

Développement de méthodologies analytiques et statistiques pour le contrôle de la naturalité de matières premières pour la cosmétique et la parfumerie

Aude Mazollier

▶ To cite this version:

Aude Mazollier. Développement de méthodologies analytiques et statistiques pour le contrôle de la naturalité de matières premières pour la cosmétique et la parfumerie. Chimie analytique. Université Claude Bernard - Lyon I, 2013. Français. NNT: 2013LYO10004 . tel-01172177

HAL Id: tel-01172177 https://theses.hal.science/tel-01172177

Submitted on 7 Jul 2015

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.





N° d'ordre : 004 - 2013 Année 2013

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE DE CHIMIE

DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

soutenue publiquement le 11/01/2013

par

Aude MAZOLLIER

Développement de méthodologies analytiques et statistiques innovantes pour le contrôle de l'authenticité de matières premières pour les industries de la cosmétique et de la parfumerie

Directeur de thèse : M. Hervé CASABIANCA

JURY:

M. LANTER I Pierre, Pro fesseur, Université Lyon 1
Mme MENUT Chantal, Pro fesseur, Université Montpellier 2
M. FERNANDEZ Xavier, Professeur, Université Nice-Sophia Antipolis
M. JULLIEN Dominique, Directeur Département de Chimie AnalytiqueRecherche avancée chez L'Oréal S.A..
M.CASABIANCA hervé, Ingénieur de recherche, département SCA de
L'ISA-CNRS

Président Rapporteur Rapporteur

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

M. François-Noël GILL Y

Vice-président du Conseil d'Administration

M. le Professeur Hamda BEN HADID

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

M. le Professeur Philippe LALLE

Vice-président du Conseil Scientifique

M. le Professeur Germain GILLET

Secrétaire Général

M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Administrateur provisoire: M. le Professeur G. KIRKORIAN

UFR d'Odontologie

Directeur: M. le Professeur D. BOURGEOIS

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA.

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur: M. le Professeur Y. MATILLON

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie

Directeur : M. le Professeur P. FARGE

Humaine

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies Directeur : M. le Professeur F. De MARCHI
Département Biologie Directeur : M. le Professeur F. FLEURY
Département Chimie Biochimie Directeur : Mme le Professeur H. PARROT

Département GEP Directeur : M. N. SIAUVE

 Département Informatique
 Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

 Département Mathématiques
 Directeur : M. le Professeur A. GOLDMAN

 Département Mécanique
 Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Département Physique Directeur : Mme S. FLECK

Département Sciences de la Terre Directeur : Mme la Professeure I. DANIEL

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives Directeur : M. C. COLLIGNON

Observatoire de Lyon Directeur : M. B. GUIDERDONI

Polytech Lyon Directeur : M. P. FOURNIER

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique Directeur : M. G. PIGNAULT

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1 Directeur : M. C. VITON

Institut Universitaire de Formation des Maîtres Directeur : M. R. BERNARD

Institut de Science Financière et d'Assurances Directeur : Mme la Professeure V. MAUME-

DESCHAMPS

RESUME en français

Les huiles essentielles extraites de plantes aromatiques, médicinales et à parfum, sont utilisées depuis des millénaires pour leurs propriétés médicinales ou olfactives. Pour des raisons de rentabilité, les distributeurs sont contraints à réduire leur coût au maximum et à commercialiser des huiles essentielles au plus bas prix. Certains ont recours à la fraude et proposent, des essences de qualité inférieure sous la dénomination produits naturels de haute qualité. Il existe des normes (AFNOR, pharmacopées) qui doivent être respectées. Mais leur seule application est souvent limitée. Cette étude a donc permis une nette amélioration du contrôle de la naturalité des huiles essentielles de citrus, et lavande.

La connaissance des compositions moléculaires des volatiles et des polymethoxyflavones (citron), l'étude énantiomérique de molécules cibles telles que l'α-pinène, le sabinène (citrus), le linalol et l'acétate de linalyle (bergamote et lavande), les analyses isotopiques du carbone 13, deutérium, des linalol, acétate de linalyle (bergamote et lavande), citral, acétate de géranyle (citron) ainsi que les analyses isotopiques du deutérium et azote 15 du N-méthyle anthranilate de méthyle (mandarine) sont les analyses permettant la mise en évidence de nombreux types de fraudes.

Pour une méthodologie efficace, les analyses en composante principale et discriminante ont été indispensables. Elles ont permis l'identification d'échantillons fraudés via l'étude des volatiles. Les analyses chirales et isotopiques permettent l'identification d'échantillon plus " finement "adultérés ou de mieux comprendre les processus de fraude.

TITRE en anglais

Development of innovative analytical and statistical methodology for the naturality control of raw materials perfumery and cosmetic industries.

RESUME en anglais

Essential oils extract from aromatics, medicinal and perfume plants, are used since ancient times for their medicinal or olfactory properties. They are quite expensive, and owing to the actual growing demand for getting high quality materials at lowest prices, fraudulent essential oils are frequently found on the market. In order to fight this problem, norms exist (AFNOR, pharmacopeas) which have to be respected. However those techniques are often limited. This work allowed great improves in the quality control of citrus and lavender essential oils.

The knowledge of the chemical composition of volatiles and polymethoxy-flavones (lemon), of the chirale ratios of α -pinene, le sabinene (citrus), linalool et linalyl acetate (bergamot et lavender), isotope ratio analyses of carbon 13, deuterium, of linalool, linalyl acetate (bergamot et lavender), citral, geranyl acetate (lemon) as wall as isotope ratio analyses of deuterium of nitrogen 15 du Nmethyl anthranilate de methyl (mandarin) permitted the detection of various type of frauds.

In order to have an efficient methodology, principal component and discriminant analyses have been proved indispensables. It allowed the identification of fraudulent samples via volatiles molecules study. Chirale analysis and isotope ratio highlight frauds on more "discrete" adulterated samples or a better understanding of adulteration's process.

DISCIPLINE

MOTS-CLES

Huiles essentielles, Citrus, lavande, GC, GC-MS énantio-GC, GC-C/Py-IRMS, adultération, **ACP**

INTITULE ET ADRESSE DE L'U.F.R. OU DU LABORATOIRE :

Département Service Central d'Analyse (SCA) - UMR 5280 Institut des Sciences Analytiques, 5 rue de la Doua, 69001 Villeurbanne

Chimie analytique

Remerciements

Tout d'abord je remercie M. Lebrun, directeur du Service Central d'Analyse, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire le temps de mon doctorat.

Je remercie tout particulièrement M. Hervé Casabianca, directeur de thèse, pour son encadrement, ses judicieux conseils scientifiques et techniques indispensables au succès de ce doctorat.

Je tiens également à remercier la société L'Oréal, MM. Dominique Jullien et Brice Bonnet, initiateurs de ce projet. Je n'oublie pas M. Steeve Domitin qui a employé une grande énergie pour l'approvisionnement en échantillons, ces conseils pour la rédaction et qui a toujours su me prodiguer une écoute bienveillante.

Je désire exprimer ma gratitude envers Mme Claire Bordes ainsi que MM. Pierre Lanteri et Yohann Clément, pour leur participation à l'analyse statistique. Leurs compétences ont largement contribuées à la réalisation de ce projet.

Je remercie Mme Chantal Menut et M. Xavier Fernandez de m'avoir fait l'honneur de juger ce travail et d'en être les rapporteurs.

Je souhaite exprimer ma profonde reconnaissance à Dany Maître pour son soutien technique et moral, et plus particulièrement pour le temps passé à corriger mon manuscrit.

Je remercie aussi Patrick Goetinck pour ses nombreux conseils techniques et son aide précieuse.

Tous mes remerciements à Magali Batteau et Sylvie Guibert pour la réalisation des analyses isotopiques.

Je voudrais aussi témoigner toute ma sympathie au personnel du SCA pour son accueil chaleureux et tout particulièrement à la jeune génération dynamique pour laquelle je conserverais d'excellents souvenirs.

Enfin, j'ai une pensée pour mon entourage son éternel soutien essentiel à la réalistion de mon projet professionnel.

Table des matières

Ta	able o	des ma	tières	2
Ta	able des figures			
Li	ste d	es tab	leaux	14
Li	${ m ste} \ { m d}$	es abb	réviations	18
In	$\operatorname{trod}_{\mathfrak{l}}$	uction		20
1	Gén	iéralit ϵ	ės	23
	1.1	Généra	alités sur les huiles essentielles	23
		1.1.1	Chimie végétale	24
			1.1.1.1 La fraction des volatiles	24
			1.1.1.1.1 Origine biochimique	24
			1.1.1.1.1 Monoterpénoïdes et sesquiterpinoïdes	24
			1.1.1.1.2 Les composés aromatiques	25
			1.1.1.2 La fraction non volatile	26
			1.1.1.2.1 Origine biochimique	26
			1.1.1.2.2 Les flavones polyméthoxylées (PMF)	26
			1.1.1.3 Stéréosélectivité	27
			1.1.1.4 Le fractionnement isotopique	28
			1.1.1.4.1 Fractionnement isotopique du carbone dans les plantes	28
			1.1.1.4.1.1 Les plantes en C3	29
			1.1.1.4.1.2 Les plantes en C4 - cycle de Hatch et Slack	30
			1.1.1.4.1.3 Cycle de CAM : Crassulacean acid metabolism	31
			1.1.1.4.2 Fractionnement isotopique du deutérium dans les plantes	31
			1.1.1.4.3 Fractionnement isotopique de l'azote dans les plantes .	33
		1.1.2	Les méthodes d'extractions	33
			1 1 2 1 Les huiles essentielles	33

		1.1.2.1.1 Les procédés de l'extraction à froid	3
		1.1.2.1.1.1 Extraction mécanique	3
		1.1.2.1.1.2 Machines pélatrices	34
		1.1.2.1.1.3 Machines sfumatrices	35
		1.1.2.1.2 Les procédés par distillation	5
		1.1.2.1.2.1 L'hydrodistillation	35
		1.1.2.1.2.2 L'entrainement à la vapeur	6
		1.1.2.1.2.3 la distillation sèche	86
		1.1.2.2 Les autres types d'extraits aromatiques	87
		1.1.2.2.1 L'hydrodistillation sous pression	37
		1.1.2.2.2 La turbodistillation	37
		1.1.2.2.3 L'hydrodistillation par micro-ondes sous vide 3	37
		1.1.2.2.4 Extraction par solvant	8
		1.1.2.2.4.1 L'extraction par CO_2 supercritique 3	39
		1.1.2.2.5 Procédé d'élimination des furocoumarines 4	10
1.2	Dégra	dation et oxydation des huiles essentielles	10
1.3	Les ci	m trus	11
	1.3.1	L'Orange	12
		1.3.1.1 Le fruit	12
		1.3.1.2 Caractéristiques de l'huile essentielle	12
	1.3.2	La Bergamote	13
		1.3.2.1 Le fruit	13
		1.3.2.2 Caractéristiques de l'huile essentielle	13
	1.3.3	Le Citron	14
		1.3.3.1 Le fruit	14
		1.3.3.2 Caractéristiques de l'huile essentielle	4
	1.3.4	La Mandarine	15
		1.3.4.1 Le fruit	15
		1.3.4.2 Caractéristiques de l'huile essentielle	15
	1.3.5	Le Pamplemousse	16
		1.3.5.1 Le fruit	16
		1.3.5.2 Caractéristiques de l'huile essentielle	17
1.4	Les la	miacées	18
	1.4.1	Lavande fine	18
		1.4.1.1 La plante	18
		1.4.1.2 Caractéristiques de l'huile essentielle	18
	1.4.2	Lavandin Super	19

2	Tec	hnique	es analytiques-Etat de l'art	5 0
	2.1	La chi	romatographie en phase gazeuse	50
		2.1.1	L'injection	51
		2.1.2	Les colonnes capillaires classiques	51
		2.1.3	Les colonnes de séparation chirale	54
		2.1.4	Détecteur FID	54
		2.1.5	Détecteur MS	55
	2.2	La spe	ectrométrie de masse dédiée à la mesure isotopique	56
		2.2.1	Le rapport isotopique	56
			2.2.1.1 Le cas du carbone 13	57
			2.2.1.2 Le cas du deutérium	58
			2.2.1.3 Le cas de l'azote	58
		2.2.2	Appareillage	58
			2.2.2.1 L'analyse du carbone 13	58
			2.2.2.2 L'analyse du deutérium	61
			2.2.2.3 L'analyse de l'azote	64
			2.2.2.4 Montages	66
			2.2.2.5 La détection	67
	2.3	Analy	se thermogravimétrique	69
	2.4	Specti	rométrie de réflexion dans le proche infrarouge	70
	2.5			70
		2.5.1		70
		2.5.2	"Fast" and "very fast" chromatographie gazeuse	71
		2.5.3		71
		2.5.4	Chromatographie gazeuse multidimensionnelle	71
		2.5.5		72
	2.6	L'outi		72
		2.6.1	•	72
		2.6.2	Analyse automatique de classement non hiérarchique : analyse discrimi-	
				73
		2.6.3		74
				74
			2.6.3.2 La régression des moindres carrés partiels (Partial Least Square	
				76
			-	77
			2.0.0.0 1 arotar 20000 square 2 borninamento rinaryono (1 do 2011)	• •
3	Cor	ntexte	et stratégie analytique	78
	3.1	Les m	éthodologies de contrôle des huiles essentielles	78

	3.2	Adultération et stratégie analytique	79
		3.2.1 Les Citrus	30
		3.2.1.1 Huile essentielle de bergamote	32
		3.2.1.2 Huile essentielle de citron	33
		3.2.1.3 Huile essentielle de mandarine	33
		3.2.1.4 Huile essentielle de pamplemousse	34
		3.2.2 Les Lamiacées	34
		3.2.2.1 Huile essentielle de lavande fine	34
	3.3	Synthèse	86
4	Ma	tériels et méthodes	37
	4.1	Echantillonnage	87
		Code échantillon de orange	39
		Code échantillon de bergamote	90
		Code échantillon de citron	92
		Code échantillon de mandarine	95
		Code échantillon de pamplemousse	97
		Code échantillon de lavande	98
		Code échantillon de lavandin super) 9
		Code échantillon de ho wood)()
	4.2	Préparation d'échantillons)1
	4.3	L'analyse en GC-FID)3
	4.4	L'analyse chirale en GC-FID)5
		$4.4.1$ Application à l'analyse chirale des terpènes α -pinène et sabinène des citrus 10)5
		4.4.1.1 Application à l'analyse de l' α -pinène)5
		4.4.1.2 Application à l'analyse du sabinène)6
		4.4.2 Application à l'analyse chirale du citronnellal dans les citrus)6
		4.4.3 Application à l'analyse chirale du linalol dans les citrus)7
		4.4.4 Application à l'analyse chirale de l' α -terpinéol dans les citrus 10)7
		4.4.5 Application à l'analyse chirale du linalol, acétates de linalyle et lavandu-	
		lyle dans la bergamote et les lamiacées)8
	4.5	L'analyse en GC-MS)8
		4.5.1 Méthode chromatographique GC-MS appliquée à l'analyse de la fraction	
		volatile des huiles essentielles sur colonne HP1 (apolaire))9
		4.5.2 Méthode chromatographique GC-MS appliquée à l'analyse de la fraction	
		volatile des huiles essentielles sur colonne Innowax (polaire)	LO
		4.5.3 Méthode chromatographique GC-MS appliquée à l'analyse des PMF $$ 11	LO
		4.5.4 Méthode chromatographique GC-MS appliquée à l'analyse chirale 11	11

	4.6	L'anal	lyse isoto _l	pique
		4.6.1	Conditio	ons expérimentales en GC- C-IRMS 13 C
			4.6.1.1	Application à l'analyse de terpènes des citrus
			4.6.1.2	Application à l'analyse du linalol et acétate de linalyle de la
				bergamote et des lamiacées
			4.6.1.3	Application à l'analyse du citral
		4.6.2	Conditio	ons expérimentales en GC-py-IRMS ² H
			4.6.2.1	Application à l'analyse du linalol et acétate de linalyle de la
				bergamote et des lamiacées
			4.6.2.2	Application à l'analyse du citral
			4.6.2.3	Application à l'analyse de N-méthyle anthranilate de méthyle
				en deutérium
			4.6.2.4	Conditions expérimentales en AE-IRMS ¹⁵ N
	4.7	Calcu	ls d'incert	situdes et valeurs limites
		4.7.1	Interval	les de confiance
	4.8	Métho	odologie p	our le contrôle de la naturalité
		4.8.1		es analyses et molécules cibles
		4.8.2	Analyse	statistique
5	Rés	ultats	et discu	ssions 127
	5.1	Carac	térisation	des huiles essentielles et dégradation
		5.1.1	Dégrada	tion
		5.1.2	Huiles e	ssentielles de citrus
			5.1.2.1	Huile essentielle d'orange
			5.1.2.2	Huile essentielle de bergamote
			5.1.2.3	Huile essentielle de citron
			5.1.2.4	Huile essentielle de mandarine
			5.1.2.5	Huile essentielle de pamplemousse
		5.1.3	Huiles e	ssentielles de lavande et lavandin super
			5.1.3.1	Huile essentielle de la lavande
			5.1.3.2	Huile essentielle de lavandin super
		5.1.4		on sur les résultats de l'analyse GC-FID
	5.2			es
	J	5.2.1		chirale des terpènes α -pinène et sabinène des citrus 157
		J	5.2.1.1	Huile essentielle d'orange
			5.2.1.2	Huile essentielle de bergamote
			5.2.1.3	Huile essentielle de citron
			5.2.1.4	Huile essentielle de mandarine

		5.2.1.5 Huile essentielle de pamplemousse	j6
	5.2.2	Analyse chirale du Citronnellal des huiles essentielles de citrus 16	6
		5.2.2.1 Huile essentielle d'orange	8
		5.2.2.2 Huile essentielle de citron	39
		5.2.2.3 Huile essentielle de mandarine	70
		5.2.2.4 Huile essentielle de pamplemousse	71
	5.2.3	Linalol et α -terpineol des huiles essentielles de citrus (sauf bergamote) 17	⁷ 2
		5.2.3.1 Huile essentielle d'orange	75
		5.2.3.2 Huile essentielle de citron	76
		5.2.3.3 Huile essentielle de mandarine	78
		5.2.3.4 Huile essentielle de pamplemousse	79
	5.2.4	Analyse chirale du linalol, acétates de linalyle et de lavandulyle 17	7 9
		5.2.4.1 Huile essentielle de ho wood	33
		5.2.4.2 Huile essentielle de bergamote	34
		5.2.4.3 Huile essentielle de lavande	36
		5.2.4.4 Huile essentielle de lavandin super	38
	5.2.5	Discussion	38
5.3	Analy	es isotopiques	1
	5.3.1	L'analyse isotopique du carbone 13)2
		5.3.1.1 Empreinte isotopique des terpènes des huiles essentielles de citrus19	12
		5.3.1.1.1 Analyse des huiles essentielles de bergamote et citron . 19	12
		5.3.1.1.2 Analyse de l'huile essentielle de mandarine 19	7
		5.3.1.1.3 Analyse des huiles essentielles d'orange et du pample-	
		mousse	9
		5.3.1.2 Valeurs isotopiques des linalol et acétate de linalyle des huiles	
		essentielles de bergamote et de lamiacées	0(
		5.3.1.2.1 Huile essentielle de ho wood)3
		5.3.1.2.2 Huile essentielle de bergamote)4
		5.3.1.2.3 Huile essentielle de lavandin super 20)5
		5.3.1.2.4 Huile essentielle de lavande)6
		5.3.1.3 Valeurs isotopiques du citral et acétate de géranyle du citron 20	17
		5.3.1.4 Discussion sur les résultats de l'analyse isotopique du carbone 13.21	. 1
	5.3.2	L'analyse isotopique du deutérium	2
		5.3.2.1 Valeurs isotopiques des linalol et acétate de linalyle des huiles	
		essentielles de bergamotes et de lamiacées	3
		5.3.2.1.1 Huile essentielle de ho wood	4
		5.3.2.1.2 Huile essentielle de bergamote	5

		5.	3.2.1.3 Huile essentielle de lavandin super 216
		5.	3.2.1.4 Huile essentielle de lavande
		5.3.2.2	Valeurs isotopiques du citral et acétate de géranyle dans l'huile
			essentielle de citron
		5.3.2.3	Valeurs isotopiques du N-méthyl anthranilate de méthyle de
			l'huile essentielle de mandarine
		5.3.2.4	Discussion sur les résultats de l'analyse isotopique du deutérium 222
	5.3.3	L'analys	e isotopique de l'azote 15 $\dots \dots \dots$
		5.3.3.1	Valeurs isotopiques du N-méthyl anthranilate de méthyle de
			l'huile essentielle de mandarine
	5.3.4	Discussio	on sur l'analyse isotopique
5.4	Analy	se des flav	rones polymethoxylées (PMF) des citrus
	5.4.1	Profil de	l'huile essentielle d'orange
	5.4.2	Profil de	l'huile essentielle de la bergamote
	5.4.3	Profil de	l'huile essentielle de citron
	5.4.4	Profil de	l'huile essentielle de mandarine
	5.4.5	Profil de	l'huile essentielle de pamplemousse
	5.4.6	Discussio	on
5.5	Analy	se thermo	gravimétrique
	5.5.1	Les huile	es essentielles de citrus
		5.5.1.1	Huile essentielle d'orange
		5.5.1.2	Huile essentielle de bergamote
		5.5.1.3	Huile essentielle de citron
		5.5.1.4	Huile essentielle de mandarine
		5.5.1.5	Huile essentielle de pamplemousse
	5.5.2	Les huile	es essentielles de lamiacées
		5.5.2.1	Huile essentielle de lavande
		5.5.2.2	Huile essentielle de lavandin super
	5.5.3	Discussio	on
5.6	Spect	roscopie pi	roche infrarouge de réflexion
	5.6.1	Analyses	des citrus
	5.6.2	Analyses	des lamiacées
	5.6.3	Analyses	des lavandes
	5.6.4	Discussio	on
5.7	Bilan	des analys	ses sélectionnées
	, ,		
	•	les résult	
Mé	thodol	ogie déga	agée pour le contrôle de l'authenticité 257

6.1 Ana	alyses statistiques – Arbre de décision	257
6.1.	1 Synthèse des données pour la bergamote	259
6.1.	2 Synthèse des données pour le citron	269
6.1.	3 Synthèse des données pour la mandarine	281
6.1.	4 Synthèse des données pour le pamplemousse	291
6.1.	5 Synthèse des données pour la lavande	292
6.1.	6 Conclusion	299
Conclusion	générale	300
Bibliograp	hie	303
Annexes		314
Annexe 1	1	315
Pro	fil chromatographique d'huile essentielle d'orange	315
Pro	fil chromatographique d'huile essentielle de bergamote	316
Pro	fil chromatographique d'huile essentielle de citron	317
Pro	fil chromatographique d'huile essentielle de mandarine	318
Pro	fil chromatographique d'huile essentielle de pamplemousse	319
Pro	fil chromatographique d'huile essentielle de lavande	320
Annexe 2	2	321
Spe	ectres de masses de molécules inconnues	321
Annexe 3	3	325
Pri	ncipales molécules étudiées	325

Table des figures

1.1	Isoprène	24
1.2	De haut en bas : géranyl pyrophosphate et le farnésylpyrophosphate	25
1.3	De gauche à droite : limonène, a-pinène, linalol	25
1.4	De gauche à droite : N-methyle anthranilate de méthyle, coumarine	26
1.5	Structure générale des PMF	26
1.6	Schéma de la photosynthèse en C3	30
1.7	Schéma de la photosynthèse en C4	31
1.8	$Rapports\ isotopiques\ 2H/1H\ moyens\ (en\ ppm)\ de\ différentes\ substances\ naturelles.\ \ .\ \ .$	32
1.9	Déviation isotopique en deutérium en Europe	33
1.10	Exemple machine Torchi	34
1.11	Exemple de machine sfumatrices	35
1.12	Dessin d'un alambic destiné à la distillation des huiles essentielles	36
1.13	Schéma d'un extracteur à fluide supercritique [48]	39
1.14	Diagramme de phase d'un corps purs	39
1.15	Réactions de photo-oxydation du limonène	41
1.16	Citrus sinensis L	42
1.17	Citrus aurantium L. SSP. Bergamia	43
1.18	Citrus limon L	44
1.19	Citrus reticultata blanco var.Mandarine	45
1.20	Citrus paradisii Macf	46
1.21	Lavande fine	48
1.22	Lavandin	49
2.1	Schéma d'un chromatographe	50
2.2	Représentation schématique d'une colonne capillaire	52
2.3	Notion de résolution chromatographique	53
2.4	A gauche une cyclodextrine, à droite un motif élémentaire d'une cyclodextrine	54
2.5	Schéma d'un détecteur FID	55
2.6	Schéma de principe d'un analyseur quadripolaire	55

2.7	$Sch\'ema\ de\ l'appareillage\ d'analyse\ isotopique\ ^{13}C/^{12}C\ d'Isoprime\ .\ .\ .\ .\ .\ .\ .$	60
2.8	Schéma d'un tube à combustion	60
2.9	$Sch\'ema\ de\ l'appareillage\ d'analyse\ isotopique\ D/H\ d'Isoprime\ .\ .\ .\ .\ .\ .\ .$	62
2.10	Schéma d'un tube à pyrolyse	62
2.11	$Sch\'ema~de~l'appareillage~d'analyse~isotopique~^{15}N/^{14}N~adapt\'e~sur~l'appareil~isoprime~.~.~.$	64
2.12	Schéma d'un tube à réduction	65
2.13	Montage pour l'analyse du ¹³ C (tube à combustion), lorsque les composés sont envoyés vers	
	le détecteur FID	66
2.14	$Montage\ pour\ l'analyse\ du\ ^{13}C\ (tube\ à\ combustion),\ lorsque\ les\ composés\ sont\ envoyés\ vers$	
	le détecteur de masse	66
2.15	Collecteur universel et la collecte des espèces isotopiques coïncidentes	68
2.16	Dendrogramme	73
2.17	Matrice de données s x n	75
2.18	Calcul matriciel de l'ACP	76
4.1	Schéma du matériel expérimental pour la distillation des zestes d'agrumes	101
4.2	Schéma d'une ampoule à décanter utilisée comme colonne de séparation de chromatographie	
	flash	102
4.3	Paramètres de la source établie avec le logiciel d'exploitation Isoprime, pour l'analyse iso-	
	topique du ^{13}C	113
4.4	Paramètres de la source établis avec le logiciel d'exploitation Isoprime, pour l'analyse iso-	
	topique de 2H	117
4.5	Table des coefficients de Student en fonction du degré de liberté et du degré de confiance .	121
5.1	Profil GC/MS d'une huile de pamplemousse oxydée sur colonne apolaire	129
5.2	$Profil\ GC/MS\ de\ l'huile\ essentielle\ de\ pamplemousse\ oxyd\'ee\ sur\ colonne\ polaire\ .\ .\ .\ .$	129
5.3	Réaction d'oxydation du limonène	130
5.4	Réaction d'aromatisation des terpinènes	130
5.5	Réaction d'ouverture d'un époxyde	131
5.6	Profil énantio-GC-FID pour la chiralité des terpènes	158
5.7	Profil énantio-GC-FID pour la chiralité du citronnellal	167
5.8	Profil énantio-GC-FID pour la chiralité de l'a-terpinéol	173
5.9	Profil énantio-GC-FID pour la chiralité du linalol	173
5.10	$Chromatogramme\ de\ la\ s\'eparation\ des\ s\'e\'e\'eo isom\`eres\ de\ linalol,\ ac\'etate\ de\ linalyle . . .$	180
5.11	Chromatogrammes de la séparation des stéréoisomères de linalol, acétate de linalyle et	
	$ac\'etate\ de\ lavandulyle$	181
5.12	Chromatogramme de la séparation des terpènes pour l'analyse isotopique des huiles essen-	
	tielles de citron et bergamote	193

Table des figures 12

5.13	Profils isotopiques d'huiles essentielles de citron, bergamote et orange	194
5.14	Profils isotopiques de l'ensemble des échantillons de bergamote	194
5.15	Profils isotopiques de l'ensemble des échantillons de citron	195
5.16	Profils isotopiques des huiles essentielles de bergamote de référence, de coupes, ainsi que	
	les profils moyens, minimum et maximum	195
5.17	Profils isotopiques des huiles essentielles de citron de référence, extraites au laboratoire, de	
	coupes, ainsi que les profils moyens, minimum et maximum	196
5.18	Chromatogramme de la séparation des terpènes pour l'analyse isotopique des huiles essen-	
	tielles de mandarine	197
5.19	Profils isotopiques d'huile essentielle d'orange et mandarine	198
5.20	Profils isotopiques des huiles essentielles de mandarine de référence	198
5.21	Chromatogramme de la séparation des terpènes pour l'analyse isotopique des huiles essen-	
	tielles d'orange et pamplemousse	199
5.22	Profil isotopique d'huile essentielle de pamplemousse et orange	200
5.23	Chromatogramme de la séparation du linalol et acétate de linalyle pour la mesure isotopique	201
5.24	Résultats des mesures isotopiques du ¹³ C du linalol et acétate de linalyle en GC-C-IRMS	
	des échantillons de bergamote	204
5.25	Chromatogramme de la séparation du citral, acétate de néryle et géranyle pour l'analyse	
	isotopique des huiles essentielles de citron	207
5.26	Structure générale des PMF et leurs fragments principaux	226
5.27	Spectre de masse de l'hepta-PMF inconnue	228
5.28	Profil (SCAN) des PMF d'une huile essentielle d'orange	230
5.29	Profil (SIM) d'une huile essentielle d'orange	230
5.30	Profil (SIM) d'une huile essentielle de bergamote	233
5.31	$Chromatogramme\ des\ ions\ 327,\ 357,\ 387,\ 417\ des\ PMF\ d'une\ huile\ essentielle\ de\ citron \qquad .$	235
5.32	$Teneurs\ en\ ppm\ des\ PMF\ mesur\'ees\ (TAN\ +NOB)\ en\ relation\ avec\ le\ pourcentage\ d'ajout$	
	d'huile essentielle d'orange	237
5.33	Profil (SIM) d'une huile essentielle de mandarine	238
5.34	Profil (SIM) d'une huile essentielle de pamplemousse	240
5.35	Spectres PIR des huiles essentielles de citrus	250
5.36	Carte factorielle des citrus (sans HE de pamplemousse). En bleu la bergamote, en vert	
	l'orange, en rouge la mandarine et en jaune le citron	251
5.37	Spectres infrarouges de lavande (bleu) et lavandin super (vert)	252
5.38	$ACP\ sur\ les\ lavandes\ (jaune),\ lavandins\ (rouge)\ et\ coupes\ (vert\ 10\%\ de\ lavandin\ dans\ la$	
	lavande, bleu 20%, violet 50%)	253
5.39	Spectres d'huile essentielle de lavande (bleu), huile essentielle de lavandin super (rose) et	
	de huile essentielle de lavande coupée à 20% de lavandin (rouge)	254

13

6.1	Modèle ACP pour l'identification de la fraude des huiles essentielles de bergamote	260
6.2	Injection des échantillons commerciaux dans le Modèle	262
6.3	ACP des analyses isotopiques du linalol et acétate de linalyle de l'huile essentielle de ber-	
	gamote	265
6.4	Arbre de décision pour le contrôle de naturalité de l'huile essentielle de bergamote	268
6.5	Modèle ACP pour l'identification de la fraude des huiles essentielles de citron	269
6.6	Injection des échantillons commerciaux dans le Modèle	271
6.7	ACP des résultats des analyses de PMF, teneurs en δ -3-carène et sabinène $(+)$ de l'huile	
	essentielle de citron	275
6.8	ACP des résultats des analyses isotopiques du citral et de l'acétate de géranyle de l'huile	
	essentielle de citron	277
6.9	Arbre de décision pour le contrôle de naturalité de l'huile essentielle de citron	280
6.10	Modèle ACP pour l'identification de la fraude des huiles essentielles de mandarine	281
6.11	Application aux différentes origines des huiles essentielles de mandarine	283
6.12	Injection des échantillons commerciaux dans le Modèle	284
6.13	Résultats des analyses isotopiques du NMAM de 2 H en fonction de celle de 15 N	287
6.14	Arbre de décision pour le contrôle de naturalité de l'huile essentielle de mandarine	290
6.15	Modèle ACP pour l'identification de la fraude des huiles essentielles de lavande	292
6.16	Injection des échantillons commerciaux dans le Modèle	293
6.17	ACP des résultats des analyses isotopiques du linalol et acétate de linalyle	296
6.18	Arbre de décision pour le contrôle de naturalité de l'huile essentielle de lavande	298

