont analysées respectivement deux fois et trois fois pour étudier la répétabilité intra-jour de l'analyse. Ces analyses sont reproduites sur trois jours différents avec des nouvelles gammes et un nouveau caramel pour étudier la répétabilité inter-jour de la méthode d'analyse. Les résultats de la validation sont présentés sur le graphique de la Figure IV-11.

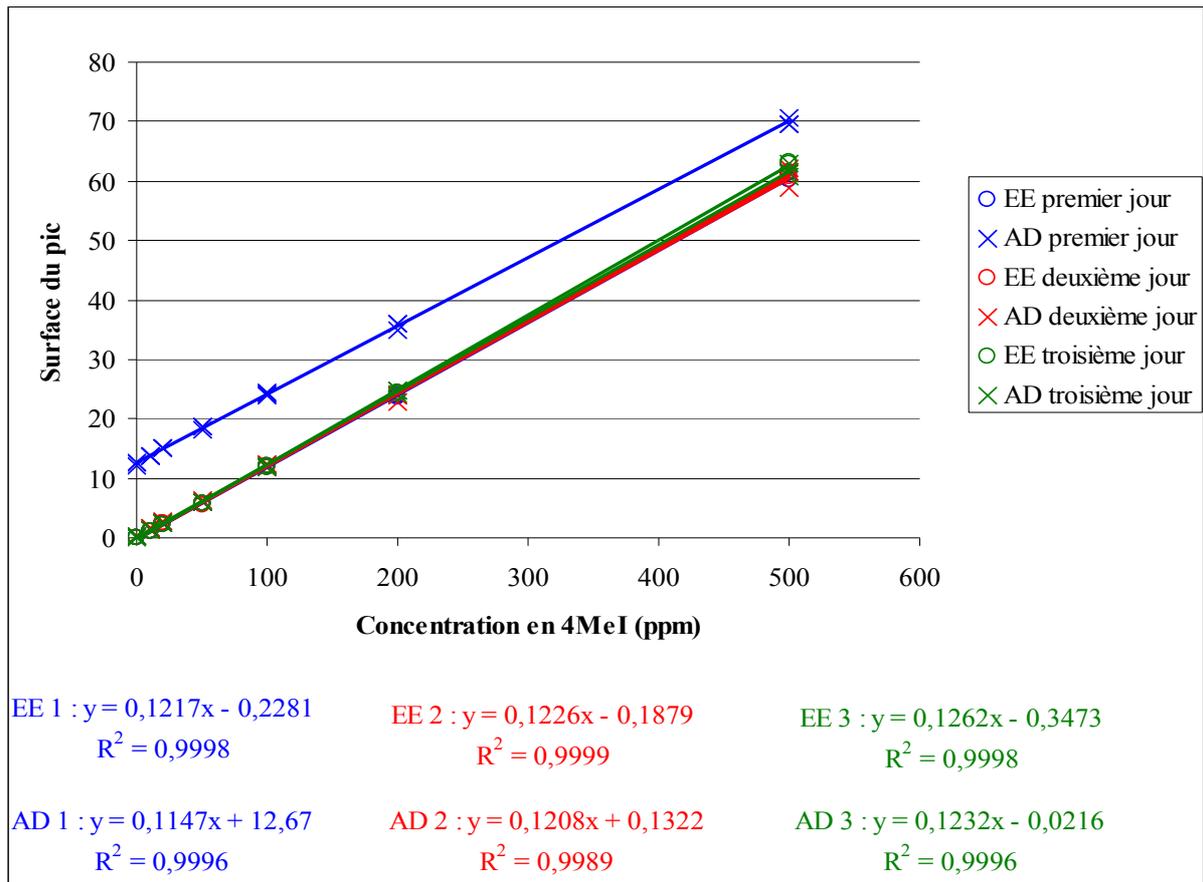


Figure IV-11 : Représentation graphique des résultats pour la validation de la méthode XBridge-PGC : surface du pic de 4MeI en fonction de la concentration en 4MeI dans le caramel non dilué. Bleu : résultats du premier jour de validation ; rouge : résultats du second jour de validation ; vert : résultats du troisième jour de validation. O : points d'étalonnage (étalonnage externe EE) ; X : points de validation (ajouts dosés AD).

Les trois droites d'étalonnage et celles de validation des jours 2 et 3 sont superposées. La répétabilité de l'étalonnage est donc bonne et les caramels utilisés pour les ajouts dosés des jours 2 et 3 contiennent très peu de 4MeI. Pour les échantillons de validation du jour 1, la droite obtenue est parallèle aux droites d'étalonnage, ce qui permet de montrer l'absence d'effet de matrice. Le caramel utilisé ce jour 1 contient 110 ppm de 4MeI.

Les droites d'étalonnage peuvent donc être utilisées pour calculer la concentration prédite inverse de toutes les analyses des échantillons de validation. Les valeurs obtenues sont compilées dans le Tableau IV-4 pour calculer les caractéristiques de la méthode : le biais et la fidélité ainsi que les limites du domaine représentant 90 % des résultats.

Tableau IV-4 : Résultats de l'étude de validation par les profils d'exactitude de la méthode XBridge-PGC de dosage du 4MeI dans les caramels colorants de classe III et IV.

Teneur en 4MeI	Prédictions inverses			Moyenne	Biais (%)
	Jour 1	Jour 2	Jour 3		
10 ppm	9,70	12,00	11,49	10,48	4,84
	9,33	11,51	10,91		
	8,08	10,28	11,05		
20 ppm	20,04	20,34	18,97	19,86	-0,72
	20,80	21,08	19,13		
	19,29	19,90	19,15		
50 ppm	48,65	48,81	47,87	48,44	-3,13
	49,33	50,17	47,83		
	45,67	48,24	49,37		
100 ppm	94,78	98,98	97,00	96,70	-3,30
	98,31	99,69	97,88		
	92,57	95,84	95,25		
200 ppm	193,58	193,99	197,15	192,90	-3,55
	193,22	195,12	198,79		
	184,64	185,95	193,62		
500 ppm	480,14	501,13	503,46	487,20	-2,56
	469,31	506,46	489,63		
	470,21	479,86	484,65		
Teneur en 4MeI	Ecart type relatif de répétabilité intra-jour (%)	Ecart type relatif de répétabilité inter-jour (%)	Ecart type relatif de fidélité (%)	Domaine d'exactitude	
				Limite inférieure	Limite supérieure
10 ppm	6,47	11,97	13,60	-43,67	53,34
20 ppm	2,43	3,51	4,27	-15,88	14,43
50 ppm	2,63	1,24	2,90	-11,24	4,99
100 ppm	2,17	1,53	2,65	-11,37	4,77
200 ppm	2,20	1,66	2,75	-11,94	4,84
500 ppm	2,04	2,51	3,23	-13,99	8,87

Le biais calculé pour toutes les concentrations est faible (< 5 %). L'erreur systématique de la méthode est donc acceptable. L'erreur aléatoire représentée par l'écart type relatif de fidélité est également inférieure à 5 % pour toutes les concentrations sauf pour 10 ppm. A cette concentration, la répétabilité des résultats entre les jours est mauvaise.

Ces résultats permettent ensuite de calculer les limites du domaine représentant 90 % des résultats pour chaque concentration. Ces valeurs sont utilisées pour tracer le domaine d'exactitude de la méthode de quantification du 4MeI (Figure IV-12).

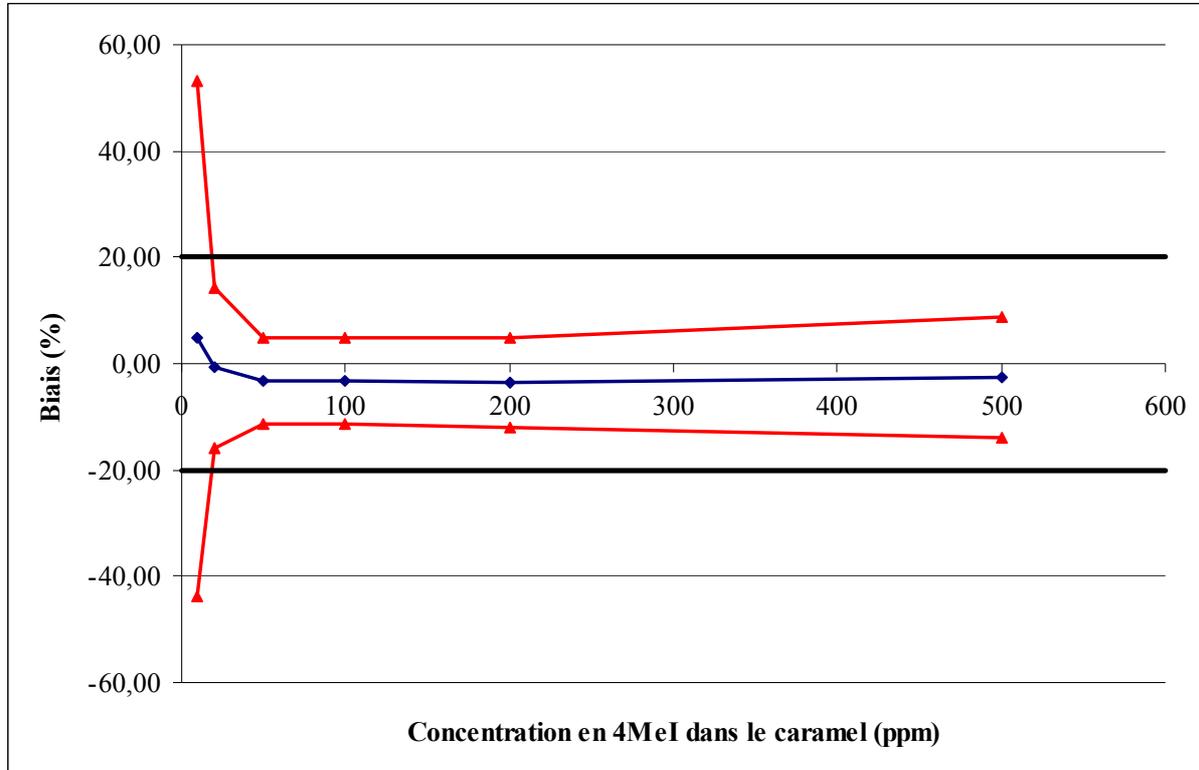


Figure IV-12 : Représentation des profils d'exactitude de la méthode de dosage du 4MeI par chromatographie liquide deux-dimensions XBridge-PGC. ◆ : Evolution du biais ; ▲ : Evolution des limites basse et haute du domaine d'exactitude ; — : Limite du domaine de validité ($\pm 20\%$).

La lecture du graphique permet de conclure que la méthode de quantification du 4MeI répond aux critères de validation (90 % des résultats à moins de 20 % de la valeur vraie) dans le domaine de concentration de 20 à 500 ppm dans le caramel pur. La faible répétabilité des résultats à la plus basse concentration du domaine étudié (10 ppm) implique une erreur importante sur les résultats et un non-respect des critères fixés initialement.

IV.3.3 Conclusion

Une nouvelle méthode de quantification du 4MeI dans les caramels colorants de classe III et IV (utilisant respectivement l'ammoniaque et le sulfite d'ammonium comme promoteur de caramélisation), basée sur la chromatographie en phase liquide avec détection spectrophotométrique à 217 nm a été mise en place. Cette méthode utilise deux séparations chromatographiques successives : la première séparation, sur une colonne XBridge Shield RP18, permet de purifier l'échantillon et la fraction contenant le 4MeI est injectée en ligne sur une colonne PGC pour compléter la séparation du soluté d'intérêt. Cette nouvelle méthode permet de quantifier le 4MeI contenu dans le caramel sans préparation d'échantillon (simple dilution au dixième dans l'eau) dans le domaine 20 – 500 ppm avec 90 % des résultats à moins de 20 % de la valeur vraie.

Par contre, compte tenu du mode de détection utilisé, il est important de vérifier la sélectivité de la méthode XBridge-PGC en comparant les résultats obtenus à ceux donnés par une méthode orthogonale, telle que celle associant l'extraction à chaud du caramel basifié, la séparation de l'extrait par chromatographie en phase gazeuse et la quantification du 4MeI par spectrométrie de masse en mode SIM.

IV.4 Etude de la sélectivité de la méthode XBridge-PGC

Divers échantillons ont été analysés par les deux méthodes validées pour le dosage du 4MeI dans les caramels colorants de classe III et IV : l'extraction à chaud suivie de la quantification par GCMS, d'une part, la chromatographie en phase liquide à deux-dimensions, d'autre part. Ces deux méthodes basées sur des principes très différents, peuvent être considérées comme orthogonales. La comparaison de leurs résultats permet de conclure sur leur sélectivité (Figure IV-13).

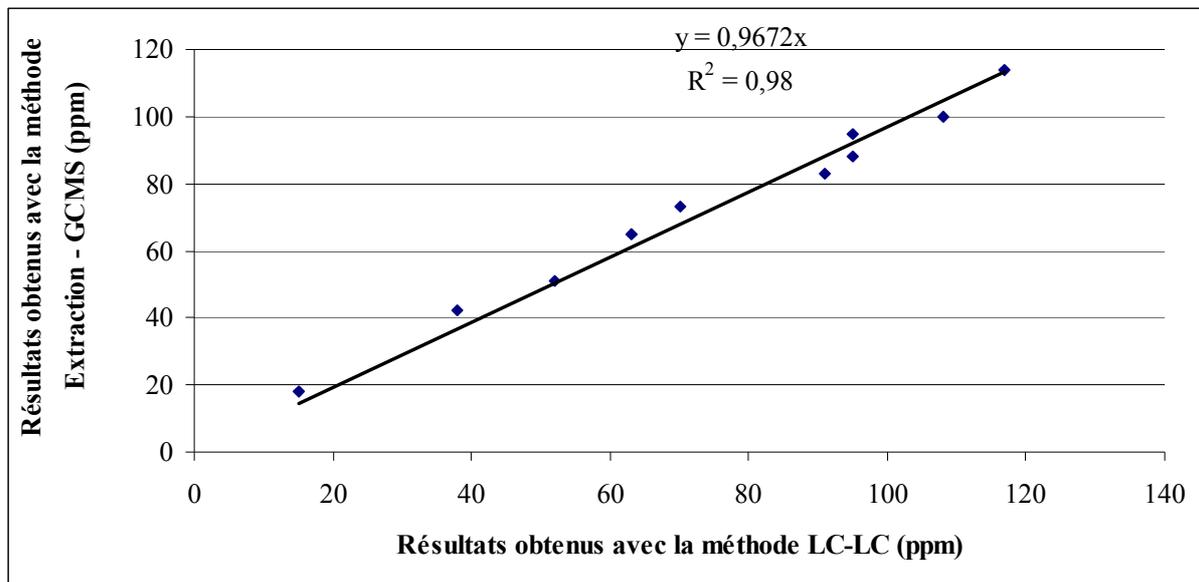


Figure IV-13 : Comparaison des concentrations de 4MeI déterminées avec les méthodes Extraction à chaud - GCMS et LC-LC dans des caramels commerciaux.

La Figure IV-13 montre la bonne corrélation entre les résultats obtenus par les deux méthodes (pente proche de 1 et r^2 égal à 0,98). La dispersion des résultats autour de la droite de corrélation est aléatoire et les écarts sont inférieurs à la précision des deux méthodes ($\pm 20\%$). La méthode de quantification du 4MeI par LC-LC est donc sélective.

IV.5 Essai de développement d'une méthode unique pour le dosage simultané des deux imidazoles (THI et 4MeI)

L'objectif de cette partie est de mettre au point une méthode d'analyse simultanée du THI et du 4MeI basée sur la LC-LC, ce qui devrait permettre de conserver une préparation d'échantillon relativement simple (dilution par 10 dans l'eau). Pour éviter une injection en deux temps sur la deuxième dimension, il faut trouver une première dimension où le THI et le 4MeI sont coélusés tout en permettant une bonne purification du caramel.

Les premiers tests ont été réalisés avec la colonne XBridge Shield RP18 en première dimension. La Figure IV-14 montre les variations des rétentions du THI et du 4MeI en fonction de la force ionique pour une phase mobile purement aqueuse contenant du formiate d'ammonium et tamponnée à pH = 10 avec de l'ammoniaque. Les études précédentes ont en effet montré qu'un pH basique est indispensable pour avoir une forme de pic correcte pour le 4MeI.

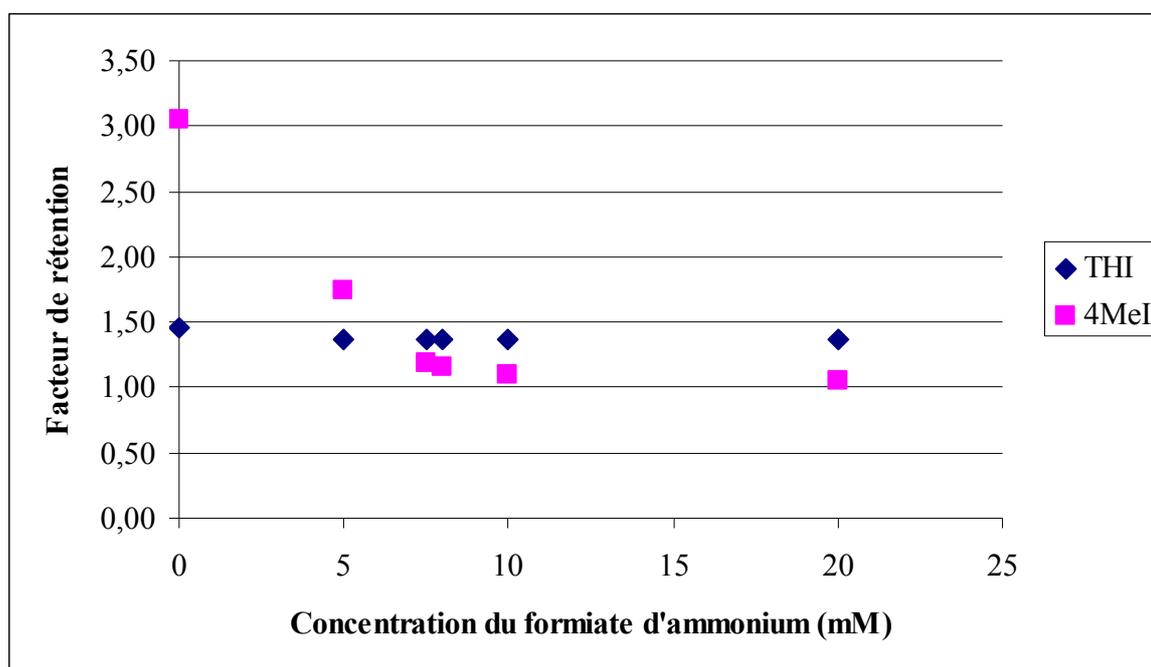


Figure IV-14 : Evolution des facteurs de rétention du THI et du 4MeI sur la colonne XBridge Shield RP18 (3,5 μ m, 4,6 x 150 mm) en fonction de la concentration en formiate d'ammonium dans la phase mobile purement aqueuse tamponnée à pH = 10 avec de l'ammoniaque.