1.1	Tableau des substituants des PMF
2.1	Abondances isotopiques des principaux atomes analysés en IRMS
2.2	Références internationales utilisées pour l'analyse isotopique du ¹³ C
2.3	Références internationales utilisées pour l'analyse isotopique du 2D
2.4	Références internationales utilisées pour l'analyse isotopique du ^{15}N
3.1	Tableau de syntèse de la stratégie analytique
4.1	Conditions expérimentales utilisées lors des différentes purifications
4.2	Ions sélectionnés pour la méthode SIM
4.3	Molécules et rapport de molécules dont les teneurs ont été sélectionnées pour la réalisation
	de l'ACP
5.1	Ecarts de confiance relatifs aux différentes teneurs
5.2	Teneurs relatives des composés normés de l'huile essentielle d'orange
5.3	Teneurs relatives des composés normés de l'huile essentielle de bergamote
5.4	Teneurs relatives des composés normés de l'huile essentielle de citron
5.5	Teneurs relatives des composés normés de l'huile essentielle de mandarine
5.6	Teneurs relatives des composés normés de l'huile essentielle de pamplemousse
5.7	Teneurs relatives des composés normés de l'huile essentielle de lavande
5.8	Teneurs relatives des composés normés de l'huile essentielle de lavandin super
5.9	Résolutions associées à la séparation des isomères de a-pinène et sabinène
5.10	Incertitudes associées à la séparation des isomères de a-pinène et sabinène
5.11	$Teneurs\ relatives\ des\ isom\`eres\ a\hbox{-}pin\`ene\ (\hbox{-})\ et\ sabin\`ene\ (\hbox{+})\ pour\ l'huile\ essentielle\ d'orange\ 16000000000000000000000000000000000000$
5.12	$Teneurs\ relatives\ des\ isom\`eres\ a-pin\`ene\ (-)\ et\ sabin\`ene\ (+)\ pour\ l'huile\ essentielle\ de\ ber-$
	gamote
5.13	$Teneurs\ relatives\ des\ isom\`eres\ a-pin\`ene\ (-)\ et\ sabin\`ene\ (+)\ pour\ l'huile\ essentielle\ de\ citron\ 163$
5.14	$Teneurs\ relatives\ des\ isom\`eres\ a-pin\`ene\ (-)\ et\ sabin\`ene\ (+)\ pour\ l'huile\ essentielle\ de\ man-$
	darine

5.15	$Teneurs\ relatives\ des\ isom\`eres\ a-pin\`ene\ (-)\ et\ sabin\`ene\ (+)\ pour\ l'huile\ essentielle\ de\ pam-$	
	plemousse	166
5.16	Résolution associée à la séparation des isomères de citronnellal	167
5.17	Incertitudes associées à la séparation des isomères du citronnellal	167
5.18	Teneurs relatives de l'isomère du citronnellal R et teneur totale pour l'huile essentielle	
	d'orange	168
5.19	Teneurs relatives de l'isomère du citronnellal R et teneur totale pour l'huile essentielle de	
	citron	169
5.20	Teneurs relatives de l'isomères du citronnellal R et teneur totale pour l'huile essentielle de	
	mandarine	170
5.21	$Teneurs\ relatives\ de\ l'isom\`eres\ du\ citronnellal\ R\ et\ teneur\ totale\ pour\ l'huile\ essentielle\ de$	
	pample mousse	171
5.22	$R\'esolution\ associ\'ee\ \grave{a}\ la\ s\'eparation\ des\ isom\`eres\ de\ l'a-terpin\'eol\ et\ du\ linalol\ \ldots\ldots\ldots$	173
5.23	$Incertitudes\ associées\ \grave{a}\ la\ s\'{e}paration\ des\ isom\`{e}res\ de\ l'a-terpin\'eol\ et\ du\ linalol\ \ .\ \ .\ \ .$	174
5.24	$Teneurs\ relatives\ des\ isom\`eres\ du\ linalol\ ()\ et\ aterpineol\ (+)\ et\ teneurs\ totales\ pour\ l'huile$	
	essentielle d'orange	175
5.25	$Teneurs\ relatives\ des\ isom\`eres\ du\ linalol\ ()\ et\ aterpineol\ (+)\ et\ teneurs\ totales\ pour\ l'huile$	
	essentielle de citron	176
5.26	$Teneurs\ relatives\ des\ isom\`eres\ du\ linalol\ ()\ et\ aterpineol\ (+)\ et\ teneurs\ totales\ pour\ l'huile$	
	essentielle de mandarine	178
5.27	$Teneurs\ relatives\ des\ isom\`eres\ du\ linalol\ (ext{})\ et\ a ext{}terpineol\ (ext{+-})\ et\ teneurs\ totales\ pour\ l'huile$	
	essentielle de pamplemousse	179
5.28	Résolution associée à la séparation des isomères du linalol et de l'acétate de linalyle	182
5.29	Incertitudes associées à la séparation des isomères du linalol et de l'acétate de linalyle	182
5.30	Teneurs relatives des isomères du linalol R et acétate de linalyle R pour l'huile essentielle	
	de ho wood	183
5.31	Teneurs relatives des isomères du linalol R et acétate de linalyle R pour l'huile essentielle	
	$de\ bergamote$	184
5.32	Teneurs relatives des isomères du linalol R, acétate de linalyle R et acétate de lavandulyle	
	R pour l'huile essentielle de lavande	186
5.33	Intervalle de tolérance des teneurs relatives obtenu pour l'acétate de linalyle R dans la	
	l'huile essentielle de lavande	187
5.34	Teneurs relatives des isomères du linalol R, acétate de linalyle R et acétate de lavandulyle	
	R pour l'huile essentielle de lavandin super	188
5.35	Incertitudes associées à la mesure isotopique du sabinène, myrcène, limonène	
5.36		
	essentielle de mandarine	197

5.37	Incertitudes associées à la mesure isotopique du sabinène, myrcène, limonène pour l'huile	000
- 00	essentielle de pamplemousse	200
5.38	Comparaison des résultats des mesures isotopiques du ¹³ C du linalol et acétate de linalyle en GC-C-IRMS et AE-IRMS	201
5.39	Résultats des mesures isotopiques du ¹³ C du linalol et acétate de linalyle en GC-C-IRMS	
	d'échantillons synthétiques ou extraits naturels	202
5.40	Résultats des mesures isotopiques du ¹³ C du linalol et acétate de linalyle en GC-C-IRMS	
	des échantillons de ho wood	203
5.41	Résultats des mesures isotopiques du ¹³ C du linalol et acétate de linalyle en GC-C-IRMS	
	des échantillons de lavandin super	205
5.42	Résultats des mesures isotopiques du 13C du linalol et acétate de linalyle en GC-C-IRMS	
	des échantillons de lavande	206
5.43	Incertitude de mesure de l'analyse isotopique du ¹³ C sur GC-C-IRMS pour le néral (1),	
	géranial (2) et acétate de géranyle (3)	207
5.44	Résultats des mesures isotopiques du ¹³ C du citral et acétate de géranyle en GC-C-IRMS	
	des échantillons de citron	209
5.45	Résultats des mesures isotopiques du ² H du linalol et acétate de linalyle en GC-C-IRMS	
	d'échantillons synthétiques ou extraits naturels	213
5.46	Résultats des mesures isotopiques du ² H du linalol et acétate de linalyle en GC-C-IRMS	
	des échantillons de ho wood	214
5.47	Résultats des mesures isotopiques du ² H du linalol et acétate de linalyle en GC-C-IRMS	
	des échantillons de bergamote	215
5.48	Résultats des mesures isotopiques du ² H du linalol et acétate de linalyle en GC-C-IRMS	
	des échantillons de lavandin super	216
5.49	Résultats des mesures isotopiques du ² H du linalol et acétate de linalyle en GC-C-IRMS	
	des échantillons de lavande	217
5.50	Résultats des mesures isotopiques du ² H du néral, géranial et acétate de géranyle en GC-	
	C-IRMS d'échantillons synthétiques ou extraits naturels	218
5.51	Résultats des mesures isotopiques du ² H du citral et acétate de géranyle en GC-C-IRMS	
	des échantillons de citron	219
5.52	$R\'{e}sultats\ des\ mesures\ isotopiques\ du\ ^2H\ du\ NMAM\ en\ GC-Py-IRMS\ d'\'{e}chantillons\ syn-$	
	thétiques ou extraits naturels	220
5.53	$R\'{e}sultats\ des\ mesures\ isotopiques\ du\ ^2H\ Du\ NMAM\ en\ GC\text{-}C\text{-}IRMS\ des\ \'{e}chantillons\ de$	
	mandarine	221
5.54	R \'esultats des mesures isotopiques du ^{15}N du $NMAM$ en AE - $IRMS$ des échantillons de	
	mandarine	224
5.55	Masses des principaux ions fragments des PMF identifiées	227

5.56	Incertitudes d'analyse des PMF	229
5.57	Profil de PMF avec chaque pourcentage relatif des échantillons d'huile essentielle d'orange	
	et les teneurs quantifiées de TAN et NOB	231
5.58	Teneurs de chaque PMF des échantillons d'huile essentielle d'orange et les teneurs totales	232
5.59	Profil des PMF avec leurs teneurs relatives des échantillons d'huile essentielle de bergamote	234
5.60	Teneurs en PMF des échantillons d'huile essentielle de citron et les teneurs quantifiées de	
	TAN et NOB	236
5.61	Teneurs en PMF des échantillons d'huile essentielle mandarine et les teneurs quantifiées	
	de TAN et NOB	239
5.62	Teneurs en PMF des échantillons d'huile essentielle de pamplemousse et les teneurs quan-	
	tifiées de TAN et NOB	241
5.63	Résidus des huiles essentielles d'orange	
	Résidus des huiles essentielles de bergamote	
	Résidus des huiles essentielles de citron	
	Résidus des huiles essentielles de mandarine	
	Résidus des huiles essentielles de pamplemousse	
	Résidus des huiles essentielles de lavande	
	Résidus des huiles essentielles de lavandin super	
5.70		210
0.10	identifier la fraude des huiles essentielles de citrus et lavande	256
	tuentifier tu fraute des nuties essentiettes de cuirus et tavande	200
6.1	Résultat de l'analyse discriminante de l'huile essentielle de bergamote	263
6.2	Résultat de l'analyse discriminante de l'huile essentielle de citron	274
6.3	Résultat de l'analyse discriminante de l'huile essentielle de mandarine	286
6.4	Résultat de l'analyse discriminante de l'huile essentielle de lavande	295

Liste des abbréviations

ACP: analyse en composante principale

AE-C-IRMS : analyse élémentaire-Combustion-Spectrométrie de masse des rapports

isotopiques

 ^{12}C : Carbone 12

 13 C: Carbone 13

C3: Cycle de Calvin

C4: Cycle de Hatch et Slack

CAM: Crassulacean Acid Metabolism

Enantio-GC: Chromatographie Gazeuse de séparation chirale

FES: Filtre éléctrostatique

FID: Détection à ionisation de flamme

GC: Chromatographie gazeuse

GC-C/Py-IRMS: Chromatographie en phase gazeuse-Combustion/Pyrolyse-Spectrométrie

de masse des rapports isotopiques

¹H: Hydrogène

²H: Deutérium

IAEA: Agence Internationale à l'énergie atomique

MS: Spéctrométrie de masse

 ^{14}N : Azote 14

 ^{15}N : Azote 15

 $^{17}\mathrm{O}$: Oxygène 17

¹⁸O: Oxygène 18

PLS-DA: Moindre carré partiel - analyse discriminante

SNIF-RMN : Fractionnement Isotopique Naturel Site-spécifique étudié par Résonance

Magnétique Nucléaire

SIM: Selected Ion Monitoring

UMA : Unité de Masse Atomique

V-PDB : Carbonate fossile de Caroline du sud (Vienna Pee Dee Belemnite)

V-SMOW : Mélange de différentes eaux océaniques (Vienna Standard Mean Ocean Water)

Introduction

Les huiles essentielles extraites de plantes aromatiques, médicinales et à parfum, sont utilisées depuis des millénaires pour leurs propriétés médicinales et olfactives. Aujourd'hui elles sont beaucoup employées dans l'industrie agro-alimentaire et cosmétique pour lesquelles leurs propriétés médicinales sont toujours exploitées.

Les huiles essentielles sont des produits pouvant être très onéreux selon le végétal d'origine, leur facilité à être cultivées ou encore le rendement de l'extraction. Pour des raisons de rentabilité, les producteurs et distributeurs sont contraints à réduire leur coût au maximum et à commercialiser des huiles essentielles au plus bas prix. Afin d'être compétitif face à une forte concurrence, certains producteurs ou distributeurs ont recours à la fraude et proposent, à moindre coût, des huiles de qualité inférieure, sous la dénomination produits naturels de haute qualité.

Les conséquences pour l'acheteur sont économiques et sanitaires. Si une huile adultérée conserve ses propriétés aux yeux d'un acheteur non-averti, elle pourrait pourtant poser des problèmes sanitaires. En effet, il se pose la question de la toxicité des adultérants. Egalement, l'ajout d'une molécule chirale peut apporter une modification de l'excès énantiomérique pouvant être à l'origine d'une modification de l'activité de l'huile essentielle. En effet les énantiomères chiraux n'ont pas le même effet sur l'organisme. Il n'est pas rare que les deux isomères n'aient pas la même activité biologique (α-terpinéol, terpinène-4-ol...) [1]. De plus dans certains cas chaque isomère à une odeur spécifique, ainsi le R-carvone caractérise la menthe verte, la S-carvone l'aneth ou le carvi.

C'est pourquoi il existe des normes internationales, dans la pharmacopée par exemple, ou encore l'AFNOR. L'existence de ces normes contribue aussi une certaine homogénéité dans la composition et la qualité des huiles essentielles.

Différents types de fraudes ont été mis en évidence lors de diverses recherches sur le sujet :

- mélange d'une huile essentielle complexe et onéreuse avec une autre de composition proche, plus simple et surtout moins chère
- addition de produits synthétiques bon marché

- addition de composés naturels isolés
- Ajout d'huile végétale afin d'augmenté le volume sans dénaturer le parfum

Dans un premier temps, l'enjeu de ce travail est de mettre en place des méthodes d'analyses chimiques, en vue, de l'authentification des huiles essentielles d'agrumes, de lavandes et lavandins super. Dans un deuxième temps, il s'agit de mettre en place des outils d'aide à la décision afin d'obtenir une méthodologie fiable et efficace pour le contrôle de la naturalité.

Les méthodes instrumentales usuellement utilisées sont les suivantes :

- GC-MS afin d'identifier les molécules présentes
- GC-FID pour une caractérisation semi-quantitative
- Enantio-GC-FID pour l'analyse des molécules chirales
- HPLC pour l'étude des composés de la fraction non-volatile
- HPTLC (chromatographie sur couche mince haute performance) pour la détection rapide de d'huile végétale
- GC-py/C-IRMS pour l'analyse isotopique
- GC multidimensionnelle pour la connaissance la plus exhaustive possible de l'essence analysée.

Pour cette étude, nous avons complété ces techniques par :

- FTIR pour déterminer « l'empreinte de l'huile »
- ATG qui permet d'obtenir la teneur de la fraction non-volatile

Ce mémoire se décompose en six chapitres :

 le premier présente les généralités sur les huiles essentielles et s'intéresse plus particulièrement à celles étudiées au cours de ces travaux. L'origine botanique de ces dernières est également détaillée.

- le deuxième chapitre décrit les techniques et appareillages nécessaires à notre étude.
- le troisième chapitre aborde les stratégies analytiques développées afin de répondre à la problématique de l'étude. Pour chaque type d'huile essentielle, les analyses envisagées et les molécules cibles sont présentées.
- le quatrième chapitre détaille les protocoles expérimentaux.
- le cinquième chapitre synthétise les résultats obtenus et précise les analyses conservées pour la mise en place de la méthodologie.
- dans le sixième chapitre sont développées les méthodologies dégagées pour chaque type d'huile essentielle. Des arbres de décisions sont ainsi crées permettant la sélection des échantillons.

Chapitre 1

Généralités

1.1 Généralités sur les huiles essentielles

La pharmacopée française (édition de 1965) donne une définition officielle des huiles essentielles : « Produits de compositions généralement assez complexes renfermant les principes volatils contenus dans les végétaux et plus ou moins modifiés au cours de la préparation. Pour extraire ces principes volatils, il existe divers procédés. Deux seulement sont utilisables pour la préparation des essences officinales : celui par distillation dans la vapeur d'eau de plantes à essences ou de certains de leurs organes et celui par expression » [1-3].

Cette définition correspond toujours à la réalité d'aujourd'hui. Néanmoins il existe des procédés d'extraction plus récents, tels que la turbodistillation ou encore l'hydro-distillation par micro-ondes sous vide. La définition ne prend en compte que les procédés de distillation (hydrodistillation, entrainement à la vapeur et distillation sèche) et d'expression car la technique d'extraction influence significativement la composition de l'extrait. Les autres types d'extraction mènent à des extraits qui ne sont pas définis comme des huiles essentielles. Les procédés d'extraction par solvants volatils, par exemple, conduisent à des essences concrètes ou absolues. Pour remplacer l'utilisation de solvants nocifs pour l'environnement, un procédé utilisant du CO₂ supercritique a été développé. Cependant les coûts importants des installations réduisent son utilisation dans l'industrie des huiles essentielles [4].

Il existe de nombreux paramètres à l'origine de variations de la composition moléculaire des huiles essentielles en dehors de la technique d'extraction. Ainsi l'origine géographique (altitude, latitude), la nature du sol, le climat (régime hydrique, ensoleillement...) et la saison de production sont des paramètres importants provoquant la présence de différents « type chimique » communément appelés « chémotypes ». Ainsi une lavande cultivée en Bulgarie n'a pas une composition homologue à celle d'une lavande de France. Les normes AFNOR sont représentatives de chémotypes spécifiques [1, 4].

Tous les organes d'une même plante peuvent renfermer des huiles essentielles de compositions

très différentes. Ainsi l'orange amère (citrus auratium) par exemple, contient dans le péricarpe de « l'essence de curaçao », la fleur l'« essence de néroli » et les feuilles l'« essence de petit grain bigaradier » [4]. Il existe ainsi des huiles essentielles provenant de fruits (citrus), de fleurs (rose, néroli...), de feuilles (petitgrains...) et de bois ou d'écorce (bois de rose, cannelle, ho wood...). De façon générale, les huiles essentielles sont présentes en très faible quantité : 1 à 2% de la matière sèche.

1.1.1 Chimie végétale

1.1.1.1 La fraction des volatiles

Une huile essentielle est principalement constituée d'une fraction volatile (95-99%) analysée en chromatographie gazeuse, mais aussi d'une fraction non volatile usuellement étudiée en chromatographie liquide. Les constituants chimiques volatiles caractéristiques de l'huile essentielle, sont composés de molécules apolaires tels que les terpènes (limonène, γ-terpinène...) et sesquiterpènes (E-β-caryophyllène...), moyennement polaires tels que les aldéhydes (décanal, citronellal...), esters (acétate de linalyle, acétate de géranyle...), ou encore alcools (linalol...). Les composés oxygénés sont les principaux composés à donner le caractère olfactif d'une huile essentielle. D'un type d'essence à l'autre, les composés peuvent être en grande partie identiques mais les teneurs respectives varient significativement. De plus la présence de composés olfactifs caractéristiques, en quantité plus ou moins importante, est à l'origine de l'unicité de chaque huile [1, 4].

1.1.1.1.1 Origine biochimique

1.1.1.1.1.1 Monoterpénoïdes et sesquiterpinoïdes

Ils constituent la majorité des composés d'une huile essentielle. Il s'agit d'hydrocarbures, substitués ou non à 10 et 15 carbones (respectivement monoterpénoïdes et sesquiterpénoïdes) issus de l'isoprène C_5H_8 :

FIGURE 1.1: Isoprène

La combinaison de deux ou trois isoprènes en présence de rayonnement solaire et d'enzymes spécifiques permet la biosynthèse des monoterpènes et des sesquiterpènes passant par les intérmédaires de synthèse respectifs : le géranylpyrophosphate (GPP) et le farnésylpyrophosphate (FPP).

Figure 1.2: De haut en bas : géranyl pyrophosphate et le farnésylpyrophosphate

Les composés ainsi biosynthétisés peuvent être cycliques ou linéaires. La substitution de ces molécules à différents états intermédiaires avec un ou plusieurs atomes d'oxygène entraine la formation d'alcools, aldéhydes, acétates.[1, 4, 5]

ex:

FIGURE 1.3: De gauche à droite : limonène, a-pinène, linalol

1.1.1.1.1.2 Les composés aromatiques

Ces composés sont plus rares. Certains sont dérivés entre autre du phénylpropane (C6-C3). Ce sont principalement des allyl- et propénylphénols ainsi qu'aldéhydes. Les huiles essentielles peuvent aussi contenir des molécules en (C6-C1) comme la vanilline et l'N-methyle anthranilate de méthyle. Enfin les coumarines entrainables à la vapeur sont présentes dans les essences distillées, et en plus forte concentration dans les citrus issus de l'expression. Ce sont des lactones dérivées des acides cinnamiques [1, 4, 5].

FIGURE 1.4: De gauche à droite : N-methyle anthranilate de méthyle, coumarine

1.1.1.2 La fraction non volatile

1.1.1.2.1 Origine biochimique

Nous définissons cette fraction par les molécules non détectées via la méthode de chromatographie gazeuse décrite par l'AFNOR pour l'analyse des huiles essentielles (NF T 75-401, (mai 1985)). Elle est essentiellement constituée de composés aromatiques tels que les coumarines et furocoumarines dont les flavones polyméthoxylées. Certains composés couramment rencontrés dans les huiles grasses comme les acides gras, tocophérol et hydrocarbures à longues chaines (triterpènes...) sont aussi présents dans cette fraction [1, 4, 5].

1.1.1.2.2 Les flavones polyméthoxylées (PMF)

C'est un sous groupe des flavones, molécules qui participent à la couleur des fruits et légumes. Elles ont aussi une activité anti-oxydante et anti-radicalaire, lui conférant des propriétés anticancéreuses. Voici les PMF couramment identifiées pour les citrus dans la littérature [1, 4-25].

FIGURE 1.5: Structure générale des PMF

Masse	Nom		R1	R2	R3
342	Tétraméthyl-O-scuteilarin	SCU	Н	Н	Н
372	T ang eritin	TAN	Н	MeO	Н
372	Sinensetin	SIN	Н	Н	MeO
402	Nobiletin	NOB	Н	MeO	MeO
402	Hexaméthylquercetagetin	QUER	MeO	Н	MeO
432	Hept améth oxyflavone	HEPT	MeO	MeO	MeO

Table 1.1: Tableau des substituants des PMF

1.1.1.3 Stéréosélectivité

La biosynthèse enzymo-catalysée des terpènes est stéréosélective, ce qui signifie qu'une molécule chirale aura un stéréoisomère préférentiellement synthétisé. Le stéréoisomère majoritaire dépend du précurseur de synthèse. En effet le GPP peut se réarranger en linalylpyrophostphate (LPP) lors de la biosynthèse, molécule pouvant avoir les configurations R ou S respectivement nommées (-)-3R-LPP et (+)-3S-LPP. Ces précurseurs détermineront l'isomère majoritaire en fin de biosynthèse. Ainsi la (-)-3R-LPP produit le (-)-limonène et la (+)-3S-LPP le (+)-limonène. Les différentes conditions de réaction (suivant la plante) et d'extraction mèneront à des excès énantiomériques plus ou moins importants permettant d'identifier l'origine botanique de l'huile essentielle [1, 4]

Il existe deux nomenclatures spécifiques :

- Une basée sur le pouvoir rotatoire des molécules : l'isomère déviant la lumière sur la droite est noté (+) et celui qui la dévie sur la gauche (-).
- La nomenclature de Cahn, Ingold et Prelog [26] indépendante du pouvoir rotatoire. Elle classe les constituant par ordre d'importance : les groupes sont placés dans l'ordre décroissant en fonction du numéro atomique Z. Ainsi si l'ordre de succession est dans le sens des aiguilles d'une montre le stéréoisomère est noté R (Rectus) et dans le cas inverse il est noté S (Sinister).

Si plusieurs carbones sont asymétriques, ont pourra alors noter le numéro du carbone suivi de sa stéréochimie (ex : 2S, 3R).

1.1.1.4 Le fractionnement isotopique

La différence dans leur nombre de masse confère aux isotopes des propriétés physicochimiques différentes. L'isotope le plus lourd forme des liaisons légèrement plus fortes que l'isotope léger il sera donc assimilé de manière différente.

Deux processus majoritaires entrent en jeu [27-32] :

- Effet isotopique cinétique : dans le cas d'une transformation le produit présente un faible taux d'isotope lourd en comparaison au substrat d'origine. Si dans le métabolisme de la plante, c'est l'effet cinétique qui prédomine, alors la transformation donnera naissance à un produit plus « léger » car l'isotope lourd réagit moins vite.
- Effet isotopique thermodynamique : un équilibre entre un substrat d'origine et un produit existe. Dans ce cas les produits pourront soit être enrichis soit appauvris en isotopes lourds, suivant l'équilibre mis en jeu.

A cela s'ajoute les phénomènes d'évaporation entrainant une concentration en isotope lourd dans la plante, car il a une préférence pour l'état liquide Ainsi le climat aura une légère influence sur le fractionnement isotopique [29]. Cependant le fractionnement isotopique reste largement influencé par le métabolisme du végétal.

1.1.1.4.1 Fractionnement isotopique du carbone dans les plantes

Il existe trois grands groupes de végétaux, différenciés par leur métabolisme d'assimilation du CO₂ atmosphérique. Ce phénomène a fait l'objet de plusieurs études, qui se sont focalisées sur les processus physico-chimiques, incluant la diffusion, la dissolution et l'étape de carboxylation entrant en jeu dans l'assimilation du CO₂ atmosphérique [27, 28, 31-34].

Les végétaux assimilent le dioxide de carbone, en présence d'eau et de lumière pour former du glucose selon l'équation suivante :

$$6{\rm CO_2}\,+\,12{\rm H_2O}\,+\,lumi\`{\rm e}{\rm re}\,\to{\rm C_6H_{12}O_6}\,+\,6{\rm O_2}\,+\,6{\rm H_2O}.$$

Le mécanisme d'assimilation du CO₂ diffère d'un végétal à l'autre, avec entre autre des intermédiaires réactionnels à 3 ou 4 carbones. Les plantes en C3 passent par un intermédiaire à 3 atomes de carbone, le 3-phosphoglycérate, ce qui est le cas de la plupart des plantes. Les plantes en C4 ont pour intermédiaire réactionnel, un malate à 4 carbones. Il existe un dernier

groupe, dont le mécanisme est appelé cycle de CAM, qui alterne les deux intermédiaires en fonction de l'environnement [32-34].

Les échanges ont lieu dans l'ouverture des stomates au niveau des feuilles. Les plantes trouvent un équilibre entre laisser les stomates ouverts pour laisser entrer le CO_2 et les fermer pour éviter l'évaporation de l'eau. Les 3 métabolismes ne mènent pas au même fractionnement isotopique, ce qui permet par analyse de rapports isotopiques du $^{13}C/^{12}C$ de discriminer ces végétaux. Ces différences sont expliquées, par simplification en deux étapes [27, 28, 31] :

- la diffusion du CO₂ vers l'intérieur des feuilles
- la carboxylation.

En ce qui concerne le ¹³C, la déviation isotopique du CO₂ atmosphérique est considérée comme relativement constante dans les zones éloignées de vive activité industrielle, et égale à -8 ‰. L'activité industrielle va entrainer un appauvrissement de la teneur en ¹³C dans l'air. Dans les zones rurales, seule la présence d'une végétation dense peut modifier légèrement cette valeur car cette dernière consomme du CO₂ en grande quantité. Cependant la valeur du rapport isotopique atmosphérique n'est pas variable de façon significative et de ce fait, la valeur isotopique obtenue ne sera que peu liée à la géolocalisation de la plante mais à son métabolisme (photosynthèse) ou éventuellement au processus industriel utilisé [27-29, 35].

La mesure de rapport isotopique du carbone est très utilisée en botanique pour comprendre le métabolisme des plantes [28].

1.1.1.4.1.1 Les plantes en C3

Il s'agit de végétaux qui observent l'appauvrissement isotopique le plus important. Les valeurs du δ^{13} C se dispersent de -21‰ à -35‰ avec une moyenne d'environ -28‰, d'après plusieurs études revues par O'Leary (1981) [36, 37]. Le processus de carboxylation est permis par fixation du CO_2 grâce à une enzyme la ribulose biphosphate carboxylase. Il s'effectue en trois étapes, d'abord l'incorporation du CO_2 dans la RuBP, suivie de la réduction de la molécule formée (APG) en triose phosphate et pour finir la RuBP est régénérée [32].

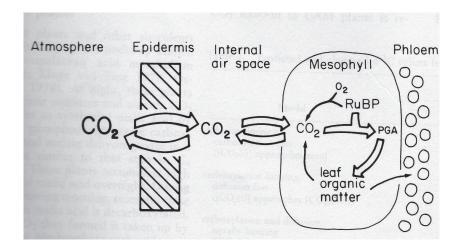


FIGURE 1.6: Schéma de la photosynthèse en C3

Les conséquences sur le fractionnement isotopique sont les suivantes : Le CO₂ pénètre dans la feuille par les stomates et ce processus est toujours plus ou moins réversible. Ensuite le CO₂ diffuse vers les chloroplastes où la carboxylation irréversible a lieu. C'est cette deuxième étape qui est déterminante dans le fractionnement isotopique. Si la diffusion stomatale est rapide, alors l'étape de carboxylation est l'étape limitante, donc déterminante du fractionnement isotopique. La déviation isotopique aura alors une valeur autour de -36% pour le végétal concerné. Par contre si la résistance des stomates est un peu plus forte alors la diffusion sera plus lente et elle sera aussi une étape importante dans le fractionnement isotopique, la déviation isotopique aura donc une valeur autour de -28%. Une majorité des plantes dont l'ensemble des arbres utilisent ce mécanisme pour assimiler le CO₂ [27, 32, 36, 37].

1.1.1.4.1.2 Les plantes en C4 - cycle de Hatch et Slack

Ces végétaux ont un appauvrissement isotopique beaucoup plus faible et la déviation isotopique est mesurée entre -9‰ et -20‰ d'après plusieurs études revues par O'Leary (1981) [29, 36, 37]. Le mécanisme d'absorption du CO₂ est séquentiel et utilise deux enzymes dans deux réactions successives.

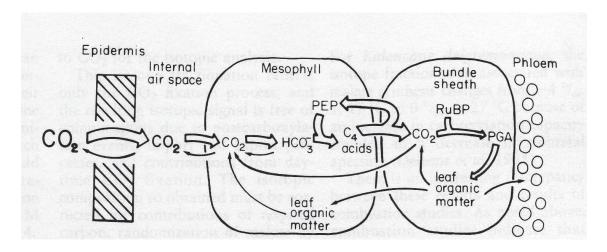


FIGURE 1.7: Schéma de la photosynthèse en C4

Avant la carboxylation, le CO₂ est d'abord hydraté en HCO₃, un équilibre se crée durant lequel l'ion HCO₃ est enrichi en ¹³C. Le CO₂ est intégré dans un intermédiaire à quatre carbones, grâce à cet enzyme. Ensuite cet intermédiaire est transporté dans des cellules spécifiques où le CO₂ est libéré et le transporteur est régénéré. Ensuite un mécanisme identique au cycle de Calvin a lieu mais avec un meilleur rendement.

Les étapes déterminantes dans le fractionnement isotopique sont la diffusion à travers les stomates et la carboxylation de la phosphophénolpyruvate. Si la diffusion est facile alors la carboxylation est l'étape limitante et la déviation isotopique est attendue aux alentours de -1‰. Si au contraire la diffusion est limitante alors le rapport isotopique sera aux alentours de -12‰. L'expérience montre des valeurs plutôt proches de -14‰, ce qui indique que c'est bien la diffusion qui est limitante. Ce type de mécanisme est observé chez les graminées tropicales comme le maïs et la canne à sucre [29, 33, 36, 37].

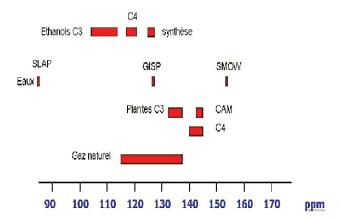
1.1.1.4.1.3 Cycle de CAM : Crassulacean acid metabolism

A l'image de la photosynthèse en C4, ces plantes utilisent également deux enzymes. Cependant le mécanisme diffère des plantes en C4 car il fonctionne en deux phases, une première la nuit où les stomates ouverts stockent de l'acide dicarboxylique, dans la journée, le cycle de Calvin a lieu, les stomates sont fermés, afin de réduire les pertes par transpiration. Les valeurs des déviations isotopiques sont comprises entre -10 % et -20 %. Ce mécanisme est observé chez les plantes grasses (cactées mais aussi ananas, vanillier...) [29, 31, 34, 36, 37].