La rétention du THI est indépendante de la concentration en formiate d'ammonium puisque cette molécule est sous forme moléculaire au pH de la phase mobile. Par contre, le facteur de rétention du 4MeI augmente lorsque la teneur en formiate d'ammonium diminue. Le THI et le 4MeI sont coélusés et peuvent être récupérés dans une seule fraction avec une phase mobile contenant 6 mM de formiate d'ammonium.

Le programme d'élution adopté pour la première dimension (Tableau IV-5) est donc dérivé de celui décrit dans le Tableau IV-2, à la différence que la concentration en formiate d'ammonium passe de 10 mM à 6 mM. La Figure IV-15 montre les chromatogrammes obtenus pour l'analyse d'une solution de THI, de 4MeI et d'un caramel. La longueur d'onde de détection est adaptée au soluté d'intérêt considéré : 287 nm pour le THI, 217 nm pour le 4MeI.

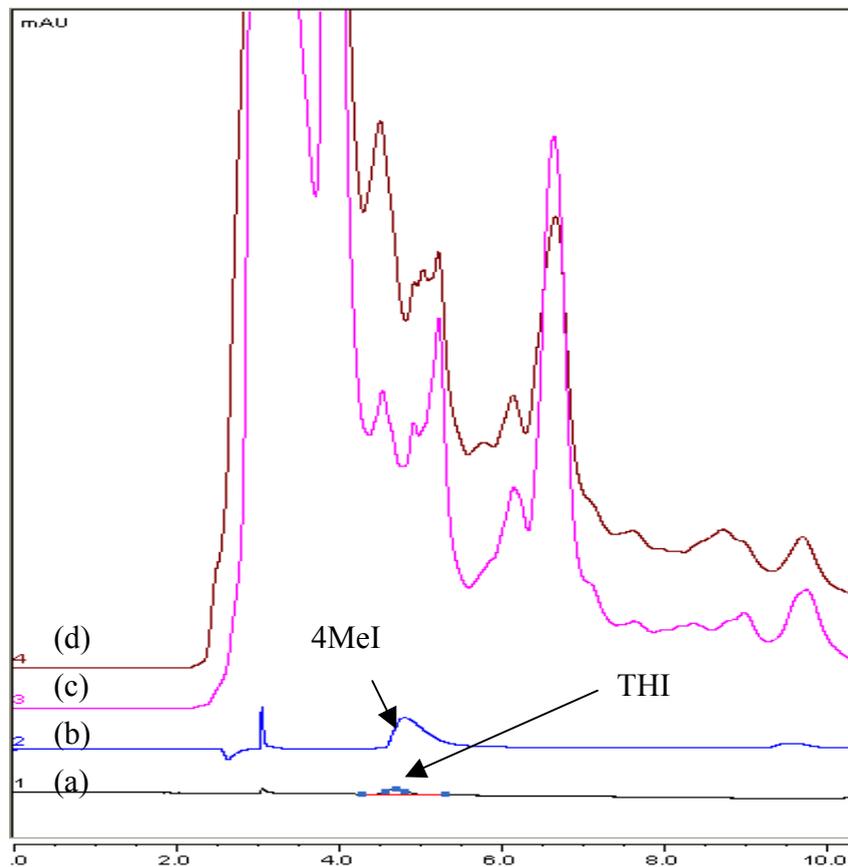


Figure IV-15 : Chromatogrammes obtenus lors de l'élution sur la colonne XBridge Shield RP18 (3,5 μ m, 4,6 x 150 mm) d'une solution de THI à 1 ppm détectée à 287 nm (a), d'une solution de 4MeI à 10 ppm détectée à 217 nm (b) et d'un caramel colorant de classe III diluée 10 fois dans l'eau détectée à 287 nm (c) et à 217 nm (d). Volume injecté : 20 μ L ; Débit de la phase mobile (formiate d'ammonium 6 mM pH 10) : 0,7 mL/min.

La collection de la fraction éluée entre 4,3 et 5,8 min permet de récupérer quantitativement le THI et le 4MeI et cette fraction doit subir une nouvelle séparation chromatographique pour isoler les deux solutés à quantifier.

Cette seconde séparation est réalisée sur la colonne Hypercarb PGC dans des conditions de gradient d'élution données dans le Tableau IV-5.

Tableau IV-5 : Conditions d'élution pour la séparation simultanée du THI et du 4MeI avec la colonne XBridge Shield RP18 (3,5 µm, 4,6 x 150 mm) en première dimension et la colonne Hypercarb PGC (5 µm, 4,6 x 100 mm) en deuxième dimension.

XBridge Shield RP 18	Temps (en min)	Débit (en mL/min)	% Formiate ammonium 6 mM pH 10	% Méthanol	Commentaires	
	0	0,7	100	0		Collection du THI et du 4MeI entre 4,3 et 5,8 min
	10	0,7	100	0		
	11	0,7	0	100		Lavage de la colonne
	20	0,7	0	100		
21	0,7	100	0	Equilibrage de la colonne		
45	0,7	100	0			

Hypercarb PGC	Temps (en min)	Débit (en mL/min)	% Ammoniaque pH 10	% ACN	% Méthanol	Commentaires	
	0	0,7	95	5	0		Récupération de la fraction à 5,8 min et séparation du THI et du 4MeI en gradient d'élution
	10	0,7	95	5	0		
	11	0,7	90	10	0		
	30	0,7	90	10	0		Lavage de la colonne
	31	0,7	0	0	100		
	40	0,7	0	0	100		Equilibrage de la colonne
41	0,7	95	5	0			
45	0,7	95	5	0			

Les analyses de solutions standards de THI et de 4MeI ainsi que celles de caramels de classe III sont présentées sur la Figure IV-16.

Les solutés d'intérêt, THI et 4MeI, ne sont pas totalement séparés des interférents de la matrice caramel. Mais ces premiers résultats sont encourageants. L'optimisation des conditions (changement du modificateur organique, du pH de la phase aqueuse...) devrait permettre à terme le développement d'une méthode basée sur la LC-LC, capable de quantifier simultanément le THI et le 4MeI.

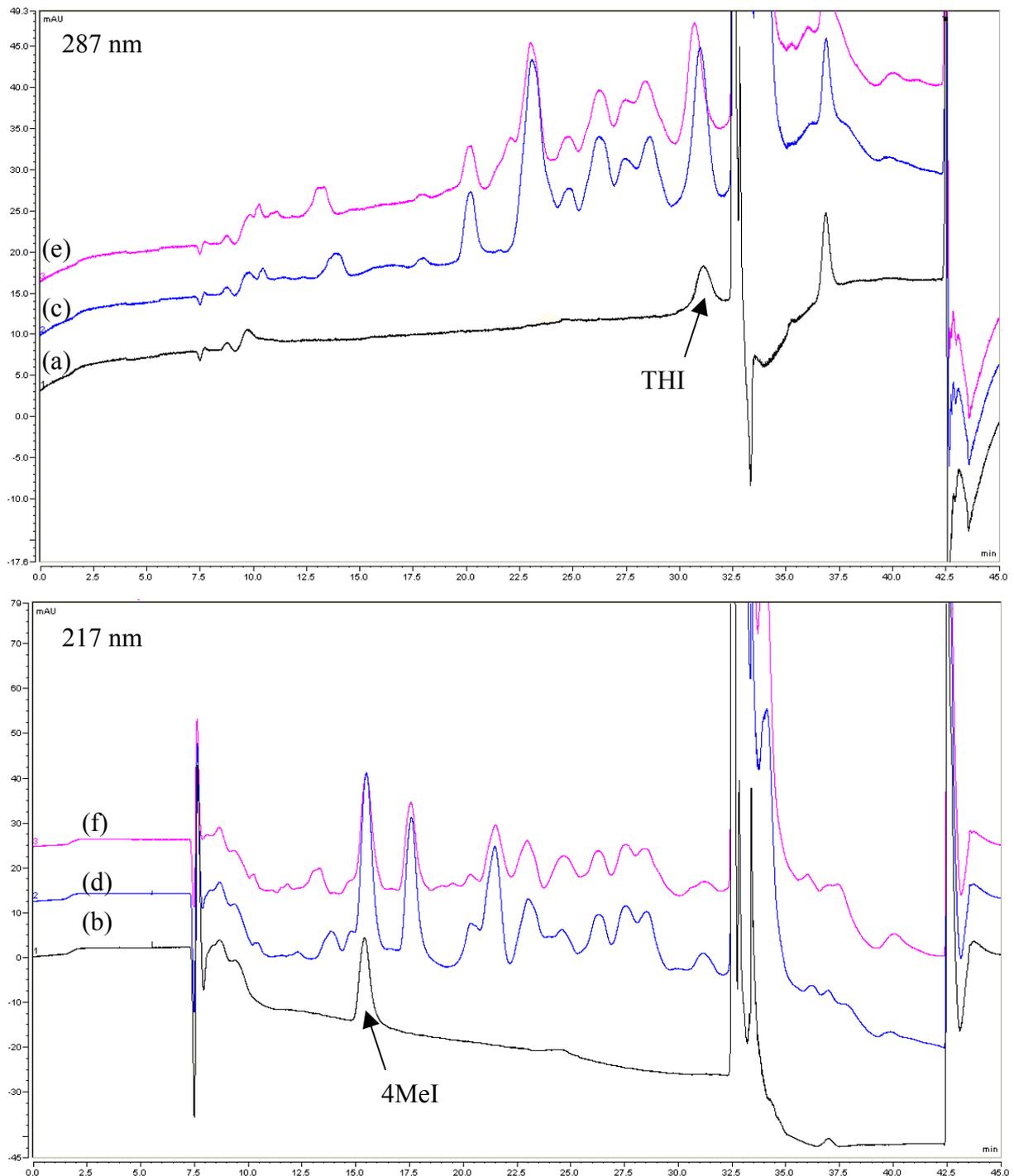


Figure IV-16 : Chromatogrammes obtenus pour l'élution d'une solution de THI à 5 ppm détectée à 287 nm (a), d'une solution de 4MeI à 10 ppm détectée à 217 nm (b), d'un premier caramel de classe III dilué 10 fois détecté à 287 nm (c) et à 217 nm (d) et d'un second caramel de classe III dilué 10 fois détecté à 287 nm (e) et à 217 nm (f). Colonne de 1^{ère} dimension : XBridge Shield RP18 (3,5 μ m, 4,6 x 150 mm). Colonne de 2^{ème} dimension : Hypercarb PGC (5 μ m, 4,6 x 150 mm). Volume injecté : 20 μ L ; Conditions d'élution : voir Tableau IV-5.

Conclusion

Le dosage du 4MeI dans les caramels colorants de classe III et IV a été réalisé par deux méthodes différentes. Tout d'abord, une méthode d'extraction à chaud par le dichlorométhane suivie d'une quantification par chromatographie en phase gazeuse avec détection par spectrométrie de masse, a été validée par les profils d'exactitude dans le domaine de concentration allant de 50 à 200 ppm. Une nouvelle méthode par chromatographie en phase liquide à deux dimensions (LC-LC) a été mise au point et validée de la même manière dans le domaine de concentration 20 – 500 ppm. Cette dernière ne nécessite qu'une simple dilution au dixième de l'échantillon dans l'eau et permet d'obtenir un résultat en 30 min. L'analyse de différents caramels avec les deux méthodes a permis de confirmer la sélectivité de chacune d'elles, puisque les résultats obtenus sont identiques alors que les deux méthodes d'analyse sont orthogonales. La méthode LC-LC permettra de faire des suivis de réaction de caramélisation pour améliorer la connaissance de la chimie du caramel et essayer de diminuer la formation du 4MeI qui est une molécule toxique du caramel.

Des essais pour doser simultanément le THI et le 4MeI par LC-LC ont été effectués. Mais, le développement de la méthode nécessite un approfondissement avant une possible validation.

Références bibliographiques

1. Casal, S.; Fernandes, J. O.; Oliveira, M. B. P. P.; Ferreira, M. A., Gas chromatographic-mass spectrometric quantification of 4-(5-)methylimidazole in roasted coffee after ion-pair extraction. *Journal of Chromatography A* **2002**, 976, (1-2), 285-291.
2. Moore-Testa, P.; Saint-Jalm, Y.; Testa, A., Identification and determination of imidazole derivatives in cigarette smoke. *Journal of Chromatography A* **1984**, 290, 263-274.
3. Fuchs, G.; Sundell, S., Quantitative determination of 4-methylimidazole as 1-acetyl derivative in caramel color by gas-liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1975**, 23, (1), 120-122.
4. Wilks, R. A.; Johnson, M. W.; Shingler, A. J., An Improved Method for the Determination of 4-Methylimidazole in Caramel Color. *J. Agric. Food Chem.* **1977**, 25, (3), 1077.
5. Fernandes, J. O.; Ferreira, M. A., Gas chromatographic-mass spectrometric determination of 4-(5) methylimidazole in ammonia caramel colour using ion-pair extraction and derivatization with isobutylchloroformate. *Journal of Chromatography A* **1997**, 786, (2), 299-308.
6. Wilks, R. A.; Shingler, A. J.; Thurman, L. S.; Warner, J. S., The isolation of 4-methylimidazole from caramel color and its determination by thin-layer and gas-liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **1973**, 87, (2), 411-418.
7. Thomsen, M.; Willumsen, D., Quantitative ion-pair extraction of 4(5)-methylimidazole from caramel colour and its determination by reversed-phase ion-pair liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **1981**, 211, (2), 213-221.
8. Klejdus, B.; Moravcová, J.; Kubán, V., Reversed-phase high-performance liquid chromatographic/mass spectrometric method for separation of 4-methylimidazole and 2-acetyl-4-(1,2,3,4-tetrahydroxybutyl)imidazole at pg levels. *Analytica Chimica Acta* **2003**, 477, (1), 49-58.

9. Klejdus, B.; Moravcová, J.; Lojková, L.; Vacek, J.; Kubán, V., Solid-phase extraction of 4(5)-methylimidazole (4MeI) and 2-acetyl-4(5)-(1,2,3,4-tetrahydroxybutyl)imidazole (THI) from foods and beverages with subsequent liquid chromatographic-electrospray mass spectrometric quantification. *Journal of Separation Science* **2006**, 29, (3), 378-384.
10. Lojková, L.; Klejdus, B.; Moravcová, J.; Kubán, V., Supercritical fluid extraction (SFE) of 4(5)-methylimidazole (4-MeI) and 2-acetyl-4(5)-(1,2,3,4)-tetrahydroxybutylimidazole (THI) from ground-coffee with high-performance liquid chromatographic-electrospray mass spectrometric quantification (HPLC/ESI-MS). *Food Additives & Contaminants* **2006**, 23, (10), 963-973.

Chapitre V :

Analyse des sucres dans le caramel

Introduction

La réaction de caramélisation est un traitement thermique des sucres (saccharose, glucose, fructose, sirop de glucose...). Ils subissent une perte d'eau pour ensuite former, par réactions successives de dégradation et de polymérisation, les molécules responsables du caractère aromatique et colorant du caramel.

L'analyse des sucres dans le produit final permet de connaître le pouvoir sucrant du caramel et, en général, de retrouver les sucres utilisés pour la caramélisation. Il est donc intéressant d'avoir une méthode d'analyse capable de doser les sucres caractéristiques présents dans le produit final : le glucose, le fructose et le saccharose sont les principaux sucres utilisés pour la caramélisation ; le maltose et le maltotriose sont des sucres présents dans les sirops de glucose ; le lactose est caractéristique des caramels au lait.

Ce chapitre présente le développement d'une nouvelle méthode d'analyse de ces sucres dans le caramel par chromatographie en phase liquide couplée au détecteur évaporatif à diffusion de lumière. Rapide, automatisée et validée par les profils d'exactitude, elle permettra le suivi de la réaction de caramélisation au cours du temps de cuisson afin d'améliorer la connaissance de la chimie du caramel.

L'appareillage utilisé pour la mise en place de la méthode d'analyse des sucres est présenté en annexe 2.

V.1 Bibliographie sur l'analyse des sucres dans les matrices agroalimentaires

Les glucides sont des molécules essentielles voire majoritaires dans les produits agroalimentaires. Le taux total de glucides est souvent déterminé (°Brix), mais la caractérisation du produit final nécessite la quantification de chaque sucre. Les sucres les plus analysés sont les mono- et les di-saccharides, les polyols (sorbitol, maltitol...) ou les osamines (sucres avec une fonction amine : glucosamine, galactosamine...).

Leurs dosages dans les produits alimentaires (légume, lait, vin, miel, viande...) peuvent être faits par chromatographie en phase liquide ou en phase gazeuse ou par électrophorèse capillaire. Leurs analyses permettent de faire du suivi de fabrication, du développement de nouveaux produits et du contrôle qualité des produits finis [1].

Sur le caramel, dès les années 1960, M. Truhaut *et al.* [2] essaient de doser le glucose, le fructose et le saccharose dans le produit final par chromatographie sur papier.

V.1.1 Dosage par chromatographie en phase liquide

V.1.1.1 Préparation d'échantillon

L'analyse des sucres dans les produits agroalimentaires nécessite une préparation d'échantillon avant injection sur la colonne de séparation chromatographique. Pour les produits liquides, une simple dilution et filtration peuvent suffire [3-5] mais une extraction sur phase solide est souvent effectuée pour purifier l'échantillon [6, 7]. Pour les matrices solides, une extraction solide-liquide (en général avec de l'eau) permet de récupérer les sucres dans une phase liquide [8, 9].

Une dérivation des sucres est quelquefois réalisée pour améliorer la sélectivité de la séparation et la sensibilité de la détection [10, 11].

V.1.1.2 Séparation chromatographique

Différents modes sont utilisés pour séparer les sucres présents dans la matrice : la chromatographie d'échange de ligands utilisant des phases stationnaires polymériques avec des cations Na^+ et Ca^{2+} et des phases mobiles aqueuses [3, 12], la chromatographie d'exclusion stérique en phase aqueuse [13], la chromatographie d'interactions hydrophiles (HILIC) sur des phases stationnaires polaires et avec des phases mobiles hydro-organiques [4, 5, 7, 14, 15] ou la chromatographie d'échange d'anions à pH basique (supérieur à 12) [8, 16]. En chromatographie à polarités des phases inversées, les sucres sont peu retenus à cause de leur caractère polaire et sont donc souvent dérivés par un réactif hydrophobe pour augmenter leur rétention [10, 17].

La séparation des mono- et di-saccharides a également été étudiée sur la colonne PGC [18]. Cette phase stationnaire apporte une rétention plus importante des molécules polaires en chromatographie à polarités des phases inversées et présente une meilleure capacité de séparation des isomères et des composés chimiquement proches (II.3).

Sur le PGC, les monosaccharides ne sont retenus qu'avec une phase mobile purement aqueuse. La diminution de la température de séparation permet d'améliorer la sélectivité entre le glucose et le fructose [19] mais la séparation complète de ces deux molécules ne peut pas être atteinte sur cette phase stationnaire.

Les disaccharides ont une rétention plus importante sur la colonne PGC et leur élution nécessite une phase mobile contenant un faible pourcentage de solvant organique (4 % d'acétonitrile ou 15 % de méthanol) [19]. Les sucres réducteurs comme le maltose et le lactose possèdent deux anomères qui sont séparés à basse température sur cette phase stationnaire. L'augmentation de la température permet d'accélérer la conversion d'un anomère à l'autre. Un seul pic est observé pour les disaccharides réducteurs avec une température de séparation supérieure à 60 °C. L'élimination des doubles pics des anomères des sucres réducteurs peut également être atteinte par l'ajout de soude dans la phase mobile (quelques mM) [18].

L'élution du maltotriose nécessite une phase mobile encore plus éluante.

V.1.1.3 Détection des molécules

Les sucres, en sortie de la séparation chromatographique, ne peuvent pas être détectés directement par un détecteur à barrette de diodes puisque ces molécules n'absorbent ni dans l'UV (seulement faiblement vers 200 nm), ni dans le visible. La dérivation pré- ou post-colonne est utilisée pour améliorer leur détection en spectrophotométrie UV-Visible [10] ou par fluorescence [11].

Le détecteur le plus couramment utilisé est le réfractomètre ; mais celui-ci est peu sensible et ne permet pas de travailler en gradient d'élution [5, 20, 21]. Le détecteur évaporatif à diffusion de lumière (DEDL) a remplacé peu à peu le réfractomètre [4, 7, 15, 16]. Ce mode de détection plus sensible [1] est utilisable en gradient d'élution. Par contre, il n'est pas du tout sélectif et sa fonction de réponse n'est pas linéaire. Pour la linéariser, l'étalonnage est réalisé en traçant le logarithme de la masse injectée en fonction du logarithme de la surface du pic [22]. De plus, la phase mobile de séparation doit nécessairement être plus volatile que les solutés à analyser. Les tampons utilisés dans la phase mobile doivent donc être choisis avec précaution.

La détection par ampérométrie pulsée permet d'avoir une bonne sélectivité et une sensibilité importante (dosage des sucres à faible teneur dans la matrice) mais nécessite une ionisation préalable des sucres [8, 23]. Cette détection est très souvent couplée à la séparation par chromatographie d'échange d'anions à pH basique.

V.1.2 Dosage par chromatographie en phase gazeuse

V.1.2.1 Préparation d'échantillon

Pour l'analyse par chromatographie en phase gazeuse, la préparation d'échantillon consiste à rendre les sucres volatils. Une évaporation à sec de l'échantillon ou de l'extrait aqueux de la matrice [24] permet d'obtenir un résidu solide contenant principalement les sucres. Ensuite, la dérivation des glucides se fait en deux étapes [24, 25] : tout d'abord, une oximation par l'hydrochlorure d'hydroxylamine (2H à 60 °C) permet de diminuer le nombre d'isomères à deux pour les sucres réducteurs (glucose, fructose, maltose, lactose...) et à un seul pour les sucres non réducteurs (saccharose) [26]. Sans cette première dérivation, le fructose est séparé en 5 pics (les deux anomères furanose, les deux

anomères pyranose et la forme linéaire) [27]. La triméthylsilylation par un mélange d'hexaméthylidisilazane et de triméthylchlorosilane (1H30 à 60 °C) est ensuite utilisée pour rendre les sucres séparables par GC sur une colonne de phase stationnaire apolaire.

V.1.2.2 Séparation chromatographique

La séparation des sucres se fait pratiquement exclusivement sur les colonnes de phase stationnaire apolaire contenant 95 % de méthylpolysiloxane et 5 % de phénylpolysiloxane (HP5MS de Agilent par exemple) avec un gradient de température de 60 à 330 °C [25, 28].

V.1.2.3 Détection des molécules

A la sortie de la colonne, les molécules sont détectées par un détecteur à ionisation de flamme [24] ou par un spectromètre de masse [25, 28], plus sélectif. Le choix du groupement de dérivation influe sur l'ionisation dans la source du spectromètre de masse et par suite sur la sensibilité de détection. La séparation des ions est réalisée par un quadripôle [25] ou une trappe ionique [28].

V.1.3 Dosage par électrophorèse capillaire

Le dosage des sucres par électrophorèse capillaire nécessite peu de préparation d'échantillon. Une simple dilution dans l'eau [29, 30] ou une filtration sont suffisantes [29]. La séparation des sucres se fait avec un électrolyte très alcalin, la soude par exemple, pour ioniser les sucres dont le pKa est supérieur à 12 [29, 31]. La détection peut se faire par détection d'absorbance indirecte [29]. Un chromophore ionique est ajouté à l'électrolyte et le détecteur reçoit un signal constant de cette molécule. L'arrivée de l'analyte provoque une baisse du signal de détection puisque celui-ci remplace quelques unes des molécules de chromophore. La détection des sucres est également effectuée par absorbance UV directe après dérivation [32], par électrochimie [31] ou par spectrométrie de masse avec ionisation Electrospray [30].

V.1.4 Conclusion

Le dosage des sucres dans les matrices agroalimentaires est une analyse très courante. Une seule publication présente le dosage des mono- et di-saccharides dans le caramel [25]. La séparation est réalisée par chromatographie en phase gazeuse après dérivatisation des sucres par un groupement silylé. Cette méthode, mise au point et utilisée actuellement par l'entreprise, nécessite une préparation d'échantillon longue.

Le but de notre travail est de développer une méthode d'analyse rapide des sucres par chromatographie en phase liquide pour suivre leur évolution au cours de la réaction de caramélisation. Cette nouvelle méthode devra utiliser une préparation d'échantillon simple, être automatisable et avoir une gamme dynamique de concentration en sucres importante. Le détecteur choisi est le DEDL pour sa facilité d'utilisation et son adaptabilité.

V.2 Mise au point de la méthode d'analyse

De la même manière que lors de la mise au point des méthodes d'analyse des imidazoles dans le caramel, l'utilisation du système bidimensionnel pour la séparation des sucres permet d'augmenter la sélectivité de la méthode et donc de diminuer la préparation de l'échantillon avant l'analyse. Ce système utilise deux séparations chromatographiques successives pour atteindre la séparation totale des solutés recherchés contenus dans le caramel. Les deux colonnes choisies doivent permettre la mise en œuvre de processus de séparation complémentaires et utiliser des phases mobiles compatibles afin d'éviter toute déformation de pics.

V.2.1 Recherche d'une colonne pour purifier le caramel

La colonne de première dimension du système LC-LC doit permettre de purifier la matrice et de récupérer sélectivement dans la boucle de collection les sucres souhaités, si possible en une seule fraction. Les mono-, di- et tri-saccharides ayant des masses molaires comprises entre 180 et 505 g/mol (Annexe 3), il est possible de purifier le caramel par chromatographie d'exclusion stérique tout en conservant la coélution de ces molécules de

faible masse molaire. La solubilité du caramel dans l'eau offre la possibilité de faire de la chromatographie de filtration sur gel (exclusion stérique en phase aqueuse). Une colonne dont la limite de perméation totale des molécules est de 500 g/mol a donc été choisie afin de récupérer tous les solutés souhaités au volume de perméation totale ou volume mort de la colonne alors que les molécules de plus gros volume sont partiellement ou totalement exclues, donc éluées avant. La géométrie de la colonne ne doit pas être trop importante pour obtenir un volume de récupération compatible avec une injection sur une deuxième colonne chromatographique.

La séparation par filtration sur gel des molécules du caramel est donc étudiée sur la colonne Shodex SB403-4E (6 μm , 4,6 x 250 mm). Cette colonne de phase stationnaire polymérique (de type poly-hydroxymétacrylate) a une limite d'exclusion totale des molécules de 100 000 g/mol pour les polysaccharides de maltotriose (pullulane). Elle est protégée par une précolonne adéquate (SB400G-4A, 7 μm , 4,6 x 50 mm).

Les températures de nébulisation et d'évaporation du DEDL sont fixées à 60 °C et le débit d'azote à 1,6 SLM (litres par minute à température et pression standard) pour avoir une évaporation totale de la phase mobile aqueuse.

Les injections successives des sucres recherchés sur cette colonne avec une phase mobile 100 % aqueuse à un débit de 0,3 mL/min (Figure V-1) montrent la possibilité de récupérer tous ces solutés dans une seule fraction.

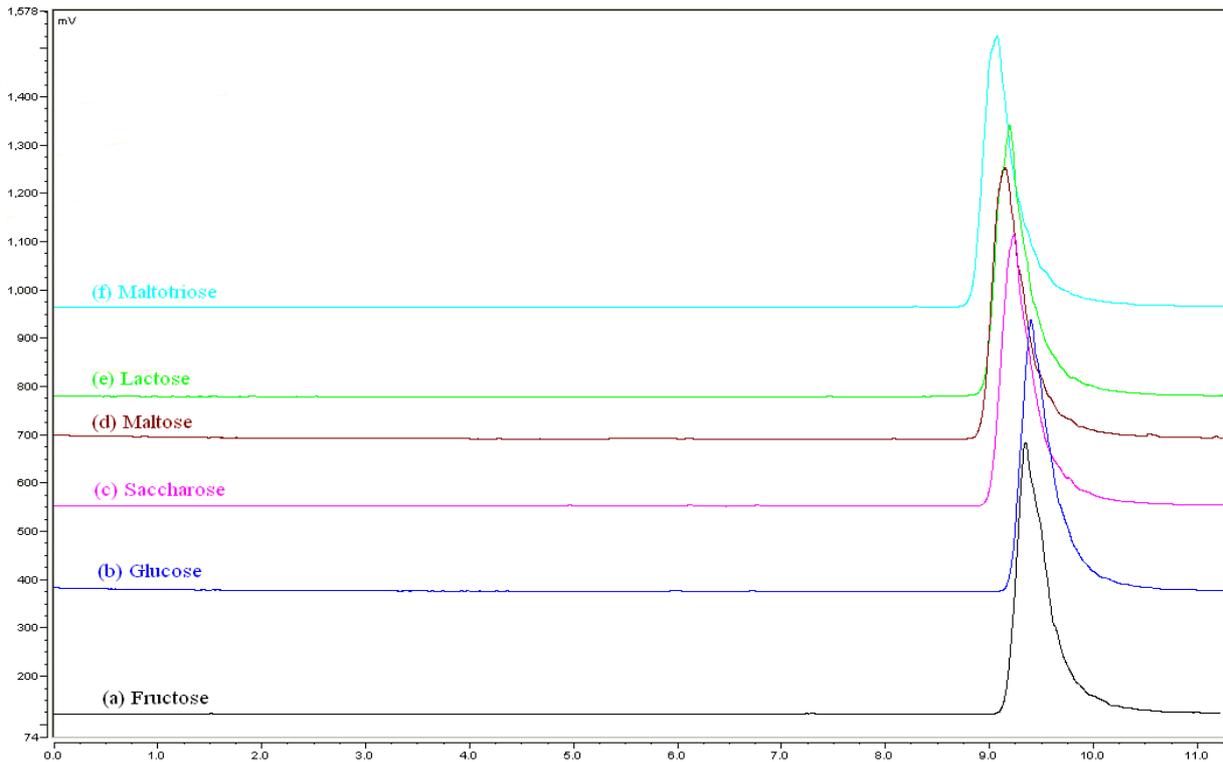


Figure V-1 : Chromatogramme de l'analyse du fructose (a), glucose (b), saccharose (c), maltose (d), lactose (e) et maltotriose (f) sur la colonne SB403-4E (6 μm , 4,6 x 250 mm) avec la précolonne SB400G-4A. Débit de la phase mobile : 0,3 mL/min. Détection par le DEDL : température de nébulisation 60 °C, température d'évaporation 60 °C et débit d'azote 1,6 SLM.

Une fraction de 2 min (de 8,5 à 10,5 min) autour des temps de sortie des sucres permet de les récupérer quantitativement. Cette fraction aqueuse et purifiée de l'échantillon doit ensuite subir une nouvelle séparation chromatographique pour quantifier séparément chacun des sucres. Il est également intéressant de noter que les petites molécules ioniques et/ou polaires (HMF, furfural, imidazoles...), théoriquement coéluées avec les sucres (d'après leurs masses molaires), interagissent avec la phase stationnaire (interactions hydrophiles ou électrostatiques) et sont donc élués au-delà du volume mort de la colonne (résultat non détaillé ici).

Lors de l'injection de caramel sur la colonne d'exclusion stérique Shodex, la récupération de la fraction des sucres est suivie par un lavage de 15 min avec une phase mobile contenant 80 % de méthanol puis un équilibrage de 15 min de la colonne avec la phase mobile aqueuse.

V.2.2 Séparation sélective des sucres récupérés

La deuxième colonne du système bidimensionnel doit séparer sélectivement les mono-, di- et tri-saccharides récupérés en phase purement aqueuse à la sortie de la colonne de filtration sur gel. La bibliographie montre que la colonne PGC peut être utilisée pour la séparation des glucides de faible masse molaire en chromatographie à polarités des phases inversées.

Le fructose et le glucose nécessitent l'utilisation d'une phase mobile 100 % aqueuse pour leur séparation [19]. Pour cause de rétention insuffisante, les conditions de préconcentration en tête de la colonne PGC de deuxième dimension ne seront donc pas réunies pour ces deux sucres avec la chromatographie d'exclusion stérique en première dimension. Par contre, les disaccharides séparés sur la colonne PGC avec une phase mobile contenant 4 % d'acétonitrile [19] et le maltotriose nécessitant une phase mobile encore plus éluante (10 % d'acétonitrile dans l'eau), devraient être soumis à un certain effet de focalisation à leur injection en phase purement aqueuse sur la colonne PGC.

Le Tableau V-1 récapitule les conditions d'élution sur la colonne PGC de la fraction récupérée à la sortie de la chromatographie de filtration sur gel.

Un lavage de 10 min à 100 % de méthanol permet de nettoyer la colonne pour la prochaine analyse. Toutes ces phases mobiles utilisées sont tout à fait compatibles avec le DEDL puisque leur volatilité est toujours supérieure aux sucres dosés.

Tableau V-1 : Conditions d'élution pour la séparation des mono-, di-, et tri-saccharides sur la colonne PGC après récupération de la fraction intéressante à la sortie de la colonne de filtration sur gel Shodex SB403-4E.

Temps (en min)	Débit (en mL/min)	% Méthanol	% ACN	% Eau	Commentaires
0	0,7	0	0	100	Equilibrage puis injection du contenu de la boucle à 10,5 mn puis séparation du glucose et fructose
15	0,7	0	0	100	
16	0,7	0	4	96	Séparation du saccharose, lactose et maltose
28	0,7	0	4	96	
30	0,7	0	10	90	Elution du maltotriose
35	0,7	0	10	90	
36	0,7	100	0	0	Lavage de la colonne
43	0,7	100	0	0	
43,1	0,7	0	0	100	Equilibrage de la colonne
45	0,7	0	0	100	

La température de l'analyse influe sur la séparation des sucres. La sélectivité entre le glucose et le fructose augmente en diminuant la température mais l'analyse à faible température implique la séparation des deux anomères des sucres réducteurs (Figure V-2).

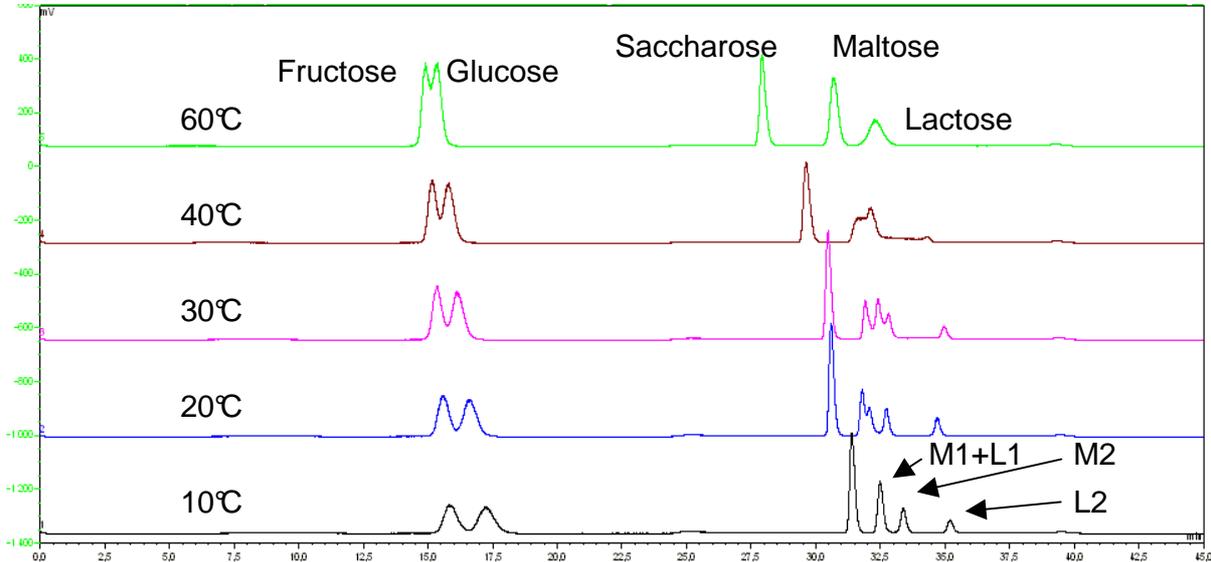


Figure V-2 : Influence de la température sur la séparation des sucres en LC-2D « heart-cutting » avec la colonne Shodex SB403-4E (6 μ m, 4,6 x 250 mm) en première dimension et la colonne PGC (5 μ m, 4,6 x 100 mm) en deuxième dimension. Conditions d'élution décrites dans le Tableau V-1. Paramètres du DEDL : température de nébulisation et d'évaporation : 60 °C ; débit d'azote : 1,6 SLM.

A une température de séparation de 10 °C, le retour à la ligne de base entre les pics de glucose et de fructose est presque observé. Par contre, chacun des disaccharides réducteurs, maltose et lactose, sont séparés en deux pics représentant leurs deux anomères, respectivement M1, M2, L1 et L2. Les deux premiers anomères, M1 et L1, sont co-élus et les deuxièmes anomères, M2 et L2, sont séparés entre eux et des deux premiers. La quantification du maltose et du lactose n'est envisageable à 10 °C qu'en se basant sur un seul anomère de ces sucres et en considérant que la proportion de cet anomère est constante dans les conditions de l'analyse (température et phase mobile données). A haute température, la quantification du lactose et du maltose est plus facile (un seul pic chromatographique) mais la séparation du fructose et du glucose n'est pas complète. La quantification de ces deux sucres ne sera pas précise.