1.1.1.4.2 Fractionnement isotopique du deutérium dans les plantes

A la différence du carbone, le taux de deutérium n'est pas constant sur terre. L'eau de pluie montre une variation importante et reproductible de la teneur en deutérium dépendant de plusieurs paramètres géographiques : le rapport isotopique $^2\mathrm{H}/^1\mathrm{H}$ de l'eau est en moyenne de 156 ppm aux environs de l'équateur et décroît fortement vers les pôles, pour atteindre une valeur caractéristique au Groënland de 129 ppm. En effet le deutérium est légèrement moins présent que l'hydrogène à l'état gazeux (plus lourd) et l'effet isotopique associé à l'équilibre thermodynamique liquide-vapeur de l'eau est EI = 1,079 (la vapeur est le produit et le liquide est le substrat). Les nuages sont donc constitués de vapeur d'eau allégée par rapport à l'eau de l'océan. De plus lorsque les nuages se déplacent vers l'intérieur des continents, ils s'appauvrissent en deutérium car la fraction d'eau perdue lors des pluies, est plus lourde que la fraction restante. Ce fractionnement isotopique augmente quand la température diminue, donc l'eau évaporée à basse température subit un plus fort appauvrissement en isotope lourd. Les pluies sont donc plus pauvres en deutérium vers les régions polaires. Aussi cet effet entraine une légère diminution de la teneur en deutérium lorsque l'altitude augmente.

A l'échelle du globe le rapport $^2\mathrm{H/^1H}$ diminue quand la latitude augmente et quand on s'éloigne de la mer. De plus, d'une saison à l'autre il existe des variations de la teneur en deutérium de l'eau. Enfin l'eau absorbée par la plante est en partie éliminée par évapotranspiration. Le fractionnement isotopique dépend donc aussi du métabolisme de la plante (C3, C4 et CAM) en plus de l'origine géographique [27, 38] .



SLAP : Standard Light Antarctic Precipitation (eau de référence du Pôle Sud). GISP : Greenland Ice Sheet Precipitation (eau de référence du Pôle Nord) Note : l'éthanol est considéré comme naturel lorsqu'il est produit par la fermentation de sucres.

FIGURE 1.8: Rapports isotopiques 2H/1H moyens (en ppm) de différentes substances naturelles.



FIGURE 1.9: Déviation isotopique en deutérium en Europe

1.1.1.4.3 Fractionnement isotopique de l'azote dans les plantes

Les sources d'azote pour les plantes sont les ions nitrates et ammoniums présents dans le sol, à l'exception pour quelques plantes qui sont capables d'assimiler l'azote atmosphérique. La teneur en azote 15 est considérée comme universellement constante avec un rapport isotopique $^{15}\mathrm{N}/^{14}\mathrm{N}$ égale à 0,3663% car c'est le standard international de référence [39]. La différence de rapport isotopique dans le sol, dans l'atmosphère et dans la biosphère est due au fractionnement isotopique qui a été détaillé en 1.1.1.4. Ceci est à l'origine d'une abondance isotopique en azote 15 plus importante dans le sol. Cet effet est aussi observé lors de l'absorption de l'azote par les plantes qui se trouve donc appauvries en azote 15 par rapport à l'abondance dans le sol [40-43]. La teneur en azote 15 dans la plante est donc relative à sa teneur dans le sol sur lequel elle est cultivée, le climat, la maturité du fruit, ainsi qu'a l'appauvrissement ayant lieu lors de son assimilation [43].

1.1.2 Les méthodes d'extractions

1.1.2.1 Les huiles essentielles

1.1.2.1.1 Les procédés de l'extraction à froid Ces technologies sont réservées à l'extraction des huiles essentielles d'agrumes qui est contenue dans les glandes du péricarpe du fruit appelées flavedo [1, 4, 5]. Il existe différents systèmes de machines que nous allons exposer brièvement [44, 45].

1.1.2.1.1.1 Extraction mécanique

Procédé mécanique: « FMC in line »: Cette machine réalise simultanément l'extraction du jus et celle de l'huile essentielle sans qu'ils n'entrent en contact. Le fruit est placé dans une coupelle constituée de doigts métalliques fixes. Une deuxième coupelle formée de doigts mobiles grands ouverts est utilisée pour presser le fruit. L'émulsion d'huile essentielle libérée par écrasement du péricarpe est emportée par un jet d'eau. La « FMC in line » est capable de traiter 2 tonnes de fruits à l'heure. Cependant le rendement pour l'huile essentielle est de l'ordre de 1 p. 1000.

1.1.2.1.1.2 Machines pélatrices

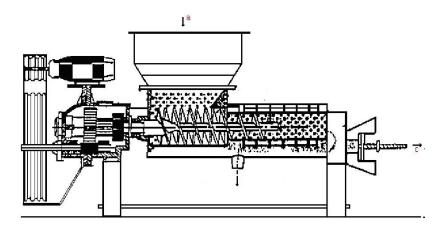


FIGURE 1.10: Exemple machine Torchi

L'extracteur BROWN (floride): Les fruits sont placés dans un bac rempli d'eau muni d'un tapis roulant et avancent vers des rouleaux en acier abrasifs. L'huile essentielle extraite est diluée dans l'eau du bac et ensuite filtrée, décantée et centrifugée. L'eau est ensuite recyclée. Les fruits toujours entiers sont dirigés vers l'extracteur à jus.

La polycitrus INDELICATO (Italie): Les fruits sont placés dans une machine constituée d'un cylindre et d'une vis d'Archimède en acier abrasif. De l'eau est pulvérisée du haut du cylindre. L'huile essentielle extraite est collectée et ensuite filtrée, décantée et centrifugée. Cette machine peut traiter 6 à 20 tonnes de fruits à l'heure.

Pélatrice CALVILLO (Italie): Les fruits sont râpés par deux rouleaux face à face, tournant dans deux sens différents. Les zestes secs obtenus sont pressés, pour fournir une huile essentielle très colorée plutôt destinée à l'industrie agroalimentaire.

1.1.2.1.1.3 Machines sfumatrices

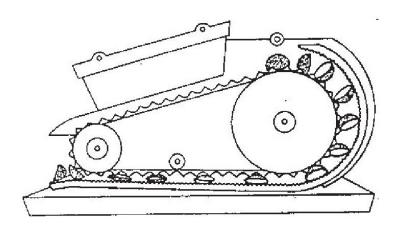


Figure 1.11: Exemple de machine sfumatrices

SPECIALE (Sicile): Le fruit est d'abord partagé et son jus est extrait. Les écorces sont ensuite pliées en deux et pressées. L'entrainement de l'émulsion d'huile essentielle est facilité par lavage des écorces avec l'eau recyclée. L'huile essentielle est ensuite séparée par centrifugation du mélange.

INDELICATO: Traite le fruit entier avant l'extraction du jus à l'image de la pélatrice. Les fruits sont placés sur un tapis formant des bandes d'acier inoxydables hérissées de petites pointes. Le tapis est mis en vibration et perce ainsi les glandes flavedo. Une aspersion d'eau recyclée emporte l'huile essentielle. L'huile essentielle extraite est collectée et ensuite filtrée, décantée et centrifugée. L'huile essentielle obtenue contient peu de colorants de l'écorce et peu de cires. C'est la plus proche de celle secrétée par le fruit. Cependant cette machine ne peut traiter que 2 à 4 tonnes d'oranges, de 1 à 2,2 tonnes de citrons ou bergamotes avec un rendement médiocre de 3 p.1000 environ.

1.1.2.1.2 Les procédés par distillation

1.1.2.1.2.1 L'hydrodistillation

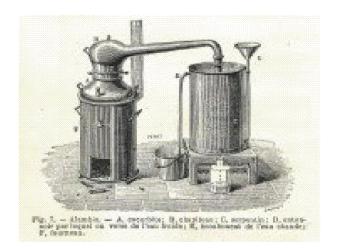


FIGURE 1.12: Dessin d'un alambic destiné à la distillation des huiles essentielles

C'est la méthode ancestrale pour l'extraction des huiles essentielles. La partie de la plante à extraire (sommités fleuries, bois, écorce) est plongée dans un bain d'eau porté à ébullition à pression atmosphérique. La quantité d'eau varie de 2 à 6 fois la quantité de végétal. La vapeur d'eau entraine les composés les plus volatiles ensuite recondensés dans le serpentin. L'huile essentielle est collectée dans un vase florentin. L'huile essentielle et la phase aqueuse n'étant pas miscibles, les deux phases sont ainsi séparées. Le contact avec l'eau en milieu acide entraine des modifications non négligeables de la composition de l'essence originelle [1, 4, 44, 45].

1.1.2.1.2.2 L'entrainement à la vapeur

La vapeur d'eau est utilisée comme moyen de transport des molécules aromatiques volatiles. elle permet en effet, à 100°C, d'extraire des molécules dont les points d'ébullition varient entre 160 et 300°C sans les dégrader. La vapeur d'eau chargée des molécules aromatiques est recueillie dans des condenseurs de manière à ce que le distillat s'écoule à 25-30°C. Ce procédé doit être maintenu assez longtemps pour extraire les molécules les plus lourdes si celles-ci ont un fort intérêt olfactif [1, 4, 44, 45].

1.1.2.1.2.3 la distillation sèche La distillation sèche est utilisée pour la séparation des produits chimiques liquides contenus dans des matériaux solides. Elle consiste à chauffer de façon modérée les plantes ou parties de plantes sans ajout d'eau ni de solvants organiques, puis à condenser les substances volatiles, cette méthide à l'avantage de se dérouler à une température inférieure à 100°C, ce qui évite la dénaturation de certaines molécules thermosensibles. Il s'agit d'une méthode d'extraction des huiles essentielles caractéristique des végétaux fragiles tels que les pétales de rose, ou de bois tel que le bois de cade (Junipérus Oxycédrus). Cette technique aboutit cependant à des rendements extrêmement faibles en huile essentielle et peu produire

des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), donc est peu utilisable en cosmétique [1, 4, 45].

1.1.2.2 Les autres types d'extraits aromatiques

1.1.2.2.1 L'hydrodistillation sous pression

Afin de traiter des matières premières pour lesquelles il est difficile d'extraire l'huile essentielle, l'hydrodistillation à pression élevée représente une bonne alternative. Cette technique est utilisée, par exemple, pour le santal, le girofle ou les rhizomes de vétyver, de gingembre et d'iris. Cependant, bien que le travail sous pression facilite l'entrainement des molécules et conduise à des économies d'énergie, une température élevée peut emmener une modification voire une altération de l'essence obtenue. D'autre part, le prix et les contraintes des équipements à mettre en oeuvre freinent développement de cette technique [4, 45].

1.1.2.2.2 La turbodistillation

La turbodistillation est un procédé d'hydrodistillation accélérée en discontinue développée en France par la société DCF-Aromaprocess. Cette technique est destinée aux matières premières végétales difficiles à traiter comme les racines, les ligneux ou les graines, comme cela est le cas pour la badiane de Chine ou les graines de céleri. Elle représente une alternative à des hydrodistillations de longue durée ou en surpression. Le réacteur contenant la matière végétale est équipé d'une turbine qui permet de déchirer des matières végétales, tout en assurant une agitation turbulente, facilitant ainsi l'extraction des composés, d'où un meilleur coefficient de transfert thermique et une augmentation de la surface de vaporisation. Egalement, la présence d'une colonne à plateaux contribue à l'enrichissement des vapeurs en huile essentielle [4, 45].

1.1.2.2.3 L'hydrodistillation par micro-ondes sous vide

Le principe de base est le même que la distillation, mais le chauffage est assuré par énergie micro-ondes. L'enceinte est sous-vide afin de réduire les températures et limiter les dégradations possibles. Le chauffage est très rapide et permet de réduire de 5 à 10 fois le temps d'extraction. Ainsi l'huile essentielle obtenue est proche de la composition originelle. De plus, en cas de traitement de matière première fraiche, l'addition d'eau n'est pas nécessaire. Ce procédé est respectueux de l'environnement car le chauffage est limité, et l'extraction est rapide.

Dans les cas de distillation, la durée d'extraction va jouer un rôle dans la composition de l'extrait, certaines molécules pouvant s'hydrater ou s'hydrolyser lors du procédé. Certains excès

énantiomériques de molécules telles que le linalol peuvent être modifiées au contact prolongé de l'eau en milieu acide.

Cependant le procédé d'entrainement à la vapeur a été développé afin de minimiser les transformations hydroliques (particulièrement les esters), car dans ce cas là, l'eau n'est pas en contact direct avec la plante. L'hydrodistillation par micro-ondes sous vide produit un extrait encore plus fidèle à celui contenu dans la plante en raison de l'absence d'eau et de la rapidité de l'extraction [1, 4, 46, 47, 45].

1.1.2.2.4 Extraction par solvant

Ce procédé permet d'obtenir des extraits appelés essences concrètes ou absolues et non plus huile essentielle. Des composés plus lourds sont extraits en parallèle des produits les plus volatiles. Une triple extraction à l'éther de pétrole est effectuée. Le solvant est ensuite évaporé pour obtenir une essence concrète. Si l'on reprend le liquide obtenu à l'alcool éthylique rectifié, l'extrait est alors appelé essence absolue. On opère à une évaporation sous vide pour enfin obtenir un liquide foncé à l'odeur puissante. Ce procédé est utilisé notamment pour la rose ou le jasmin.

Il existe également des améliorations à ce type de procédé. L'hydrodistillation-extraction simultanée et l'extraction par Soxhlet en sont les principales. L'hydrodistillation-extraction simultanée (SDE) a été décrite en 1964 pour la première fois par Lickens et Nickerson. Cette technique consiste en la rencontre de la vapeur d'eau chargée de molécules aromatiques provenants de l'hydrodistillation et des vapeurs de solvant, entraînant l'extraction des composés aromatiques de la phase aqueuse vers la phase organique. Le refroidissement de ces de phases, dans le réfrigérant, va permettre la condensation et la séparation des deux phases. La SDE est une technique actuellement très utilisée dans l'extraction de molécules aromatiques d'origines végétales Plus récemment, la SDE a été réalisée sous pression réduite, ce qui permet de réduire les phénomènes d'artéfact.

En parallèle, l'extraction par l'appareil de Soxhlet des molécules aromatiques d'origine végétale s'est également développée. Cette technique consiste à faire passer à travers la matière à traiter contenue dans une cartouche de cellulose, un flux descendant de solvant toujours neuf puisque distillé à chaque cycle. Elle a également été récemment combinée aux micro-ondes et aux ultra-sons [1, 4, 44, 45].

1.1.2.2.4.1 L'extraction par CO₂ supercritique

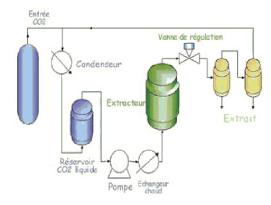


Figure 1.13: Schéma d'un extracteur à fluide supercritique [48]

Le point critique d'un corps pur est le point de pression, de température et de masse volumique tel que le corps est à l'état liquide et à l'état gazeux. Un corps réunissant ces trois conditions « critiques » de température, de pression, et de masse volumique est dit en « état critique ». Toute élévation supplémentaire de température ou de pression au-delà de sa valeur critique conduit à l'état qualifié de « supercritique » dans lequel le corps ne peut donc physiquement être ni liquide ni gazeux. Le fluide a alors la densité d'un liquide et la viscosité d'un gaz lui conférant une importante diffusibilité dans les solides et un pouvoir solvant intéressant. L'utilisation du CO₂ à de nombreux atouts : c'est un produit naturel, inerte, peu coûteux, aisément disponible, non toxique, sélectif. En effet en modifiant la pression et la température, la viscosité du fluide varie ainsi que sa sélectivité. Il est ainsi possible d'extraire et de fractionner simultanément.

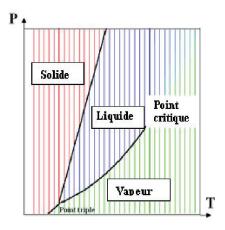


Figure 1.14: Diagramme de phase d'un corps purs

Ces fluides ont des propriétés très intéressantes pour l'extraction des huiles essentielles. Cette extraction est similaire à l'extraction par solvant, la principale différence est la température et la pression d'exécution de l'extraction. A la fin de l'extraction la pression est réduite et le CO 2 est à nouveau gazeux et l'extrait est récupéré sous forme liquide. L'extraction a lieu à haute pression (73,8 bars) et à faible température (31,1°C). L'absence d'eau et la faible température permet de respecter l'extrait autant que possible, le laissant proche de ce que produit le végétal [1-4, 44, 47].

1.1.2.2.5 Procédé d'élimination des furocoumarines

Il existe deux procédés d'extraction des furocoumarines. La première méthode consiste à mélanger l'huile pure et une solution de soude à 4 % massique puis de laisser réagir pendant quelques heures. Il se forme une espèce ionique, soluble dans la phase aqueuse résultant de l'hydrolyse basique. Le mélange obtenu est centrifugé et l'huile sans bergaptène est lavée deux à trois fois avec de l'eau afin d'éliminer l'excès de soude. Par contre une perte en masse de 10 % d'huile est observée lors de la centrifugation.

La deuxième méthode est basée sur la distillation de l'huile. En effet les furocoumarines sont des composés peu volatils et sont éliminées en vaporisant les constituants les plus volatils collectés après réfrigération. Les furocoumarines restent quant à elles dans le contenant d'origine. Après cette étape de défurocoumarinisation, on obtient une huile essentielle de citrus incolore [49].

1.2 Dégradation et oxydation des huiles essentielles

Une huile essentielle est une matrice complexe contenant un grand nombre de molécules pouvant réagir au contact avec l'air en présence de lumière [44, 49-51]. Ces réactions photocatalysées peuvent être limitées par de bonnes conditions de stockage. Cela consiste à conserver l'échantillon au frais, à l'abri de la lumière et dans un flacon adapté dont l'air de surface est remplacé par un gaz inerte. Ces conditions de stockage ne sont pas toujours aisées à respecter surtout dans le cadre d'une étude ou les échantillons sont fréquemment manipulés. Dans la littérature, des études de dégradation accélérée sont relatées afin d'avoir une connaissance approfondie des matrices étudiées et d'éviter les confusions entre dégradation et adultération. Le limonène est une molécule pouvant subir de fréquentes dégradations. De plus en raison de sa forte teneur dans les huiles essentielles de citrus, de nombreux produits résultants de son oxydation ont été observés tels que l'α-terpinéol, la carvone et ses dérivés (dihydrocarvone...), les isomères de carvéol, les oxydes de limonène, de p-mentha-1,8-dien-4-ol, de p-mentha-1(7),8-dien-2-ol ainsi que p-mentha-2.8-dien-1-ol.

La photo-oxydation du limonène produit du p-cymène et 8(9)-p-menthadiène selon la réaction suivante [53] :

FIGURE 1.15: Réactions de photo-oxydation du limonène

Le γ -terpinène peut subir le même type de dégradation et lui aussi produire du p-cymène. [44].

Le myrcène est une autre molécule très réactive. En effet ses trois doubles liaisons en font un candidat de choix à l'oxydation, menant par réaction en chaine au linalol, nérol, géraniol puis citral. De plus ses trois doubles liaisons le rendent très réactifs et une réaction de Diels-alder entrainera une polymérisation de cette molécule. Des composés tels que les aldéhydes légers et cétones sont aussi sensibles à l'oxydation, une diminution de leur teneur peut donc être observée au cours du vieillissement d'une huile essentielle. Certains sesquiterpènes tel le Germacrène sont sensibles à la chaleur et peuvent se réaranger, menant ainsi à une baisse de sa concentration initiale en cas d'exposition à la chaleur [50-52].

De nombreuses autres réactions d'oxydations se produisent mais ne sont pas détaillées ici. Une huile essentielle est un produit fragile qu'il convient de respecter en maitrisant les paramètres de conservation et en tenant compte de son instabilité si les bonnes conditions de conservation n'ont pu être respectées.

1.3 Les citrus

Les citrus regroupent les plantes des pays chauds de la famille des rutacées, dont plusieurs espèces sont cultivées pour leurs fruits aussi appelés agrumes. Ces agrumes sont appréciés pour leurs chairs juteuses, acides et parfois sucrées. La peau épaisse relargue l'huile essentielle, si elle est pliée ou pincée. La période de production commence en octobre pour l'ensemble des citrus et s'étale tout au long de l'année suivant la variété.

Les huiles essentielles d'agrumes, obtenues par expression à froid, possèdent un grand nombre de composants en commun, mais se distinguent souvent par des variations quantitatives. Ces variations quand elles ont lieu au niveau des composés à fort pouvoir olfactif expliquent en partie les différentes caractéristiques de chaque huile essentielle de citrus. Aussi il existe des molécules spécifiques pour chaque agrume lui conférant sa spécificité.

Pour chaque huile essentielle de citrus il existe plusieurs chémotypes, normés ou non par l'AFNOR. De plus des variations saisonnières peuvent exister en raison des cultivars produits à chaque époque de l'année, de la maturité du fruit et du climat [44, 54].

1.3.1 L'Orange

1.3.1.1 Le fruit

Nom botanique : Citrus Sinensis L.





FIGURE 1.16: Citrus sinensis L.

L'orange est l'un des fruits les plus consommés à travers le monde. Son origine est incertaine : pour certains elle serait une variété de l'orange amère, pour d'autres elle serait issue d'un croisement d'agrumes. Elle est supposée originaire du sud de la Chine, du nord-est de l'Inde ou peut-être de l'Asie du sud-est. On ne sait pas exactement comment elle est arrivée en Europe mais ce fut probablement grâce à des marchands italiens ou navigateurs portugais dans les années 1450-1500. Elle fut très vite valorisée pour ses propriétés médicinales. Elle fut ensuite introduite sur le continent américain par les espagnols et les français. L'orange est principalement cultivée en Asie du sud-est, Afrique du sud, Australie, dans le bassin Méditerranéen, ainsi que dans les zones subtropicales des Etats-Unis et des Caraïbes. Elle est produite en très grande quantité car très demandée pour la qualité de son jus. De ce fait c'est une huile essentielle vendue à bas prix en comparaison aux autres agrumes ce qui en fait un candidat de choix comme adultérant [54-56].

Aujourd'hui son huile essentielle est reconnue par l'aromathérapie pour ses propriétés antiseptique, légèrement calmante et sédative. Cependant elle est aussi photosensibilisante [1].

1.3.1.2 Caractéristiques de l'huile essentielle

L'huile essentielle d'orange se différencie des autres agrumes par la présence d'aldéhydes aliphatiques en plus forte quantité, ainsi que la présence de valencène et de δ -3-carène. Sa teneur en limonène varie entre 94-97 % ce qui en fait le constituant majeur [60] (norme AFNOR NF

T75-203 (sept2006)). Il existe de nombreuses variétés et d'origines géographiques, cependant la norme AFNOR ne fait pas de différence entre les chémotypes. Il existe pourtant des chémotypes, bien que peu marqués, telle que l'huile essentielle d'orange de type Valencia renfermant des teneurs plus importantes en valencène [60].

1.3.2 La Bergamote

1.3.2.1 Le fruit

Nom Botanique : Citrus aurantium L. SSP. Bergamia.



Figure 1.17: Citrus aurantium L. SSP. Bergamia

La bergamote est considérée comme une variété de l'orange amère et est originaire de Calabre en Italie où 80% de la production se situe encore aujourd'hui. Le reste de la production est situé en France (Corse) et Côte d'Ivoire. Elle est très reconnue en aromathérapie pour ses qualités anti-infectieuse, antibactérienne, antiseptique, antispasmodique, calmante et sédative mais aussi photosensibilisante [1, 55].

1.3.2.2 Caractéristiques de l'huile essentielle

L'huile essentielle de bergamote est produite de novembre à janvier. Elle est principalement extraite par les machines dites «pélatrices». Cette huile se caractérise par une quantité réduite d'hydrocarbures terpéniques en comparaison aux autres citrus et donc une faible teneur en limonène (25-45%). Les teneurs en γ-terpinène (8-11%) et β-pinène (6-12%) sont semblables à celles des huiles essentielles de citron. Par contre, elle présente de fortes teneurs en linalol (3-15%) et acétate de linalyle (20-30%) ce qui la différencie des autres citrus . Les teneurs en linalol et acétate de linalyle sont les plus variables selon la zone de production. En cours de saison le linalol tend à diminuer tandis que l'acétate de linalyle augmente. La norme différencie deux chémotypes, les types Italie et Côte d'ivoire. En effet l'origine Côte d'ivoire (à l'instar du type Corse qui n'est pas normé) possède des teneurs en linalol et acétate de linalyle en moyenne plus importantes que celles de l'huile essentielle de type Italie. (AFNOR NF ISO 3520 (février 1999), [44, 54, 57, 60, 61]).

1.3.3 Le Citron

1.3.3.1 Le fruit

Nom botanique : Citrus limon L.



FIGURE 1.18: Citrus limon L.

L'origine du citron n'est pas connue avec certitude. Certains auteurs le pensent originaire du nord-ouest de l'Inde. Il aurait été introduit dans le sud de l'Italie en 200 ap. JC et aurait été cultivé en Iraq et Egypte à partir de 700. Il aurait ensuite atteint la Sicile et la Chine. Les arabes sont à l'origine de sa dispersion dans le bassin méditerranéen tandis que les espagnols l'auraient exporté vers le continent américain. Son huile essentielle est reconnue aujourd'hui pour ses qualités anti-infectieuse, antibactérienne, antiseptique; son effet légèrement calmant; elle est aussi photosensibilisante et dermoagressive [1, 55].

1.3.3.2 Caractéristiques de l'huile essentielle

Le citron est cultivé tout au long de l'année et la composition de son huile essentielle varie légèrement au cours des saisons, principalement en raison de l'existence de cultivars spécifiques à chaque saison. Il est extrait avec des machines «Pélarice», «Sfumatrices», «Torchi» et «FMC».

Cette huile essentielle contient une quantité d'hydrocarbures terpéniques similaire à celle de l'orange. Il se distingue cependant de celle-ci par une teneur en limonène plus faible (60-68%), mais des teneurs en γ -terpinène (8-12%) et β -pinène (10-16,5%) dans des gammes comparable à l'huile essentielle de bergamote . La présence de citronnellal et de citral (Z-citral = néral et E-citral = géranial, 2-4%) donnent à l'huile essentielle ses caractéristiques olfactives particulières. Le prix de l'huile essentielle est indexé sur le « total carbonyle compounds » (citral), expliquant la forte proportion d'adultération de cette huile essentielle par ajout de citral d'origine synthétique. La somme des hydrocarbures terpéniques est stable, par contre l'huile essentielle produite en été présente une teneur en limonène plus basse impliquant des teneurs en β -pinène et sabinène plus élevées. Cette huile essentielle d'été, est aussi riche en alcools et esters mais donc pauvre en citral. C'est donc une huile essentielle de moindre qualité que celle obtenus à d'autre période de l'année. La norme AFNOR différencie les chémotypes d'origine Argentine, désertique, côtier, Italie, Espagne et Côte d'Ivoire. En effet, un citron provenant de Côte

d'Ivoire, Brésil et surtout "désertique" peut avoir des teneurs en limonène plus haute que ceux des autres origines. En contre partie les teneurs en β-pinène et γ-terpinène sont plus faibles. Il en est de même pour l'α-terpinéol, β-bisabolène, les acétates de néryle et géranyle. Le néral et géranial sont plus bas pour le désertique à l'image du citron d'été. En rechanche pour Côte d'Ivoire et Brésil la gamme de naturalité est plus étendue que celle d'Italie. La différence majeure entre les échantillons d'Espagne et d'Italie sont les teneurs du citral pouvant être plus basses pour l'origine Espagne (AFNOR NF ISO 855 (mai 2004), [44, 54, 57, 60, 62, 63]).

1.3.4 La Mandarine

1.3.4.1 Le fruit

Nom botanique: Citrus reticulata blanco var. Mandarine





Figure 1.19: Citrus reticultata blanco var. Mandarine

La mandarine est considérée comme originaire de l'Asie du sud-est. C'est un agrume originel, il n'est pas issu d'hybridation. Elle est arrivée en occident par étapes. Deux variétés de Canton ont été introduites en Angleterre en 1805 et ensuite cultivées dans le sud de l'Europe dans les années 1850. Elle est aujourd'hui principalement cultivée en Europe. Elle fut ensuite importée aux Etats-Unis par un consul italien. Il existe aujourd'hui un grand nombre de variété de mandarines, d'origines géographiques différentes, leur conférant leurs caractéristiques propres. Il existe aussi de nombreux hybrides à partir de la mandarine, inventés à des fins commerciales [56, 65-67, 70].

Aujourd'hui son huile essentielle est reconnue par l'aromathérapie pour ses propriétés légèrement antiseptique, relaxante, sédative ainsi que légèrement antispasmodique. Aussi comme tous les agrumes elle est photosensibilisante [1, 55].

1.3.4.2 Caractéristiques de l'huile essentielle

La période de production s'étale d'octobre à mars. Les mandarines sont classifiées selon la période de récolte, les mandarines vertes pour celles de début de saison, les mandarines jaunes en milieu de saison et les mandarines rouges en fin de saison. Elle est obtenue pas «Pélatrice»,

«Torchi» et «FMC» [54]. Cette huile essentielle contient une quantité d'hydrocarbures terpéniques similaire à celle de l'orange. Elle se distingue cependant de celle-ci par une teneur en limonène plus faible (65-75%) et des teneurs en β -pinène (1,2-2 %) et γ -terpinène (16-22%) plus élevées. La mandarine se différencie des autres citrus par la présence d' α -sinensal, de N-méthylanthranilate de méthyl et de thymol qui lui donne son caractère particulier [69].

La teneur en limonène augmente en cours de saison induisant une baisse des taux en α -pinène, β -pinène et γ -terpinène. Il est de même avec les alcools, N-méthyl anthranilate de méthyl et α -sinensal dont la teneur diminue en cours de saison. Bien que les huiles essentielles de mandarine soient divisées en trois catégories selon la période de récolte, la norme AFNOR ne considère que le type Italie sans distinction de maturité de fruit (verte, jaune, rouge) (AFNOR NF ISO 3528 (nov1997)) [25, 44, 53, 59, 64, 68-70].

Les types Argentine, Brésil et Espagne ne sont quant à eux pas normés. Cependant d'après Dugo et al., par rapport à celle provenant d'italie, la mandarine d'Espagne a des taux plus bas en γ -terpinène, N-méthyl-anthranilate de méthyle (NMAM), thymol et α -sinensal, mais plus haut au niveau du limonène. Les mandarines du Brésil ont un taux de limonène similaire aux mandarines rouges mais un taux de γ -terpinène plus bas. Des taux de NMAM et thymol plus élevés sont aussi observés. Les huiles provenant d'Argentine ont un taux de limonène plus haut que le type Italie, mais un taux plus faible de NMAM et γ -terpinène [54, 60, 71].

1.3.5 Le Pamplemousse

1.3.5.1 Le fruit

Nom botanique: Citrus paradisii Macf



FIGURE 1.20: Citrus paradisii Macf

Il a été décrit pour la première fois en 1750 par G. Hughes qui le dénomma le «fruit défendu» de Barbade. Il serait le fruit de l'hybridation accidentelle entre le pamplemousse vrai (ou pummelo pour les américains) Citrus grandis ou maxima probablement originaire d'Asie du sud-est et l'orange (citrus sinensis). L'orange étant parente du pamplemousse, il est alors logique de trouver de grandes similitudes dans la composition chimique de leurs huiles

essentielles. Le nom correct, mais encore peu utilisé en français, pour cette espèce est pomélo et non pamplemousse, et entraine des confusions avec le pummelo.

Ce fruit pousse dans les régions de climat subtropical. Il est principalement cultivé au sud des Etats-Unis, en Amérique centrale et aussi en Amérique du sud. Son huile essentielle est reconnue pour ses propriétés antiseptique et photosensibilisante [1, 55].

1.3.5.2 Caractéristiques de l'huile essentielle

Sa composition est très proche de celle de l'huile essentielle d'orange. Elle se différencie par sa forte teneur en nootkatone, produit d'oxydation du valencène, principal acteur de son odeur caractéristique. La présence de δ-3-carène est parfois rapportée bien que ce constituant soit principalement caractéristique de l'essence d'orange [44, 60, 65, 72, 73].

La norme AFNOR ne différencie pas les chémotypes. Cependant de nombreuses publications font état de cultivars de pamplemousse avec des faibles taux de nootkatone, voir une absence de ce composé [44, 72, 74, 75]. Par ailleurs la norme propose une gamme de naturalité très étendue pour les teneurs naturelles en nootkatone.

1.4 Les lamiacées

Les lamiacées représentent principalement des plantes herbacées, des arbustes largement répandus autour du monde et dans tout type de milieux. La forme de la fleur et la présence d'huiles essentielles, ainsi que fréquemment la section carrée de la tige et les feuilles opposées, sont caractéristique de cette famille. De nombreuses espèces de cette famille sont des plantes mellifères, fréquentées par les abeilles.

Les huiles essentielles de lavande fine ou clonal ainsi que de divers lavandin (super, abrial, grosso) sont des huiles souvent rencontrées en l'aromathérapie, parfumerie ou la cosmétique, principalement obtenus pas distillation des somités fleuries [76].

1.4.1 Lavande fine

1.4.1.1 La plante

Nom botanique: Lavandula angustifolia Mill.ssp. angustifolia





FIGURE 1.21: Lavande fine

Elle pousse de façon spontanée en Provence mais est aussi cultivée dans des régions plus septentrionales. Il existe d'autres variétés de lavandes originaires du sud de l'Europe et dans le bassin méditerranéen. Tout comme les agrumes, il en existe de nombreux cultivars chacun avec leurs caractéristiques propres, lui apportant une meilleure résistance au diverses contraintes extérieures (parasites, maladies).

Elle est fortement appréciée depuis des centaines d'années pour ses notes fraîches et herbales avec des nuances balsamiques, florales, boisées et grasses [77].

Elle est reconnue de façons ancestrales pour ses propriétés, antispasmodique, calmante, sédative, décontractante musculaire, hypotensive, anti-inflammatoire, antalgique et cicatrisante [1, 76, 78].

1.4.1.2 Caractéristiques de l'huile essentielle

Son huile essentielle est caractérisée par de fortes teneurs en linalol et acétate de linalyle mais aussi par des teneurs notables en acétate de lavandulyle, terpinène-4-ol, lavandulol et Z

et E- β -ocimènes. Sa variabilité naturelle est due notamment aux nombreux cultivars et aux conditions de distillation [60].

La norme AFNOR NF ISO 3515 (déc 2004) différencie par ailleurs les chémotypes de la lavande spontanée d'origine France avec différent clones ainsi que différentes origines géographiques telles que Russie, Bulgarie ou Australie.

1.4.2 Lavandin Super

Nom botanique: Lavandula angustifolia P. Miller x lavandula latifolia (linnaeus fils) Medikus

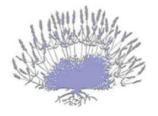


FIGURE 1.22: Lavandin

Le lavandin super a une composition très semblable à la lavande mais possède une teneur en camphre et 1,8 cinéole significativement plus importante que la lavande, ce qui lui confère une odeur caractéristique moins agréable que celle de la lavande fine. Son huile essentielle est aussi reconnue en aromathérapie pour ses qualités antispasmodique, calmante, sédative, décontractante musculaire, hypotensive, anti-inflammatoire, antalgique, cicatrisante [1, 76, 78]

.

Chapitre 2

Techniques analytiques-Etat de l'art

2.1 La chromatographie en phase gazeuse

Dans les années 40 A.J.P Martin et A.T. James, mettent au point cette technique pour la première fois. Ils eurent le prix Nobel en 1952 pour cette découverte. Les progrès qui suivirent, ont permis notamment avec l'invention des colonnes capillaires, une séparation plus fine qu'avec les colonnes remplies. Aujourd'hui le choix important de colonnes capillaires offre de nombreuses possibilités pour l'optimisation de la séparation. Les progrès informatiques ont été déterminants dans le développement de cette technologie.

Cette technique s'applique aux mélanges composés de molécules susceptibles de se vaporiser à des températures jusqu'à 250-300°C (voire plus avec des colonnes résistant aux hautes températures) sans être dégradées. L'échantillon injecté est vaporisé dans l'injecteur puis entrainé par un gaz vecteur (Hélium ou H₂ par exemple) dans la colonne chauffée selon une programmation en température adaptée pour séparer les différents constituants du mélange. Le gaz vecteur le plus souvent utilisé est l'hélium pour des raisons de sécurité. Cependant l'hydrogène a une plus grande vélocité, les pics obtenus sont donc plus fins. Les principaux détecteurs sont le détecteur à ionisation de flamme (FID) ou la spectrométrie de masse (MS) [78-80].

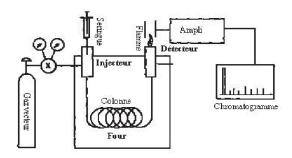


FIGURE 2.1: Schéma d'un chromatographe

2.1.1 L'injection

L'échantillon injecté à l'aide d'une seringue à travers le septum, arrive dans l'insert en verre (inerte ou non). La température d'injection est relativement élevée afin de s'assurer d'une vaporisation homogène de l'échantillon. Elle pourra être augmentée si l'on souhaite éluer les composés les plus lourds. Le gaz vecteur est introduit au niveau de l'injecteur (voir figure 2.1) à débit constant ou pression constante. Le débit est choisi par l'utilisateur, habituellement entre 1 et 2 mL/min pour des diamètres de colonne de 0,25 et 0,32 microns. La constance du débit est assurée par un régulateur électronique qui compense la pression selon la température.

Il existe deux modes principaux d'injection : split et splitless

Split : la totalité de l'échantillon n'est pas injectée. L'échantillon vaporisé est mélangé au gaz vecteur, ensuite une partie de ce mélange gazeux est introduite dans la colonne, tandis que le reste est évacué. Cela permet de ne pas nécessairement utiliser un solvant de dilution. Le taux de split est déterminé par l'utilisateur. Il existe des inserts (liner) spécifiques à ce type d'injection avec de la laine de verre, favorisant l'homogénéité de la vaporisation. Il est important de le changer régulièrement, car les substances lourdes (non vaporisées) peuvent perturber les analyses suivantes.

Splitless: La totalité de l'échantillon est injectée. La géométrie de l'insert est légèrement différente. Il n'y a pas de laine de verre, mais un resserrement en fin de liner permet de concentrer l'échantillon à l'entrée de la colonne [82].

Il existe d'autres types d'injection, tel que le mode on column, consistant à l'injection directe de l'échantillon dans la colonne sans vaporisation préalable, ce qui permet notamment d'éviter la dégradation des composés thermolabiles.

Des couplages sont également possible avec par exemple un système "headspace".

2.1.2 Les colonnes capillaires classiques

La figure 2.2 représente une coupe de colonne capillaire. Celle-ci est constituée d'un tube de silice fondue dont la paroi interne est couverte d'un polymère appelé phase stationnaire. La paroi externe est gainée d'un revêtement en polyimide grâce auquel la colonne est souple et robuste à la fois. En règle générale, la phase stationnaire est caractérisée par les fonctions chimiques greffées sur la silice, assurant ainsi la stabilité du système. Des greffages de polarités variables sont possibles afin d'obtenir différents pouvoirs séparateurs adaptables aux problématiques. Les phases usuellement rencontrées sont constituées d'alcanes, phényles, polyéthylènes glycols, ou

encore polysiloxanes. Si la phase est polaire, alors les constituants d'un mélange sont séparés principalement en fonction de leur polarité, en revanche si la phase stationnaire est apolaire, leur volatilité sera déterminante. Les composés évolueront au sein de la colonne en fonction de leurs affinités avec la phase stationnaire aux températures données. Plus un composé a des affinités avec la phase stationnaire plus son temps d'élution sera important. Aussi une augmentation de la température diminue les interactions des molécules avec la phase stationnaire, et les composés sont élués plus rapidement. Le but étant de trouver la bonne programmation en température pour avoir une séparation satisfaisante et des délais d'analyse raisonnables.

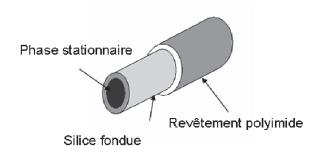


FIGURE 2.2: Représentation schématique d'une colonne capillaire.

Les temps de rétention permettent l'identification des molécules. Ils correspondent au temps nécessaire à une molécule pour parcourir la distance entre la tête de colonne et le détecteur. Or ce temps de rétention varie en fonction de l'état de la colonne (nombre de sites actifs) et de la longueur de colonne. Les indices de rétention sont calculés selon le principe mis au point par Kovats pour l'obtention d'une valeur relativement indépendant des fluctuations possibles au cours du temps. Chaque molécule a un indice de rétention correspondant à une colonne en particulier, les facteurs de rétention étant dépendant de la phase stationnaire et de la géométrie de la colonne. Ces indices sont calculés à partir d'un mélange de paraffines (C5-C30) selon le la formule suivant dans le cas d'une programmation en température linéaire :

$$I_K = 100 \left[n + \frac{t_R(x) - t_R(n)}{t_R(n-1) - t_R(n)} \right]$$

n : nombre d'atomes de carbone de la paraffine éluée avant le produit inconnu x

 $t_{R(x)}$: temps de rétention du produit inconnu x

 $t_{R(n)}$: temps de rétention de la paraffine à n atomes de carbone éluée avant le produit x

 $t_{R(n+1)}$: temps de rétention de la paraffine à n+1 atomes de carbone éluée après le produit x.

En plus des natures différentes des phases stationnaires, les colonnes capillaires ont des géométries différentes: la longueur (de 10 à 100 m), le diamètre interne (de 0,1 à 0,5 mm), l'épaisseur de la phase stationnaire (de 0,1 à 5 µm); chacun exerçant une influence déterminante sur la qualité de la séparation. L'objectif est triple : obtenir des pics chromatographiques les plus fins (grande efficacité), les mieux séparés (bonne résolution, voir figure 2.3), en un temps d'analyse minimum. La résolution peut être augmentée en allongeant la colonne, au détriment du temps d'analyse et de l'efficacité. Le débit du gaz vecteur est aussi un paramètre à optimiser pour obtenir la meilleure des séparations. Une colonne de 15 mètres suffit à séparer des mélanges simples, tandis que l'analyse d'échantillons complexes nécessite une colonne de longueur supérieure à 30 m. Plus l'épaisseur de la phase stationnaire est importante, plus il existe d'interactions entre celle-ci et les solutés, ce qui améliore la séparation chromatographique mais augmente la durée de l'élution. Une épaisseur de film importante pourra être choisie lorsque l'on souhaite séparer des composés très volatils. L'augmentation du diamètre interne permet une injection plus importante d'échantillon, mais entraine une diminution de l'efficacité (réduction du nombre de plateaux théoriques) et un temps d'analyse plus important (AFNOR NF T 75-401(mai 1985))[78-80].

Deux composés sont séparés si la résolution est supérieure à 1,5. Pour une résolution égale à 1 la séparation est incomplète (cf. figure 2.3)(AFNOR NF T 75-401(mai 1985)).

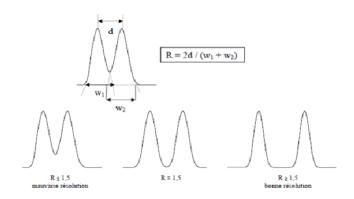


FIGURE 2.3: Notion de résolution chromatographique

2.1.3 Les colonnes de séparation chirale

Les cyclodextrines sont des produits issus de la dégradation enzymatique de l'amidon, qui produit des sucres cycliques. Les trois tailles de cyclodextrines les plus couramment utilisées sont des cycles à 6 unités de D-glucose, appelées les α -cyclodextrines, des cycles à 7 unités, appelées, les β -cyclodextrines et à 8 unités, les γ -cyclodextrines.

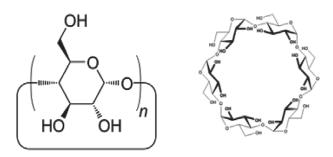


FIGURE 2.4: A gauche une cyclodextrine, à droite un motif élémentaire d'une cyclodextrine

C'est en 1978 que Harada et al. [83] présentent pour la première fois les cyclodextrines comme agent de séparation chirale. La plupart des cyclodextrines sont solides à température ambiante, et nécessite une dilution dans un polysiloxane afin de couvrir une plus grande fourchette de température. La résistance de ces colonnes est moindre que celles des colonnes greffées. Les mécanismes de fonctionnement sont encore peu connus, ce qui rend difficile les prévisions des séparations chirales. Aujourd'hui il n'existe pas de colonne universelle capable de séparer n'importe quels énantiomères. Pour augmenter l'efficacité de la séparation et la solubilité, les cyclodextrines sont dérivées. Ainsi des greffages sont effectués sur les groupements OH réactifs, le plus souvent des groupements alkyles [82-85].

2.1.4 Détecteur FID

Le détecteur à ionisation de flamme est constitué d'une flamme formée à partir de flux d'hydrogène et d'air comprimé à haute température (entre 250-280°C), dans lesquels circule un courant électrique. En sortie de colonne les composés sont conduits jusqu'au détecteur où ils sont brûlés (cf. figure 2.5). La combustion produit des ions collectés par une électrode entourant la flamme créant ainsi un courant, ensuite amplifié afin que la tension ainsi créee puisse être mesurée. Ce détecteur est très sensible (réagit à environ 2 pg de produit) et linéaire. En revanche, il est discriminant car sa réponse varie suivant les produits injectés, ce qui impose un étalonnage dans le cadre d'une analyse quantitative. Il détecte la majorité des produits organiques. Le détecteur à ionisation de flamme ne donne aucune réponse avec les composés inorganiques et des corps très simples comme H₂O, NH₃, H₂C=O[80]

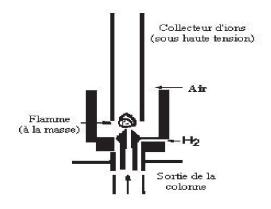


FIGURE 2.5: Schéma d'un détecteur FID

2.1.5 Détecteur MS

Le spectromètre de masse est de plus en plus utilisé comme détecteur en sortie de colonne, car il permet d'identifier les molécules analysées, grâce à l'exploitation du spectre de masse. L'ionisation électronique est le mode d'ionisation la plus utilisée. Un filament parcouru par un courant électrique (70eV) produit des électrons ensuite attirés par une anode. Ce faisceau d'électrons ionise l'échantillon. Suivant la molécule, plus ou moins de fragments sont produits, dont le rapport masse sur charge mesuré. Ceci permet l'identification des molécules. Il est assez rare de rencontrer des ions de charge supérieure à 1 avec ce type de source. Les ions sont ensuite envoyés vers un analyseur quadripolaire constitué de deux anodes et deux cathodes. Chaque cathode est électriquement reliée à l'anode qui est face à elle (cf. figure 2.6).

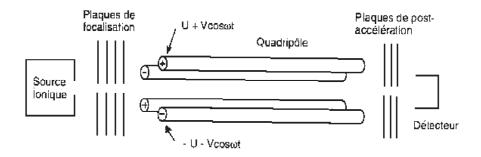


Figure 2.6: Schéma de principe d'un analyseur quadripolaire

Un champ électrique continu, additionné d'un champ électrique alternatif, sont appliqués entre les électrodes. La valeur de ces tensions permet de sélectionner les ions selon leur rapport masse sur charge. Cet analyseur est compact et peu coûteux mais de faible résolution (1 uma). Le détecteur MS peut s'utiliser selon deux modes, en SCAN, c'est-à-dire que toutes les masses dans la gamme précisée par l'utilisateur sont mesurées, ou en SIM (Selected Ion Monitoring) où seuls les ions sélectionnés sont mesurés dans des fenêtres de temps adaptées [87].

2.2 La spectrométrie de masse dédiée à la mesure isotopique

La mesure des variations isotopiques des composés naturels a commencé avec Nier et Gulbransen en 1939 [88] sur les isotopes du carbone. En 1950, Mc Kinney et al. améliorent la précision du spectromètre de Nier et introduisent la notion de déviation isotopique notée δ. Pour la plupart des éléments chimiques, il existe différents isotopes stables, possédant un numéro atomique identique (même nombre de protons dans le noyau et donc d'électrons gravitant autour), mais un nombre de neutrons différent. Cela se traduit par des masses distinctes pour les isotopes du dit élément. L'isotope dit lourd est le moins abondant et est souvent rare [85, 88].

Élément	Isotopes stables	Z	A	Abondance naturelle	
				moyenne (%)	
Hydrogène	$^{1}\mathrm{H}$	1	1	99,9844	
	$^{2}\mathrm{H}$	1	2	0,0156	
Carbone	$^{12}\mathrm{C}$	6	12	98,891	
	$^{13}\mathrm{C}$	6	13	1,108	
Oxygène	¹⁶ O	8	16	99,759	
	¹⁷ O	8	17	0,037	
	¹⁸ O	8	18	0,204	
Azote	$^{14}\mathrm{N}$	7	14	99,635	
	$^{15}\mathrm{N}$	7	15	0,365	

Table 2.1: Abondances isotopiques des principaux atomes analysés en IRMS

Les molécules existantes avec les différents isotopes sont appelées des isotopomères. Le calcul des rapports isotopiques porte sur la mesure des différents taux en isotopomères. L'occurrence d'un isotopomère contenant deux isomères minoritaires est considérée comme trop improbable et n'est donc pas prise en compte [27].

2.2.1 Le rapport isotopique

Ces isotopes lourds sont présents dans les molécules constituant les huiles essentielles à différents taux. Ce taux est lié à l'origine botanique et à l'origine géographique. Ainsi le rapport isotopique peut permettre de détecter l'ajout de produits synthétiques, ou de discriminer les différentes origines de produits naturels.

Le rapport isotopique (R) est le rapport de l'isotopomère minoritaire sur le majoritaire. Pour faciliter la comparaison entre les différentes mesures, la déviation isotopique a été introduite afin de comparer les valeurs mesurées à un standard universel :

$$\delta$$
 $^{13}\mathrm{C}{=}1000~\mathrm{x}~(\mathrm{R_{\acute{e}ch}}-\mathrm{R_{STD}})/~\mathrm{R_{STD}}$

Ce rapport est exprimé en « unités pour mille » (‰) pour avoir des valeurs plus faciles à manier [27, 85, 88, 89].

2.2.1.1 Le cas du carbone 13

Le rapport isotopique dans le cas du carbone 13 est $R = {}^{13}C/{}^{12}C$ et est noté $\delta^{13}C_{PDB}$. Un calcaire de Caroline du Sud (Pee Dee Belemnite ou PDB) CaCO₃ a été décrit par Craig en 1957 comme standard international. Il a la particularité de dégager du CO₂ par attaque acide. Aujourd'hui ce standard n'existe plus, de nouvelles matières de références (polymère) préparées par le National Bureau of Standard (NIST) sont utilisées. Les valeurs mesurées sont converties en échelle PDB avec la formule suivante [27, 85, 89] :

$$\delta^{13}C_{\text{\'ech/PDB}} = \delta^{13}C_{\text{\'ech/ref}} + \delta^{13}C_{\text{ref/PDB}} + (\delta^{13}C_{\text{\'ech/ref}} * \delta^{13}C_{\text{ref/PDB}})/1000$$

Avec:

- δ $^{13}\mathrm{C}_{\mathrm{\acute{e}ch/PDB}}$: la déviation isotopique de l'échantillon par rapport au standard PDB
- $\delta^{13}C_{\rm \acute{e}ch/ref}$: la déviation isotopique de l'échantillon par rapport à la matière de référence
- $\delta^{13}C_{ref/PDB}$: la déviation isotopique de la matière de référence par rapport au standard PDB

Élément	Molécule	Désignation	Origine	A* (ppm)	R** (ppm)
	de				
	référence				
Carbone	CaCO ₃	PDB (Pee Dee	Calcaire de la	11123,3	$11237,2 (\pm 2,9)$
		Belemnite)	Caroline du Sud		
			(USA)		

Table 2.2: Références internationales utilisées pour l'analyse isotopique du ¹³C

^{* :} abondance isotopique en ppm.

^{** :} rapport isotopique en ppm.

2.2.1.2 Le cas du deutérium

Le rapport isotopique dans le cas de l'hydrogène est $R = {}^2H/{}^1H$ et est noté $\delta^2H_{V\text{-SMOW}}$. Le tableau 2.3 donne la référence internationale utilisée en analyse isotopique pour l'élément hydrogène. Le principe de mesure est identique à celui du carbone [27, 89].

Élément	Molécule	Désignation	Origine	A* (ppm)	R** (ppm)
	de				
	référence				
Hydrogène	H2O	V.SMOW	Mélange d'eaux	155,74	$155,76 \ (\pm 0,05)$
		(Vienna	océaniques		
		Standard Mean			
		Ocean Water)			

Table 2.3: Références internationales utilisées pour l'analyse isotopique du 2D

2.2.1.3 Le cas de l'azote

Le rapport isotopique dans le cas de l'hydrogène est $R = {}^{15}N/{}^{14}N$ et est noté $\delta^{15}N_{air}$. Le tableau 2.4 donne la référence internationale utilisée en analyse isotopique pour l'élément azote. Le principe de mesure est identique à celui du carbone [27, 85, 89].

Élément	Molécule	Désignation	Origine	A* (ppm)	R** (ppm)
	de				
	référence				
Azote	N_2	Gaz azote	Azote	3663	3676,5 (±8,1)
			atmosphérique		

Table 2.4: Références internationales utilisées pour l'analyse isotopique du ¹⁵N

2.2.2 Appareillage

2.2.2.1 L'analyse du carbone 13

L'appareil est constitué d'un spectromètre de masse entièrement dédié à la mesure isotopique, couplé à un four permettant la transformation du carbone organique en CO₂, et un

^{* :} abondance isotopique en ppm.

^{** :} rapport isotopique en ppm.

^{* :} abondance isotopique en ppm

^{** :} rapport isotopique en ppm.

chromatographe en phase gazeuse permettant la séparation préalable des molécules. Ce couplage permet de cibler les molécules dont on souhaite connaître le rapport isotopique.

L'analyse des rapports isotopiques nécessite que l'échantillon soit transformé en gaz de pyrolyse ou de combustion tout en conservant son empreinte isotopique. La comparaison avec du dioxyde de carbone dont la valeur isotopique est connue, utilisée comme référence, permet l'obtention du rapport isotopique de l'échantillon.

Les déviations isotopiques des standards sont mesurées avec un analyseur avec lequel la totalité de l'échantillon est brûlée, puis le CO_2 dégagé est entrainé dans le spectre de masse pour la mesure des masses 45, 44 et 46 :

```
masse 44 de {}^{12}C^{16}O^{16}O
masse 45 de {}^{13}C^{16}O^{16}O et {}^{12}C^{17}O^{16}O
masse 46 de {}^{12}C^{18}O^{16}O ou {}^{13}C^{17}O^{16}O (improbable)
```

L'appareil mesure le rapport masse 45/44. Deux isotopomères possèdent la masse 45, dont un ne contenant pas de ¹³C. Il est donc nécessaire de corriger le rapport 44/45 afin d'obtenir la valeur du rapport ¹³C/¹²C. Celle-ci est effectuée en utilisant la mesure de la masse 46 qui permet d'obtenir la quantité d' ¹⁸O. La relation entre les teneurs en ¹⁷O et ¹⁸O est connue ainsi le taux de l'isotopomère ¹²C¹⁷O¹⁶O est calculer. Ainsi la masse 45 obtenue est corrigée pour n'avoir plus que le taux de ¹³C¹⁶O¹⁶O.

Les formules de corrections utilisées sont les formules démontrées par Craig [89, 90] :

$$\delta$$
 $^{13}C=1.067^*$ δ (% masse 45 $/$ % masse 44) -0.0338 δ ^{18}O et δ $^{18}O=1.0010^*$ δ (% masse 46 $/$ % masse 44) -0.00021 δ ^{13}C

Ce type d'analyseur est intéressant lorsqu'une seule molécule est analysée ou que la déviation isotopique totale de l'échantillon est recherchée. Dans le cadre de la recherche de l'adultération d'une huile essentielle, ce sont les déviations isotopiques de composés cibles (caractéristiques olfactives de l'huile) qui sont recherchées, afin d'affiner la discrimination entre échantillons naturels et fraudés. Ainsi l'analyseur IRMS est couplé à la chromatographie en phase gazeuse. Cette méthode met en œuvre le couplage d'un passeur d'échantillons 7683 Agilent technologie, d'une interface de combustion ou de et d'un spectromètre de masse des rapports isotopiques IRMS ISOPRIME GV instrument-Elementar (Manchester, UK- Hanau, Allemagne). Il se présente ainsi :

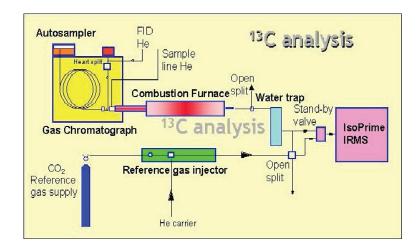


FIGURE 2.7: Schéma de l'appareillage d'analyse isotopique ¹³C/¹²C d'Isoprime

Avant d'être brulée puis analysée par le spectromètre de masse, chaque molécule constituant l'échantillon est séparée grâce à la chromatographie gazeuse. La colonne choisie est adaptée pour avoir la meilleure séparation. La résolution entre deux molécules doit impérativement être supérieure à 1,5, car une coélution peut considérablement fausser un résultat. La méthode est développée afin que les pics soient situés sur un plateau de température et les paramètres (débit, rampe) sont optimisés. De cette manière les pics obtenus sont le plus gaussien possible afin d'obtenir des résultats, exacts, justes et reproductibles.

L'échantillon, une fois injecté dans la colonne est soit dirigé vers le détecteur FID, soit vers le détecteur IRMS, grâce à la vanne heartsplit. Seule la partie d'intérêt est envoyée vers ce second détecteur. Cette fraction subit d'abord une combustion dans un four à 850 °C constitué d'un tube en quartz rempli d'oxyde de cuivre, les entités suivantes sont ainsi générées : C, O et H en CO₂ et H₂O.

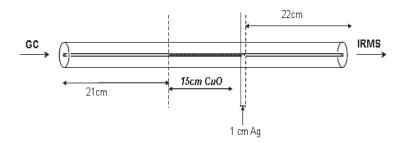


Figure 2.8: Schéma d'un tube à combustion

Après le remplissage d'oxyde cuivre, dans la seconde partie du tube à combustion, se trouve de la laine d'argent (Ag) afin de piéger le soufre (S) et les halogènes (X_2) . L'argent est oxydé

en oxyde d'argent (I) avant de réagir avec les halogènes et le soufre. La réaction chimique mise en œuvre avec les halogènes est :

$$X_2 + Ag_2O \rightarrow 2 AgX + 1/2 O_2$$

S'il y a du soufre présent dans l'échantillon, il est alors transformé lors de la combustion après passage sur l'oxyde de cuivre en SO_3 ensuite piégé sur de la laine d'argent oxydée suivant la réaction chimique :

$$SO_3 + Ag_2O \rightarrow Ag_2SO_4$$

L'eau créée par la réaction d'oxydation doit être éliminée avant l'entrée dans la source d'ion car elle se combine avec le $\rm CO_2$ et produit du $\rm HCO^{2+}$ (réaction de protonisation). L'ion $\rm HCO^{2+}$ a une masse m/z de 45 et interfère donc avec l'analyse isotopique de masse 45 de $\rm ^{13}C^{16}O_2$. Pour ce faire un tube de NafionTM est utilisé pour enlever l'eau issue de la combustion. L'eau est ainsi captée par la membrane tandis que le $\rm CO_2$ poursuit sa route vers le détecteur.

L'intégration des pics sur les chromatogrammes des masses 44, 45, 46 permet d'obtenir la valeur isotopique en carbone 13 (δ ¹³C) des molécules ciblées [89, 91, 92].

2.2.2.2 L'analyse du deutérium

La configuration de l'appareillage est similaire à celle utilisée pour la mesure isotopique du ¹³C, mais dans ce cas, l'analyseur est équipé d'un tube à pyrolyse permettant la transformation de l'hydrogène organique en H₂.

Les molécules désirées sont ainsi minéralisées à 1050 °C dans un tube garni de chrome transformant l'hydrogène des molécules en gaz H_2 . Elles sont ensuite introduites dans le spectromètre isotopique pour la mesure des rapports ${}^1H^2D/{}^1H^1H$ de masse 3/2. L'appareillage est identique à celui décrit dans la section 2.2.2.1 avec un tube à pyrolyse GC5MK1 GV instrument.

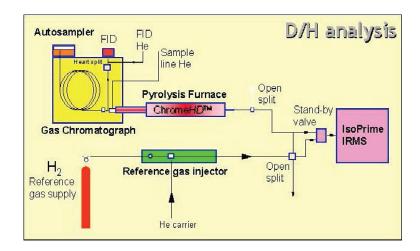


Figure 2.9: Schéma de l'appareillage d'analyse isotopique D/H d'Isoprime

Les composés après élution chromatographique sont entraînés vers le tube à pyrolyse par le biais du gaz vecteur hélium. Puis, l'hydrogène contenu dans les composés à analyser est transformé en H_2 et HD dans le tube de pyrolyse à $1050\,^{\circ}$ C rempli par un catalyseur, le chrome (Cr). Le tube est en quartz et mesure 60 cm avec un diamètre externe de 6 mm et un diamètre interne de $0.9\,$ mm+/- $0.2\,$ mm.

Le tube de chrome est constitué de la manière suivante :

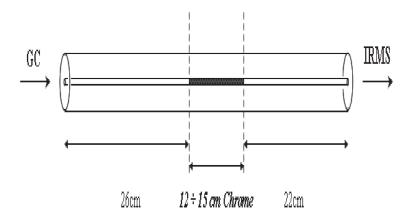


Figure 2.10: Schéma d'un tube à pyrolyse

La réaction mise en jeu est la suivante :

$$C_x H_y O_x \xrightarrow{C_x,1050^{\circ} C} xC + \frac{y}{2} H_2 + \frac{z}{2} O_2$$

L'oxygène formé réagit avec le chrome pour donner l'oxyde de chrome (III) Cr_2O_3 :

$$2Cr + \frac{3}{2}O_2 \xrightarrow{1050^{\circ}C} Cr_2O_3$$

Le chrome est choisi comme catalyseur pour la conversion du composé en hydrogène dans le tube de pyrolyse car il n'est pas sensible aux effets de mémoire et piège directement d'autres éléments pouvant perturber l'analyse, tels que les halogènes, le soufre, le silicium, le bore, le carbone, l'azote et l'oxygène.

Des ions H^{3+} sont générés lors de l'analyse, leur masse est identique à celle de HD^+ . Un facteur de correction est alors nécessaire. Les ions H^{3+} sont générés par impact entre les ions H^{2+} et les molécules de H_2 . La probabilité d'impact est proportionnelle à la pression partielle d'hydrogène. La vitesse de génération des H^{3+} est proportionnelle au carré de la pression partielle d'hydrogène et la vitesse de génération des ions H_2^+ et HD^+ formés par impact électronique, est directement proportionnelle à la pression partielle d'hydrogène. Le rapport $\mathrm{i}_3/\mathrm{i}_2$ des courants ioniques ainsi créés, pour les nombres de masse 3 et 2 respectivement, est par conséquent composé de deux termes :

- Le premier terme : $\frac{i_{(HD^+)}}{i_{(H2)}}$ qui est indépendant de la pression
- le second terme : $\frac{i_{(H_3^+)}}{i_{(H2)}}$ qui est proportionnel à la pression

Pour le rapport des courants ioniques la relation suivante est appliquée :

$$\frac{i_{(3)}}{i_{(2)}} = \frac{i_{(HD^+)} + i_{(H_3+)}}{i_{(H_2)}} = \frac{i_{(HD+)} + f_{H_3} + *i_{(H_2)}^2}{i_{(H_2)}} = \frac{i_{(HD^+)}}{i_{(H_2)}} + f_{H_3^+} + *i_{(H_2)}$$

Le facteur $f_{H^{3+}}(ppm)$ est déterminé expérimentalement à partir de la dépendance à la pression du rapport i_3/i_2 .

Il faut optimiser tous les paramètres de l'appareillage pour que le soit inférieur à 10 ppm pour un signal entre 2 nA et 14 nA [89].

2.2.2.3 L'analyse de l'azote

L'appareillage est dans un premier temps identique à celui utilisé pour la mesure du carbone 13. A la suite du tube à combustion a été ajouté un tube à réduction permettant de transformer les atomes d'azote présents dans les molécules analysées en diazote à 600 °C.

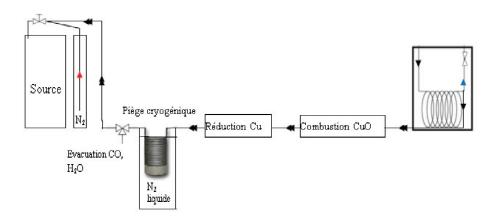


Figure 2.11: Schéma de l'appareillage d'analyse isotopique ¹⁵N/¹⁴N adapté sur l'appareil isoprime

L'analyseur de l'appareil mesure les masses 28, 29 et 30 correspondant à $^{14}N^{14}N$ et $^{15}N^{14}N$ ainsi que $^{12}C^{16}O$. Le tube à combustion est identique à celui décrit dans la section 2.2.2.1. Après passage dans le tube à combustion, le mélange gazeux est dirigé vers le tube à réduction où le NO_2 est réduit en N_2 détectable par l'appareil.

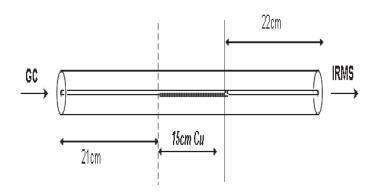


Figure 2.12: Schéma d'un tube à réduction

Le cryo-piège bloque l' $\rm H_2O$ et le $\rm CO_2$ issu de la combustion. Ils sont ensuite évacués sous flux d'hélium à température élevée, source fermée. La température relativement faible de 600 °C du tube à réduction permet d'éviter la réduction du $\rm CO_2$ en CO de masse 28, ce qui perturberait l'analyse.