Une solution envisagée est d'effectuer un gradient de température entre la sortie des monosaccharides (meilleure séparation à 10 °C) et l'élution des disaccharides (pas de

séparation des isomères à 60 °C) mais les performances du four ne sont pas suffisantes pour réaliser cette montée en température suffisamment rapidement (le temps de changement de 10 à 60 °C est de 20 min).

La température finalement choisie pour la séparation des sucres contenus dans le caramel est de 10 °C.

La méthode GFC-PGC basée sur la chromatographie de filtration sur gel sur la colonne Shodex SB403-4E couplée avec la colonne PGC mise en œuvre à 10 °C permet la séparation du glucose, fructose, saccharose, lactose, maltose et maltotriose contenus dans le caramel. La Figure V-3 présente les profils de sucres obtenus pour certains caramels spécifiques.

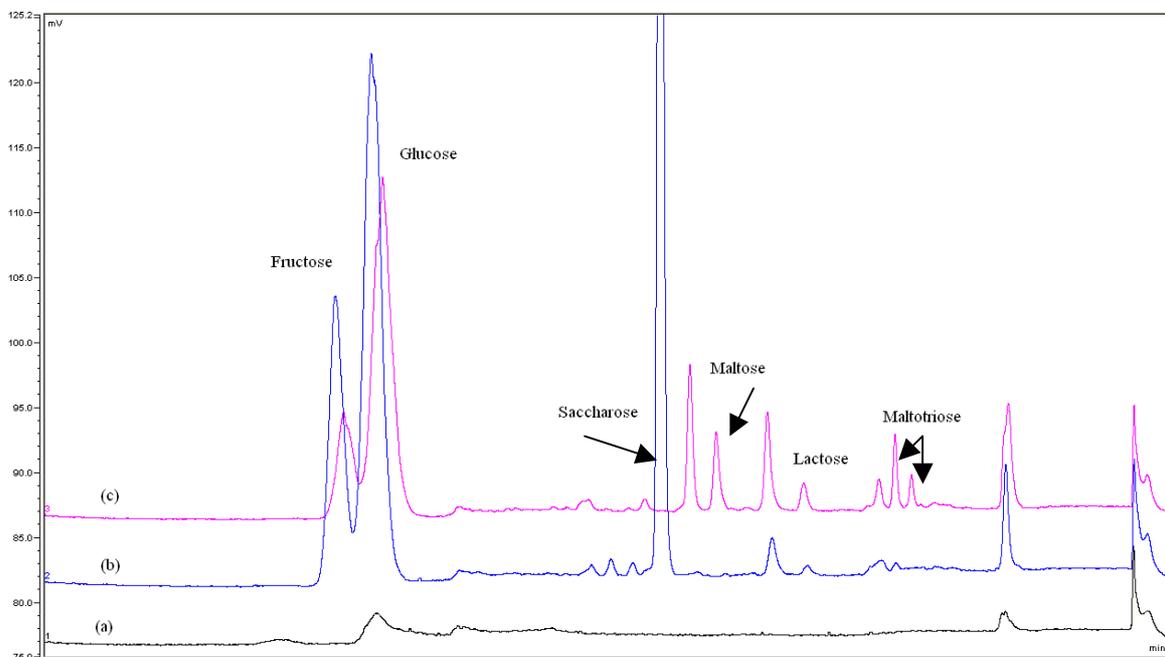


Figure V-3 : Profils de sucres obtenus avec la méthode LC-LC GFC-PGC sur (a) un caramel colorant de saccharose (absence de sucre après cuisson), (b) un caramel aromatique avec ajout de saccharose après cuisson (présence de glucose et fructose non caramélisé et de saccharose), (c) un caramel de sirop de glucose avec ajout de lait (présence de glucose, fructose, maltose, maltotriose et lactose).

La plus faible largeur des pics des di- et tri-saccharides par rapport à celle des pics des monosaccharides confirme que, sur la colonne PGC, les di- et tri-saccharides préconcentrés en eau pure et élués en gradient sont soumis à un effet de focalisation important.

V.3 Validation de la méthode par les profils d'exactitude

La teneur en sucre dans le caramel est dépendante du temps et de la température de cuisson ainsi que de l'ajout possible de sucre après cuisson. La gamme de validation doit donc couvrir la plus grande zone possible, pratiquement de la limite de détection à la saturation du DEDL. Le domaine choisi est de 100 à 2500 ppm en sucre dans les solutions diluées. La Figure V-4 montre les chromatogrammes obtenus pour un mélange de standards à différentes valeurs de la gamme de concentration.

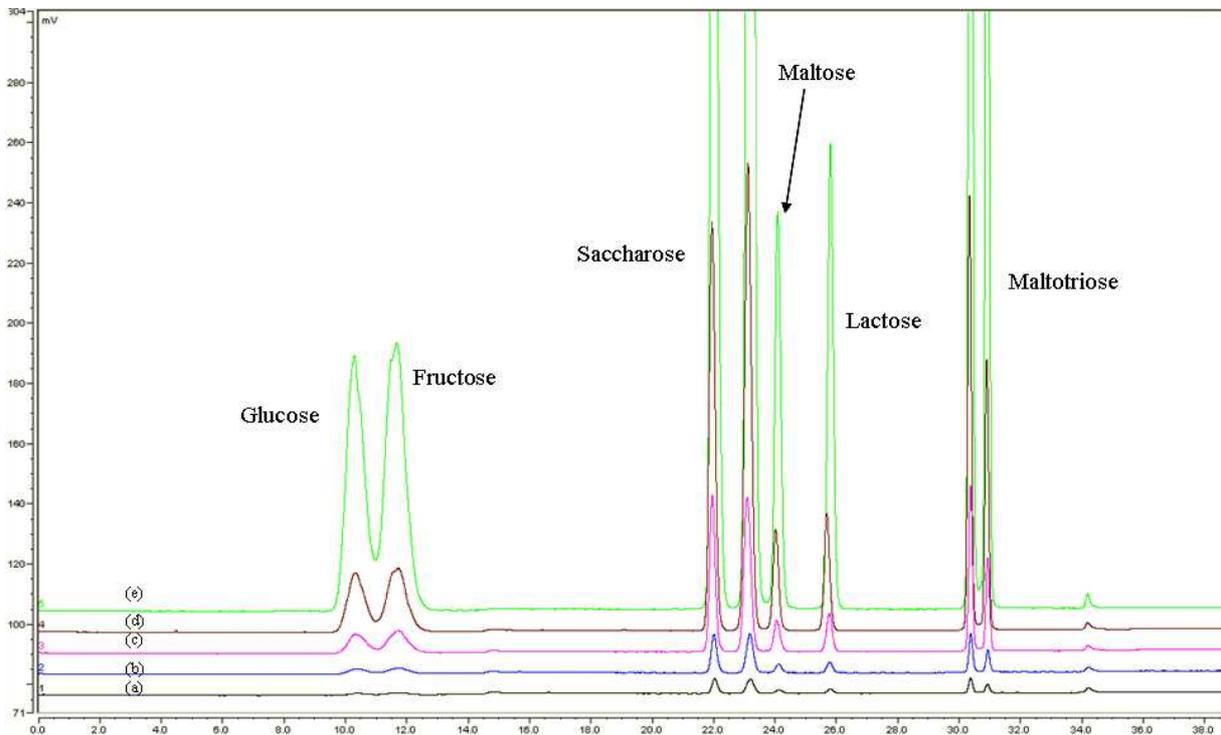


Figure V-4 : Superposition de l'analyse des différents points de la gamme par la méthode GFC-PGC : (a) 100 ppm, (b) 200 ppm, (c) 500 ppm, (d) 1000 ppm et (e) 2500 ppm.

De la même manière que pour la validation des méthodes précédentes, les gammes de validation sont préparées par ajouts dosés sur des caramels. La première gamme de validation est préparée sur un caramel avec peu de sucre résiduel, la deuxième sur un caramel contenant du fructose, glucose et saccharose, et la troisième sur un caramel contenant du maltose et du maltotriose.

La non-linéarité de la fonction de réponse du DEDL (Figure V-4) impose la transformation des données en log-log pour pouvoir tracer une courbe d'étalonnage

linéaire. Mise à part cette transformation des données, le protocole de validation par les profils d'exactitude est le même. La méthode d'analyse doit assurer que 90 % des résultats sont à moins de 20 % de la valeur vraie ($\lambda = 20\%$ et $\beta = 90\%$ sont les valeurs des paramètres nécessaires à la validation par les profils d'exactitude).

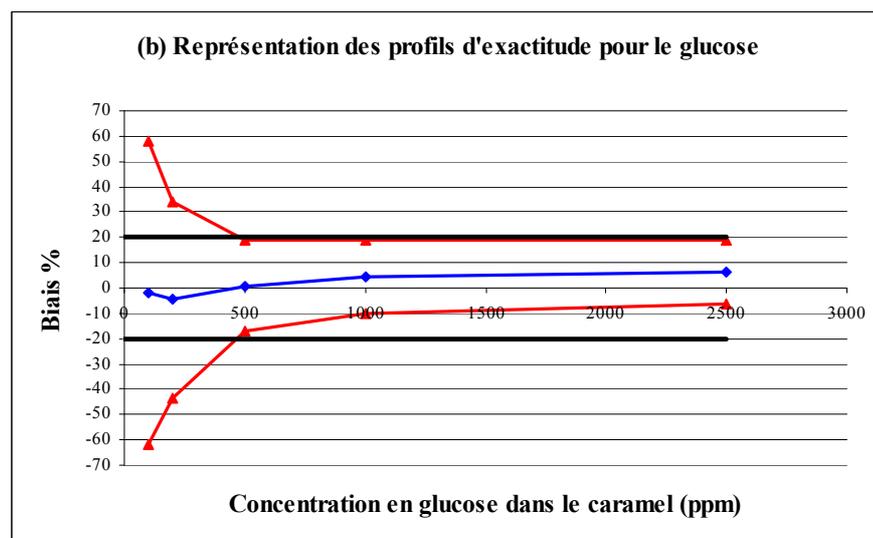
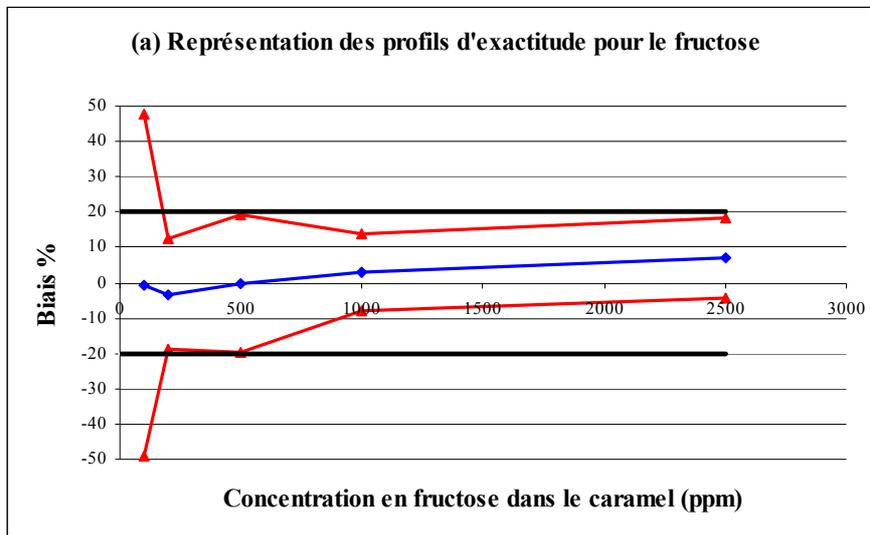
L'annexe 4 présente les résultats des analyses effectuées pour la validation par les profils d'exactitude de la méthode GFC-PGC. Le Tableau V-2 montre les paramètres descriptifs de la méthode calculés à partir des échantillons de validation pour chaque sucre à chaque concentration.

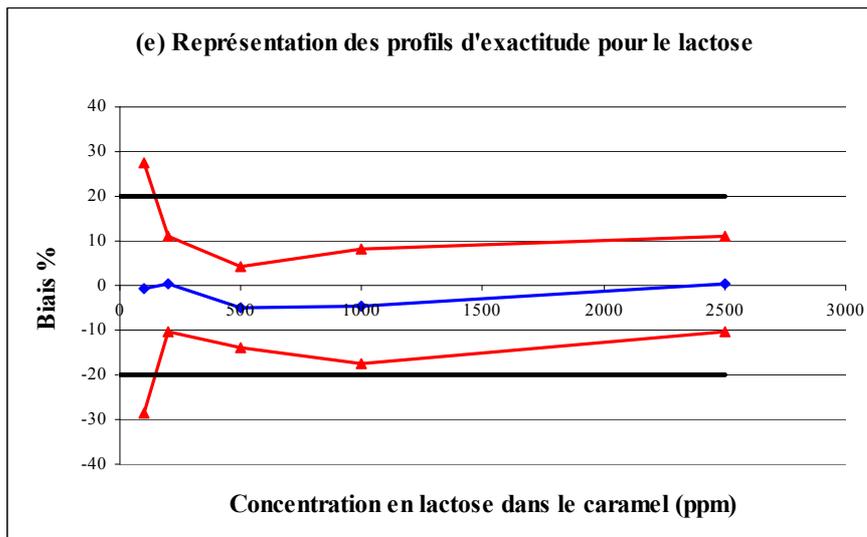
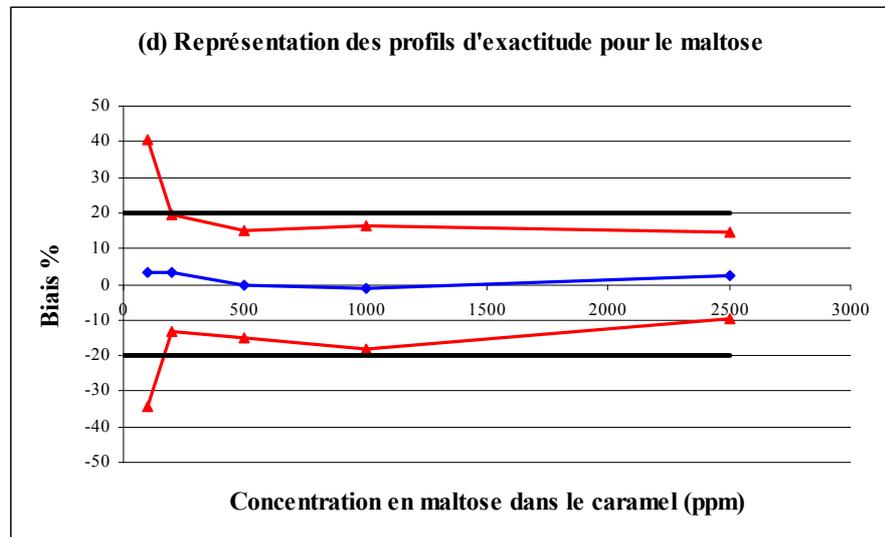
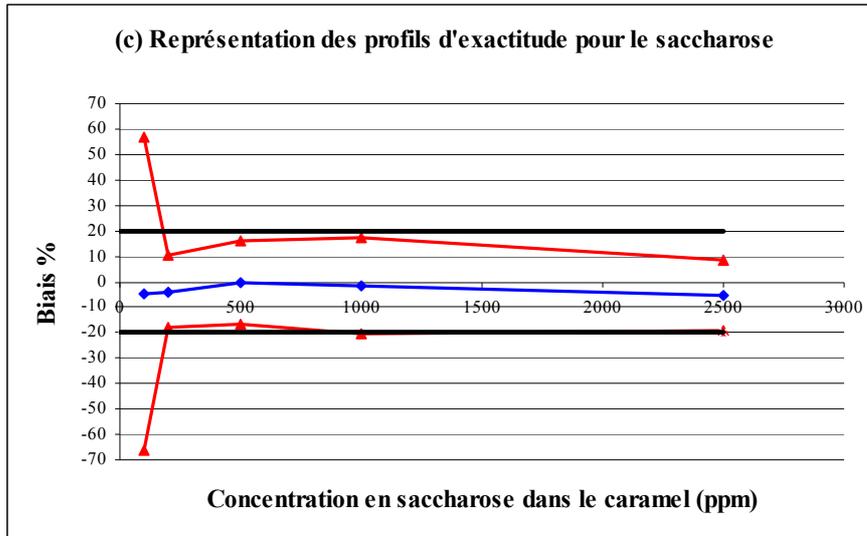
Tableau V-2 : Résultats de l'étude de validation par les profils d'exactitude de la méthode GFC-PGC pour l'analyse des sucres dans le caramel.

	Teneur en sucre	Biais (%)	Ecart type relatif de répétabilité intra-jour (%)	Ecart type relatif de répétabilité inter-jour (%)	Ecart type relatif de fidélité (%)	Domaine d'exactitude	
						Limite inférieure	Limite supérieure
FRUCTOSE	100 ppm	-0,71	11,07	11,15	15,71	-48,95	47,53
	200 ppm	-3,23	4,87	2,65	5,54	-18,77	12,31
	500 ppm	-0,24	3,01	4,59	5,49	-19,74	19,26
	1000 ppm	2,89	3,58	1,65	3,94	-8,12	13,90
	2500 ppm	6,94	3,60	1,89	4,07	-4,45	18,33
GLUCOSE	100 ppm	-1,92	9,52	13,90	16,85	-61,70	57,85
	200 ppm	-4,69	10,30	7,40	12,68	-43,33	33,95
	500 ppm	0,76	4,20	4,04	5,83	-17,11	18,64
	1000 ppm	4,42	4,17	2,54	4,88	-10,40	19,23
	2500 ppm	6,20	2,08	2,90	3,57	-6,44	18,84
SACCHAROSE	100 ppm	-4,82	4,11	11,95	12,64	-66,26	56,63
	200 ppm	-3,89	2,30	3,30	4,02	-18,16	10,38
	500 ppm	-0,19	2,00	4,13	4,59	-16,60	16,21
	1000 ppm	-1,70	2,79	4,53	5,32	-20,62	17,22
	2500 ppm	-5,42	4,41	2,35	5,00	-19,42	8,58
MALTOSE	100 ppm	3,20	9,64	7,53	12,23	-34,13	40,52
	200 ppm	3,16	2,31	3,93	4,56	-13,06	19,38
	500 ppm	-0,15	3,47	3,45	4,89	-15,16	14,86
	1000 ppm	-1,09	3,04	3,83	4,89	-18,37	16,19
	2500 ppm	2,30	1,47	3,05	3,38	-9,78	14,39
LACTOSE	100 ppm	-0,57	7,35	5,50	9,18	-28,57	27,42
	200 ppm	0,37	1,81	2,39	3,00	-10,25	10,99
	500 ppm	-4,90	3,36	0,86	3,47	-14,02	4,22
	1000 ppm	-4,64	4,63	1,39	4,83	-17,38	8,10
	2500 ppm	0,29	4,31	0,23	4,31	-10,52	11,10
MALTOTRIOSE	100 ppm	-1,34	3,50	12,96	13,42	-66,82	64,13
	200 ppm	0,42	2,26	4,75	5,26	-18,39	19,24
	500 ppm	0,95	1,92	2,15	2,88	-9,20	11,10
	1000 ppm	0,98	3,88	3,21	5,03	-14,40	16,36
	2500 ppm	-0,84	2,03	3,64	4,17	-15,69	14,01

Le biais obtenu avec la méthode GFC-PGC pour tous les sucres et toutes les concentrations est rarement supérieur à 5 %. L'erreur systématique sur les résultats est donc faible. Les écarts types relatifs de répétabilité intra-jour, de répétabilité inter-jour et donc de fidélité sont généralement inférieures à 5 % et ne dépassent les 10 % que pour la plus basse concentration du domaine étudié.