Lorsque le taux d'azote 15 est faible, l'analyse peux être perturbée par la présence de NO de masse 30. Deux formules de calcul ont alors été développées, l'une pour les molécules à fort taux d'azote 15 [89] :

- ¹⁵N Atome % = ((R₂₉+ 2R₃₀) / 2(1+R₂₉+R₃₀))*100 et l'autre pour les faibles taux d'azote 15 (moins de 5%)
- ¹⁵N Atome % = (R₂₉/(2+R₂₉))*100
- Avec R29 = % masse 29 / % masse 28 et R30 = % masse 30 / % masse 28

2.2.2.4 Montages

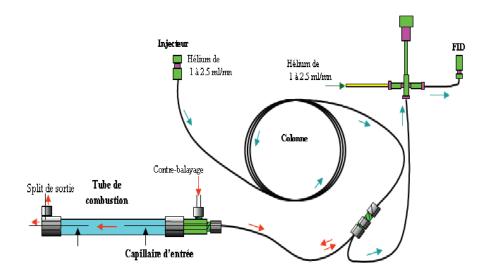


FIGURE 2.13: Montage pour l'analyse du ¹³C (tube à combustion), lorsque les composés sont envoyés vers le détecteur FID

Quand le solvant est totalement élué, la vanne est fermée (second temps), permettant aux composés volatils d'être entraînés vers le tube de pyrolyse. Les débits d'hélium s'ajoutent et permettent à ces composés de traverser le tube de pyrolyse.

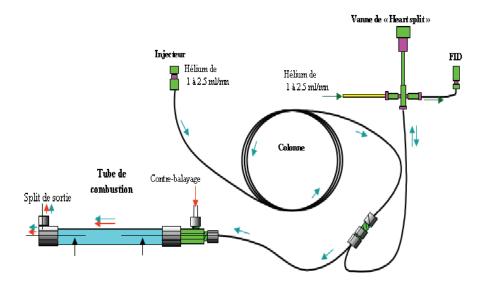


FIGURE 2.14: Montage pour l'analyse du ¹³C (tube à combustion), lorsque les composés sont envoyés vers le détecteur de masse

Pour cela, le système utilise une vanne « heartsplit » (backflush) contrôlée par ordinateur. Dans un premier temps (flèches bleues sur schéma 2), à l'injection, la vanne « heartsplit »

est ouverte, permettant ainsi l'évacuation du solvant vers le détecteur à ionisation de flamme (FID), le débit de contre-balayage (4 à 5 ml/mn) permet pendant ce temps d'alimenter le tube à pyrolyse et d'empêcher l'arrivée de gaz dans le tube [89].

2.2.2.5 La détection

Les molécules gazeuses H₂ provenant du four à pyrolyse ou combustion sont introduites dans la chambre d'ionisation (source) de l'IRMS qui est sous vide secondaire. Les molécules sont alors ionisées positivement par impact électronique. Les ions ainsi formés, de masse M et de charge Z, sont ensuite accélérés par un courant de haute tension V puis soumises à un champ électromagnétique uniforme. Dans ces conditions, les ions sont déviés et leur trajectoire peut-être décrite par l'équation mathématique d'une orbite circulaire de rayon R selon la formule suivante :

D\penalty \@M :/Aude/Mes documents/comm-loreal/thèse/images/R.bmp

En IRMS, B et V sont constants durant l'analyse. Par conséquent, les rayons de courbure caractéristiques M/Z resteront inchangés. A chaque gaz analysé correspond une valeur de champ magnétique. Cette déviation permet la séparation des ions en faisceaux correspondant aux masses des gaz mesurées. Ces faisceaux sont collectés par des cages de Faraday (cf. figure 2.15) donnant un signal électrique qui est ensuite amplifié. L'intensité du courant amplifié est proportionnelle à la quantité d'ions. Les 3 cages de faraday ont des largeurs différentes afin de pouvoir collecter les différents faisceaux (ex : CO₂ et N₂), donc avec une déviation différente, dans les même collecteurs. La cage axiale collectant le faisceau mineur 1 permet une meilleure résolution car les faisceaux observent des déviations plus proches selon la masse (non pas coïncidents comme représenté sur la figure 2.15), en raison de sa position axiale.

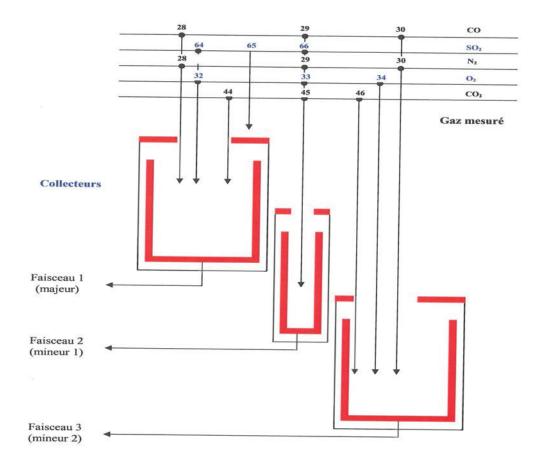


FIGURE 2.15: Collecteur universel et la collecte des espèces isotopiques coïncidentes

L'analyse de l'hydrogène nécessite une cage de faraday supplémentaire pour l'analyse des ions de masse 2, les ions de masse 3 étant collectés dans le mineur 2. Le gaz vecteur He possède un isotope stable mineur de masse 4 qui peut être ionisé en ⁴He⁺. La résolution entre ces deux faisceaux n'est pas optimale si l'analyse est effectuée en flux continu. En raison de la faible énergie de cet ion, un filtre électrostatique permet de rejeter les ions ⁴He⁺ qui ont perdu leur énergie par collision avant d'arriver au collecteur (queue du faisceau). Cette filtration permet d'obtenir des faisceaux résolus et une analyse sans interférence [89].

2.3 Analyse thermogravimétrique

C'est une méthode qui appartient à l'ensemble des analyses thermiques définies par Mackensie en 1979 comme étant « un ensemble de techniques dans lesquelles une propriété physique d'une substance est mesurée en fonction de la température lorsque cette substance est soumise à un programme contrôlé en température » [93]. L'analyse thermogravimétrique consiste à mesurer la masse d'un échantillon en fonction de la température. Ainsi il est possible de connaître son comportement face aux variations de température. L'analyse peut être effectuée sous air, si des interactions avec l'oxygène sont observées ou alors sous atmosphère inerte afin de n'étudier que la perte de masse due au chauffage [93, 94]. Une méthode spécialement dédiée à l'analyse des huiles essentielles a été mises au point dans le laboratoire d'analyse thermique au SCA.

2.4 Spectrométrie de réflexion dans le proche infrarouge

C'est une méthode très utilisée dans l'industrie agroalimentaire car extrêmement rapide et facile à mettre en œuvre. Cette méthode s'appuie sur la théorie quantique qui montre qu'une molécule est capable d'absorber de l'énergie lumineuse. L'appareil envoie un rayon lumineux polychromatique dans le proche infrarouge et le rayon lumineux réfléchi est d'intensité moindre du fait de l'absorption des molécules présentes dans l'échantillon. L'absorption est différente selon la longueur d'onde, car chaque molécule absorbe l'intensité lumineuse à des longueurs d'onde spécifiques selon la théorie quantique. L'énergie du rayon transmis est ensuite transformée en courant électrique puis mesurée et un spectre infrarouge est obtenu.

Cette technique présente cependant plusieurs désavantages. L'interprétation des spectres est difficilement poussée, car un mélange de composés a de nombreuses bandes d'absorption qui se superposent. On obtient donc une « empreinte » de l'échantillon, mais aucune interprétation au niveau moléculaire n'est possible, bien que dans certain cas l'analyse quantitative de molécule soit réalisable. Aussi des échantillons semblables (ex : semoules de blé durs d'origines variées) donnent des spectres dont les différences ne sont pas forcément visibles à l'œil nu. Les résultats doivent être exploités par analyse statistique des spectres [95].

2.5 Les technologies émergentes

Les progrès techniques incessants permettent l'amélioration continue des technologies préexistantes. Nous n'avons testé ces méthodes lors de cette étude, mais il nous apparait important d'en décrire rapidement un certain nombre.

2.5.1 Le nouvelles phases stationnaires

Les colonnes polaires et apolaires utilisées pour l'analyse des huiles essentielles ont montré à maintes reprises leurs limites. En effet, en raison du nombre important de composés présents dans ce type d'extrait, de nombreuses coélutions subsistent. Le développement de phases sationnaires constituées de liquides ioniques a permis une amélioration de la résolutions dans certains cas. Ces phase sont généralement des cations organiques contenant N⁻ ou P⁻, contrebalancés par un anion organique ou inorganique. Ce type de phase à une polarité similaire au polyéthy-lène glycol, mais avec une meilleure résistance thermique. Des composés tels le limonène et 1,8 cinéole sont résolus sur colonne à liquide ionique [96].

2.5.2 "Fast" and "very fast" chromatographie gazeuse

Le développement de ces techiques a permis de réduire considérablement les temps d'analyse. En effet, les colonnes microbores, de diamètres interne et d'épaisseur de film réduits (de 10 mm x 10 mm à 0,1 mm x 0,1 mm), ont une efficacité augmentée (nombre de plateaux théoriques augmenté). Ainsi, le débit du gaz vecteur et la rampe de température peuvent être augmentées sans affecter la séparation. L'hydrogène est privilégié comme gaz vecteur en raison de sa grande vélocité.

Ces techniques permettent l'injection de moindre quantité d'échantillon et d'obtenir des résultats similaires à la GC conventionnelle, 30 fois plus vite. La légère perte en sensibilité est largement compensée par les avantages résultants de l'analyse "fast" et "very fast" GC.

L'adaptation possible de spectromètres de masse hautes résolutions en fin de colonnes microbores en fait un outil puissant dans le contrôle qualité des huiles essentielles [96].

2.5.3 Chromatographie gazeuse-olfactométrie

Cette technique est basée sur la chromatographie gazeuse conventionnelle, mais utilisant le nez humain comme détecteur. Cela permet notamment d'évaluer l'impact aromatique d'une molécule. Son utilisation est également reconnue pour contribuer à l'évaluation de la qualité d'une huile essentielle, le nez humain étant généralement plus sensible que les détecteurs conventionnels.

2.5.4 Chromatographie gazeuse multidimensionnelle

Le couplage de deux colonnes chromatographiques de sélectivité différentes, insérées dans des fours distincts, permet d'augmenter la capicité de pic en comparaison à la GC unidimensionnelle. Ainsi le nombre de coélution est minimisé et un maximum de composés peuvent être identifiés. Cette technique est actuellement limitée par le manque de banque de données en 2 dimensions. Cependant le couplage avec un spectromètre de masse peut permettre de palier ce défaut.

Il existe deux types d'analyse en GC multidimensionnelle, La première est l'"heart cutting" consistant à injecter une fraction donnée afin d'en améliorer la résolution. Cette technique est également utilisée en analyse chirale, la première colonne effectuant le fractionnement, la deuxième, l'analyse chirale. Le risque de coélution est ainsi très limité. La deuxième appelée "comprehensive", ou l'ensemble des composés est envoyé sur une seconde colonne, améliorant ainsi la séparation [96].

2.5.5 La chromatographie planaire haute performance

La chromatographie sur couche mince n'est pas une technique récente, cependant elle a connu de nombreuses évolutions technologiques, laissant penser aujourd'hui que cette technique à un avenir dans le contrôle de la naturalité des huiles essentielles. En effet les phases stationnaires ont une granulométrie plus fine (de 5 à 6 µm environ), ce qui a permis une nette amélioration de la performance analytique. De plus de nombreux types de phases stationnaires ont été développées, ainsi que des automates pour la déposition d'échantillons et la détection des composés après séparation. Il existe également des phases stationnaires chirales, permettant la séparation rapide d'énantiomères.

De la même manière, l'automatisation a permis de développer l'HPTLC multidimensionnelle, permettant d'appliquer des phases mobiles de différentes polarités, afin d'améliorer la séparation.

Des évolutions plus récentes des phases sationnaires à particules sphériques, ainsi que d'autres de porosité et d'épaisseur de phase plus faibles permettent une dispersion réduite des solutés et une amélioration de la résolution.

Enfin le développement de couplage avec la spectrométrie de masse, IR ou encore RAMAN, augmente significativement l'intérêt de cette technique.

Actuellement l'HPTLC est notamment utilisée pour la détection d'huile végétale dans les huiles essentielles [97].

2.6 L'outil statistique et d'aide à la décision

2.6.1 Analyse de Clusters (classification)

Cette méthode a pour but de créer un certain nombre de classes regroupant les individus les plus proches. A chaque étape, on recherche les deux classes les plus proches pour n'en faire plus qu'une et ainsi de suite jusqu'à n'obtenir qu'une grande classe regroupant tous les individus. Le dendrogramme ci-dessous détaille ce processus.

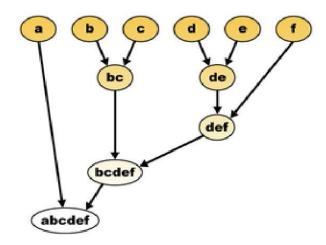


FIGURE 2.16: Dendrogramme

Le nombre de classes souhaitées comportant les individus les plus proches est choisi (exemple 3 classes : a, bc et def), selon des critères connus sur les individus (provenance, type, âges...).

Il existe différents algorithmes de calcul des distances entre les échantillons pour déterminer les classes. On peut considérer, comme en ACP, que chaque critère a la même importance. Dans ce cas, la distance utilisée est la distance euclidienne :

$$d(X,Y) = \sqrt{\sum_{i=1}^{n} (y_i - x_i)^2}$$

D'autres algorithmes, basés sur des distances autres que la distance euclidienne, permettent de calculer la similarité entre deux individus et peuvent être mieux adaptés à la problématique étudiée. Leur utilisation peut conduire à des classes différentes de celles observées sur la représentation graphique de l'ACP [95-97].

2.6.2 Analyse automatique de classement non hiérarchique : analyse discriminante

A l'inverse de la technique précédente, les groupes sont prédéterminés en fonction des connaissances sur les échantillons. Un modèle est construit de telle façon que chaque échantillon soit plus proche du centre de gravité de son groupe que de celui des groupes voisins. Ce modèle permet d'affecter chaque échantillon à un groupe sur la base de distances. Si chaque échantillon est bien classé, le modèle peut alors être validé. Dans ce cas, le modèle pourra être utilisé pour prédire l'appartenance d'un échantillon inconnu à un groupe à partir du calcul de sa distance à chacun des groupes. Plus celle-ci sera faible, plus l'échantillon aura de probabilité d'appartenir

à une classe donnée. Différents algorithmes permettent de calculer la distance. Dans cette étude la distance euclidienne sera utilisée.

Ce type d'analyse est très intéressant. Cependant il ne s'agit plus d'analyse statistique descriptive car les groupes sont prédéfinis par l'opérateur. C'est pourquoi, pour construire un modèle robuste, il est nécessaire d'avoir des informations de départ fiables, au risque d'arriver à des conclusions erronées [95-97].

2.6.3 Analyse de données multidimensionnelles

L'objectif de l'analyse multivariée est d'étudier les inter-relations entre plusieurs variables figurant dans une base de données et, si possible, d'en généraliser les conclusions à l'aide d'informations statistiques. L'analyse multivariée réunit un grand nombre de méthodes, souvent complexes qui tentent de donner une image simplifiée des multiples relations entre les variables. On distingue deux grands goupes d'outils d'analyse de données : les méthodes descriptives qui permettent de représenter l'information entre les individus (similarité, dissimilarité...) comme l'Analyse en Composantes Principales ou la classification, et les méthodes explicatives qui cherchent à construire un modèle pour expliquer une ou plusieurs réponses (propriétés) à partir de variables explicatives comme la régression linéaire multiple et les méthodes PLS. Ces dernières sont très utilisées en sciences analytiques pour l'étalonnage de méthodes spectroscopiques.

2.6.3.1 Analyse en composante principale

L'analyse en composante principale (ACP) est une analyse statistique descriptive qui a pour but de réduire en dimension un tableau de données. Elle propose à partir d'un nombre important de paramètres initiaux de réaliser une projection des individus (points, échantillons, expériences, spectres, ...) dans un espace réduit à 2 ou 3 dimensions appelées composantes principales. L'ACP permet ainsi d'obtenir une représentation graphique interprétable des relations entre individus : similitudes entre échantillons, échantillons atypiques, description des corrélations entre les différents paramètres ainsi représentés.

En pratique l'ACP consiste en la transformation de m variables quantitatives plus ou moins corrélées entre elles, en m nouvelles variables quantitatives non corrélées nommées composantes principales. Le but est ensuite de ne conserver qu'un nombre minimum pertinent k de ces composantes exprimant le maximum de variations à l'intérieur de la population étudiée.

La matrice de données X est la suivante :

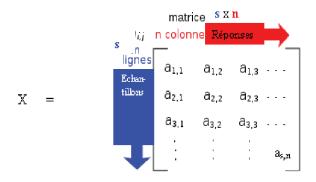


Figure 2.17: Matrice de données s x n

Afin de pouvoir traiter des données possédant des ordres de grandeur très différents selon leur origine, les éléments de la matrice initiale peuvent être transformés en variables centrées réduites :

- Le centrage consiste à remplacer les valeurs d'une colonne (représentant un facteur donné)
 par leur écart à la moyenne
- La réduction consiste à diviser par l'écart-type de la colonne les valeurs obtenues précédemment. Ce type de traitement permet d'obtenir une matrice en variables centrées réduites

A partir de la matrice \mathbf{X} de départ (les données centrées-réduites), on construit la matrice \mathbf{M} de corrélation :

$$M = 1/n$$
 (X'/X) avec X' transposée de X.

La matrice \mathbf{M} est ensuite diagonalisée pour obtenir la matrice diagonale \mathbf{D} des valeurs propres et la matrice \mathbf{P} des vecteurs propres avec $D = P^{-1} M P$ (cf. figure 2.18).

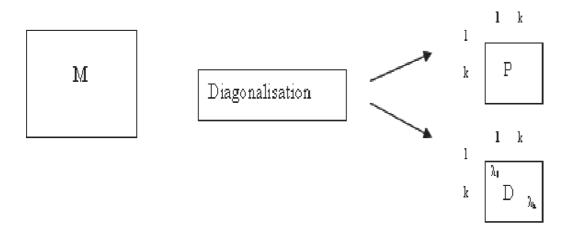


FIGURE 2.18: Calcul matriciel de l'ACP

avec $D = P^{-1} M P$

Les vecteurs colonnes de la matrice P contiennent les coefficients des combinaisons linéaires des variables de départ qui conduisent aux nouvelles variables appelées axes factoriels ou composantes principales. L'information contenue sur un axe factoriel i est fonction de la valeur propre λ_i ; on définit le % de variance ou inertie apportée par cet axe par : $\lambda_i/\sum \lambda_i$. Selon le pourcentage d'information désirée, on ne retiendra que k axes principaux. Une représentation graphique est alors réalisable dans un espace à k dimensions tout en connaissant le pourcentage de l'information conservée sur chaque axe. Par exemple 60 % des variations sont expliquées par l'axe 1 et 30 % par l'axe 2, soit 90 % pour le plan axe1-axe2, le pourcentage restant (10 %) décrit ainsi les variations non visibles sur le graphe qui sont en quelque sorte de l'information perdue.

Lorsque la valeur propre est proche de zéro, la composante associée ne présente plus d'intérêt car ne présente plus de variance. L'information étudiée risque alors d'être redondante et l'analyse polluée par un bruit de fond trop important. Dans cette étude, nous nous limiterons souvent à trois composantes qui seront suffisantes pour étudier la discrimination de la fraude.

2.6.3.2 La régression des moindres carrés partiels (Partial Least Square regression PLS)

La régression linéaire multiple relie plusieurs paramètres (descripteurs) regroupés dans la matrice X à leurs réponses analytiques constituant la matrice Y et dépendant de plusieurs de ces paramètres simultanément. L'équation associée s'écrit Y = XA + B où A est la matrice des coefficients de régression reliant X à Y et B la matrice de bruit aléatoire.

Si les variables le permettent on peut utiliser directement la Régression Linéaire Multiple (RLM) avec la méthode des moindres carrés. Par contre, lorsque le nombre de variables est im-

portant et que ces variables sont plus ou moins corrélées entre elles, ou bien lorsque le nombre d'échantillons est inférieur au nombre de descripteurs, on peut utiliser la méthode des moindres carrés partiels (PLS) pour effectuer la régression entre réponse(s) et descripteurs.

L'algorithme de cette régression dérive en partie de celui de l'ACP, dans la mesure où pour schématiser, il s'agit de réaliser une double décomposition en composantes principales sur X (matrice des descripteurs) et sur Y (matrice des réponses) [95-97].

2.6.3.3 Partial Least square – Discriminante Analysis (PLS-DA)

Le même algorithme est utilisé, cependant la matrice Y est à deux modalités (voire plus), c'est-à-dire que les observations de la matrice Y appartiennent au moins à deux catégories différentes déterminées au préalable (ex : échantillons fraudés et échantillons de référence). En cas de Y bimodale, la matrice sera entièrement constituée de 1 et de 0 identifiant chaque groupe. Cette méthode permet ainsi de déterminer l'importance des variables dans la séparation statistique des deux groupes de la matrice Y en calculant un coefficient d'importance pour chaque variable. Ceci permet de sélectionner les variables les plus pertinentes dans la construction d'un modèle statistique discriminant entre au moins deux groupes d'observations [95-97].

Chapitre 3

Contexte et stratégie analytique

3.1 Les méthodologies de contrôle des huiles essentielles

Le contrôle qualité des huiles essentielles est indispensable et est donc normé par les pharmacopées. Il existe différents tests physiques tels que les mesures de l'indice de réfraction (molécules chirales), la densité relative, ainsi que des tests chimiques comme l'évaluation de la miscibilité à l'éthanol, la détermination d'indices d'acides, d'esters et de carbonyles, la recherche d'huile grasse quand cela est pertinent et la détermination du résidu d'évaporation (NF ISO 875 (nov. 1999), NF ISO 1242 (déc. 1999), NF ISO 709 (fév. 2002)NF ISO 279 (mars 1999), NF ISO 280 (mars 1999), NF ISO 592 (mars 1999), NF T75-117 (avril 1976), NF T75-125 (février 1984)) [1, 4].

Afin d'obtenir des informations plus complètes, une analyse chromatographique est requise. En routine, la chromatographie en couche mince (HPTLC) peut être utilisée pour le contrôle qualité des huiles essentielles (détection d'huiles végétales), cependant malgré les progrès récents dans ce domaine, elle reste généralement moins performante que la chromatographie en phase gazeuse. En effet, cette dernière est la plus adaptée, en raison de la volatilité des constituants des huiles essentielles, de sa facilité de mise en œuvre, de la fiabilité des résultats et de l'automatisation des systèmes d'analyses. Cette technologie permet l'identification d'un profil moléculaire semi-quantitatif, caractéristique d'un type d'huile essentielle. Chaque essence présente des composés représentatifs, à des teneurs statistiquement identiques dans tous les échantillons (ex : limonène dans l'essence d'orange) et des composés caractéristiques qui lui confèrent sa spécificité (ex : nootkatone dans le pamplemousse). Ces profils moléculaires sont normés par l'AFNOR permettant une homogénéisation des huiles essentielles et un contrôle de leur qualité (provenance géographique, dégradation)(NF T75-401 (mai 1985)) [1, 4, 79].

La GC peut être utilisée dans des conditions différentes afin d'effectuer des analyses chirospécifiques. Ces analyses sont très importantes dans le contrôle qualité en raison de l'influence de l'excès énantiomérique sur l'odeur et sur l'activité thérapeutique. De plus, l'excès énantiomérique est lié à l'origine botanique, ce qui en fait un paramètre non négligeable lors du contrôle des huiles essentielles. La détection d'ajout d'huile essentielle d'origines botaniques différentes ou de produits synthétiques racémiques est alors possible. Les développements récents de la GC multidimensionnelle permettent l'analyse d'huiles essentielles assez complexes, sans préfractionnement. Ainsi la première colonne effectue le fractionnement en ligne et chaque fraction est dirigée sur la deuxième colonne qui peut être classique ou chirospécifique [79, 80, 85].

Aussi, le développement de couplages avec la spectrométrie de masses des rapports isotopiques (IRMS) a permis la détection d'ajout de nombreux composés d'origine synthétique ou d'huiles essentielles d'origines botaniques différentes ainsi que de molécules naturelles qui en seraient extraites. Si cette méthode est très élaborée, elle est parfois limitée en ce qui concerne l'ajout de composés extraits [85].

La chromatographie liquide se révèle aussi intéressante pour les préfractionnements, ou l'analyse de la fraction lourde des citrus [1, 4].

L'analyse thermogravimétrique (ATG) évalue la teneur de la fraction lourde (résidu) d'une huile essentielle. Ainsi l'ajout d'une huile grasse pourra être identifié. En effet, ce procédé d'adultération existe pour des huiles très sesquiterpéniques telle que l'huile essentielle de vétiver. La solubilité à l'éthanol pourra aussi le mettre en évidence (NF T75-117 (avril 1976))[1, 4].

L'utilisation de l'analyse proche infrarouge est investiguée dans le contrôle qualité des huiles essentielles. Cette technologie comporte de nombreux avantages tels qu'un matériel facilement transportable et des temps d'analyse réduits. De plus, elle permet l'analyse globale de l'échantillon (fractions volatile et lourde). Par contre cette méthode ne permet pas d'identification moléculaire car elle identifie les fonctions, ce qui limite sa sensibilité. En effet, de nombreuses bandes d'absorption se superposent [95].

3.2 Adultération et stratégie analytique

Une adultération régulièrement rencontrée consiste à ajouter une huile essentielle de composition proche mais moins onéreuse. L'ajout de molécules synthétiques peut permettre de compenser les modifications engendrées par une première adultération afin de satisfaire aux normes et spécifications et ainsi de masquer la fraude. Aussi cet ajout peut simplement permettre à un lot d'être conforme aux normes et spécifications. Les techniques d'adultération sont spécifiques à chaque huile essentielle et les méthodes de détection de la fraude devront être adaptées au cas par cas [56].

En raison des nombreux types de fraudes existants, de multiples analyses sont nécessaires à leur mise en évidence. De plus, de nombreux paramètres intrinsèques au végétal et environnementaux influencent la composition d'une huile essentielle. La corrélation de différents résultats

d'analyse permet de réduire le risque de mauvaise interprétation ou de conclusions hâtives. En effet, les origines botaniques et géographiques sont des paramètres extrêmement importants pour l'interprétation des résultats, or ils sont souvent méconnus pour un échantillon donné, ceci pouvant mener à des conclusions erronées.

3.2.1 Les Citrus

Une des adultérations classiques des huiles essentielles d'agrumes est l'ajout de terpènes d'orange douce (citrus sinensis), ainsi que d'huile d'orange douce distillée ou issue de l'expression [55-58]. L'huile essentielle d'orange est constituée de 94 à 97 % de limonène, ce qui constitue, tout comme pour l'huile essentielle de pamplemousse, la teneur la plus importante chez les citrus. Les huiles essentielles de bergamote, mandarine, et citron sont en revanche moins riches en ce composé. En raison de cette forte présence en limonène, l'huile essentielle d'orange est constituée de relativement peu de molécules, ce qui tend à faciliter son utilisation en tant qu'adultérant. Néanmoins, le δ-3-carène parait relativement spécifique à cette huile essentielle et sa présence constitue un premier indice pour identifier une coupe à l'orange. Ce n'est pourtant pas une preuve absolue, car il n'est pas systématiquement présent en teneur significative dans l'huile essentielle d'orange. De plus, il a été démontré que certaines variétés de citron, de mandarine ou de pamplemousse par exemple en contiennent de faibles teneurs à l'état naturel [25, 44, 54, 60, 65, 72, 73, 101].

L'ajout d'huile essentielle d'orange ou seulement de terpènes est accompagné d'une variation du profil moléculaire, mais qui n'est pas nécessairement évidente. Néanmoins, une baisse de la teneur en β -pinène, γ -terpinène et une augmentation de la teneur en limonène et en aldéhydes aliphatiques constituent un premier indice d'une coupe éventuelle par de l'huile essentielle d'orange douce.

L'ajout d'huile essentielle distillée à partir des résidus d'écorces pressées est également parfois observé [56]. De la même manière, la variation de composition moléculaire engendrée permet déjà de suspecter la fraude. En effet, cette huile est très différente de l'huile essentielle obtenue par pression à froid . La période de stockage des écorces résiduelles et la distillation elle-même, entrainant des réactions chimiques dans des milieux acides aqueux et/ou chauffés, sont à l'origine de ces différences. Ces huiles possèdent une fraction volatile plus importante. De façon générale, les esters, les sesquiterpènes et le citronnellal sont des composés mineurs dans ces huiles, au contraire de certains alcools comme le linalol, le terpinen-4-ol et l'α-terpinéol qui eux sont plus concentrés [57]. L'étude des ratios terpinen-4-ol/citronnellal terpinen-4-ol/décanal pourra indiquer la présence d'une coupe avec de l'huile distillée [57].

Les variations de composition moléculaire induites par l'adultération ne sont pas évidentes à observer sans l'intervention d'un traitement statistique.

Ainsi une étude statistique du profil moléculaire sera envisagée lors de cette étude, afin de simplifier et fiabiliser la détection de la fraude.

Le développement d'analyses plus spécifiques permettra une détection affinée de la fraude ainsi qu'une meilleure compréhension de celle-ci.

D'après la littérature [99-102], l'analyse chirale des terpènes, α -pinène et sabinène, permettra d'identifier l'ajout d'une huile essentielle d'orange.

Malheureusement cette méthode ne s'adapte pas à l'huile essentielle de pamplemousse qui possède une chiralité trop proche de celle de l'orange. Ainsi d'autres analyses seront nécessaires. La chiralité de l'α-terpinéol et du linalol a été étudiée chez certains agrumes par Dugo et al [102], la méthode sera donc testée sur les agrumes étudiés ici. Aussi, il été a démontré par H. Casabianca et Tran Thi [122], que la chiralité du citronnellal diffère dans les huiles essentielles d'orange et de citron. L'étude sera donc étendue à tous les agrumes sauf à la bergamote dont la teneur en citronnellal est plus faible.

L'étude énantiomérique du linalol pourrait permettre la détection d'ajout d'huile essentielle distillée. H. Casabianca et J.B Graff démontrent la fragilité du linalol se racémisant dans les huiles essentielles à pH acide et à température ambiante [106]. Cependant Dugo et Al. rapportent que la chiralité du linalol est très peu affectée par la distillation dans les citrus [102].

Dans certains cas l'addition de produits naturels ou synthétiques est nécessaire à la préservation de la qualité olfactive de l'huile essentielle et aussi à sa conformité à la norme. Ces ajouts peuvent également avoir lieu pour compenser une première adultération. La détection de ces ajouts ne sera pas nécessairement aisée car il peut s'agir de faible quantité. Pour ce type de fraude, l'analyse chirale ou isotopique des composés à fort pouvoir olfactif sera importante. Ainsi le développement des analyses isotopiques des aldéhydes, du N-méthyl anthranilate de méthyle, du linalol et de l'acétate de linalyle ainsi que du citral, des acétates de néryle et géranyle sera envisagé.

Dans le but de démontrer l'ajout d'orange dans le pamplemousse, l'intérêt de l'analyse isotopique des terpènes a été étudié et étendu à tous les citrus.

L'analyse des polymethoxyflavones (PMF) a été envisagée, bien que la littérature expose principalement l'ajout d'huiles distillées ou de terpènes d'orange [56]. Dans ces cas là, le profil des PMF reste inchangé mais une détection de la dilution de la fraction lourde par ATG ou plus précisément la dilution spécifique des PMF (GC-FID) pourra être détectée. En cas d'ajout d'huile essentielle d'orange non défurocoumarinée alors le profil des PMF de l'huile essentielle de citrus sera modifié. Aussi les teneurs relatives pour chaque PMF sont différentes selon la variété du citrus, donc l'établissement du profil des PMF pourrait permettre de faire la distinction entre les différentes variétés de fruit (ex : orange valencia et orange sanguine) [1, 4-21].

La technologie proche infrarouge a connu une croissante utilisation dans le domaine de l'agroalimentaire. Cette technique est aussi utilisée pour l'étude de certaines huiles essentielles. Ainsi différentes espèces de menthe, de basillic, de citrus ou encore de lamiacées ont été discriminées à l'aide de cette technique. D'après l'auteur, cette technique pourrait remplacer la chromatographie gazeuse pour le contrôle qualité des huiles essentielles car moins onéreuse et plus rapide. Le plus souvent cette technique est utilisée comme une méthode quantitative de certains composés comme le limonène, le myrcène et aldéhydes. Le même auteur rapporte que dans le cas des citrus, la spectroscopie en moyen infra-rouge serait plus performante. En effet les signaux des composés caractéristiques sont mieux résolus car il s'agit des bandes d'absorption fondamentales et non harmoniques [107].

D'après Hubert Joe et al [108] la détection et la quantification de l'adultération du santalum album par l'huile de castor est rendue possible par cette technique. Cependant aucune publication n'est connue sur l'utilisation de cette technique pour la détection de la fraude des citrus. En ce qui concerne, les lavandes et lavandins super, des travaux internes au laboratoire montrent que cette technique est intéressante pour la détection rapide de la fraude chez les lamiacées.

3.2.1.1 Huile essentielle de bergamote

Il existe plusieurs types d'adultération de l'huile de bergamote, à savoir l'ajout :

- d'huile essentielle d'orange douce ou terpènes d'orange (citrus sinensis)
- d'huile essentielle de citron
- de composés caractéristiques de l'huile pour compenser la dilution (ex : linalol et acétate de linalyle)
- de linalol provenant d'huile essentielle de ho wood/shiuh (cinnamomum spp.)
- d'huile essentielle de ho wood acétylée
- d'huile essentielle d'orange amère (citrus aurantium)

En complément des analyses citées dans la section 3.2.1, l'étude de la chiralité du linalol et acétate de linalyle permet de vérifier qu'il n'y a pas eu d'ajout de molécules de synthèse, mais ne permet pas de détecter l'ajout de ho wood. Pour l'analyse du profil GC-FID, il existe des molécules spécifiques du ho wood telles que le gaïacol, le Z-rose-oxyde, le plinol A, le plinol C, le méthyl chavicol (estragol), cependant leur concentration (0,2% pour les plinol A et C pour les plus concentrées), sont probablement trop faibles pour détecter une coupe. Une étude isotopique serait sans doute nécessaire.

Egalement, en cas d'ajout d'huile essentielle de bergamote reconstituée, d'huile essentielle d'orange douce ou de terpènes d'orange, une dilution des linalol et acétate de linalyle est

observée. Dans ce cas l'huile essentielle perd de sa qualité olfactive et surtout elle peut ne plus correspondre à la norme. L'ajout de linalol et acétate de linalyle s'impose alors. Le profil en GC-FID pourra éventuellement permettre la détection de produits secondaires issus de la synthèse du linalol (dihydrolinalol et dehydrolinalol), mais cela se révèle parfois impossible, alors l'analyse chirale est indispensable [109, 110].

L'huile essentielle d'orange amère est quant à elle onéreuse, donc a priori son utilisation présente peu d'intérêt pour la fraude. De plus, les teneurs relatives de ces composés sont relativement différentes, ce qui rendrait la coupe peu discrète [55, 60, 99-103, 106, 108-114].

3.2.1.2 Huile essentielle de citron

Les adultérations possibles du citron sont notamment les ajouts de :

- terpènes d'orange
- huile essentielle de citron distillée à partir des déchets de péricarpe pouvant être accompagné d'ajout d'huile de lime ou pamplemousse pour augmenter l'absorbance UV.
- huile essentielle reconstituée à partir d'huile d'orange douce distillée et de composés synthétiques olfactivement importants (citral, citronnellal)

L'analyse GC-MS de la fraction lourde pourra permettre la détection de traces d'auraptène, furocoumarine spécifique au pamplemousse, ce qui est d'après la D. Mchale et J.B sheridan, S.H. Vannier and W.L. Stanley [22, 123], significatif d'une coupe à l'huile essentielle distillée. En effet, une essence de citron distillée mélangée à celle de citron réduit l'absorbance UV de cette huile et l'ajout de faible quantité d'huile essentielle de pamplemousse pourrait compenser cela. Cependant cette méthode n'est pas adaptée aux huiles essentielles de citron défurocoumarinées [55, 62, 63, 99-103, 115-121].

3.2.1.3 Huile essentielle de mandarine

Il existe de nombreux cultivars et hybrides de mandarines de part le monde. Le chémotype de ces différentes variétés est nécessairement proche de celui de la mandarine car elles sont biologiquement liées [11, 69, 125].

Les fraudes possibles sont des ajouts de :

- terpènes d'orange
- mandarine distillée à partir des déchets de péricarpe
- huile reconstituée à partir d'huile d'orange distillée et de produits synthétiques olfactivement importants.

- N-méthyl anthranilate de méthyle provenant du mandarinier petit-grain, qui contient environ 50% de cette molécule.
- tangerine (Citrus reticulata 'Tangerina') mélangée à du γ-terpinène, N-méthyl anthranilate de méthyl, α-sinensal et perillaldéhyde
- utilisation d'hybrides différents

La tangerine et la mandarine proviennent toutes les deux du citrus reticulata blanco mais sont des huiles essentielles de compositions différentes car elles proviennent de deux cultivars et d'origines géographiques bien distincts. La tangerine est plus circuse que la mandarine, l'analyse ATG, ainsi que l'analyse des PMF pourront être révélatrices d'une huile de tangerine modifiée, ou de l'utilisation d'un hybride différent (clémentine). Cependant la concentration en limonène de la tangerine et de la clémentine paraissent bien supérieure à celui de la mandarine [124, 126].

L'ajout d'α-sinensal est peu probable tant il est difficile de se procurer ce standard. De plus son coût limite son intérêt pour la fraude [43, 55, 65, 68, 99, 100, 103, 115, 121, 123-128].

3.2.1.4 Huile essentielle de pamplemousse

En ce qui concerne le pamplemousse, il n'y a que très peu de publications sur son adultération car il est aujourd'hui impossible de la détecter. La composition de l'huile essentielle d'orange et de pamplemousse sont tellement proches qu'il est impossible d'observer une quelconque variation de composition moléculaire. Aussi la détection de la fraude est complexe du fait de la variabilité naturelle du pamplemousse, et de l'existence de nombreux hybrides [64, 71-73, 121].

Les méthodes développées en début de ce chapitre seront appliquées aux échantillons d'huile essentielle de pamplemousse afin d'évaluer leur pertinence.

3.2.2 Les Lamiacées

3.2.2.1 Huile essentielle de lavande fine

La lavande fine produit une huile essentielle onéreuse, il existe donc aussi de nombreuses fraudes [55, 103, 108, 112, 129-132], comme l'ajout de :

- huile essentielle de lavandin moins chère (ex : lavandin super)
- huile essentielle de « spike lavander » (lavandula latifolia)
- huile essentielle de ho wood modifiée ou acétylée
- linalol et acétate de linalyle synthétiques

Pour détecter la fraude, l'analyse chirale du linalol, acétate de linalyle et acétate de lavandulyle est importante. Par contre, la chiralité du linalol et du ho wood est trop proche de celle du

linalol pour pouvoir les différencier. L'analyse isotopique est alors nécessaire pour compléter l'étude.

En présence de distillation prolongée (2h), l'acétate de linalyle est en partie dégradé, puis les produits de dégradation sont oxydés et forment entre autres du linalol racémique. On dit que le linalol se racémise car le ratio énantiomérique peut baisser jusqu'à 85/15. C'est aussi le cas en milieu acide et à température ambiante [106]. L'ajout de produit synthétique ne pourra être certifié qu'en cas d'un excès énantiomérique inférieur à 85 % de l'isomère majoritaire [133]. Le profil en GC-FID pourra éventuellement permettre la détection de produits secondaires issus de la synthèse du linalol (dihydrolinalol et dehydrolinalol), mais cela se révèle parfois impossible, alors l'analyse chirale est indispensable [109, 110].

3.3 Synthèse

étudiées	GC-FID	Chiralité	Iso	topie	Autres
Bergamote	Conformité à la norme, teneur relative en ō-3-carène	Linalol, acétate de linalyle, α-pinène, sabinène	C13 Terpènes, linalol, acétate de linalyle	Deuterium Linalol, acétate de linalyle (acétate de lavandulyl)?	Flavones poly- m éthoxylées (GC) ARG,NIR
Citron	Conformité à la norme, teneur relative en ō-3-carène, calcul de rapport terpinène-4-ol/citronnellal, terpinène-4-ol/decanal (neral+carvone)/geranial, y-terpinène/lim onène (pertinence à confirm er par statistiques)	Citronnellal, α-Pinène, sabinène, linalol, α-terpinéol	Terpènes	Citral	Flavones poly- m éthoxylées (GC) ARG,NIR
Mandarine	Conformité à la norme, teneur relative en ō-3-carène, calcul de rapport Terpinène-4ol/citronnellal, T4ol/decanal, y-terpinène/lim onène (pertinence à confirm er par statistiques)	Citronnelal, α-Pinène, Sabinène, linalol, α-terpinéol	Terpènes	N-Methyl antranilate de methyl	Flavones poly- méthoxylées (GC) ARG,NIR
Pamplemousse	Conformité à la norme, teneur relative en ō-3-carène	Citronnellal, linalol	Terpènes, aldéhydes		Flavones poly- m éthoxylées (GC) ARG.NIR
Lavande fine	Conformité à la norme, teneur relative en camphre corrélée à celle du t-β-ocimène	Linalol, acétate de linalyle, acétate de lavandulyle	Linalol, acétate de linalyle	Linalol, acétate de linalyle, acétate de lavandulyle	NIR

Table 3.1: Tableau de syntèse de la stratégie analytique

Chapitre 4

Matériels et méthodes

4.1 Echantillonnage

Les échantillons proviennent fournisseurs ou producteurs très différents. Les huiles essentielles extraites au laboratoire sont issues de fruits provenant de commerce tels que Monoprix, Carrefour, Biocoop, La vie claire, un lot de citrons et de mandarines et deux lots de bergamotes ont été obtenus de producteurs d'huile essentielle. Enfin, l'INRA de Corse nous a fait parvenir des huiles essentielles de citrus issues de leurs propres cultures et obtenues par centrifugation des zestes.

A partir de cet échantillonnage, nous avons identifié des échantillons authentiques appelés références. Ces échantillons proviennent, la plupart du temps, directemment de producteurs, car ce sont les sources plus sûres. De plus, pour les huiles essentielles de lavandes, une collaboration avec un producteur a été mis en place, afin de fiabiliser les approvisionnement. De la même manière, dans le cadre de l'étude des huiles essentielles de citrus, des fournisseurs ont collaboré dans le but d'obtenir un échantillonage fiable.

Ces échantillons ont été produits à des périodes de récolte variées de 2009 à 2012, de manière à ce qu'ils constituent un échantillonnage représentatif. Ils correspondent en tout point à la norme AFNOR (sauf exception) et ils ne doivent pas présenter de résultats suspects pour les analyses chirales ou isotopiques. Les autres échantillons sont désignés comme échantillons commerciaux.

Afin de créer des modèles statistiques et d'interpréter les résultats des échantillons commerciaux, des échantillons ont été adultérés au laboratoire. Ainsi, quand cela est pertinent, des additions de 5-10-20 % ont été effectuées sur des huiles essentielles de citrus :

- huile essentielle d'orange issue de l'expression ou de l'hydro-distillation. L'ajout de ter-

pènes d'orange a été calculé théoriquement dans des huiles essentielles de mandarine et citron.

- huile essentielle d'agrume hydro-distillée, d'huile essentielle de citron, de lime

Aux échantillons de bergamote et lavande, 5 ou 8 % d'huile essentielle de ho wood ont été ajoutés.

L'ajout d'huile essentielle de ho wood acétylée a été calculé théoriquement par ajout de 5 % de linalol et 8 % d'acétate de linalyle.

Ensuite en complément, des ajouts de diverses teneurs (Annexe 1) de linalol, d'acétate de linalyle, de citral, d'acétate de géranyle ainsi que de NMAM ont été effectués sur des échantillons authentiques d'origine Italie mais aussi Espagne ou Côte d'Ivoire dans le cas de l'huile essentielle de citron. Enfin, selon la publication de E.M. Gaydou, J.P Bianchini, and R.P Randriamiharisoa [7], des coupes théoriques ont été calculées à partir d'un profil d'huile essentielle d'orange contenant 1300 ppm de PMF, afin de pouvoir comparer ces résultats à ceux des échantillons commerciaux. En effet, l'échantillonnage d'huile essentielle d'orange dont nous disposions ne contenait que des huiles essentielles plus riches en PMF.

La codification suivante des échantillons a été mise en place :

Codes échantillons d'orange

REF	Origine	Remarques
OB1	Brésil	
OB2	Brésil	
OB3	Brésil	
OB4	Brésil	
OB5	brésil	
OCR6	Costa Rica	
OCR7	Costa Rica	
OEV8	Espagne (Valence)	
OEV9	valencia	
OI10	italie	
Ol11s-df	italie	Sanguine/défurocoumariné
Ol12d	Italie	douce
Ol13s	italie	sanguine
OM14s-df	Mexique	Sanguine/défurocoumariné
Oi15-df	inconnue	
Oi16	inconnue	
Oi17	inconnue	
Oi18-df	inconnue	Bio
Oi19	inconnue	
Oi20	inconnue	terpène extrait Oi19
0i21	inconnue	
0i22	inconnue	
Oi23dt	inconnue	déterpénée
Oi24-hd	inconnue	hydro-distillée

Codes échantillons de bergamote

REF	Origine	Remarques	
BI1-R	Italie	·	Référence
BI2-R	Italie		Référence
BI3-R	Italie		Référence
BI4-R	Equateur	type Italie	Référence
BI5-R	İtalie		Référence
BI6-R	Italie		Référence
BI7-R	Italie		Référence
BI8	Italie		Référence
Bl9	Italie		
BI10	Italie		
BI11	Italie		
Bl12	Italie	bio	
Bl13	Italie		
Bl14-df	Italie	défurocoumarinée à froid	
BI15	Italie		
Bl16	Italie		
BI17	Italie	défurocoumarinée à froid	
BI18	Italie	défurocoumarinée à froid	
Bl19	Italie	défurocoumarinée à froid	
Bl20-df	Italie	défurocoumarinée à froid	
Bl21	Italie		
Bl22-df	Italie	basse teneur en furocoumarines	
Bl23	Italie		
Bl24	Italie		
Bl25	Italie		
Bl26	Italie		
Bl27-df	Italie		
Bl28-df	Italie	défurocoumarinée à froid	
Bl29-df	Italie		
Bl30-df	Italie		
Bl31-df	Italie	défurocoumarinée à froid	
Bl32-df	Italie	incolore	

BIC33-5	Italie	échantillon 1 +5 % d'HE orange	
BIC34-10	Italie	échantillon 1 + 10 % d'HE orange	
BIC35-20	Italie	échantillon 1 + 20 % d'HE orange	
BIC36-10+1std	Italie	échantillon 1 + 10 % d'HE orange + 3% linalol + 3% acétate de linalyle	
BIC37-10+2std	Italie	échantillon 1 + 10 % d'HE orange +7% linalol +12% acétate de linalyle	
BIC38-5	Italie	échantillon 3 + 5 % d'HE orange	
BIC39-10	Italie	échantillon 3 + 10 % d'HE orange	
BIC40-20	Italie	échantillon 3 + 20 % d'HE orange	
BIC41-10+1std	Italie	échantillon 3 + 10 % d'HE orange + 3% linalol + 3% acétate de linalyle	
BIC42-10+1std	Italie	échantillon 3 + 10 % d'HE orange + 7% linalol +12% acétate de linalyle	
BIC43-5	Italie	échantillon 2 + 5 % d'HE orange	
BIC44-10	Italie	échantillon 2 + 10 % d'HE orange	
BIC45-20	Italie	échantillon 2 + 20 % d'HE orange	
BIC46-10+1std	Italie	échantillon 2 + 10 % d'HE orange + 3% linalol + 3% acétate de linalyle	
BIC47-10+2std	Italie	échantillon 2 + 10 % d'HE orange + 7 % linalol +12 % acétate de linalyle	
BICc48-5	Italie	échantillon 3+5 % d'HE citron	
BICc49-10	Italie	échantillon 3+ 10 % d'HE citron	
BICc50-20	Italie	échantillon 3+20 % d'HE citron	
BICc51-10+1std	Italie	échantillon 3+ 10 % d'HE citron + 3% linalol + 3% acétate de linalyle	
BICc52-10+2std	Italie	échantillon 3+ 10 % d'HE citron +7% linalol +12% acétate de linalyle	
BICc53-5	Italie	échantillon 2 + 5 % d'HE citron	
BICc54-10	Italie	échantillon 2 + 10 % d'HE citron	
BICc55-20	Italie	échantillon 2 + 20 % d'HE citron	
BICc56-10+1std	Italie	échantillon 2 + 10 % d'HE citron + 3% linalol + 3% acétate de linalyle	
BICc57-10+2std	Italie	échantillon 2 + 10 % d'HE citron + 7 % linalol +12 % acétate de linalyle	
BIC58-10-HVV1	Italie	échantillon 3 + 10 % d'HE orange + 5% ho wood	
BIC59-10-8HW7ac	Italie	échantillon 3 + 10 % d'HE orange + 8% hoac	
BIC60-10-HVV1	Italie	échantillon 2 + 10 % d'HE orange + 5% ho wood	
BIC61-10-8HW7ac	Italie	échantillon 2 + 10 % d'HE orange + 8% hoac	
BIC62-10-HW1	Italie	échantillon 3 + 10 % d'HE cit + 5% ho wood	
BIC63-10-8HW7ac	Italie	échantillon 3 + 10 % d'HE cit +8% hoac	
BIC64-10-HVV1	Italie	échantillon 2 + 10 % d'HE cit + 5% ho wood	
BIC65-10-8HW7ac	Italie	échantillon 2 + 10 % d'HE cit + 8% hoac	
Bl66dt	Italie	déterpénée	
BIL67	Italie	extrait au laboratoire	
BIL68-R	Italie	extrait au laboratoire	Référence
BC69	Italie	extrait INRA Corse	
BCI70	Côte d'Ivoire		
BA71	Argentine		
	3		

Codes échantillons de citron

REF	Origine	Remarques	
CI1 df-R	Italie	Défurocoumarinée	Référence
Cl2a-R	Italie	Citron d'automne	Référence
Cl3h-R	Italie	Citron d'hiver	Référence
CI4p-R	Italie	Citron de Printemps	Référence
Cl5e-R	Italie	Citron d'été	Référence
Cl6h-R	Italie	Citron d'hiver Défurocoumarinée	Référence
CI7-R	Italie	Bio	Référence
CI8-R	Italie		Référence
CI9-R	Italie		Référence
CI10-R	Italie		Référence
CI11-R	Italie		Référence
CI12-R	Italie		Référence
CI13-R	Italie		Référence
Cl14-R	Italie		Référence
CI15-df	Italie	Défurocoumarinée	
CI16	Italie	Défurocoumarinée	
CI17-df	Italie	Défurocoumarinée	
CI18-df	Italie	Défurocoumarinée	
CI19	Italie		
CI20-df	Italie	Défurocoumarinée	
Cl21-df	Italie	Défurocoumarinée	
Cl22-df	Italie	Défurocoumarinée	
CI23	Italie		
Cl24	Italie		
CI25	Italie		
Cl26-df	Italie	Défurocoumarinée	
Cl27	Italie		
CI28	Italie		
Cl29-df	Italie	Défurocoumarinée	
Cl30-df	Italie	Défurocoumarinée	
Cl31	Italie		
Cl32	italie		
Cl33m	méditerranée		
CIL34	Italie		

01000.4	1. P	1	
CIC36-1	Italie	échantillon 2 + 1 % d'HE orange	
CIC37-5	Italie	échantillon 2 + 5 % d'HE orange	
CIC38-10	Italie	échantillon 2 + 10 % d'HE orange	
CIC39-20	Italie	échantillon 2 + 20 % d'HE orange	
CIC40-5	Italie	échantillon 2 + 5 % d'HE orange hydrodistillée	
CIC41-10	Italie	échantillon 2 + 10 % d'HE orange hydrodistillée	
CIC42-20	Italie	échantillon 2 + 20 % d'HE orange hydrodistillée	
CIC43-5	Italie	échantillon 2 + 5 % d'HE lime expression	
CIC44-10	Italie	échantillon 2 + 10 % d'HE lime expression	
CIC45-20	Italie	échantillon 2 + 20 % d'HE lime expression	
CIC46-5	Italie	échantillon 2 + 5 % d'HE citron hydrodistillée	
CIC47-10	Italie	échantillon 2 + 10 % d'HE citron hydrodistillée	
CIC48-20	Italie	échantillon 2 + 20 % d'HE citron hydrodistillée	
CIC49-1	Italie	échantillon 2 + 1 % d'HE terpènes d'orange	
CIC50-5	Italie	échantillon 2 +5 % d'HE terpènes d'orange	
CIC51-10	Italie	échantillon 2 + 10 % d'HE terpènes d'orange	
CIC52-20	Italie	échantillon 2 + 20 % d'HE terpènes d'orange	
CIC53-5	Italie	échantillon 10 +5 % d'HE citron hydrodistillée	
CIC54-10	Italie	échantillon 10 + 10 % d'HE citron hydrodistillée	
CIC55-20	Italie	échantillon 10 + 20 % d'HE citron hydrodistillée	
CIC56-5	Italie	échantillon 10 +5 % d'HE orange	
CIC57-10	Italie	échantillon 10 + 10 % d'HE orange	
CIC58-20	Italie	échantillon 10 + 20 % d'HE orange	
CIC59-5	Italie	échantillon 10 + 5 % d'HE orange hydrodistillée	
CIC60-10	Italie	échantillon 10 + 10 % d'HE orange hydrodistillée	
CIC61-20	Italie	échantillon 10 + 20 % d'HE orange hydrodistillée	
CIC62-5	Italie	échantillon 5 + 5 % d'HE citron hydrodistillée	
CIC63-10	Italie	échantillon 5 + 10 % d'HE citron hydrodistillée	
CIC64-20	Italie	échantillon 5 + 20 % d'HE citron hydrodistillée	
CIC65-5	Italie	échantillon 5 + 5 % d'HE orange	
CIC66-10	Italie	échantillon 5 + 10 % d'HE orange	
CIC67-20	Italie	échantillon 5 + 20 % d'HE orange	
CIC68-5	Italie	échantillon 5 + 5 % d'HE orange hydrodistillée	
CIC69-10	Italie	échantillon 5 + 10 % d'HE orange hydrodistillée	
CIC70-20	Italie	échantillon 5 + 20 % d'HE orange hydrodistillée	
CIC71-20+0,5std	Italie	échantillon 10 + 20 % d'HE orange + 0,5% citral	
CIC72-20+1std+0,2gac	Italie	échantillon 10 + 20 % d'HE orange + 1% citral	
CIC73-20+1std	Italie	échantillon 10 + 20 % d'HE orange hydrodistillée + 1% citral	
CIC74-20+1std+0,2gac	Italie	échantillon 2 + 20 % d'HE orange + 1% citral	

CIC75-20+1std	Italie	échantillon 2 + 20 % d'HE orange hydrodistillée + 1% citral	
CIC76-20+0,5std	Italie	échantillon 2 + 20 % d'HE orange + 0,5 ul citral	
CIC77-20+1std+0,2gac	Italie	échantillon 2 + 20 % d'HE citron hydrodistillée + 1% citral + 0,2% acétate de géranyle	
CIC78-20+1std+0,2gac	Italie	échantillon 2 + 20 % d'HE lime expression + 1% citral + 0,2% acétate de géranyle	
CIC79+1std	Italie	échantillon 5 + 1% citral	
CIC80+1std+0,2gac	Italie	échantillon 5 + 1%citral + 0,2% acétate de géranyle	
CA81	Argentine	government of the state of the	
CA82-df	Argentine	Défurocoumarinée	
CA83	Argentine		
CA84	Argentine		
CA85	Argentine	Non Bio	
CCI86	Cote d'ivoire		
CCI87-df	inconnu	Défurocoumarinée	
CCl88+1std+0,2gac	Cote d'ivoire		
Cl89-df	Brésil	Bio	
Cli90	inconnu		
Cli91	inconnu		
Cli92	inconnu		
CE93	Espagne		
CE94	Espagne		
CE95	Espagne		
CE96	Espagne		
CE97-5	Espagne	échantillon 96 + 5 % d'HE orange	
CE98-10	Espagne	échantillon 96 + 10 % d'HE orange	
CE99-20	Espagne	échantillon 96+20 % d'HE orange	
CE100+1std+0,2gac	Espagne	échantillon 94 + 1% citral + 0,2% acétate de géranyle	
CEL101	Espagne	extraite au laboratoire	
CEL102	Espagne	extraite au laboratoire	
CEL102-D	Espagne	extraite au laboratoire et laissé à la lumière et l'air à 30-40°C pendant quelques semaines	
CEL103	Espagne	extraite au laboratoire	
CEL104	Espagne	extraite au laboratoire	
CEL105	Espagne	extraite au laboratoire	
CEL106-hd	Espagne	distillée au laboratoire	
CC107	corse	extrait INRA-Corse	
CC108	corse	extrait INRA-Corse	
CI109dt	Italie	déterpénée	
CI110dt	Italie	déterpénée	

Codes échantillons de mandarine

REF	Origine	Remarques	
	3	1	
MI1r-R	Italie	rouge	Référence
Ml2j-R	Italie	jaune	Référence
MI3-R	Italie	rouge	Référence
MI4v-R	Italie	verte	Référence
MI5j-R	Italie	jaune	Référence
MI6j-R	Italie	jaune	Référence
MI7v-R	Italie	verte	Référence
MI8v-R	Italie	verte	Référence
MI9j-R	Italie	jaune	Référence
MI10j-R	Italie	jaune	Référence
MI11r-R	Italie	rouge	
MI12j	Italie	jaune	
MI13	Italie/brésil		
MI14-df	Italie		
MI15-df	Italie		
MI16j	Italie	jaune	
MI17j-df	Italie	jaune	
MI18v-df	Italie	verte	
MI19	Italie		
MI20	Italie		
MI21-df	Italie		
Ml22j	Italie	jaune	
MI23-df	Italie		
MICm24-5	Italie	échantillon 2 + 5 % d'HE mandarine hydrodistillée	
MICm25-10	Italie	échantillon 2 + 10 % d'HE mandarine hydrodistillée	
MICm26-20	Italie	échantillon 2 + 20 % d'HE mandarine hydrodistillée	
MICm27-5	Italie	échantillon 6 + 5 % d'HE mandarine hydrodistillée	
MICm28-10	Italie	échantillon 6 + 10 % d'HE mandarine hydrodistillée	
MICm29-20	Italie	échantillon 6 + 20 % d'HE mandarine hydrodistillée	
MICm30-5	Italie	échantillon 5 + 5 % d'HE mandarine hydrodistillée	
MICm31-10	Italie	échantillon 5 + 10 % d'HE mandarine hydrodistillée	
MICm32-20	Italie	échantillon 5 + 20 % d'HE mandarine hydrodistillée	
MIC33-5	Italie	échantillon 2 +5 % d'HE orange	
MIC34-10	Italie	échantillon 2 + 10 % d'HE orange	
MIC35-20	Italie	échantillon 2 + 20 % d'HE orange	
MICf36-5	Italie	échantillon 2 +5 % d'HE feuille de mandarinier extrait au laboratoire	
MICo37-5	Italie	échantillon 2 +5 % d'HE orange hydrodistillée	
MICo38-10	Italie	échantillon 2 + 10 % d'HE orange hydrodistillée	
MICo39-20	Italie	échantillon 2 + 20 % d'HE orange hydrodistillée	
MICto40-5	Italie	échantillon 2 + 5 % d'HE terpènes d'orange	

1.00 44.40	1 10 P	() (III)	
MICto41-10	Italie	échantillon 2 + 10 % d'HE terpènes d'orange	
MICto42-20	Italie	échantillon 2 + 20 % d'HE terpènes d'orange	
MICto43-5	Italie	échantillon 6 + 5 % d'HE terpènes d'orange	
MICto44-10	Italie	échantillon 6 + 10 % d'HE terpènes d'orange	
MICto45-20	Italie	échantillon 6 + 20 % d'HE terpènes d'orange	
MICto46-5	Italie	échantillon 5 + 5 % d'HE terpènes d'orange	
MICto47-10	Italie	échantillon 5 + 10 % d'HE terpènes d'orange	
MICto48-20	Italie	échantillon 5 + 20 % d'HE terpènes d'orange	
MIC49-5	Italie	échantillon 6 +5 % d'HE orange	
MIC50-10	Italie	échantillon 6 + 10 % d'HE orange	
MIC51-20	Italie	échantillon 6 + 20 % d'HE orange	
MICo52-5	Italie	échantillon 6 +5 % d'HE orange hydrodistillée	
MICo53-10	Italie	échantillon 6 + 10 % d'HE orange hydrodistillée	
MICo54-20	Italie	échantillon 6 + 20 % d'HE orange hydrodistillée	
MIC55-5	Italie	échantillon 5 + 5 % d'HE orange	
MIC56-10	Italie	échantillon 5 + 10 % d'HE orange	
MIC57-20	Italie	échantillon 5 + 20 % d'HE orange	
MICo58-5	Italie	échantillon 5 + 5 % d'HE orange hydrodistillée	
MICo59-10	Italie	échantillon 5 + 10 % d'HE orange hydrodistillée	
MICo60-20	Italie	échantillon 5 + 20 % d'HE orange hydrodistillée	
MIC61-10+0.4std	Italie	échantillon 2 + 10 % d'HE orange + 0.4% NMAM	
MI62+0.4std	Italie	échantillon 2 + 0.4% NMAM	
MIL63-hd	Italie	distillée au laboratoire	
MI64-hd	Italie	distillée	
MIL65	Italie	extraite au laboratoire	
MA66-df	Argentine		
MA67j	Argentine	jaune	
MA68	Argentine		
MA69	Argentine		
MB70v	Brésil	verte	
MB71v	Brésil	verte	
MB72v	Brésil	verte	
MB73v	Brésil	verte	
MB74	Brésil		
MB75	Brésil		
MCB76-10		échantillon 75 + 10 % d'HE orange	
MCL77	Corse	échantillon extrait par l'INRA corse	
MFC78	Corse	feuille	

Codes échantillons de pamplemousse

REF	Origine	Remarques
		·
PA1	Argentine	
PA2	Argentine	
PA3	Argentine	
PA4	Argentine	
PC5	Cuba	
PF6	Floride	
PF7	Floride	
PUS8	USA	
PUS9-df	USA	Défurocoumarinée
PUS10	USA	
PUS11	USA	
PP12-df	Paraguay	Défurocoumarinée
PP13-df	Paraguay	Bio/Défurocoumarinée
PI14	Israel	
PI15	Israel	
PAS16	Afrique du Sud	
PAS17	Afrique du Sud	
Pi18		
Pi19		
Pi20-df		Défurocoumarinée
Pi21		
Pi22		
Pi23		Bio
PiC24-5		
PiC25-10		
PiC26-20		
PiC27-5		
PiC28-10		
PiC29-20		
PUSL30	Floride	Extrait au laboratoire
PUSL31	USA	Extrait au laboratoire
PC32	Corse	INRA-Corse
PC33	Corse	INRA-Corse

Codes échantillons de lavande

LF1-R	France		Référence
LF2-R	France		Référence
LF3-R	France		Référence
LF4-R	France		Référence
LF5-R	France		Référence
LF6-R	France		Référence
LF7-R	France		Référence
LF8-R	France		Référence
LF9	France		
LF10	France		
LF11	France		
LF12	France		
LF13	France		
LF14	France		
LF15	France		
LF16	France		
LF17	France		
LF18	France	bio	
LF19	France		
LFC20-5	France	échantillon 2+5% d'HE Lavandin super	
LFC21-10	France	échantillon 2+10% d'HE Lavandin super	
LFC22-20	France	échantillon 2+20% d'HE Lavandin super	
LFC23-5-5std	France	échantillon 2 + 5% d'HE Lavandin super + 5% linalol + acétate de linalyle	
LFC24-5-8std	France	échantillon 2 + 5% d'HE Lavandin super + 8% linalol + acétate de linalyle	
LFC25-10-5std	France	échantillon 2 + 10% d'HE Lavandin super + 5% linalol + acétate de linalyle	
LFC26-10-8std	France	échantillon 2 + 10% d'HE Lavandin super + 8% linalol + acétate de linalyle	
LFC27-20-5std	France	échantillon 2 + 20% d'HE Lavandin super + 5% linalol + acétate de linalyle	
LFC28-20-8std	France	échantillon 2 + 20% d'HE Lavandin super + 8% linalol + acétate de linalyle	
LFC29-5std	France	échantillon 2 +5% linalol + acétate de linalyle	
LFC30-8std	France	échantillon 2 +8% linalol + acétate de linalyle	
LFC31-5lin		,	
LFC32-8linac			
LFC33-5		échantillon 3+5% d'HE Lavandin super	
LFC34-10		échantillon 3+10% d'HE Lavandin super	
LFC35-20		échantillon 3+20% d'HE Lavandin super	
LFC36-5-5std		échantillon 3 + 5% d'HE Lavandin super + 5% linalol + acétate de linalyle	
LFC37-5-8std		échantillon 3 + 5% d'HE Lavandin super + 8% linalol + acétate de linalyle	
LFC38-10-5std		échantillon 3 + 10% d'HE Lavandin super + 5% linalol + acétate de linalyle	
LFC39-10-8std		échantillon 3 + 10% d'HE Lavandin super + 8% linalol + acétate de linalyle	
LFC40-20-5std		échantillon 3 + 20% d'HE Lavandin super + 5% linalol + acétate de linalyle	
LFC41-20-8std		échantillon 3 + 20% d'HE Lavandin super + 8% linalol + acétate de linalyle	
LFC42-5std			
LFC43-8std			
LFC44-5lin			
LFC45-8linac			
LF46	France	Clone C1550	
LB47	Bulgarie		
LF48v		échantillon 6 laissé à la lumière et l'air à 30-40°C pendant quelques semaines	
LF49-6shiu		échantillon 6+6%shiu	
LF50-12shiu		échantillon 6+ 12%shiu	
LF51-16shiu		échantillon 6+ 16%shiu	

Codes échantillons de lavandin super

REF	Origine	Remarques
LSF1	France	
LSF2	France	
LSF3	France	
LSF4	France	
LSF5	France	
LSF6	France	
LSF7	France	
LSF8	France	
LSF9	France	
LSF10	France	
LSF11	France	
LSF12	France	
LSF13	France	
LSF14	France	
LSF15	France	
LSF16	France	
LSF17	France	
LSF18	France	
LSF19	France	
LSF20	France	
LSF21	France	
LSF22	France	
LSF23	France	
LSF24	France	
LSF25	France	
LSF26	France	
LSF27	France	
LSF28	France	
LSF29	France	
LSF30	France	
LSF31	France	
LSF32	France	

Codes échantillons de ho wood

REF	Origine	Remarques			
HVV1	japon				
HW2	japon				
HVV3	Chine				
HVV4	Chine				
HW5	Chine	échantillon 6 + 20% de linalol			
HW6	Chine				
HW7-20std	Chine	échantillon 6 acétylé			
		échantillon 6 + 20% de linalol- acétylé			
HWac8	Chine				
HWac9-20std	Chine				

Les fruits ont été extraits des manières suivantes :

Extraction par solvants:

Les zestes de fruit sont placés dans un bécher de 500 mL avec 300 mL d'un mélange pentane/éther 80/20. Le mélange est ensuite placé sous agitation magnétique puis filtré et ensuite évaporé à 60°C à pression atmosphérique. L'opération est répétée trois fois afin d'obtenir un meilleur rendement.