Ces paramètres permettent ensuite de calculer les limites inférieure et supérieure du domaine d'exactitude représentant 90 % des résultats. Ces limites montrent l'imprécision des résultats à faible concentration (100 ppm). Il est alors possible de représenter graphiquement les profils d'exactitude pour chaque sucre dans le domaine 100 - 2500 ppm (Figure V-5).





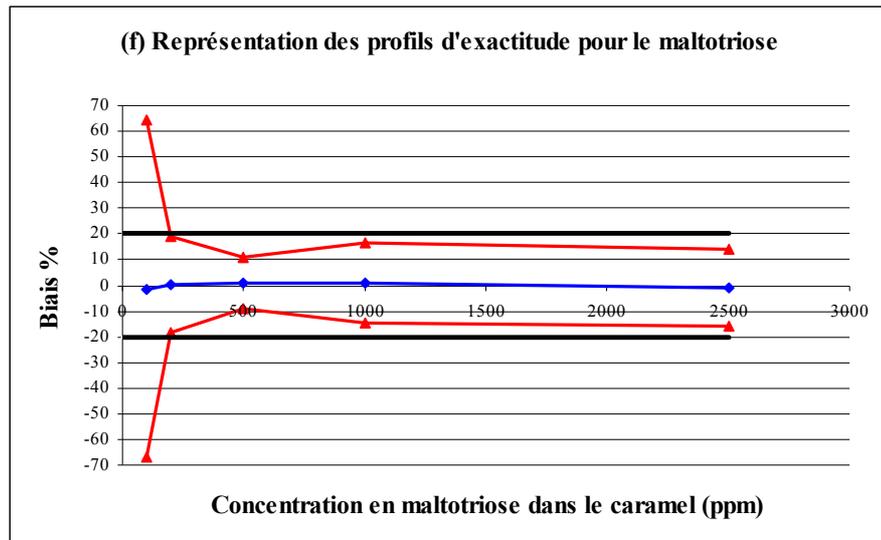


Figure V-5 : Représentations des profils d'exactitude de la méthode GFC-PGC pour la quantification du fructose (a), glucose (b), saccharose (c), maltose (d), lactose (e) et maltotriose (f). ◆ : Evolution du biais ; ▲ : Evolution des limites basse et haute du domaine d'exactitude ; — : Limite du domaine de validité.

L'analyse des sucres dans le caramel par la méthode GFC-PGC répond aux objectifs fixés (limite d'acceptation de 20 % et probabilité de résultats bons supérieure à 90 %) dans le domaine de concentration de 200 à 2500 ppm pour le fructose, saccharose, maltose, lactose et maltotriose et de 500 à 2500 ppm pour le glucose (Figure V-5). La quantification à 100 ppm pour tous les sucres n'est pas du tout assez répétable pour espérer que les résultats soient considérés comme justes.

Les gammes validées sont suffisamment larges pour effectuer des suivis de réaction et du contrôle de produits finis. Suivant le facteur de dilution du caramel utilisé, ces gammes permettent d'analyser les sucres à une teneur allant de 1 % (dilution par 50) jusqu'à 50 % (dilution par 200). Pour certains caramels, il sera peut être nécessaire de réaliser deux analyses avec des facteurs de dilution différents pour déterminer la teneur de tous les sucres analysés.

V.4 Etude de la sélectivité de la méthode LC-LC

L'utilisation du DEDL comme détecteur pour la quantification des sucres ne permet pas d'assurer la sélectivité de la méthode. Il faudrait comparer les résultats obtenus avec la méthode LC-LC validée à ceux d'une méthode considérée comme référence. Pour palier l'absence d'une véritable méthode de référence, nous avons réalisé deux opérations :

- opération 1 : deux échantillons de caramel ont été envoyés dans un laboratoire extérieur pour la quantification des mono- et di-saccharides par chromatographie en phase liquide (d'après le bulletin d'analyse, l'incertitude sur les résultats est de 10 %) et analysés avec la méthode LC-LC dans l'entreprise. Les résultats obtenus sont comparés dans le Tableau V-3.

- opération 2 : les sucres présents dans des sirops de sucres utilisés comme matière première de caramélisation ont été quantifiés par la méthode LC-LC. Les résultats obtenus sont comparés aux teneurs annoncées par le fournisseur sur les fiches produits (l'incertitude sur les teneurs n'est pas communiquée) (Tableau V-3).

Tableau V-3 : Comparaison des résultats d'analyse pour l'étude de la sélectivité de la méthode LC-LC.

	Fructose			Glucose		
	LC-LC	Labo. Extérieur	Ecart (%)	LC-LC	Labo. Extérieur	Ecart (%)
Caramel 1				19,59	20,80	5,84
Caramel 2	18,35	18,80	2,39	28,30	34,80	18,68
	LC-LC	Fiche Produit	Ecart (%)	LC-LC	Fiche Produit	Ecart (%)
Sirop de sucre 1	8,10	8,04	-0,73	19,68	24,46	19,53
Sirop de sucre 2	7,95	8,13	2,26	18,80	24,73	23,99
Sirop de sucre 3	7,75	7,54	-2,73	19,04	24,04	20,80
	Saccharose			Maltose		
	LC-LC	Labo. Extérieur	Ecart (%)	LC-LC	Labo. Extérieur	Ecart (%)
Caramel 1	23,27	27,70	15,99	7,65	8,60	11,05
Caramel 2				9,03	11,20	19,38
	LC-LC	Fiche Produit	Ecart (%)	LC-LC	Fiche Produit	Ecart (%)
Sirop de sucre 1				31,60	35,07	9,89
Sirop de sucre 2				30,50	34,28	11,02
Sirop de sucre 3				32,06	36,14	11,30

Les écarts entre les résultats obtenus par la méthode LC-LC et les valeurs de « référence » (données par le laboratoire extérieur ou le fournisseur) sont faibles pour le fructose et plus importants pour le glucose, le saccharose et le maltose. Ces premiers résultats, obtenus sur un faible nombre d'échantillons et à partir de méthodes de référence mal définies, ne permettent cependant pas de conclure sur la sélectivité de la méthode LC-LC. Des études complémentaires sont nécessaires.

Conclusion

Une méthode d'analyse par LC-2D « heart-cutting » utilisant la chromatographie de filtration sur gel en première dimension et la séparation sur PGC à 10 °C en seconde dimension, avec un DEDL comme système de détection, permet de quantifier directement, après une simple dilution de l'échantillon dans l'eau, le fructose, le glucose, le saccharose, le maltose, le lactose et le maltotriose contenu dans le caramel. Cette méthode est validée (90 % des résultats à moins de 20 % de la valeur vraie) dans le domaine 200 – 2500 ppm pour tous les sucres, sauf le glucose. Ce dernier ne répond aux critères de validation que dans le domaine 500 - 2500 ppm. En modifiant le facteur de dilution de l'échantillon entre 50 et 200, cette méthode permet de quantifier précisément les sucres du caramel à des teneurs variant entre 1 et 50 %. Cependant, la sélectivité de la méthode n'est pas encore totalement démontrée.

Références bibliographiques

1. Martínez Montero, C.; Rodríguez Dodero, M. C.; Guillén Sánchez, D. A.; Barroso, C. G., Analysis of Low Molecular Weight Carbohydrates in Food and Beverages: A Review. *Chromatographia* **2004**, 59, (1), 15-30.
2. Truhaut, R.; Castagnou, R.; Larcebau, S.; Lassalle-Saint-Jean, V., Contribution à l'étude du caramel: Technique de dosage chromatographique de quelques sucres. *Bulletin de la Société de pharmacie de Bordeaux* **1961**, 100, 78-86.
3. Edelmann, A.; Ruzicka, C.; Frank, J.; Lendl, B.; Schrenk, W.; Gornik, E.; Strasser, G., Towards functional group-specific detection in high-performance liquid chromatography using mid-infrared quantum cascade lasers. *Journal of Chromatography A* **2001**, 934, (1-2), 123-128.
4. Wei, Y.; Ding, M.-Y., Analysis of carbohydrates in drinks by high-performance liquid chromatography with a dynamically modified amino column and evaporative light scattering detection. *Journal of Chromatography A* **2000**, 904, (1), 113-117.
5. Mendes, E.; Brojo Proença, E.; Ferreira, I. M. P. L. V. O.; Ferreira, M. A., Quality evaluation of Portuguese honey. *Carbohydrate Polymers* **1998**, 37, (3), 219-223.
6. Castellari, M.; Versari, A.; Spinabelli, U.; Galassi, S.; Amati, A., An improved HPLC method for the analysis of organic acids, carbohydrates, and alcohols in grape musts and wines. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* **2000**, 23, (13), 2047 - 2056.
7. Megherbi, M.; Herbreteau, B.; Faure, R.; Dessalces, G.; Grenier-Loustalot, M. F., Solid Phase Extraction of Oligo- and Polysaccharides; Application to Maltodextrins and Honey Qualitative Analysis. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* **2008**, 31, (7), 1033 - 1046.
8. Cataldi, T. R. I.; Campa, C.; Casella, I. G.; Bufo, S. A., Determination of Maltitol, Isomaltitol, and Lactitol by High-pH Anion-Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1999**, 47, (1), 157-163.

9. Casella, I. G.; Guascito, M. R.; Cataldi, T. R. I., Electrocatalysis and amperometric detection of alditols and sugars at a gold-nickel composite electrode in anion-exchange chromatography. *Analytica Chimica Acta* **1999**, 398, (2-3), 153-160.
10. Rakotomanga, S.; Baillet, A.; Pellerin, F.; Baylocq-Ferrier, D., Liquid chromatographic analysis of monosaccharides with phenylisocyanate derivatization. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **1992**, 10, (8), 587-591.
11. Masuda, R.; Kaneko, K.; Yamashita, I., Sugar and Cyclitol Determination in Vegetables by HPLC Using Postcolumn Fluorescent Derivatization. *Journal of Food Science* **1996**, 61, (6), 1186-1190.
12. Stefansson, M.; Westerlund, D., Ligand-exchange chromatography of carbohydrates and glycoconjugates. *Journal of Chromatography A* **1996**, 720, (1-2), 127-136.
13. Churms, S. C., Recent progress in carbohydrate separation by high-performance liquid chromatography based on size exclusion. *Journal of Chromatography A* **1996**, 720, (1-2), 151-166.
14. Churms, S. C., Recent progress in carbohydrate separation by high-performance liquid chromatography based on hydrophilic interaction. *Journal of Chromatography A* **1996**, 720, (1-2), 75-91.
15. Nogueira, L. C.; Silva, F.; Ferreira, I. M. P. L. V. O.; Trugo, L. C., Separation and quantification of beer carbohydrates by high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection. *Journal of Chromatography A* **2005**, 1065, (2), 207-210.
16. Li, J.; Chen, M.; Zhu, Y., Separation and determination of carbohydrates in drinks by ion chromatography with a self-regenerating suppressor and an evaporative light-scattering detector. *Journal of Chromatography A* **2007**, 1155, (1), 50-56.
17. Blanco Gomis, D.; Muro Tamayo, D.; Mangas Alonso, J., Determination of monosaccharides in cider by reversed-phase liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta* **2001**, 436, (1), 173-180.

18. Koizumi, K., High-performance liquid chromatographic separation of carbohydrates on graphitized carbon columns. *Journal of Chromatography A* **1996**, 720, (1-2), 119-126.
19. Koizumi, K.; Okada, Y.; Fukuda, M., High-performance liquid chromatography of mono- and oligo-saccharides on a graphitized carbon column. *Carbohydrate Research* **1991**, 215, (1), 67-80.
20. Picinelli, A.; Suarez, B.; Moreno, J.; Rodriguez, R.; Caso-Garcia, L. M.; Mangas, J. J., Chemical Characterization of Asturian Cider. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2000**, 48, (9), 3997-4002.
21. Vérette, E.; Qian, F.; Mangani, F., On-line dialysis with high-performance liquid chromatography for the automated preparation and analysis of sugars and organic acids in foods and beverages. *Journal of Chromatography A* **1995**, 705, (2), 195-203.
22. Kohler, M.; Haerdi, W.; Christen, P.; Veuthey, J.-L., The evaporative light scattering detector: some applications in pharmaceutical analysis. *Trends in Analytical Chemistry* **1997**, 16, (8), 475-484.
23. Weston, R. J.; Brocklebank, L. K., The oligosaccharide composition of some New Zealand honeys. *Food Chemistry* **1999**, 64, (1), 33-37.
24. Bartolozzi, F.; Bertazza, G.; Bassi, D.; Cristoferi, G., Simultaneous determination of soluble sugars and organic acids as their trimethylsilyl derivatives in apricot fruits by gas-liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **1997**, 758, (1), 99-107.
25. Ratsimba, V.; Fernández, J. M. G.; Defaye, J.; Nigay, H.; Voilley, A., Qualitative and quantitative evaluation of mono- and disaccharides in -fructose, -glucose and sucrose caramels by gas-liquid chromatography-mass spectrometry: Di--fructose dianhydrides as tracers of caramel authenticity. *Journal of Chromatography A* **1999**, 844, (1-2), 283-293.
26. Laine, R. A.; Sweeley, C. C., O-methyl oximes of sugars. Analysis as O-trimethylsilyl derivatives by gas-liquid chromatography and mass spectrometry. *Carbohydrate Research* **1973**, 27, (1), 199-213.

27. Curtius, H. C.; Müller, M.; Völlmin, J. A., Studies on the ring structures of ketoses by means of gas chromatography and mass spectroscopy. *Journal of Chromatography A* **1968**, 37, 216-224.
28. Katona, Z. F.; Sass, P.; Molnár-Perl, I., Simultaneous determination of sugars, sugar alcohols, acids and amino acids in apricots by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1999**, 847, (1-2), 91-102.
29. Klockow, A.; Paulus, A.; Figueiredo, V.; Amadò, R.; Widmer, H. M., Determination of carbohydrates in fruit juices by capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **1994**, 680, (1), 187-200.
30. Klampfl, C. W.; Buchberger, W., Determination of carbohydrates by capillary electrophoresis with electrospray-mass spectrometric detection. *Electrophoresis* **2001**, 22, (13), 2737-2742.
31. Ye, J.; Baldwin, R. P., Determination of carbohydrates, sugar acids and alditols by capillary electrophoresis and electrochemical detection at a copper electrode. *Journal of Chromatography A* **1994**, 687, (1), 141-148.
32. Rydlund, A.; Dahlman, O., Efficient capillary zone electrophoretic separation of wood-derived neutral and acidic mono- and oligosaccharides. *Journal of Chromatography A* **1996**, 738, (1), 129-140.

Chapitre VI :

Application des méthodes d'analyse au suivi de production

Introduction

Compte tenu de la simplicité de la préparation d'échantillon mise en œuvre (simple dilution dans l'eau), la rapidité des méthodes d'analyse nouvellement développées permet d'envisager un suivi de la réaction de caramélisation.

L'analyse de nombreux prélèvements du mélange réactionnel effectués à des intervalles de temps réguliers au cours de la caramélisation permet de visualiser les cinétiques de disparition des sucres et d'apparition des CNI (THI et 4MeI).

L'étude de l'évolution de ces cinétiques en fonction des différents paramètres régissant la réaction devrait conduire à terme à la définition d'une recette permettant de diminuer la formation des composés néoformés indésirables et ainsi améliorer la qualité des caramels colorants produits.

VI.1 Evolution de la composition en sucre au cours de la caramélisation

Lors de la caramélisation, le sucre, initialement présent, se dégrade pour former les molécules odorantes et colorantes du caramel. Un prélèvement régulier du mélange réactionnel a permis de tracer l'évolution de la teneur en glucose et en fructose d'un caramel colorant de classe III fabriqué à partir de glucose (Figure VI-1). Le premier prélèvement (Temps de caramélisation = 0) correspond au moment où l'ajout d'ammoniaque commence. La méthode de dosage des sucres utilisée est la méthode développée et validée dans le chapitre V de ce rapport.

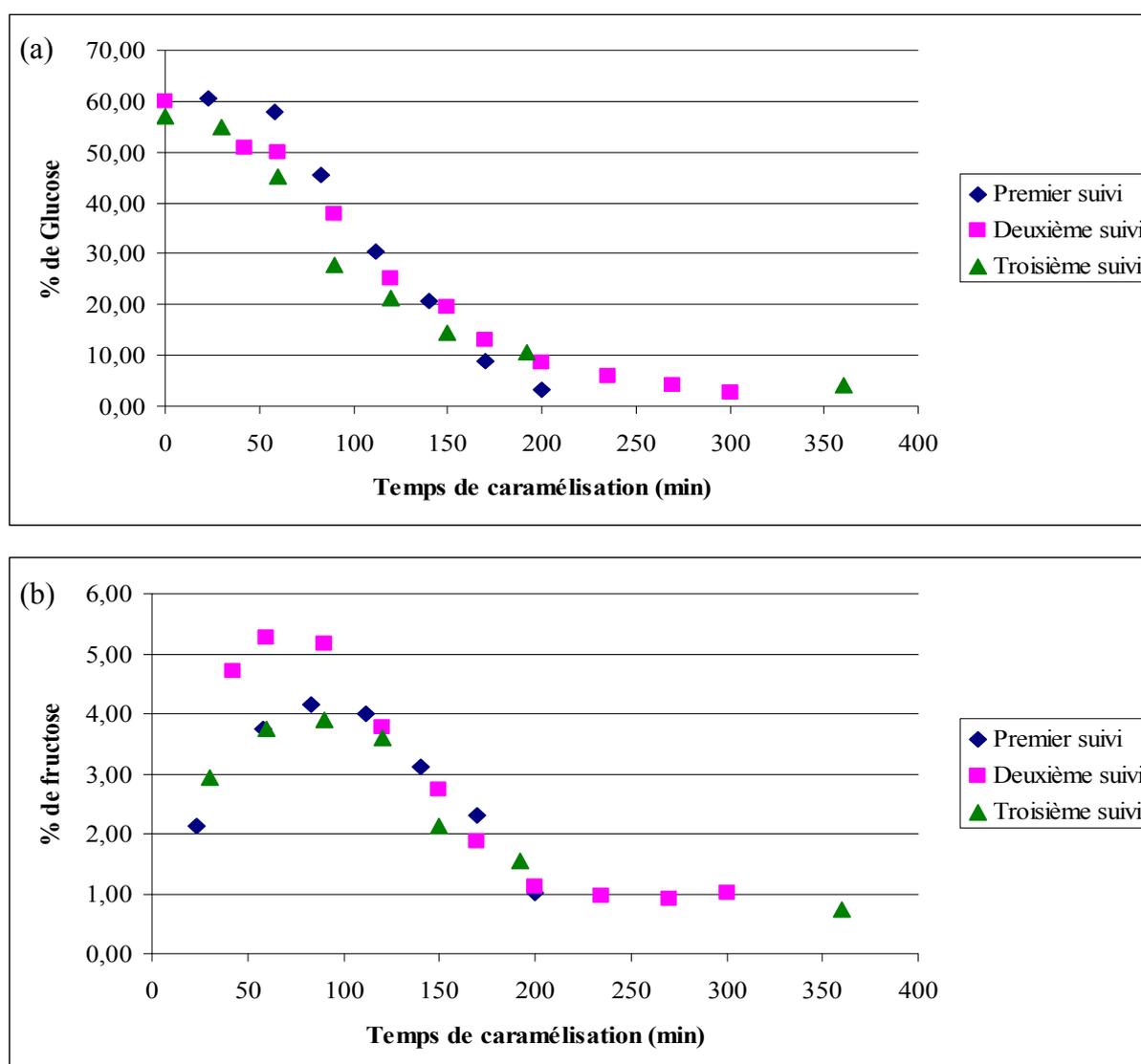


Figure VI-1 : Evolution de la teneur en glucose (a) et en fructose (b) au cours du temps lors de la caramélisation du glucose en présence d'ammoniaque comme promoteur de caramélisation.

L'évolution de la dégradation du glucose montre un temps de latence, puis une phase de diminution exponentielle de sa teneur, avant un équilibre final proche de 0. Ce temps de latence a déjà été observé lors de précédentes études cinétiques de la réaction de caramélisation avec d'autres méthodes d'analyse [1-3].

Une quantité non négligeable de fructose se forme également lors de la caramélisation du glucose en milieu ammoniacal (jusqu'à 5 %). Ce sucre se forme grâce au réarrangement de Lobry de Bruyn - Alberda van Ekenstein qui permet de transformer le glucose en fructose (cf. I.2.2.1).

Un caramel à base de saccharose est également suivi pour connaître l'évolution de la teneur en glucides au cours de la caramélisation. Le premier prélèvement est effectué lorsque le saccharose est totalement transféré dans le cuiseur (température de 50 °C) puis le mélange est prélevé à intervalles de temps réguliers lors de l'augmentation de la température du mélange. La température maximale atteinte est de 170 °C au bout de 120 min de cuisson. La méthode d'analyse développée dans le chapitre V permet de visualiser l'évolution de la teneur en saccharose, glucose et fructose du mélange (Figure VI-2).

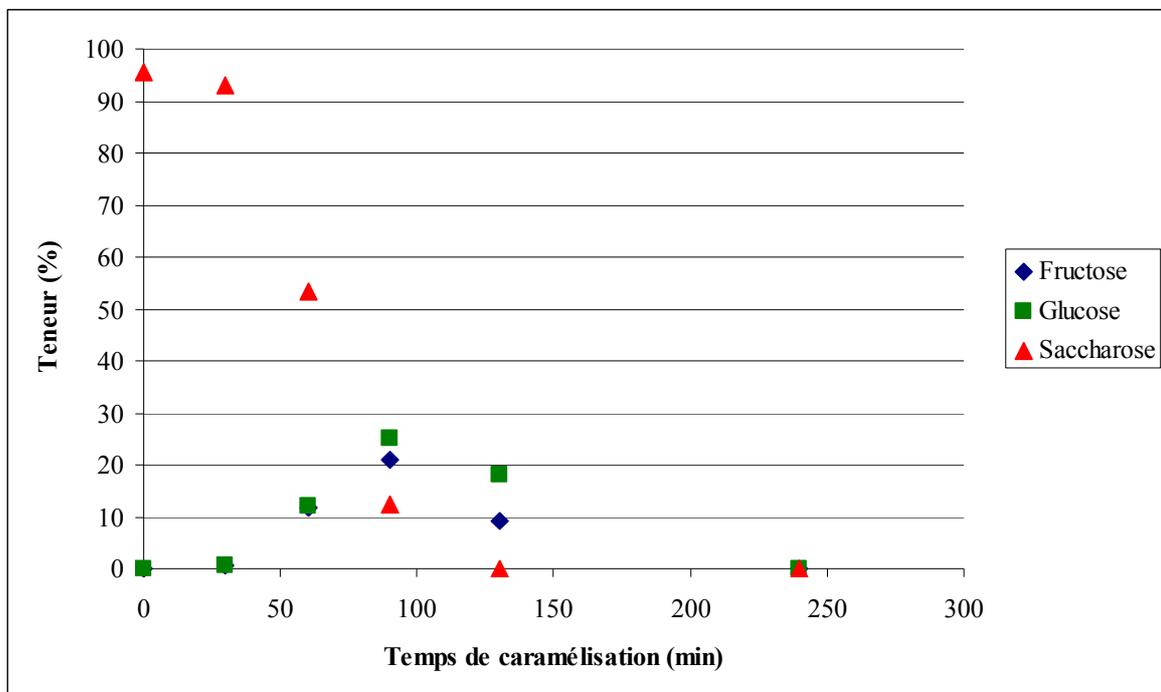


Figure VI-2 : Evolution de la teneur en fructose, en glucose et en saccharose au cours du temps lors de la caramélisation de saccharose en présence de sulfite d'ammonium comme promoteur de caramélisation (caramel colorant de classe IV).

L'évolution des teneurs en glucides montre une décomposition du saccharose en glucose et fructose pendant environ 100 min (température atteinte de 150 °C). Les teneurs en fructose et glucose atteignent alors un maximum (vers 90 min et 140 °C) puis décroissent du fait des réactions de déshydratation que subissent ces molécules pour former le caramel. Le taux de fructose diminue plus rapidement que celui du glucose car il caramélise plus facilement et à une température plus basse (cf. I.2.2.1). A la fin de la caramélisation, les teneurs en fructose, glucose et saccharose sont très faibles.

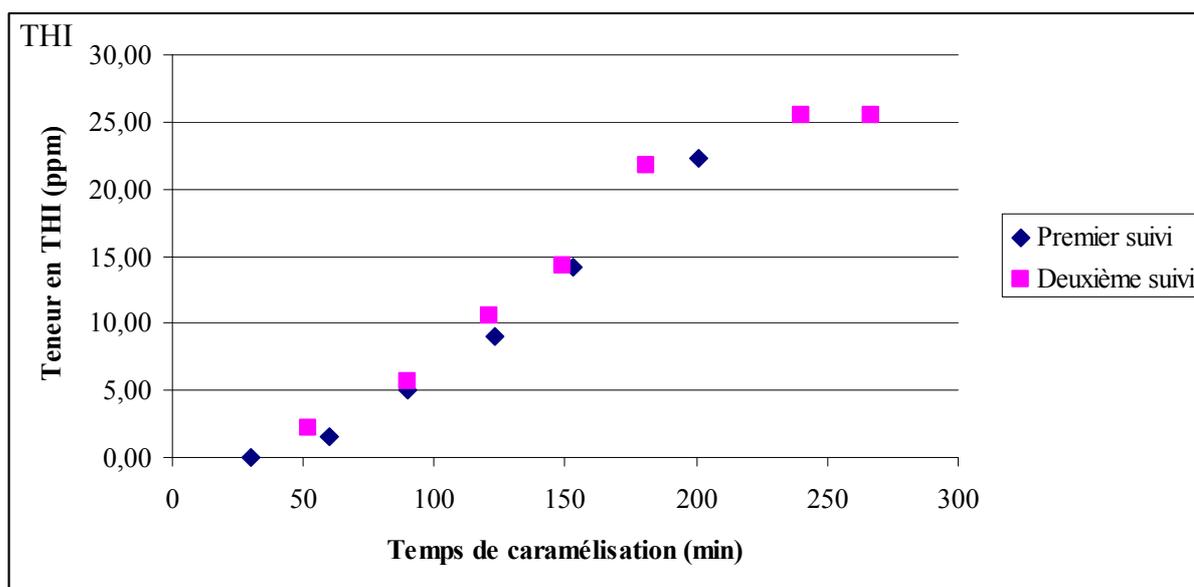
Ces deux suivis des glucides lors de la caramélisation ont permis de confirmer les résultats trouvés lors de la recherche bibliographique sur les réactions de caramélisation (I.2.2).

VI.2 Evolution des teneurs en 4MeI et en THI

L'analyse des prélèvements au cours du processus de caramélisation a également pour but d'améliorer les connaissances sur la formation des CNI et d'essayer de diminuer leur teneur dans le produit final, tout en gardant les caractéristiques du caramel.

Lors de la fabrication des caramels de classe III, l'ammoniaque est ajoutée progressivement. Actuellement, cet ajout se fait en deux phases : pendant une heure, le débit d'ajout est fixé à 14 % du débit maximal de la pompe, puis à 70 % jusqu'à ce que la totalité de l'ammoniaque soit mélangé au sucre. La cuisson du caramel se poursuit ensuite jusqu'à atteindre la couleur souhaitée.

Deux cuissons successives de caramel colorant de classe III ont été suivies et le dosage du THI et du 4MeI, sur les échantillons prélevés à intervalles réguliers, par les méthodes développées et validées dans les chapitre III et IV respectivement, a permis de tracer leurs cinétiques d'apparition (Figure VI-3).



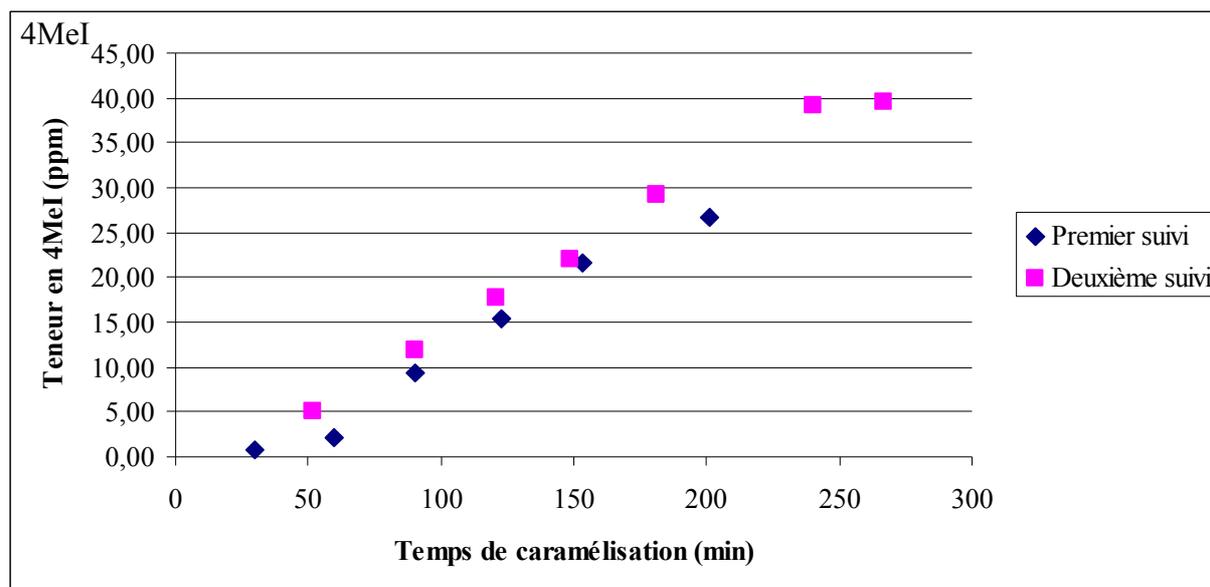


Figure VI-3 : Evolution des teneurs en THI et 4MeI au cours de la caramélisation du glucose en présence d'ammoniaque.

Le THI et le 4MeI se forment pendant toute la durée de la caramélisation. En examinant plus en détail la forme des courbes, il semble que la vitesse de formation de ces CNI est plus faible pendant la première heure qu'après (cette tendance est moins visible sur le deuxième suivi). Il y aurait donc une corrélation entre le débit d'ajout d'ammoniaque et la vitesse de formation de ces CNI.

Dans le but de diminuer la formation du THI et du 4MeI dans le caramel, des essais ont été réalisés sur un réacteur pilote permettant de faire varier facilement le débit d'ajout d'ammoniaque dans le cuiseur. Contrairement à ce qui se fait dans la recette initiale, l'introduction de l'ammoniaque dans ces essais se fait à débit constant tout au long de la cuisson. Différents essais ont été effectués avec des débits d'ajout correspondant à 90 %, 70 % et 50 % du débit maximal de la pompe (Figure VI-4).

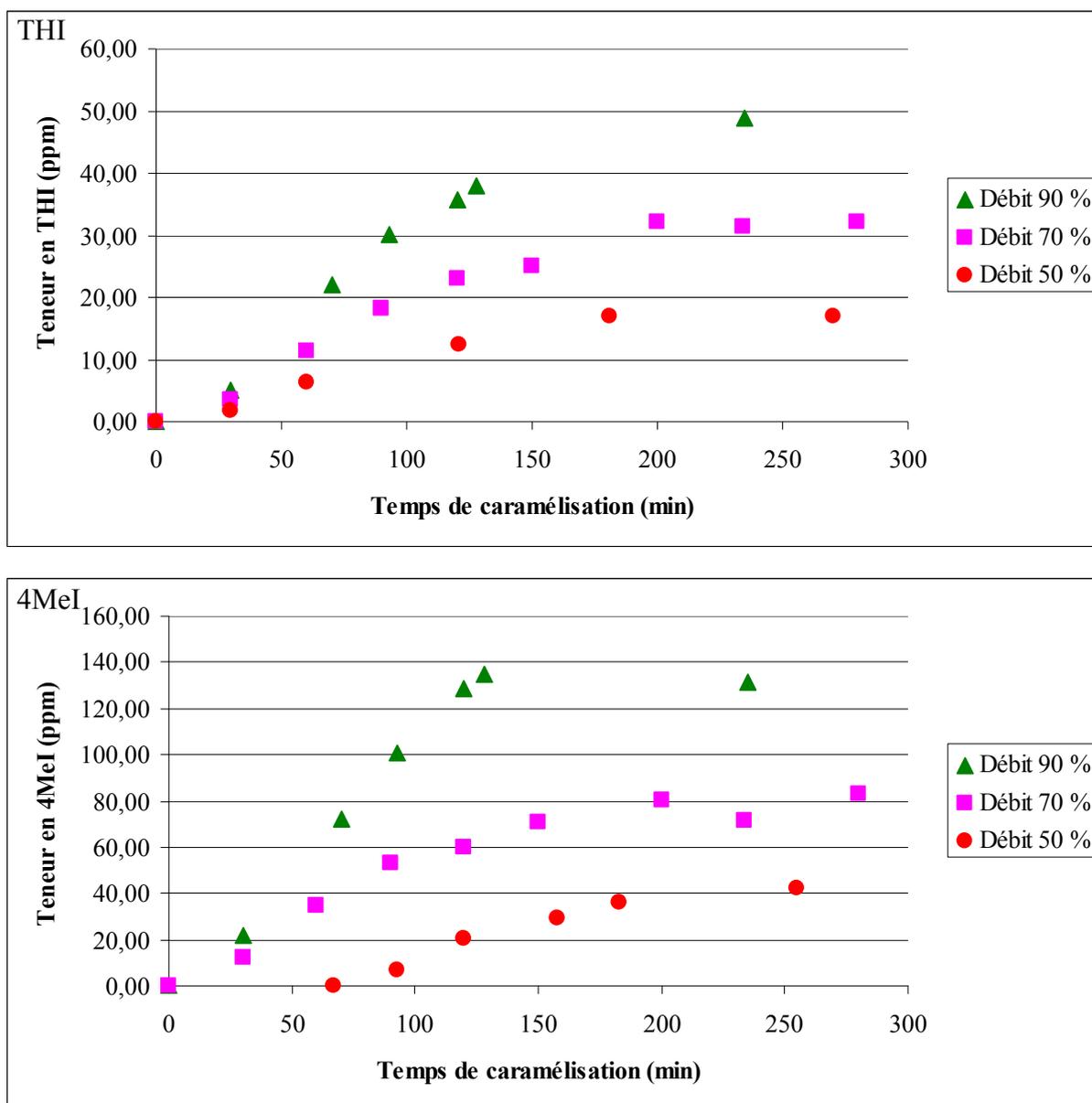


Figure VI-4 : Evolution des teneurs en THI et 4MeI formé au cours de la caramélisation du glucose suivant le débit d'ajout d'ammoniaque.

Il est clair que les vitesses de formation du THI et du 4MeI ainsi que les concentrations atteintes en fin d'opération, sont d'autant moins importantes que le débit d'ajout de l'ammoniaque est faible. Mais il est impossible de descendre en dessous d'un débit d'ajout équivalent à 50 % du débit de la pompe car le caramel obtenu n'est plus stable dans les milieux d'utilisation (apparition de troubles lors du mélange avec les bières).

En prenant en compte les quatre ou cinq premiers points des courbes cinétiques de la Figure VI-4, il est possible de calculer les vitesses de formation du THI et du 4MeI aux différents débits d'ajout d'ammoniaque. La représentation graphique des résultats (Figure VI-5) montre clairement la corrélation entre la vitesse de formation des CNI et le débit d'ajout de promoteur de caramélisation.

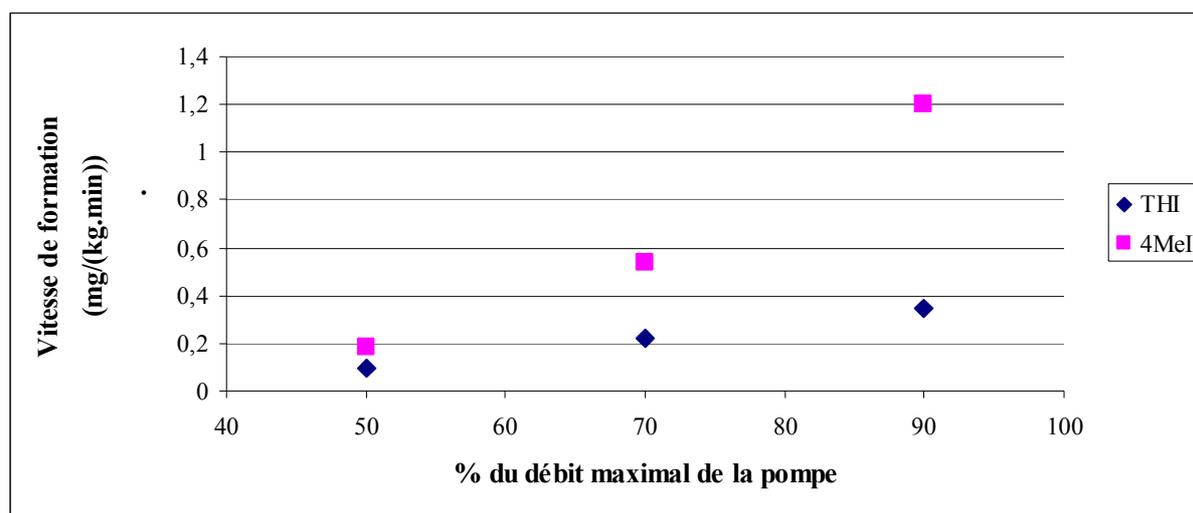


Figure VI-5 : Variation des vitesses de formation du THI et du 4MeI en fonction du débit d'ajout d'ammoniaque.