Hydro-distillation:

Les zestes de fruits ont été placés dans un ballon rempli d'eau portée à ébullition. La vapeur d'eau entraine les molécules volatiles qui sont condensées dans le réfrigérant à eau, puis collectées dans une ampoule à décanter. La distillation des zestes est maintenue pendant minimum 1h après le début de l'ébullition.

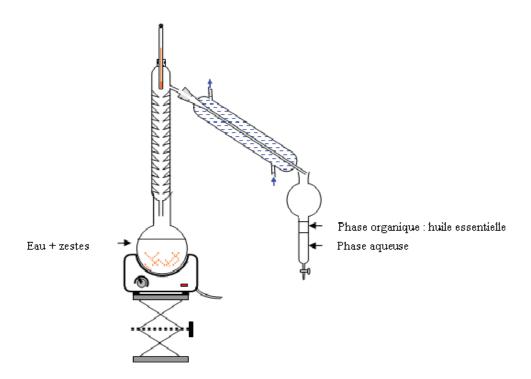


FIGURE 4.1: Schéma du matériel expérimental pour la distillation des zestes d'agrumes

4.2 Préparation d'échantillons

Un fractionnement sur gel de silice est nécessaire pour purifier ou concentrer certains échantillons. Ainsi les analyses énantiomériques des terpènes, du citronnellal, du linalol et de l'α-terpinéol des citrus nécessitent une purification préalable, afin de réduire le risque de coélution et d'éliminer les composés lourds pouvant endommager les colonnes chirales, qui ne sont pas des colonnes greffées. Ce n'est pas le cas pour les analyses du linalol et acétate de linalyle dont l'importante concentration dans les échantillons permet l'analyse sans purification préalable.

L'énantiomère S de l'acétate de lavandulyle est masqué par la présence de terpinène-4-ol. Le fractionnement sur silice est donc requis.

Fractionnement sur silice: chromatographie flash

Les solvants sont adaptés selon l'huile essentielle étudiée et le type de fractionnement souhaité. Mode opératoire :

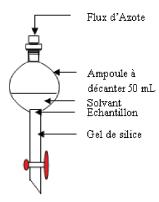


FIGURE 4.2: Schéma d'une ampoule à décanter utilisée comme colonne de séparation de chromatographie flash

Le solvant, suivant sa polarité, élue plus ou moins les molécules. Il est donc adapté à la séparation voulue. Il convient aussi d'ajuster la quantité de solvant au fractionnement désiré et à la quantité d'échantillon de départ à purifier. Le fractionnement est effectué sur gel de silice (chroma gel 200 – 400 Mesh) placé dans une ampoule à décanter en verre. La méthodologie est développée avec un volume de silice et de solvant fixe.

Ce fractionnement n'influence pas l'excès énantiomérique, mais peut en revanche entrainer un fractionnement isotopique. En effet si la totalité de la molécule n'est pas extraite, le rapport isotopique est modifié car l'élution de l'isotope lourd est privilégiée.

Les différents éluants utilisés sont, purs (distillés au laboratoire) ou en mélange, par ordre de polarité, le pentane, le dichlorométhane, l'éther, et le méthanol. Le choix de ces éluants permet d'obtenir avec une relative précision, quatre fractions différentes :

- apolaire (terpènes, sesquiterpènes...)
- moyennement polaire (aldéhydes, esters)
- polaire (alcools)
- très polaire (polyols, PMF)

Dans le tableau suivant sont synthétisées les conditions expérimentales pour obtenir le fractionnement souhaité.

HE	Molécules	Prise d'essai (μL)	Fraction 1	Fraction 2	Fraction 3
Citrus	Terpènes	100	100mL pentane		
Citrus sauf bergamote	Citronnellal	100	100mL pentane	100mL pentane/éther 5/95	
Citrus sauf bergamote	Linalol, α-terpiné ol	100	100mL pentane	100mL pentane/éther 5/95	100mL éther
Orange Mandarine Pample mousse	PMF	100	200ml dichlorométane		50mL méthanol
	NMAM	500	150mL pentane	200mL pentane/éther 95/5	
Lamiacées	A cétate de lavandulyle	100	100mL pentane	100mL pentane/dichlorométhane 85/15	100mL dichlorométhane

Table 4.1: Conditions expérimentales utilisées lors des différentes purifications

Les fractions sont collectées dans des ballons de volume adapté, puis évaporées à pression atmosphérique à 60°C, à l'exception du méthanol (PMF) qui nécessite le vide (trompe à eau). Le résidu est repris avec 1 mL d'hexane ou d'acétone pour les PMF. Concernant le NMAM, le but est d'obtenir un extrait concentré. L'évaporation de la totalité du solvant s'effectue donc successivement dans des ballons de taille de plus en plus réduite afin de limiter la perte de résidu et la quantité de solvant nécessaire à la récupération de la fraction.

4.3 L'analyse en GC-FID

La chromatographie en phase gazeuse associée à un détecteur à ionisation de flamme (GC-FID) est l'outil utilisé pour l'identification des composés volatils constituant l'huile essentielle. Les molécules sont identifiées par indices de rétention (cf chp 2.1).

Les appareils utilisés sont deux GC-FID 6890N de marque Agilent technologies (Santa Clara, Etats-Unis) équipé d'une colonne apolaire et d'une colonne polaire. Pour l'analyse de la dégradation des échantillons, le recours à la chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur de masse (GC-MS 5975, Agilent technologies (Santa Clara, Etats-Unis)) a été nécessaire. Les colonnes utilisées sont de phases identiques mais de dimensions différentes. Les programmations ont alors dû être adaptées. Le gaz vecteur est l'hélium et la température d'injection est de 250 °C.

Sur colonne apolaire : HP1, 50m x 320 μ m x 0,25 μ m (agilent technologies) la méthode chromatographique est la suivante (Norme AFNOR NF T75-400).

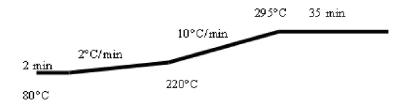
Méthode chromatographique :

Volume d'injection : 1 µL d'huile essentielle pure

Injection split 120:1

Pression constante: 13 psi

Programmation en température :



Echantillon: Huile essentielle pure

Sur colonne polaire : innowax $60m \times 320\mu m \times 0.25 \mu m$ (agilent technologies) la méthode chromatographique est la suivante (Norme AFNOR NF T75-400).

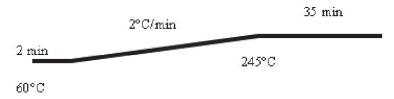
Méthode chromatographique :

Volume d'injection : 1 μL

Injection Split 100:1

Débit constant : 1,3 mL/min

Programmation en température :



Echantillon: Huile essentielle pure

4.4 L'analyse chirale en GC-FID

Paramètres communs aux analyses chirales:

Appareillage:

GC-FID modèle 6890N (Agilent technologies (Santa Clara, United states))

Méthode chromatographique :

T° injecteur: 250°C

Volume d'injection : $1 \mu L$

 $Gaz\ vecteur: H_2$

4.4.1 Application à l'analyse chirale des terpènes α -pinène et sabinène des citrus

4.4.1.1 Application à l'analyse de l' α -pinène

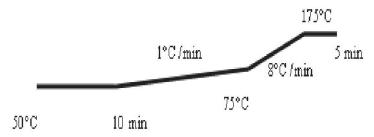
Colonne chirale : beta-Dex 325 (2,3-di-O-methyl-6-O-TBDMS- β -cyclodextrin) (25% dilué dans poly(20% phenyl/80% dimethylsiloxane)) 30m x 250μm x 0,25μm (Supelco, Sigma-aldrich, St-Louis, USA)

Méthode chromatographique :

Injection split 80:1

Débit constant : 1,2 mL/min

Programmation en température :



Echantillon: purification préalable (cf. section 4.2)

4.4.1.2 Application à l'analyse du sabinène

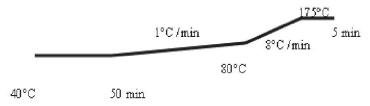
Colonne chirale : Cyclosil B (hepatkis (2,3-di-O-methyl-6-O-t-butyl dimethylsilyl)-β-cyclodextrin) 30m x 250μm x 0,25μm (agilent technologies)

Méthode chromatographique :

Injection split 100:1

Débit constant : 1,2 mL/min

Programmation en température :



Echantillon: purification préalable (cf. section 4.2)

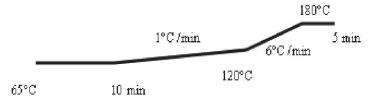
4.4.2 Application à l'analyse chirale du citronnellal dans les citrus

Colonne chirale : HYDRODEX β-6TBDM (heptakis-(2,3-di-O-methyl-6-O-t-butyldimethyl-silyl)-β-cyclodextrin) (dilué dans du polysiloxane), $50 \text{m} \times 250 \mu \text{m} \times 0.25 \mu \text{m}$ (Macherey-Nagel, Düren, Allemagne)

Méthode chromatographique:

Injection split 50:1-20:1Débit constant : 1,3 mL/min

Programmation en température :



Echantillon: purification préalable (cf. section 4.2)

4.4.3 Application à l'analyse chirale du linalol dans les citrus

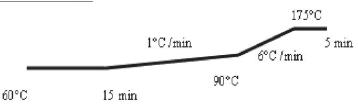
Colonne chirale : Cyclosil B (hepatkis (2,3-di-O-methyl-6-O-t-butyl dimethylsilyl)-β-cyclodextrin)(30% dilué dans DB-1701) 30m x 250μm x 0,25μm (agilent technologie)

Méthode chromatographique :

Injection split 60:1

Débit constant : 1,2 mL/min

Programmation en température :



Echantillon: purification préalable (cf. section 4.2)

4.4.4 Application à l'analyse chirale de l'α-terpinéol dans les citrus

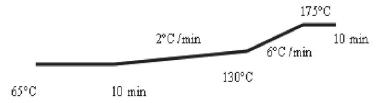
Colonne chirale : Cyclosil B (hepatkis (2,3-di-O-methyl-6-O-t-butyl dimethylsilyl)-β-cyclodextrin)(30% dilué DB-1701) 30m x 250μm x 0,25μm (agilent technologie)

Méthode chromatographique :

Injection split 60:1

Débit constant : 1,2 mL/min

Programmation en température :



Echantillon: purification préalable (cf. section 4.2)

4.4.5 Application à l'analyse chirale du linalol, acétates de linalyle et lavandulyle dans la bergamote et les lamiacées

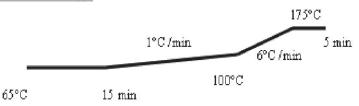
Colonne chirale : Sur colonne 6-tertiobutyl dimethylsilyl, 2x3 diethyl-β-cyclodextrine (50% dilué PS086) 25m x 250μm x 0,25μm (Méga, Legano, Italie)

Méthode chromatographique :

Injection split 100:1

Débit constant : 1,3 mL/min (programme à débit constant)

Programmation en température :



Echantillon : 0,5 μL d'échantillon est dilué dans 1,5 mL d'éthanol pour l'analyse du linalol et de l'acétate de linalyle. Par contre l'analyse de l'acétate de lavandulyle nécessite une purification préalable (cf. section 4.2)

4.5 L'analyse en GC-MS

L'analyse GC-MS des huiles essentielles a été dans un premier temps utile à l'identification des composés de dégradation. Ensuite les limites de l'analyse chirale unidimensionnelle ont été partiellement palliées par l'utilisation de la GC-MS équipée d'une colonne chirale. L'analyse des PMF a aussi été effectuée en GC-MS.

Paramètres communs aux analyses:

<u>Appareillage</u>: GC 6890N et 7890N couplé à un spectromètre masse 5975 quadripolaire en mode d'ionisation par impact électronique 70eV (Agilent technologies)

Réglage de la source : Les températures de la source et du quadripôle sont respectivement de 150°C et 230°C. Le gaz vecteur est à une pression de 36 psi. L'ionisation par impact électronique 70eV. Deux modes sont utilisés au cours de l'étude : Total Ion Current (TIC) qui réalise un scan de chaque molécule et Selected Ion Monitoring (SIM) focalisant les ions sélectionnés sur une fenêtre de temps donnée. Le mode scan est réglé tel que les masses de 35 à 500 uma soient

balayées à une vitesse de 7,76 scan/s. Les banques de données utilisées pour l'identification de molécules à partir de spectres de masses sont les bases NIST, WILEY et celle interne au laboratoire.

Méthode chromatographique :

 T° injecteur : 250°C

Ligne de transfert : 300 °C

Gaz vecteur: He

4.5.1 Méthode chromatographique GC-MS appliquée à l'analyse de la fraction volatile des huiles essentielles sur colonne HP1 (apolaire)

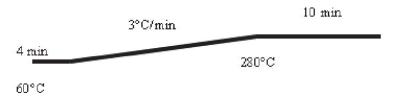
Méthode chromatographique :

Volume d'injection : $0.2 \mu L$

Injection split 100:1

Débit constant : 1,3 mL/min

Programmation en température :



Echantillon : Huile essentielle sans prétraitement

4.5.2 Méthode chromatographique GC-MS appliquée à l'analyse de la fraction volatile des huiles essentielles sur colonne Innowax (polaire)

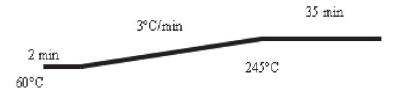
Méthode chromatographique:

Volume d'injection : $0,2~\mu L$

Injection Split 100:1

Débit constant : 1,3 mL/min

Programmation en température :



Echantillon : Huile essentielle sans prétraitement

4.5.3 Méthode chromatographique GC-MS appliquée à l'analyse des PMF

<u>Colonne moyennement polaire</u> : DBXLB, 30m x 250 μ m x 0,25 μ m Agilent Technologies

Méthode chromatographique :

T° injecteur: 320°C

Volume d'injection : $0.2~\mu L$ Injection splitless pulsée Débit constant : 1~mL/min

Programmation en température :



Méthode SIM appliquée à l'analyse des PMF d'huiles essentielles de bergamote, mandarine, pamplemousse et orange :

Voici les ions sélectionnés pour mettre la méthode SIM en place. Chaque groupe correspond à une fenêtre de temps disctinctes, afin de cibler chacunes des PMF et d'abaisser le bruit de fond.

Groupes	Masses ions (uma) 1	Masses ions (uma) 2	Masses ions (uma) 3
Groupe 1	371	387	402
Groupe 2	314	357	372
Groupe 3	284	327	342
Groupe 4	401	417	432
Groupe 5	371	387	402
Groupe 6	371	387	402
Groupe 7	313	357	372

Table 4.2: Ions sélectionnés pour la méthode SIM

Chaque groupe d'ions est analysé sur une fenêtre de temps réduite car ces ions ne sont pas parfaitement spécifiques des PMF. Les fenêtres de temps doivent être établies selon l'état de la colonne.

<u>Echantillon</u>: huiles essentielles purifiées (cf section 4.2) pour les huiles essentielles de mandarine, pamplemousse et orange. Huiles essentielles sans prétraitement pour celles de bergamote et citron.

Methode par extraction d'ion appliquée à l'huile essentielle de citron :

Une extraction des ions 327, 357, 387 et 417 est effectuée. Cette méthode d'exploitation a permis d'abaisser la limite de détection et d'éliminer les coélutions présentes lors de la méthode SCAN. Pour cet agrume, le mode SIM n'a pas été utilisés. En effet les teneurs variables en PMF n'ont pas permis de sélectionner une fenêtre de temps pour chaque molécule, adaptée à tous les échantillons.

4.5.4 Méthode chromatographique GC-MS appliquée à l'analyse chirale

Les méthodes chromatographiques sur colonnes chirales sont identiques à celles employées en GC-FID. Seul le gaz vecteur est différent car le dihydrogène, utilisé en GC-FID réagirait

avec les ions issus de la fragmentation.

4.6 L'analyse isotopique

<u>Appareillage</u>: C/py-IRMS modèle isoprime de la société GV instrument (Manchester, United Kingdom).

La source est réglée afin d'obtenir un compromis entre répétabilité et intensité du signal. Pour l'analyse du carbone la stabilité du signal est privilégiée au dépend de l'intensité, pour l'hydrogène la source est paramétrée pour un maximum d'intensité avec une stabilité acceptable. Toutes les dix analyses des « pics center » automatiques sont réalisés afin de refocaliser le faisceau d'ions en adaptant le voltage (accelerating voltage) de la source (cf. figure 4.3). Ceci permet de conserver une bonne répétabilité de mesure au cours d'une longue série d'analyse.

L'analyse isotopique n'est pas aussi robuste que peuvent être celles en GC-FID ou en GC-MS. Afin de vérifier le bon fonctionnement, avant chaque série d'analyse, la stabilité et la linéarité de l'IRMS sont vérifiées. Il s'agit d'injecter consécutivement 10 fois la même concentration (stabilité) ou des concentrations différentes (linéarité) d'un gaz référence dont les valeurs isotopiques sont connues. L'appareil est prêt à l'emploi, s'il remplit les conditions données par le constructeur, c'est-à-dire si la stabilité et la linéarité donne un écart type inférieur à 0,3 \% pour les rapports isotopiques du carbone et inférieur à 4\% pour les rapports isotopiques de l'hydrogène. En effet l'analyse du deutérium est moins répétable car il est 100 fois moins abondant que le carbone 13. L'appareil est certifié linéaire entre 1 nA et 10 nA (données constructeur). En pratique, pour la plupart des molécules les résultats sont linéaires jusqu'à 15 nA, tandis que pour des intensités inférieures à 1nA, la linéarité de la mesure devra être démontrée au cas par cas. Ensuite un mélange de 4 ou 5 paraffines avec une méthode adaptée à la colonne utilisée, est analysé afin de vérifier l'injection, la colonne et, la combustion ou la pyrolyse. Chaque appareil de mesure isotopique que ce soit en AE-IRMS ou GC-C/py-IRMS possède un biais qui lui est propre suivant la molécule analysée. L'utilisation de standards certifiés par l'IAEA permet de mesurer le biais de l'appareil afin de s'en affranchir, les valeurs obtenues sont ensuite corrigées.

N'ayant pas de molécule standard validée par l'IAEA, nous devons donc analyser les molécules d'intérêt sur l'AE-IRMS pour obtenir des valeurs dans le référentiel international que l'on utilisera en mélange comme standard en GC-C/Py-IRMS et qui permettront la correction. Au début de chaque série d'analyse ces mélanges de standards sont injectés deux fois, puis injectés une fois toutes les dix analyses.

Aussi les tubes à combustion et pyrolyse ont une durée de vie limitée. Dans le cas du carbone, le tube doit être ré-oxydé régulièrement par passage d'oxygène gazeux. En ce qui concerne le tube à pyrolyse, celui-ci ne pouvant être régénéré (pas de montage sur ISOPRIME pour la

régénération et hydrogène dangereux à haute température), sa durée de vie sera plus courte. Travailler avec un tube dégradé, entraine une combustion ou pyrolyse incomplète des molécules d'où des valeurs isotopiques erronées.

4.6.1 Conditions expérimentales en GC- C-IRMS ¹³C

La vérification de facteur 18 O permet d'évaluer la nécessité de régénérer le tube à combustion. Ce facteur est utilisé comme correction pour obtenir la valeur finale. Cette valeur doit donc être rigoureusement contrôlée. En effet lorsque le tube manque de CuO réducteur, la valeur de l' 18 O sature autour de -50 δ 18 O. Pour travailler dans de bonnes conditions l'expérience montre qu'il faut travailler entre -5 et -40 δ 18 O. Un flux d'oxygène balaye le tube pendant toute une nuit afin de le régénérer. Après ré-oxydation du tube à combustion, il est nécessaire de laisser un flux d'hélium pendant quelques minutes avant analyse afin d'éliminer l'oxygène restant dans le tube. Les mesures sont corrigées uniquement si l'écart est supérieur à 0,6 % entre la valeur en AE-IRMS et celle en GC-C-IRMS.

Les paramètres de la source utilisés sont les suivants :

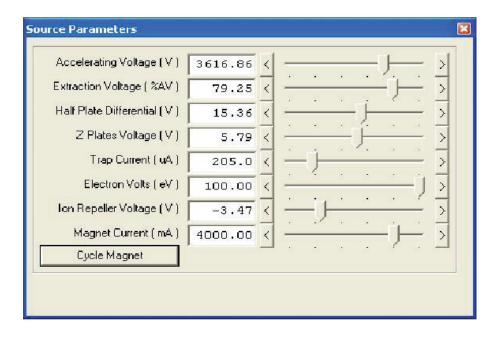


FIGURE 4.3: Paramètres de la source établie avec le logiciel d'exploitation Isoprime, pour l'analyse isotopique du ^{13}C

L'accelerating voltage est réajusté toutes les 10 analyses suivant l'état de la source.

Paramètres communs aux analyses isotopiques du carbone 13:

Séparation GC:

GC-FID: Agilent 6890N Technologies (Santa Clara, United States)

Méthode isotopique :

Standard externe en bouteille de gaz CO₂ de valeur isotopique connue, mesurée sur autre appareil IRMS.

Méthode chromatographique :

T° injecteur : 260° C

Volume d'injection : 1 μL

4.6.1.1 Application à l'analyse de terpènes des citrus

Méthode isotopique:

Analyse FID jusqu'à 5 minutes pour éliminer le solvant

Ensuite analyse IRMS de l'α-pinène, sabinène et myrcène

Analyse FID à partir de 16 minutes

Méthode chromatographique:

Colonne polaire: Innowax, 60m x 250µm x 0,25µm Agilent Technologies (Santa Clara, United

States)

Split 100:1-120:1

Débit constant : 1,5 mL/min

Programmation en température : isotherme à 90°C pendant 16 min

Echantillon: Huile essentielle sans prétraitement.

Méthode chromatographique appliquée à l'analyse isotopique de l' α -pinène, le sabinène et le myrcène de la bergamote, citron et mandarine :

L'analyse est un peu différente car ces huiles contiennent plus de β -pinène et cela affecte la résolution de ce composé avec le sabinène.

Injection split 120:1

Débit constant : 1,5 mL/min

Programmation en température : isotherme de 70 °C pendant 16 minutes.

Echantillon : Huile essentielle sans prétraitement.

Méthode chromatographique:

Colonne polaire: Innowax, 60m x 250µm x 0,25µm Agilent Technologies (Santa Clara, United

States)

Split 100:1

Débit constant : 1,5 mL/min

Programmation en température : isotherme à 90°C pendant 20 min

Echantillon: Huile essentielle à une dilution de 100:1

4.6.1.2 Application à l'analyse du linalol et acétate de linalyle de la bergamote et des lamiacées

Méthode isotopique :

Analyse FID jusqu'à 15 minutes

Ensuite analyse IRMS du linalol et acétate de linalyle

Analyse FID à partir de 42 minutes

Méthode chromatographique:

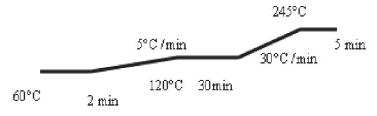
Colonne polaire : Innowax, 60m x 250 μ m x 0,25 μ m Agilent Technologies (Santa Clara, United

States)

Split 80:1

Débit constant : 1,5 mL/min

Programmation en température :



Echantillon : Huile essentielle diluée 5 fois.

4.6.1.3 Application à l'analyse du citral

Méthode isotopique :

Analyse FID jusqu'à 4 minutes

Ensuite analyse IRMS du linalol et acétate de linalyle

Analyse FID à partir de 12 minutes

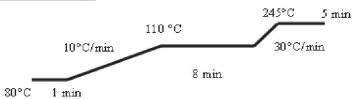
Méthode chromatographique:

Colonne DBXLB 30m x 250µm x 0,25µm Agilent Technologies (Santa Clara, United States)

Injection split 30:1

Débit constant : 1,2 mL/min

Programmation en température :



La méthodologie a été adaptée aux échantillons dégradés.

Echantillon: Huile essentielle sans prétraitement.

4.6.2 Conditions expérimentales en GC-py-IRMS ²H

Le suivi de l'évolution du tube à pyrolyse est moins aisé en analyse du deutérium. L'injection régulière de paraffines permet de vérifier que l'écart ne varie pas de manière significative entre les valeurs obtenues au cours de la série d'analyse. Le procédé de correction est différent de celui appliqué pour l'analyse du carbone. En effet l'incertitude de l'AE-IRMS est trop importante pour que la valeur obtenue soit utilisée comme correction. Par contre cette valeur permet d'évaluer le biais de l'appareillage et de pouvoir comparer nos résultats à la littérature. Les valeurs sont donc corrigées par rapport à la première mesure du rapport isotopique des standards des molécules analysées, afin que les valeurs obtenues ne soient pas dépendantes du remplissage du tube et de son évolution.

L'analyse en deutérium comporte un risque de pyrolyse incomplète d'une molécule, entrainant ainsi une importante erreur sur la valeur isotopique obtenue. L'ajout d'un standard synthétique, élué sur le même isotherme que les molécules cibles, permet de vérifier le bon déroulement de l'analyse (décanal, citronnellal). En effet le standard doit avoir une valeur stable au cours des analyses. De cette manière nous nous assurons qu'un rapport isotopique anormal

est effectif et ne relève pas d'une erreur analytique. En cas de valeurs anormales du standard ajouté l'analyse sera répétée. Ce standard est en large excès car la molécule peut exister dans l'échantillon. Il est donc nécessaire que la valeur isotopique intrinsèque ne modifie pas celle du standard.

Les paramètres d'analyses utilisés sont les suivant :

Paramètre de la source :

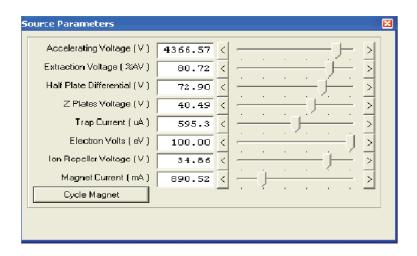


FIGURE 4.4: Paramètres de la source établis avec le logiciel d'exploitation Isoprime, pour l'analyse isotopique de 2H

L'accelerating voltage est réajusté toutes les 10 analyses suivant l'état de la source.

Séparation GC:

GC-FID : Agilent 6890N Technologies (Santa Clara, United States) Colonne polaire : Innowax, 60m x 250µm x 0,25µm Agilent Technologies (Santa Clara, United States)

Paramètres communs aux analyses isotopiques du ²H:

<u>Méthode isotopique</u> : Standard externe en bouteille de gaz ²H de valeur isotopique connue, mesurée sur autre appareil IRMS.

Les conditions chromatographiques sont identiques à celles développées pour l'analyse du carbone (cf. chp. 4.6.1) quand elles existent, seule la quantité injectée varie.

4.6.2.1 Application à l'analyse du linalol et acétate de linalyle de la bergamote et des lamiacées

Méthodes chromatographique et IRMS en section 4.6.1.2

Echantillon : Huiles essentielles diluées 4 fois, plus un ajout de 5 μ L de décanal.

4.6.2.2 Application à l'analyse du citral

Méthodes chromatographique et IRMS en section 4.6.1.3

Split: 20:1

Echantillon: Huiles essentielles sans prétraitement, plus un ajout de 5 µL de citronellal.

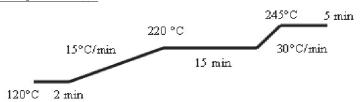
4.6.2.3 Application à l'analyse de N-méthyle anthranilate de méthyle en deutérium

Méthode chromatographique :

Split 5:1-2:1

Débit constant : 1.5 mL/min

Programmation en température :



Methode isotopique:

Analyse FID jusqu'à 12 minutes

Ensuite analyse IRMS du N-méthyle anthranilate de méthyle

Puis analyse FID après 20 minutes

Echantillon: Huiles essentielles sans prétraitement

4.6.2.4 Conditions expérimentales en AE-IRMS ¹⁵N

Ces analyses ont été réalisées par l'équipe « analyse organique et isotopique » du SCA. Tout comme en GC-C/py-IRMS l'appareil est en fonction après le contrôle de la stabilité et de la linéarité de la source.

Le standard international USGS-40 (L-glutamic acid) est utilisé pour calibrer l'appareillage.

Appareillage:

L'appareillage est un analyseur élémentaire Flash EA 1112 couplé à un spectromètre de masse des rapports isotopiques Thermo Delta V plus (Waltham, United States).

La combustion a lieu dans tube à combustion plongé dans un four à 900 °C sous courant d'hélium (débit de 90ml/min) additionné, lors de l'introduction de l'échantillon, d'un débit d'oxygène de 180 ml/min pendant 5 secondes.

4.7 Calculs d'incertitudes et valeurs limites

L'ensemble des données obtenues a été considéré comme suivant la loi normale des probabilités. L'écart-type associé qui décrit les variations de la distribution autour de la moyenne est calculé tel que :

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (x-x)^2}{(n-1)}}$$

4.7.1 Intervalles de confiance

L'intervalle de confiance sur n répétion de mesures de moyenne μ et d'écart-type σ , permet de déterminer l'incertitude sur un résultat. Il constitue l'intervalle autour du résultat à l'interieur duquel il y a une forte probabilité que la « vraie » valeur se situe. Cette probabilité est appelée le degré de confiance du résultat. L'encadrement est calculé par la formule suivante :

$$I=t\frac{\sigma}{\sqrt{n}}$$

avec t coefficient de Student correspondant à un niveau de confiance choisi.

La valeur du résultat est alors comprise entre : μ +/- I

Voici un extrait de la table donnant la valeur du coefficient à des probabilités α de 67, 95, 99, 99,9 % à différents degrés de liberté n (degré de liberté égale au nombre de mesures moins 1).

n/α	0,67	0,95	0,99	0,999
1	1,73	12,7	63,7	637
2	1,26	4,30	9,92	31,6
3	1,15	3,18	5,84	12,9
4	1,10	2,78	4,60	8,61
5	1,07	2,57	4,03	6,87
10	1,02	2,23	3,17	4,59
100	0,972	1,98	2,63	3,39
1000	0,968	1,96	2,58	3,30

Figure 4.5: Table des coefficients de Student en fonction du degré de liberté et du degré de confiance

Ce calcul sera utilisé au cours de l'étude pour le calcul d'incertitude expérimentale d'une mesure à un degré de confiance de 99 %[98].

L'intervalle de confiance pour une mesure individuelle m, est l'intervalle admis sur un résultat d'après une série de mesures, de moyenne μ et d'écart-type σ , d'un même paramètre sur des échantillons différents. Dans notre étude cela sera utile pour déterminer les valeurs limites d'un résultat, intervalle à l'intérieur duquel une mesure sera considérée comme normale [98].

Le calcul est le suivant : $I = t^*\sigma$

Les bornes supérieures ou inférieures sont alors calculées de la manière suivante : μ +/- I

4.8 Méthodologie pour le contrôle de la naturalité

4.8.1 Choix des analyses et molécules cibles

Le chapitre stratégie analytique fait le point, grâce à la littérature, sur les différentes analyses intéressantes à effectuer en vue de la détermination de la fraude. Toutes ne se sont pas révélées pertinentes. Seules les analyses discriminant les échantillons de référence et les échantillons fraudés volontairement sont conservées. L'analyse doit-être fiable tant au niveau de son résultat que de son interprétation. Quand cela est pertinent, les analyses sont ensuite corrélées les unes aux autres, afin d'affiner la discrimination. Ceci permettra aussi de mesurer la fiabilité des interprétations des résultats.