La diminution du débit d'ajout permet de diminuer les teneurs en THI et 4MeI. Mais, le temps de caramélisation et la stabilité du produit fini imposant un débit minimal, un compromis est nécessaire et un débit d'ajout correspondant à 50 % du débit maximal de la pompe est optimal.

Conclusion

Les premiers essais de suivi de la réaction de caramélisation ont permis de montrer l'évolution de la teneur en sucres, en THI et en 4MeI lors de la fabrication de caramels colorants de classe III. Des modifications des recettes ont été testées pour diminuer la formation des CNI et améliorer la qualité des caramels. Une corrélation entre le débit d'ajout du promoteur de caramélisation (ammoniaque) et la vitesse de formation des CNI a été mise en évidence.

Grâce à la relative simplicité des méthodes analytiques développées au cours de ce travail de thèse, il sera possible d'envisager l'étude de l'influence de nombreux autres paramètres, ceci afin d'approfondir les connaissances sur la réaction de caramélisation et d'optimiser les recettes de fabrication des différents caramels.

Références bibliographiques

1. Quintas, M.; Guimarães, C.; Baylina, J.; Brandão, T. R. S.; Silva, C. L. M., Multiresponse modelling of the caramelisation reaction. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **2007**, 8, (2), 306-315.
2. Quintas, M. A. C.; Brandão, T. R. S.; Silva, C. L. M., Modelling colour changes during the caramelisation reaction. *Journal of Food Engineering* **2007**, 83, (4), 483-491.
3. Quintas, M.; Guimarães, C.; Baylina, J.; Brandão, T. R. S.; Silva, C. L. M., Modelling autocatalytic behaviour of a food model system--Sucrose thermal degradation at high concentrations. *Journal of Food Engineering* **2007**, 78, (2), 537-545.

Conclusion générale

Conclusion générale

Le traitement thermique des sucres à des températures supérieures à 100 °C en présence ou non de promoteurs de caramélisation conduit à un mélange complexe de molécules : le caramel, qui est utilisé dans l'agroalimentaire pour son caractère aromatique et colorant. Des études toxicologiques sur les caramels colorants de classe III et IV (utilisant respectivement l'ammoniaque et des sels d'ammonium comme promoteurs de caramélisation) ont montré la présence de certains hétérocycles azotés qui peuvent être toxiques. La teneur de certains de ces composés néoformés indésirables, comme le 2-acétyl-4-(1,2,3,4-tétrahydroxybutyl)imidazole (THI) et le 4-méthylimidazole (4MeI) est réglementée et limitée, respectivement, à 10 et 250 ppm.

De nouvelles méthodes de dosage de ces molécules, ainsi que des sucres présents dans le caramel, ont été développées avec l'objectif d'améliorer la précision de la quantification tout en automatisant au maximum le protocole d'analyse. La chromatographie en phase liquide à deux-dimensions en mode « heart-cutting » ou LC-LC (une seule fraction récupérée à la sortie de la colonne de première dimension est injectée sur la colonne de seconde dimension) est utilisée pour obtenir la sélectivité très importante qui est nécessaire pour séparer les solutés d'intérêt de la matrice complexe qu'est le caramel. Cette technique permet de limiter la préparation d'échantillon à une simple dilution dans l'eau et le temps d'analyse ne dépasse jamais 45 min. Dans chaque cas, compte tenu de l'insuffisance de sélectivité du mode de détection utilisé (spectrophotométrie UV-Visible ou DEDL), il a été nécessaire d'étudier la sélectivité de la quantification par comparaison de résultats obtenus sur les mêmes échantillons par deux méthodes considérées comme orthogonales.

Le THI est quantifié dans les caramels colorants de classe III. Le couplage utilise, en première dimension, soit une séparation par chromatographie à polarités des phases inversées, soit une séparation par chromatographie d'échange d'ions en milieu acide. Dans les deux cas, la fraction contenant le THI est ensuite séparée par chromatographie à polarités des phases inversées sur une phase stationnaire de carbone graphitique poreux. Ces deux protocoles d'analyse ont été validés (90 % des résultats à moins de 20 % de la valeur vraie) dans les domaines de concentration 5 à 50 ppm et 10 à 50 ppm, respectivement.

La méthode de quantification du 4MeI présent dans les caramels colorants de classe III et IV, utilisée actuellement par l'entreprise Nigay (extraction liquide-liquide sur support solide par le dichlorométhane à chaud, puis séparation de l'extrait acétylé par

Conclusion générale

chromatographie en phase gazeuse sur une colonne de phase stationnaire apolaire et quantification par spectrométrie de masse) a été validée par les profils d'exactitude dans le domaine de concentration 50 à 200 ppm. Une nouvelle méthode par LC-LC utilisant le couplage entre deux séparations par chromatographie à polarités des phases inversées, l'une sur une colonne de silice hybride octadécyle, l'autre sur une colonne de carbone graphitique poreux, a été validée par le même protocole dans le domaine 20 à 500 ppm.

Enfin, une méthode de quantification des sucres caractéristiques du caramel par LC-LC a été développée en mettant en œuvre une séparation par chromatographie d'exclusion stérique suivie d'une séparation par chromatographie à polarités des phases inversées sur une colonne de carbone graphitique poreux à basse température. Cette méthode a été validée par les profils d'exactitude dans le domaine 200 à 2500 ppm pour le fructose, saccharose, lactose, maltose et maltotriose et dans le domaine 500 à 2500 ppm pour le glucose. L'ajustement du facteur de dilution de l'échantillon permet de quantifier ces sucres dans le caramel à des teneurs comprises entre 1 et 50 %.

Ces méthodes rapides et validées ont ensuite été utilisées pour perfectionner la connaissance de la réaction de caramélisation. Ceci permettra à terme de déterminer les facteurs influençant la formation du THI et du 4MeI dans les caramels colorants et, par suite, d'améliorer la qualité des caramels en modifiant les recettes de fabrication.

Annexes

Annexe 1 : Appareil utilisé pour la mise au point et la validation des méthodes de quantification du THI.

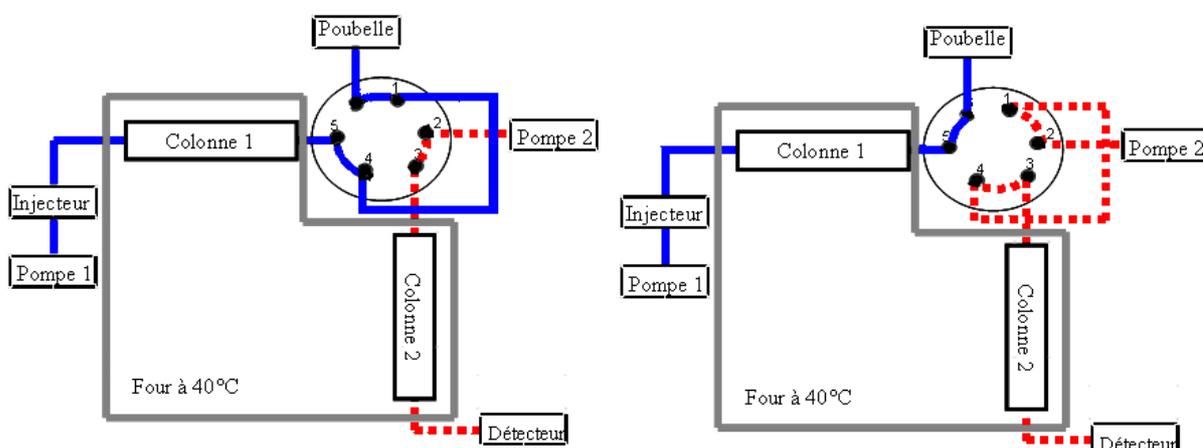
Equipement :

- un système HPLC Varian (Walnut Creek, CA, Etats-Unis) Prostar comprenant un injecteur automatique modèle 410, un système de pompage ternaire modèle 230 (pompe 1), un four à colonne modèle 510 et un détecteur UV-Visible à barrette de diodes modèle 330, le tout piloté par le logiciel Star (Varian)

- une pompe isocratique Shimadzu (Kyoto, Japon) LC-10AD (pompe 2)

- une vanne manuelle 6-voies Rheodyne (Cotati, CA, Etats-Unis) 7010.

Système LC-LC :



Après injection du caramel dans la colonne 1, la fraction éluée contenant le soluté d'intérêt est collectée dans la boucle de récupération (schéma de gauche). En tournant la vanne d'un sixième de tour, la fraction récupérée est injectée sur la colonne 2 pour compléter la séparation pendant que la première colonne est lavée et équilibrée pour la prochaine analyse (schéma de droite).

Annexe 2 : Appareil utilisé pour la mise au point et la validation des méthodes de quantification du 4MeI et des sucres.

Equipement :

- un système HPLC Dionex (Sunnyville, CA, Etats-Unis) Ultimate 3000 comprenant un injecteur automatique modèle WPS-3000SL, deux systèmes de pompage ternaires haute pression modèle DGP-3600M, un four à colonne équipé de deux vannes de commutation 2-positions 10-voies modèle TCC-3200 et un détecteur UV-Visible à barrette de diodes modèle PDA-3000, le tout piloté par le logiciel Chroméléon (Dionex)

- un détecteur évaporatif à diffusion de lumière (DEDL) Varian modèle 380-LC, piloté également par Chroméléon.

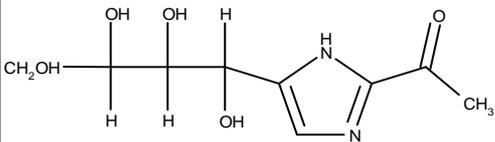
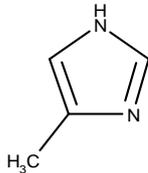
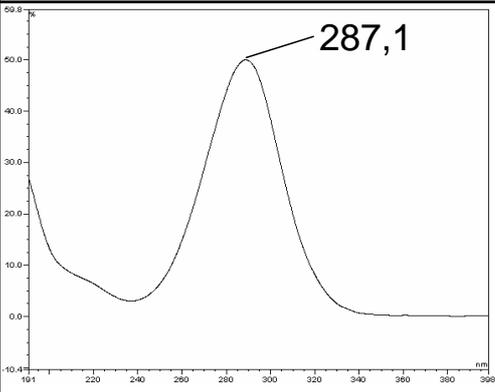
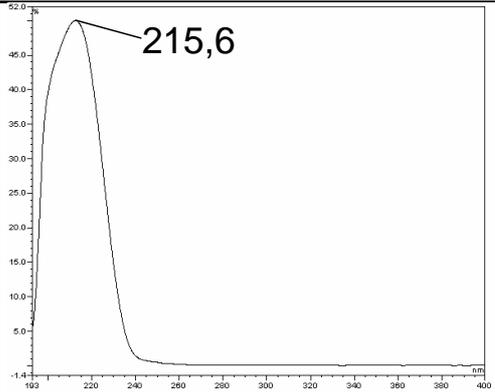
Système LC-LC :

Dans son principe, le système utilisé est identique à celui schématisé dans l'annexe 1.

Il faut cependant noter trois différences :

- la vanne de commutation utilisée est une vanne 10-voies (au lieu de 6)
- elle est positionnée dans le four à colonne
- elle est directement pilotée par le logiciel.

Annexe 3 : Présentation des solutés étudiés

Nom	2-acétyl-4-(1,2,3,4-tetrahydroxybutyl)imidazole	4-méthylimidazole
Abréviation	THI	4MeI
Numéro CAS	95120-07-3	822-36-6
Formule	$C_9H_{14}N_2O_5$	$C_4H_6N_2$
Poids moléculaire (g/mol)	232,22	82,1
Log P	-3,7	0,3
pKa	3,5 et 10,6	7,7 et 14,5
Point d'ébullition (°C)	600	263
Formule développée		
Spectre UV-Visible		

Nom	Glucose	Fructose	Saccharose	Maltose	Lactose	Maltotriose
Numéro CAS	50-99-7	57-48-7	57-50-1	69-79-4	63-42-3	1109-28-0
Formule	$C_6H_{12}O_6$	$C_6H_{12}O_6$	$C_{12}H_{22}O_{11}$	$C_{12}H_{22}O_{11}$	$C_{12}H_{22}O_{11}$	$C_{18}H_{32}O_{16}$
Poids moléculaire (g/mol)	180,2	180,2	342,3	342,3	342,3	504,4
Log P	-3,2	-1,6	-3,5	-4,1	-4,1	-4,1
pKa	12,4	11,9	12,8	12,4	12,4	12,4

Annexes

Annexe 4 : Valeurs des prédictions inverses pour la validation par les profils d'exactitude de la méthode de quantification des sucres par GFC-PGC.

Teneur	Fructose			Glucose			Saccharose		
	Jour 1	Jour 2	Jour 3	Jour 1	Jour 2	Jour 3	Jour 1	Jour 2	Jour 3
100 ppm	87,62	84,34	91,23	109,94	91,79	96,24	94,45	81,61	109,18
	84,42	111,51	120,10	94,38	81,44	118,77	84,68	86,90	109,10
	89,64	108,39	116,37	98,24	75,76	116,14	86,77	95,31	108,65
200 ppm	193,34	185,24	187,70	204,04	159,67	167,78	197,41	183,68	196,46
	184,30	185,74	199,92	198,99	156,88	191,56	184,18	183,76	196,95
	187,09	209,71	208,86	200,19	204,53	231,94	195,59	189,16	202,77
500 ppm	475,83	472,73	528,33	504,48	472,01	488,82	501,38	492,19	524,53
	480,02	475,89	534,09	503,55	465,84	559,02	488,83	489,76	528,00
	488,82	521,17	512,18	511,29	509,43	519,95	488,11	464,76	513,77
1000 ppm	997,33	1074,65	989,04	1070,69	1092,28	1000,11	964,00	1024,75	1013,68
	1001,83	995,22	1048,73	1055,83	949,54	1062,65	922,11	963,00	1029,09
	1031,49	1035,44	1086,35	1073,82	1008,41	1084,37	938,81	940,30	1051,42
2500 ppm	2665,81	2779,39	2586,24	2771,46	2697,24	2623,48	2337,73	2593,10	2367,69
	2649,02	2586,03	2851,71	2713,39	2545,60	2669,52	2270,31	2386,12	2494,38
	2626,00	2571,13	2746,77	2707,02	2516,05	2650,91	2300,60	2132,62	2397,60

Teneur	Maltose			Lactose			Maltotriose		
	Jour 1	Jour 2	Jour 3	Jour 1	Jour 2	Jour 3	Jour 1	Jour 2	Jour 3
100 ppm	100,50	118,59	84,80	95,03	100,35	115,90	92,58	116,64	91,73
	96,50	113,15	118,93	88,29	97,01	99,43	86,59	114,90	96,26
	93,10	102,62	100,57	95,96	109,22	93,64	86,02	108,11	95,09
200 ppm	213,82	212,57	201,83	202,92	198,18	197,65	205,85	213,13	188,94
	215,17	201,66	203,37	214,66	201,29	198,19	207,99	202,81	192,39
	216,67	196,01	195,79	200,95	197,03	195,79	211,57	195,68	189,26
500 ppm	487,86	515,48	494,00	472,64	497,17	495,75	496,86	521,04	498,53
	476,27	533,12	532,47	478,74	463,79	467,82	496,36	521,12	519,10
	477,05	493,93	483,13	489,32	462,50	451,79	500,59	509,19	479,94
1000 ppm	986,81	1027,45	1057,14	974,81	1066,56	950,19	965,04	1079,09	1042,31
	942,74	944,46	1023,76	945,84	918,07	965,48	976,02	1049,87	1063,28
	954,48	947,90	1017,45	954,66	908,54	898,09	978,83	938,95	994,65
2500 ppm	2481,77	2625,43	2664,36	2515,09	2718,87	2588,58	2351,81	2601,00	2535,33
	2465,44	2604,47	2598,03	2514,90	2445,04	2568,45	2398,69	2552,98	2576,30
	2472,58	2504,64	2601,61	2511,86	2344,77	2358,10	2371,86	2451,24	2472,20

Liste des abréviations

Liste des abréviations

4MeI : 4-méthylimidazole

AD : Ajouts dosés

AFNOR : Association Française de Normalisation

CNI : Composés Néοformés Indésirables

DEDL : Détecteur Evaporatif à Diffusion de Lumière

DJA : Dose Journalière Admissible

EE : Etalonnage Externe

EI : Etalonnage Interne

GC : Chromatographie en phase Gazeuse

GCMS : Chromatographie en phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse

GFC : Chromatographie de Filtration sur Gel

HMF : 5-hydroxyméthylfurfural

HPLC : Chromatographie en phase Liquide Haute Performance

ICARE : Impeding neoformed Contaminants Accumulation to Reduce their Health Effect (empêchement de l'accumulation des polluants néοformés pour réduire leurs effets sur la santé)

LCxLC : chromatographie en phase liquide deux-dimensions « comprehensive »

LC-LC : chromatographie en phase liquide deux-dimensions « heart-cutting »

N : Nombre de Plateaux Théoriques

PGC : Carbone Graphitique Poreux

ppm : partie par million

SCX : Strong Cation eXchange (chromatographie d'échange de cations forts)

SIM : Single Ion Monitoring (suivi d'un seul ion)

SFSTP : Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques

SPE : Extraction sur Phase Solide

T : Température

THI : 2-acétyl-4-(1,2,3,4-tetrahydroxybutyl)imidazole

Tables des illustrations

Liste des figures

Figure I-1 : Décomposition du saccharose en glucose et fructose [14, 15]..... 17

Figure I-2 : Transformation du glucose en fructose avec le réarrangement de Lobry de Bruyn – Alberda Van Ekenstein pour former l’intermédiaire 1,2-enediol [15]..... 18

Figure I-3 : Dégradation du glucose et du fructose sous l’effet de la chaleur en milieu neutre ou acide [15, 17, 19-21]..... 20

Figure I-4 : Dégradation spécifique du glucose et du fructose en milieu basique [19]..... 21

Figure I-5 : Formation des oligosaccharides lors de la caramélisation du saccharose [24-28]..... 23

Figure I-6 : Schéma de formation des glucosylamine et fructosylamine et des aminodeoxyfructose et aminodeoxyglucose [30]..... 25

Figure I-7 : Schéma de formation des pyrazines dans le caramel [15]. 26

Figure I-8 : Schémas de formation des imidazoles dans le caramel : (a) à partir des sucres aminés ; (b) à partir des produits de dégradation dicétoniques [15]..... 27

Figure II-1 : Illustration d’une anomalie possible avec les méthodes classiques de validation. La valeur vraie est comprise dans la distribution des résultats de la méthode 1 mais pas dans celle de la méthode 2. Bien que les deux méthodes aboutissent à la même erreur moyenne Δ , la méthode 1 moins précise est considérée comme juste..... 43

Figure II-2 : Représentation graphique de l’exactitude, de la justesse et de la fidélité des résultats d’une méthode d’analyse. Ces résultats suivent la loi normale, définie par la moyenne m et l’écart-type σ 44

Figure II-3 : Exemple de profils d’exactitude. 48

Figure II-4 : Représentation schématique du montage de LC-2D « comprehensive » : P1, I, Col 1 : respectivement pompe, injecteur et colonne de la première dimension ; P2, Col 2, D : respectivement pompe, colonne et détecteur de la deuxième dimension ; W: la poubelle ; V : la vanne 10 voies, 2 positions avec deux boucles de récupération. Quelle que soit la position de la vanne (rouge ou bleue), la phase mobile sortant de la colonne de séparation 1 est récupérée dans une des boucles pendant que la fraction contenue dans l'autre boucle est envoyée vers la deuxième colonne par la pompe 2..... 52

Figure II-5 : Chromatogramme d'un extrait de maïs mutant. Première colonne : Discovery HS-F5 (5 cm), gradient (20 min) d'acétonitrile (5-40 %) dans un mélange de phosphate de sodium 20 mM et de perchlorate de sodium 20 mM dans l'eau (pH 5,7) à 40 °C, 0,10 mL/min. Seconde colonne : ZirChrom-CARB (5 cm) ; gradient (17,4 s) d'acétonitrile (0-70 %) dans de l'acide perchlorique 20 mM dans l'eau à 110 °C, 3 mL/min. (Reproduction de la référence [16]). 53

Figure II-6 : Chromatogrammes successifs de l'analyse de la fraction insoluble de *S. cerevisiae*. Première colonne : SCX Partisphere (4 cm), élution par palier successifs de chlorure d'ammonium 250 mM avec arrêt de la phase mobile entre chaque palier. Deuxième colonne : Zorbax Eclipse XDB C18 (10 cm), gradient d'élution acétonitrile / eau. (Reproduction de la référence [19]). 54

Figure II-7 : Représentation schématique du montage de LC-2D « heart-cutting » : P1, I, Col 1 : respectivement pompe, injecteur et colonne de la première dimension ; P2, Col 2, D : respectivement pompe, colonne et détecteur de la deuxième dimension ; W : poubelle ; V : vanne 6 voies 2 positions. La vanne en position rouge permet de récupérer les solutés souhaités dans la boucle de récupération en sortie de la colonne 1. Lors du passage en position bleue, le contenu de la boucle est envoyé sur la deuxième colonne pendant que la première est nettoyée et équilibrée pour l'analyse suivante..... 56

Figure II-8 : Processus de préconcentration en tête de la deuxième colonne : (a) accumulation du soluté en tête de colonne pendant l'étape d'analyse frontale. (b) focalisation de la bande de soluté pendant l'étape d'élution par « step gradient ». L_2 = longueur de la deuxième colonne. L_{ac} = longueur de la bande de soluté après accumulation en tête de la deuxième colonne. L_i = longueur occupée par le volume de phase mobile de la première dimension transféré vers la deuxième dimension. L_{foc} = longueur de la bande de soluté après focalisation.....	57
Figure II-9 : Illustration de la déformation de la bande lorsque l'échantillon migre (de haut en bas) dans la colonne chromatographique : (a) différence de viscosité entre l'échantillon et la phase mobile de 0,48 cP (0,38 cP pour le solvant de l'échantillon et 0,86 cP pour la phase mobile) : problème de digitation visqueuse lorsque le solvant de l'échantillon, de plus faible viscosité, pousse la phase mobile ; (b) aucune différence de viscosité : pas de perturbations. (Reproduction de la référence [26]).	60
Figure II-10 : Structure bidimensionnelle du PGC.....	62
Figure II-11 : Représentation schématique des interactions électroniques entre un soluté polaire (chargé positivement en (a) et négativement en (b)) et la surface du PGC (d'après le guide de Thermo Fisher Scientific sur la colonne PGC).....	64
Figure III-1 : Formule développée et caractéristiques physico-chimiques du THI.....	75
Figure III-2 : Evolution du facteur de rétention du THI en fonction de la composition de la phase mobile (acétonitrile / eau) sur la colonne XBridge Shield RP18 (3,5 μ m, 4,6 x 150 mm) (◆) et sur la colonne Hypercarb PGC (5 μ m, 4,6 x 100 mm) (■).	77
Figure III-3 : Influence du pH de la phase mobile (formiate d'ammonium 10 mM) sur la rétention du THI sur la colonne Polymer Laboratories SCX (8 μ m, 150 x 4,6 mm). Débit de la phase mobile : 0,7 mL/min. Acidifiant = acide formique.....	79
Figure III-4 : Séparation sur la colonne SCX (8 μ m, 150 x 4.6 mm). Conditions d'élution du Tableau III-1. Longueur d'onde de détection : 287 nm. Débit de la phase mobile : 0,7 mL/min. Volume injecté : 20 μ L. Chromatogramme (a) : injection d'une solution de THI 1 ppm « zoomée » 100 fois. Chromatogramme (b) : injection d'un caramel de classe III dilué 10 fois dans l'eau.....	80

Liste des illustrations

- Figure III-5 : Séparation sur la colonne Aquasil C-18 (5 μm , 4,6 x 150 mm). Conditions d'élution du Tableau III-2. Débit de la phase mobile : 0,7 mL/min. Détection à 287 nm. Volume injecté : 20 μL . Chromatogramme (a) : injection d'une solution de THI 1 ppm « zoomée » 100 fois. Chromatogramme (b) : injection d'un caramel de classe III dilué 10 fois dans l'eau..... 82
- Figure III-6 : Influence du volume d'injection sur la colonne PGC (de 0,2 à 1,5 mL) : (a) THI dissout dans le formiate d'ammonium 10 mM acidifié par de l'acide formique à pH 2,5, correspondant à la fraction en sortie de la colonne SCX ; (b) THI dissout dans l'eau, correspondant à la fraction en sortie de la colonne C18. 83
- Figure III-7 : Chromatogrammes obtenus avec la méthode SCX-PGC (en haut) et la méthode C18-PGC (en bas). Chromatogramme (a) : Analyse d'une solution de THI à 2 ppm ; Chromatogramme (b) : Analyse d'un échantillon de caramel, dilué 10 fois ; Chromatogramme (c) : Analyse du même échantillon de caramel dopé à 50 ppm en THI, dilué 10 fois. Volume injecté : 20 μL . Débit de la phase mobile : 0,7 mL/min. Longueur d'onde de détection : 287 nm. 85
- Figure III-8 : Représentation graphique des résultats pour la validation des méthodes SCX-PGC (a) et C18-PGC (b) : surface du pic de THI en fonction de la concentration en THI dans le caramel non dilué. Bleu : résultats du premier jour de validation ; Rouge : résultats du second jour de validation ; Vert : résultats du troisième jour de validation. O : points d'étalonnage (étalonnage externe EE) ; X : points de validation (ajouts dosés AD). 87
- Figure III-9 : Représentation des profils d'exactitude de la méthode (a) SCX-PGC et (b) C18-PGC.  : Evolution du biais ;  : Evolution des limites basse et haute du domaine d'exactitude ;  : Limite du domaine de validité ($\pm 20\%$). 91
- Figure III-10 : Comparaison des concentrations de THI déterminées avec les méthodes C18-PGC et SCX-PGC sur des caramels commerciaux. 92
- Figure IV-1 : Formule développée et caractéristiques physico-chimiques du 4MeI 100
- Figure IV-2 : Chromatogramme de la séparation du 2MeI et du 4MeI par GCMS. Conditions de séparation décrite en IV.2.1. Volume d'injection : 2 μL . Split 30 pour 1. 103
- Figure IV-3 : Spectre de masse du 4MeI et du 2MeI. 103

- Figure IV-4 : Représentation graphique des résultats pour la validation de la méthode extraction à chaud – GCMS pour la quantification du 4MeI. Concentration du standard interne dans les caramels non dilués : 100 ppm. Bleu : résultats du premier jour de validation ; Rouge : résultats du second jour de validation ; Vert : résultats du troisième jour de validation. O : points d'étalonnage (étalonnage interne EI) ; X : points de validation (ajouts dosés AD). 105
- Figure IV-5 : Représentation des profils d'exactitude de la méthode de dosage du 4MeI par l'extraction à chaud puis analyse GCMS.  : Evolution du biais ;  : Evolution des limites basse et haute du domaine d'exactitude ;  : Limite du domaine de validité (± 20 %). 107
- Figure IV-6 : Evolution du facteur de rétention k et du nombre de plateaux théoriques N du pic de 4MeI obtenu sur la colonne XBridge Shield RP18 (3,5 μ m, 4,6 x 150 mm) en fonction de la phase mobile utilisée. pH : ajusté avec l'ammoniaque. Débit de la phase mobile : 0,7 mL/min. 109
- Figure IV-7 : Séparation sur la colonne XBridge Shield RP18 (3,5 μ m, 4,6 x 150 mm). Conditions d'élution du Tableau IV-2. Longueur d'onde de détection : 217 nm. Volume injecté : 20 μ L. Débit de la phase mobile : 0,7 mL/min. Chromatogramme (a) : injection d'une solution de 4MeI à 5 ppm « zoomée » 10 fois. Chromatogramme (b) : injection d'un caramel de classe III dilué 10 fois dans l'eau. 110
- Figure IV-8 : Evolution du facteur de rétention k et du nombre de plateaux théoriques N suivant la partie aqueuse de la phase mobile sur la colonne Hypercarb PGC (5 μ m, 4,6 x 100 mm). Toutes les phases mobiles contiennent 5 % d'acétonitrile. pH : ajusté par ajout d'ammoniaque. Débit de la phase mobile : 0,7 mL/min. 112
- Figure IV-9 : Evolution du facteur de rétention k du 4MeI en fonction de la composition de la phase mobile (acétonitrile / ammoniaque pH = 11 ou acétonitrile / formiate d'ammonium 10 mM pH = 11) sur la colonne Hypercarb PGC (5 μ m, 4,6 x 100 mm). ... 113
- Figure IV-10 : Chromatogrammes obtenus avec la méthode XBridge-PGC. Chromatogramme (a) : Analyse d'une solution de 4MeI à 10 ppm ; Chromatogramme (b) et (c) : Analyse de deux échantillons de caramel, dilué 10 fois. Longueur d'onde de détection : 217 nm. Volume injecté : 20 μ L. Débit de la phase mobile : 0,7 mL/min. 114

- Figure IV-11 : Représentation graphique des résultats pour la validation de la méthode XBridge-PGC : surface du pic de 4MeI en fonction de la concentration en 4MeI dans le caramel non dilué. Bleu : résultats du premier jour de validation ; rouge : résultats du second jour de validation ; vert : résultats du troisième jour de validation. O : points d'étalonnage (étalonnage externe EE) ; X : points de validation (ajouts dosés AD). 116
- Figure IV-12 : Représentation des profils d'exactitude de la méthode de dosage du 4MeI par chromatographie liquide deux-dimensions XBridge-PGC.  : Evolution du biais ;  : Evolution des limites basse et haute du domaine d'exactitude ;  : Limite du domaine de validité ($\pm 20\%$). 118
- Figure IV-13 : Comparaison des concentrations de 4MeI déterminées avec les méthodes Extraction à chaud - GCMS et LC-LC dans des caramels commerciaux. 120
- Figure IV-14 : Evolution des facteurs de rétention du THI et du 4MeI sur la colonne XBridge Shield RP18 (3,5 μm , 4,6 x 150 mm) en fonction de la concentration en formiate d'ammonium dans la phase mobile purement aqueuse tamponnée à pH = 10 avec de l'ammoniaque. 121
- Figure IV-15 : Chromatogrammes obtenus lors de l'élution sur la colonne XBridge Shield RP18 (3,5 μm , 4,6 x 150 mm) d'une solution de THI à 1 ppm détectée à 287 nm (a), d'une solution de 4MeI à 10 ppm détectée à 217 nm (b) et d'un caramel colorant de classe III diluée 10 fois dans l'eau détecté à 287 nm (c) et à 217 nm (d). Volume injecté : 20 μL ; Débit de la phase mobile (formiate d'ammonium 6 mM pH 10) : 0,7 mL/min. 122
- Figure IV-16 : Chromatogrammes obtenus pour l'élution d'une solution de THI à 5 ppm détectée à 287 nm (a), d'une solution de 4MeI à 10 ppm détectée à 217 nm (b), d'un premier caramel de classe III dilué 10 fois détecté à 287 nm (c) et à 217 nm (d) et d'un second caramel de classe III dilué 10 fois détecté à 287 nm (e) et à 217 nm (f) . Colonne de 1^{ère} dimension : XBridge Shield RP18 (3,5 μm , 4,6 x 150 mm). Colonne de 2^{ème} dimension : Hypercarb PGC (5 μm , 4,6 x 150 mm). Volume injecté : 20 μL ; Conditions d'élution : voir Tableau IV-5. 124

Liste des illustrations

- Figure V-1 : Chromatogramme de l'analyse du fructose (a), glucose (b), saccharose (c), maltose (d), lactose (e) et maltotriose (f) sur la colonne SB403-4E (6 μm , 4,6 x 250 mm) avec la précolonne SB400G-4A. Débit de la phase mobile : 0,3 mL/min. Détection par le DEDL : température de nébulisation 60 °C, température d'évaporation 60 °C et débit d'azote 1,6 SLM. 138
- Figure V-2 : Influence de la température sur la séparation des sucres en LC-2D « heart-cutting » avec la colonne Shodex SB403-4E (6 μm , 4,6 x 250 mm) en première dimension et la colonne PGC (5 μm , 4,6 x 100 mm) en deuxième dimension. Conditions d'élution décrites dans le Tableau V-1. Paramètres du DEDL : température de nébulisation et d'évaporation : 60 °C ; débit d'azote : 1,6 SLM. 140
- Figure V-3 : Profils de sucres obtenus avec la méthode LC-LC GFC-PGC sur (a) un caramel colorant de saccharose (absence de sucre après cuisson), (b) un caramel aromatique avec ajout de saccharose après cuisson (présence de glucose et fructose non caramélisé et de saccharose), (c) un caramel de sirop de glucose avec ajout de lait (présence de glucose, fructose, maltose, maltotriose et lactose). 141
- Figure V-4 : Superposition de l'analyse des différents points de la gamme par la méthode GFC-PGC : (a) 100 ppm, (b) 200 ppm, (c) 500 ppm, (d) 1000 ppm et (e) 2500 ppm. 142
- Figure V-5 : Représentations des profils d'exactitude de la méthode GFC-PGC pour la quantification du fructose (a), glucose (b), saccharose (c), maltose (d), lactose (e) et maltotriose (f).  : Evolution du biais ;  : Evolution des limites basse et haute du domaine d'exactitude ;  : Limite du domaine de validité. 146
- Figure VI-1 : Evolution de la teneur en glucose (a) et en fructose (b) au cours du temps lors de la caramélisation du glucose en présence d'ammoniaque comme promoteur de caramélisation. 158
- Figure VI-2 : Evolution de la teneur en fructose, en glucose et en saccharose au cours du temps lors de la caramélisation de saccharose en présence de sulfite d'ammonium comme promoteur de caramélisation (caramel colorant de classe IV). 159
- Figure VI-3 : Evolution des teneurs en THI et 4MeI au cours de la caramélisation du glucose en présence d'ammoniaque. 162

Liste des illustrations

Figure VI-4 : Evolution des teneurs en THI et 4MeI formé au cours de la caramélisation du glucose suivant le débit d'ajout d'ammoniaque..... 163

Figure VI-5 : Variation des vitesses de formation du THI et du 4MeI en fonction du débit d'ajout d'ammoniaque..... 164

Liste des tableaux

Tableau I-1 : Caractéristiques des quatre classes de caramels colorants.....	11
Tableau III-1 : Conditions du gradient d'éluion sur la colonne Polymer Laboratories SCX (8 µm, 150 x 4,6 mm) pour la rétention du THI par chromatographie d'échange d'ions. ...	80
Tableau III-2 : Conditions d'éluion sur la colonne Aquasil C-18 (5 µm, 4,6 x 150 mm) en chromatographie à polarités des phases inversées.....	81
Tableau III-3 : Résultats de l'étude de validation par les profils d'exactitude des méthodes LC-LC pour le dosage du THI dans les caramels colorants de classe III. (a) Méthode SCX-PGC ; (b) Méthode C18-PGC.....	89
Tableau III-4 : Comparaison des résultats de l'analyse de 10 caramels différents par les méthodes C18-PGC et SCX-PGC.	93
Tableau IV-1 : Résultats de l'étude de validation par les profils d'exactitude de la méthode Extraction à chaud – GCMS pour le dosage du 4MeI dans les caramels colorants de classe III et IV.	106
Tableau IV-2 : Conditions d'éluion sur la colonne XBridge Shield RP18 (3,5 µm, 4,6 x 150 mm) en chromatographie à polarités des phases inversées.	110
Tableau IV-3 : Conditions d'éluion pour la séparation de la fraction récupérée à la sortie de la colonne XBridge Shield RP18 sur la colonne PGC.....	113
Tableau IV-4 : Résultats de l'étude de validation par les profils d'exactitude de la méthode XBridge-PGC de dosage du 4MeI dans les caramels colorants de classe III et IV.....	117
Tableau IV-5 : Conditions d'éluion pour la séparation simultanée du THI et du 4MeI avec la colonne XBridge Shield RP18 (3,5 µm, 4,6 x 150 mm) en première dimension et la colonne Hypercarb PGC (5 µm, 4,6 x 100 mm) en deuxième dimension.....	123
Tableau V-1 : Conditions d'éluion pour la séparation des mono-, di-, et tri-saccharides sur la colonne PGC après récupération de la fraction intéressante à la sortie de la colonne de filtration sur gel Shodex SB403-4E.....	139

Liste des illustrations

Tableau V-2 : Résultats de l'étude de validation par les profils d'exactitude de la méthode GFC-PGC pour l'analyse des sucres dans le caramel.....	143
Tableau V-3 : Comparaison des résultats d'analyse pour l'étude de la sélectivité de la méthode LC-LC.....	147