4.8.2 Analyse statistique

Le but de cette étude est d'identifier des échantillons fraudés en utilisant le moins d'analyses possibles afin de mettre en place une méthodologie rapide et efficace. Dans la littérature, l'interprétation du profil de la fraction volatile obtenue par GC-FID est à mon sens sous-exploitée. Si en 1992 Dugo et al. [57], mettent en évidence quelques rapports entre certains pourcentages relatifs d'intérêt (cf. section3.2.1). La piste d'une étude statistique approfondie n'a pas été suivie. Or la détermination d'échantillons fraudés à l'aide d'une méthodologie statistique présente un intérêt certain par rapport à une norme classique type AFNOR. En effet, une norme est basée sur une dizaine de molécules alors qu'un modèle statistique considère l'ensemble des composés étudiés. Même si un nombre réduit de teneurs relatives est conservé, ces teneurs sont représentatives de la composition complète de l'huile essentielle car le modèle tient compte des corrélations entre teneurs relatives. Ceci n'est pas le cas pour une norme classique, qui n'indique que des fourchettes à respecter, sans corrélation spécifique entre les différentes teneurs mesurées. Par exemple, pour une mandarine : on peut mesurer des teneurs en limonène et en γ-terpinène acceptables selon la norme alors que leurs proportions relatives montre que l'échantillon n'est pas « naturel ». Dans ce cas l'analyse statistique est plus riche en ce sens qu'elle n'est pas restrictive dans la composition des groupes et permet de faire apparaître des individus atypiques ou intermédiaires par rapport à la norme.

Notre base d'échantillons contient un certain nombre d'échantillons oxydés et dégradés. Les teneurs relatives modifiées lors de l'oxydation et de la dégradation des échantillons sont connues et ne sont pas prises en compte individuellement, lors de l'étude statistique. En effet le γ -terpinène et l' α -terpinène se dégradent en p-cymène et le limonène s'oxyde. Ainsi pour ne pas confondre dégradation et adultération, les paramètres suivant sont sommés :

- α-terpinène, p-cymène et γ-terpinène
- limonène et ses oxydes

Pour construire la base de données et pouvoir établir des relations entre teneurs analytiques et fraudes, nous avons adultéré au laboratoire des échantillons référents (dits sûrs) conformément aux fraudes connues de l'huile essentielle des citrus et des lamiacées (cf. section 3.2).

Les paramètres explicatifs ont été sélectionnés via l'analyse en PLS-DA (cf. section 2.6.2) effectuée sur l'ensemble des molécules présentes dans les huiles essentielles étudiées, ainsi qu'un important nombre de rapports de teneurs relatives, de valeurs stables pour des huiles essentielles authentiques. De cette manière, la discrimination est maximisée et la subjectivité de l'analyse minimisée. Les paramètres suivants, mis en évidence comme les plus discriminants sont sélectionnés :

Bergamote	Citron	Mandarine	Lavande
octène-1-ol	α-thuyène	α-thuyène	myrcène
myrcène	α-pinène	α-pinène	δ-3-carène
δ-3-carène	camphène	β-pinène	M-myrcène + α-terpinène
E-β-ocimène	sabinène	octanal	P-cymène
nonanal	β-pinène	δ-3-carène	limonène
α-terpinéol	α-phellandrène	y-terpinène + α-terpinène + P-cymène	Z-β-ocimène
décanal	8-3-carène	limonène + oxydes	E-β-ocimène
octyl-acétate	limonène + oxydes	β-phellandrène	y-terpinène
géraniol	β-phellandrène	E-β-ocimène	camphre
géranial	Z-β-ocimène	terpinolène	terpinène-4-01
acétate de bornyle	E-β-ocimène	nonanal	a-terpinéol
undécanal	E-thuyanol-4	α-terpinéol	butyrate d'hexyle
acétate de géranyle	linalol	citronnellol + nérol	géraniol
β-élémène	Z-thuyanol-4	E-2-décénal	acétate de linalyle + géranial
dodécanal	Citronnellal	thymol	E-β-caryophyllène + β-santalène
E-β-farbésène	terpinène-4-ol	N-méthyl anthranilate de méthyle	linalol/acétate de linalyle
β-santalène	α-terpinéol	E-β-caryophyllène	linalol/acétate de lavandulyle
β-bisabolène	nérol	germacrène D	acétate de linalyle/acétate de lavandulyle
spathulénol	géraniol	α-sélinène	propionate d'hexyle/camphre
β-pinène/sabinène	perillaldéhyde	tétradécanal	E-β-ocimène/camphre
α-pinène/limonène	phéllandral	y-terpinène/limonène	
β-pinène/limonène	acétate de néryle	NMAM/y-terpinène	
y-terpinène/limonène	acétate de géranyle	α-sinensal	
acétate de géranyle/géranial	géraniol/géranial	α-pinène (-)	
β-pinène/linalol	nérol/néral	Sabinène (+)	
y-terpinène/linalol	terpinène-4-ol/citronellal	terpinène-4-ol/t-thuyanol 4	
sabinène (+)	β-pinène/limonène	terpinène-4-ol/citronnellal	
néral/géranial	sabinène/β-pinène	terpinène-4-ol/decanal	
	sabinène/γ-terpinène		
	sabinène (+)		

Table 4.3: Molécules et rapport de molécules dont les teneurs ont été sélectionnées pour la réalisation de l'ACP

Nous avons choisi de faire une première ACP utilisant au départ les pourcentages relatifs de toutes les molécules de la fraction volatile et la chiralité des monoterpènes. Ces résultats

sont tous obtenus par GC-FID et nous donnent une information plus complète donc plus discriminante que si l'on analyse chacune des techniques séparément. Afin de ne pas créer une discrimination erronée des échantillons défurocoumarinés des huiles essentielles de citron, les teneurs relatives en sesquiterpènes n'ont pas été prises en compte, car sont très souvent eux aussi éliminés lors du procédé de purification.

Dans un premier temps, les huiles essentielles dites de référence ainsi que d'autres fraudées au laboratoire, sont utilisées afin de déterminer statistiquement les paramètres permettant leur discrimination : sur les 80 à 150 variables de départ, seules 20 à 30 sont ainsi conservées. Dans une deuxième étape, l'ACP est réalisée sur les variables retenues. En n'utilisant que trois ou quatre composantes principales, on conserve plus de 60% de l'information initiale. Ceci est du au fait que les teneurs relatives sont pour la majeure partie corrélées entre elles. Il a été choisi de représenter les graphiques sur 2 ou 3 plans plutôt qu'en 3 dimensions, car la visualisation graphique y est plus aisée.

L'ACP est utile en plusieurs points :

- Premièrement, elle permet de représenter graphiquement en 2 ou 3 dimensions le tableau multi paramétrique de départ. Ainsi sur les plans choisis (PC1-PC2, PC1-PC3 et PC2-PC3), il est possible d'observer les points géométriquement proches et éloignés donc d'identifier les échantillons fraudés des échantillons conformes à l'attente. L'ellipse de densité (ou de tolérance), tracée par le logiciel selon l'écart type de la série de données des échantillons de référence, établie les limites de naturalité. Un échantillon extérieur à l'ellipse est considéré comme non conforme.
- Deuxièmement, elle permet de mettre en valeur les corrélations entre les variables de départ (corrélation, anti-corrélation ou indépendance entre les variables). Ceci permet d'établir les relations entre les différentes analyses et de fiabiliser l'interprétation des résultats. Ces corrélations sont visibles sur le cercle des corrélations de rayon 1; si un vecteur (représentant la projection d'une variable de départ) est voisin de 1, il est bien projeté sur le plan considéré et donc la variable associée interprétable. Si deux vecteurs bien représentés sont proches, cela indique une forte corrélation entre les variables; si ces deux vecteurs sont opposés, les variables sont anti-corrélées, enfin, s'ils sont orthogonaux, les deux variables sont indépendantes.

Une fois l'ACP réalisée, des échantillons inconnus sont projetés. Les échantillons proches des échantillons adultérés au laboratoire sont suspects et ceux proches des échantillons de référence

ne le sont pas. D'après l'ACP et toutes les analyses effectuées, certains échantillons commerciaux correspondent aux références et d'autres aux échantillons adultérés.

Les échantillons considérés comme insuffisamment discriminés sont quant à eux testés via l'analyse discriminante élaborée en utilisant les paramètres de l'ACP en intégrant les échantillons supplémentaires bien identifiés dans chacun des groupes.

Les références sont classées dans le groupe 1, les coupes orange et dérivés dans le groupe 2, les coupes avec des huiles hydro-distillées dans le groupe 3 pour la bergamote et la mandarine, le groupe 4 pour le mélange d'huile essentielle de mandarine et de feuilles.

L'analyse discriminante permet de savoir à quel groupe appartient l'échantillon inconnu testé. Les résultats sont exprimés en distance entre l'échantillon et le centre de gravité de chaque groupe. Plus la distance est courte plus l'échantillon a des probabilités d'appartenir à ce groupe. Cependant dans certains cas les distances calculées entre l'échantillon et le centre de gravité de chaque groupe sont très importantes et l'échantillon a de fortes probabilités de n'appartenir à aucun des deux groupes car il s'agirait d'une adultération non envisagée.

Les analyses complémentaires comme la chiralité ou l'isotopie servent ensuite à confirmer ou infirmer ces résultats. Certains résultats de ces analyses sont aussi représentés via une ACP, afin de discriminer graphiquement les échantillons adultérés. On prend en compte :

- les abondances isotopiques en deutérium et en carbone 13 du linalol et de l'acétate de linalyle, ainsi que leurs différences, en ce qui concerne les huiles essentielles de bergamote et lavande.
- l'analyse chirale du sabinène, la teneur en δ -3-carène et la teneur totale en PMF en ce qui concerne l'huile essentielle de citron
- Les abondances isotopiques en deutérium et en carbone 13 du géranial, du néral et de l'acétate de géranyle pour l'huile essentielle de citron

Ces résultats complémentaires ont été comparés à ceux obtenus par l'analyse statistique présentée ci-dessus.

Nous ne présentons pas ici une analyse globale avec l'ensemble des descripteurs; en effet si on conserve le grand nombre de variables du GC-FID l'influence des paramètres des analyses complémentaires n'est pas pertinente.

D'autre part le but de cette étude étant de réduire au maximum le nombre d'analyses indispensables à la détermination de la fraude il n'est pas nécessaire de rajouter des analyses selon le protocole que l'on cherche à proposer. Ces analyses complémentaires pourraient être utiles pour des cas de fraudes plus complexes ou pour une compréhension poussée de la fraude, mais pas toujours indispensables.

Chapitre 5

Résultats et discussions

5.1 Caractérisation des huiles essentielles et dégradation

Les profils GC-FID obtenus sur les deux colonnes sont étudiés afin d'obtenir le pourcentage relatif de chaque molécule présente. Le profil moléculaire qualitatif et semi-quantitatif de l'huile essentielle est ainsi établi.

La colonne polaire est utilisée pour vérifier les pourcentages et élucider les coélutions éventuelles. Il y a en effet trop de molécules présentes à des volatilités similaires pour que la résolution des pics chromatographiques soit suffisante sur le chromatogramme de la colonne apolaire. Ensuite les résultats sont comparés aux normes AFNOR correspondantes, s'il en existe pour l'origine de l'échantillon. Afin d'avoir un résultat complet, l'incertitude sur la mesure doit être connue et prise en compte lors de la comparaison à la norme. La répétabilité de l'injection et de l'analyse en GC-FID ont déjà été étudiées au sein du laboratoire. L'écart de confiance relatif, sur une répétition de 6 injections d'une même huile essentielle, a été calculé en fonction de l'ordre de grandeur des teneurs relatives, comme l'indique le tableau 5.1.

Teneur %	Incertitude injection %
<0,5	3
<1	2
< 5	1
< 10	1
< 20	0,6
< 45	0,3
>45	0,15

Table 5.1: Ecarts de confiance relatifs aux différentes teneurs

Nous avons porté une attention toute particulière aux échantillons les plus anciens, afin

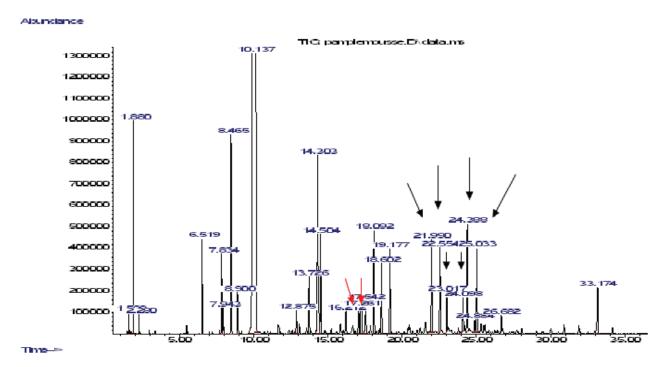
d'observer les effets de la photo-oxydation et de l'oxydation sur la composition moléculaire des échantillons. Certains ont été étudiés en GC-MS en vue d'identifier les molécules générées lors de la dégradation de l'huile.

La comparaison à la norme a donné des résultats variables selon l'huile essentielle étudiée. Cependant aucun des échantillons extraits au laboratoire n'est conforme à la norme. En effet, les normes sont établies pour des huiles essentielle issues de l'expression à froid et non de l'extraction par solvant.

5.1.1 Dégradation

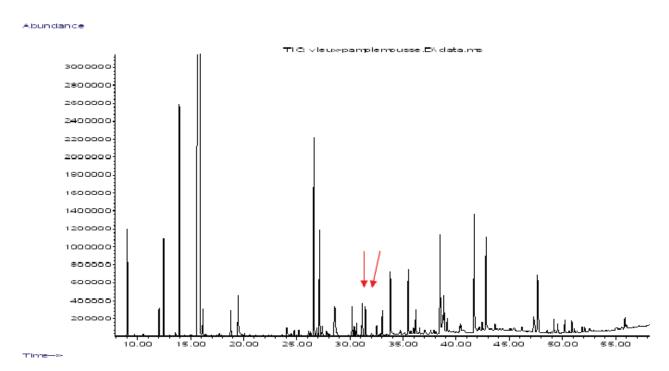
L'étude de la dégradation des huiles essentielles utilisées est indispensable car il est essentiel de ne pas confondre fraude et dégradation. Pour chaque huile essentielle de citrus, une étude comparative a été effectuée entre une huile fraiche et une huile conservée depuis plusieurs mois au laboratoire à température ambiante. Il a été remarqué que la majorité des dégradations sont identiques pour cette famille d'huiles essentielles car les compositions moléculaires sont peu différentes.

L'étude a en partie été complétée par GC-MS sur une huile essentielle de pamplemousse particulièrement dégradée, représentative des dégradations multiples existant pour l'ensemble des citrus. Il s'est avéré que la plupart des molécules identifiées étaient déjà préexistantes en très faible quantité dans des huiles essentielles fraîches. Les profils ont alors été complétés. La majorité des composés a été identifiée lors de l'analyse de l'huile essentielle de pamplemousse suivante (cf. figures 5.1 et 5.2) :



- \rightarrow Molécules très polaires issues de la dégradation et non-identifiées (non visibles sur colonne polaire)
- \rightarrow Molécules issues de la dégradation non-identifiées

FIGURE 5.1: Profil GC/MS d'une huile de pamplemousse oxydée sur colonne apolaire



- → Molécules très polaires issues de la dégradation et non-identifiées (non visibles sur colonne polaire)
- ightarrowMolécules issues de la dégradation non-identifiées

 $Figure \ 5.2: \textit{Profil GC/MS de l'huile essentielle de pamplemousse oxydée sur colonne polaire}$

Concernant la lavande, il n'a pas été nécessaire d'avoir recours à la GC-MS, car nous n'avons pas observé l'apparition de pics inconnus.

Cette étude rapide des dégradations et la comparaison avec des études effectuées précédemment au laboratoire ont permis d'arriver aux conclusions suivantes :

De nombreuses variations sont observées au sein des terpènes :

 Baisse du pourcentage relatif du limonène dont les doubles liaisons sont réactives à l'oxydation notamment :

$$CH_3$$
 H_3C
 CH_2
 H_3C
 CH_2
 Figure 5.3: Réaction d'oxydation du limonène

- Des terpinènes qui s'aromatisent en p-cymène de la manière suivante :

FIGURE 5.4: Réaction d'aromatisation des terpinènes

Les deux observations ci-dessus ont déjà été faites dans de précédentes études [44, 53] ainsi qu'au laboratoire. L'augmentation de la teneur en p-cymène est la plus marquée, lors de la dégradation d'une huile essentielle contenant un fort taux de γ-terpinène, elle est également toujours accompagnée de l'apparition d'oxydes. Ne contenant pas de γ-terpinène, les huiles essentielles de pamplemousse et d'orange sont moins sujettes à cette dégradation. L'augmentation des oxydes constitue alors la plus forte indication de photo-oxydation.

- Baisse de la teneur en myrcène et des Z et E- β -ocimènes assez réactifs car ils possèdent trois doubles liaisons.
- Apparition de carvéol et carvone en quantité significative, composés probablement issus de l'oxydation du limonène.
- Baisse de la teneur en aldéhydes linéaires et augmentation de la teneur en acides carboxyliques due à l'oxydation des aldéhydes.
- Augmentation de la teneur en oxydes accompagnée d'une baisse de la teneur en précuseurs : limonène, E-β-caryophyllène.
- On peut soupçonner de nombreuses apparitions d'oxydes, d'alcools, voire peroxydes issus de l'oxydation de certains terpènes dont, principalement le limonène, mais en trop faible quantité pour être formellement identifiés.
- Certains composés ne sont pas identifiés (indiqués par des flèches sur les chromatogrammes 5.1 et 5.2). Plus nombreux sur colonne apolaire que polaire, il pourrait donc s'agir de composés trop polaires non élués sur colonne polaire. Il pourrait s'agir de polyols issus de la formation d'époxydes.



FIGURE 5.5: Réaction d'ouverture d'un époxyde

Toutes ces variations sont dues à des transformations chimiques menant à des composés déjà préexistants ou à de nouveaux composés identifiés ou non (cf. spectres de masse des molécules citées ci-dessus en annexe).

Cependant il faut rester prudent lors de l'interprétation des variations des pourcentages relatifs car elles sont aussi dues à l'évaporation des composés les plus volatils.

Ces dégradations sont surtout présentes dans les huiles essentielles de citrus mais n'en restent pas moins présentes dans les huiles essentielles de lamiacées. Cependant, la teneur des monoterpènes les plus affectés par les dégradations, étant moins importante, les transformations le seront d'autant moins. Pour la lavande, la dégradation des Z et E-β-ocimène est la plus

notable et s'avère parfois très importante.

En conclusion, l'ensemble de ces paramètres ne sont pas à négliger lors de la détection de la fraude.

5.1.2 Huiles essentielles de citrus

Les analyses réalisées sur GC-FID avec colonne polaire et apolaire ont permis l'identification de 98,5 à 99,9% des molécules de la fraction volatile des huiles essentielles de citrus. Pour chacune des huiles essentielles de citrus étudiées, il existe une norme AFNOR correspondant à une origine géographique précise (ref norme, bergamote NF ISO 3520 (fév 1999), citron NF ISO 855 (mai 2004), mandarine NF ISO 3528 (nov 1997)) ou générale (orange ISO/FDIS 3140 (Mai 2011), pamplemousse NF ISO 3053 (janvier 2005)). Les teneurs relatives établies sont comparées à la norme correspondant à l'échantillon. Ceci constitue la première étape de la détection de la fraude.

Cependant aucune conclusion définitive n'est tirée de ses résultats. En effet, une norme ne considérant qu'un nombre limité de molécules, nous nous sommes apperçus que certains échantillons peuvent être conformes à la norme mais tout de même fraudés. Inversement certains échantillons peu éloignés de la norme peuvent ne pas avoir été adultérés.

Dans cette partie sont présentées les teneurs relatives des molécules normées. Nous avons de cette manière vérifié la conformité à la norme. Les taux de δ-3-carène sont aussi reportés car c'est un marqueur important caractéristique de l'orange, ce composé étant absent ou seulement présent à des teneurs maximales de 0,006 % dans les huiles de bergamote et citron notamment. Le cas du pamplemousse est plus complexe car des teneurs variables de ce composé ont été rapportées (cf section 1.3.5.2).

Le valencène est aussi un marqueur de l'orange mais il est difficilement identifiable car coélué sur les deux colonnes.

Des molécules marqueurs d'oxydation (p-cymène, Z et E-limonène-oxyde) de l'huile essentielle ont été ajoutées aux profils normés habituels utilisés; ainsi les échantillons dégradés pourront être identifiés facilement.

5.1.2.1 Huile essentielle d'orange

Ci-après (cf. tableau 5.2) sont présentés les pourcentages relatifs des composés décrits en section 5.1.2 obtenus après analyse GC-FID de la fraction volatile des huiles essentielles d'orange.

	α-pinène	Sabinène	8-vinène	octanal	mvrcène	limonène	nonana	linalol	décanal	néral	aéranial	valencène	β- sinensal	ō-3- carène	c. Imonène	c. t. Imonène limonène	,
REF		%	%	%	%	%	%	%	%	%		%		%	oxyde %	oxyde %	conformite
081	6,0	6,0	0,02	0,31	1,9	94,6	0,04	0,42	6,0	0,04	0,10	0,04	0,04	20'0	0,02	0,02	C
082	5'0	4'0	0,03	0,31	2,0	94,6	90'0	0,42	6,0	0,02	90'0	0,10	0,03	0,11	900'0	10'0	С
0B3	5'0	4'0	0,03	0,31	1,8	94,0	50'0	0,45	6,0	0,04	80'0	0,10	0,03	0,11	90'0	0,03	С
084	5'0	6,0	0,02	0,22	1,8	94,5	0,04	0,43	0,2	0,03	60'0	0,03	0,02	0,11	90'0	0,03	C
085	6,0	6,0	0,03	0,27	1,9	94,6	0,04	0,53	6,0	0,05	60'0	90'0	90'0	60'0	600'0	0,016	С
0CR6	5'0	6,0	0,02	05,0	1,8	94,6	80'0	0,45	4'0	60'0	60'0	0,02	0,02	0,02	60'0	0,02	NC
0CR7	6,0	6,0	0,02	0,52	1,8	94,6	80'0	0,45	9'4	0,05	0,10	0,02	0,02	0,02	10,0	10'0	NC
0EV8	6,0	0,2	0,02	0,25	1,8	93,7	0,04	0,45	6,0	0,05	0,10	50'0	0,03	70'0	0,1	90'0	С
0EV9	5'0	6,0	0,02	0,41	1,9	946	50'0	0,44	6,0	50'0	0,10	50'03	0,02	90'0	90'0	60'0	C
0110	6,0	6,0	90'0	0,11	1,9	95,0	0,02	0,28	1,0	0,03	0,04	0,11	0,02	0,21	600'0	0,02	С
0111s-df	6,0	6,0	0,04	0,23	1,8	94,3	0,03	0,42	6,0	0,08	80'0	0,05	0,03	0,12	200'0	0,02	С
0l12d	6,0	2'0	70'0	0,34	2,0	94,0	90'0	0,35	6,0	0,05	60'0	0,05	0,03	0,16	200'0	10'0	С
0113s	6,0	6,0	90'0	0,21	1,9	94,9	0,03	0,32	0,2	0,05	0,10	80'0	0,01	0,14	Ю'0	10'0 .	U
OM14s-df	5'0	0,2	0,02	0,16	2,0	94,8	0,03	0,37	0,2	0,05	20'0	0,04	0,03	60'0	<0.005	800'0	NC
0115	9'0	5'0	0,04	0,19	2,0	95,3	0,02	0,40	0,1	0,03	0,03	Ю'0	<0,005	0,17	800'0	10'0	NC
0116	6,0	0,4	0,04	0,14	1,9	94,6	0,03	96,0	0,2	0,05	90'0	0,01	0,02	0,14	0,02	0,02	С
0117	6,0	5'0	0,03	0,19	1,9	94,1	0,03	65'0	0,2	90'0	10'0	0,12	0,04	0,17	800'0	10'0	NC
0i18-df	6,0	6,0	90'0	0,17	1,6	94,4	0,04	0,48	0,4	0,04	60'0	0,10	0,02	0,10	0,11	90'0	NC
0i19	9'0	0,3	0,02	0,41	1,9	94,8	90'0	0,45	9'4	90'0	60'0	0,03	0,02	0,02	0,005	600'0	U
0i20	9'0	0,3	0,02	0,42	1,9	96,4								0,02			0
0i21	6,0	6,0	0,02	0,61	1,9	93,8	60'0	0,53	6,0	0,05	60'0	0,02	0,02	0,02	Ю'0	0,01	NC
0i22	0,5	6,0	0,02	09'0	1,9	94,3	60'0	0,51	9'4	<0.005	0,03	Ю'0	0,03	0,02	0,005	600'0	SC
moyennes	9'0	6,0	0,03	0,31	1,88	94,56	90'0	0,43	0,3	90'0	80'0	90'0	0,03	0,02	60'0		
écarts types	50'0	0,11	0,02	0,15	60'0	75'0	0,02	20'0	0,10	0,01	0,03	0,04	0,01	0,0	90'0		
écarts types relatifs %	10	ઝ	53	47	5	1	47	17	34	29	36	72	88	35	ន		
0i23dt	<0,005	10'0	500'0>	0,04	60'0	40,4	1,8	6,83	14,3	1,35	4,28	2,08	0,21	10'0	0,18	0,15	0
0i24hd	5'0	6,0	0,02	96,0	1,6	658	20'0	6,0	6,0	6'0	p0'0	0,02	1,0	0,02	0,02	0,02	0
Norme	0,4-0,8	0,2-0,8	0,02 - 0,15	0,1-0,4	1,5 - 3,5	90'0 - 10'0 0'96 - 0'86	$\overline{}$	0,15 - 0,7	7'0-1'0	0,03 - 0,1	0,05-0,2	0,01 - 0,4	0,01 - 0,4 0,01 - 0,06				

TABLE 5.2: Teneurs relatives des composés normés de l'huile essentielle d'orange

En rouge : teneurs anormales selon la norme associée; En bleu : teneurs anormales, témoins d'oxydation; C : conforme à la norme associée; D : dégradé; 0 : aucune norme correspondante; L : extrait au laboratoire; Norme AFNOR ISO/FDIS 3140 (Mai 2011)

huit échantillons commerciaux ne correspondent pas à la norme. Ceci est innatendu car l'huile essentielle d'orange est très peu onéreuse et n'est pas connue pour être fraudée. Ceci tend a prouvé qu'un échantillon hors-norme n'est pas nécessairement adultéré.

Le cas du δ -3-carène est un peu différent. Pour ce composé la variabilité est grande d'une huile essentielle d'orange à l'autre mais ce n'est pas une molécule normée. Etant un traceur de l'orange son étude est importante. Malheureusement la faible proportion de δ -3-carène dans certaines huiles essentielles d'oranges facilite l'addition de cette dernière dans celles de citrus si l'huile essentielle d'orange de départ a été bien choisie.

L'ajout d'huile essentielle distillée a été parallèlement étudiée. Elle présente un profil moléculaire contenant des teneurs plus hautes en limonène, et globalement plus basses pour les aldéhydes et plus hautes pour les alcools.

Le calcul des écarts types relatifs montre qu'excepté pour les β -pinène, nonanal, et valencène, la composition des huiles essentielles d'orange est plutôt constante. De plus ces teneurs sont assez faibles, ce qui explique les grands pourcentages de variation. Ceci permet d'affirmer que l'addition d'orange de toutes origines dans une huile essentielle de citrus aura des effets très similaires. Lors de nos adultérations au laboratoire, nous avons opté pour l'huile essentielle d'orange Oi19 qui possède un faible taux de δ -3-carène, ceci afin de créer une méthode de détection la plus sélective possible. Comme expliqué précédemment les profils d'orange étant relativement proches il n'a pas été jugé nécessaire d'utiliser différentes huiles essentielles d'orange pour adultérer nos citrus. Nous avons préféré faire varier l'huile essentielle de citrus cible.

5.1.2.2 Huile essentielle de bergamote

Ci-dessous (cf. tableau 5.3) sont regroupés les pourcentages relatifs obtenus des composés décrits en section 5.1.2. Ils ont été comparés à la norme relative à leur origine s'il elle existe. A ces teneurs ont été ajoutées celles du p-cymène et des Z et E limonène—oxydes, témoins importants de l'oxydation de l'huile essentielle de bergamote.

	8 ninàna	limonène	v-terninène	lolenil	acétate	déranial	R hiesholène		n-cymène	c-limonène- t-limonène	t-limonène-	
	%	%	%	%	de linalyle	%	%	% %	%	oxyde	oxyde	Conformité
RET DIM D	0.2	7 7	7.5	10	3,80	00.0	0.47	200 00	00.00	2000	% 0000	(
PII-K	n i	- +	0 1	n,	C,42	00'0) t-10	con'os	00'0	con'n	000'0	۰
BI2-R	5,7	<u>م</u> ا	6,4	13,8	34,4	0,28	66,0	<0,005	0,19	\$000\$	900'0	U
BI3-R	6,0	36,1	2'0	9,5	32,4	0,25	0,44	<0,005	0,13	0,03	0,02	U
BI4-R	6,0	40,7	7,2	8,9	27,5	0,25	0,47	<0,005	0,32	<0,005	900'0	C(Italie)
BI5-R	6,1	34,5	0'2	10,2	33,1	0,26	0,44	<0,005	0,16	<0,005	900'0	C
BI6-R	7,0	38,5	8,1	7,4	29,2	0,23	0,44	0,001	0,12	<0,005	<0,005	NC
BI7-R	9'9	36,6	7,5	8,8	30,2	0,41	0,44	<0,005	0,25	<0,005	200'0	O
B18	6,2	9'96	5,9	12,8	29,3	0,31	0,47	500'0>	59'0	10,0	0,01	C
B19	7,1	38,7	7,5	9,5	26,9	0,32	0,54	500'0>	0,49	0,02	0,02	C
BI10	6,5	39,7	6'9	9,4	27,2	06,0	0,44	<0,005	05'0	0,01	0,01	C
BI11	5,9	43,5	6,5	7,6	28,7	0,20	0,29	<0,005	1,07	0,01	0,01	NC
B112	5,2	48,3	5,5	6,4	26,0	0,19	96,0	500'0>	1,26	0,04	60,0	NC
BH3	5,8	42,7	7,3	5,6	28,4	0,21	0,49	<0,005	0,45	800'0	0,01	NC
BI14-df	5,2	48,1	5,3	6,5	26,3	0,17	0,36	<0,005	1,42	0,03	0,02	NC
BI15	5,9	42,9	6,5	7,7	29,2	0,21	0,27	<0,005	0,91	0,01	0,01	NC
BI16	6,1	45,0	7,2	7,0	25,8	0,22	0,42	<0,005	1,02	0,02	0,02	NC
B117	7,6	39,65	7,1	7,6	28,1	0,11	0,25	800'0	0,37	0,01	200'0	NC
BH8	6,8	38,1	6,1	10,3	28,6	0,19	0,21	<0,005	98'0	0,02	0,01	NC
BI19	7,0	38,1	6,2	9,9	28,1	0,12	0,21	<0,005	62'0	0,01	600'0	NC
BI20-df	6,0	40,9	9'9	7,7	30,8	0,23	0,26	<0,005	1,52	0,03	0,02	NC
B121	5,6	39,1	8'9	7,6	29,7	0,14	0,52	<0,005	78'0	0,04	0,03	NC
BI22-df	7,1	47,6	6,7	7,0	22,5	0,19	0,12	<0,005	2,12	0,04	0,03	NC
BI23	5,4	40,3	6,3	10,2	29,6	0,21	0,28	<0,005	62'0	0,02	0,01	NC
BI24	5,5	44,2	6,4	8,0	27,5	0,27	0,45	<0,005	1,52	<0,005	900'0	NC
B125	6,0	36,4	7,1	10,9	30,9	0,18	0,23	<0,005	0,18	0,03	50'0	NC
B126	6,8	36,6	9'9	10,4	30,2	0,21	0,40	<0,005	0,43	<0,005	<0,005	NC
BI27-df	5,8	39,8	5,7	7,9	30,6	0,04	0,43	<0,005	2,18	0,04	0,03	NC
BI28-df	5,6	39,8	5,8	13,7	28,1	0,24	0,32	<0,005	06,0	900'0	800'0	NC
BI29-df	8,3	36,6	9'9	8,3	27,6	06,0	0,26	<0,005	3,33	0,02	0,02	NC(dégradé)
BI30-df	5,9	43,4	5,8	7,6	28,6	0,22	0,29	<0,005	1,73	0,03	0,03	NC(dégradé)
BI31-df	6,5	36,3	5,1	12,2	31,4	80'0	0,13	0,007	2,13	0,04	0,02	NC(dégradé)
BI32-df	5,8	39,65	4,3	9,9	29,7	0,18	0,40	500'0	2,82	0,04	0,02	NC(dégradé)
BIC33-5	9'5	46,1	7,1	7,6	23,4	0,29	05'0	<0,005	06,0	0,005	800'0	O

					acétate					c-limonène-	t-limonène-	
	β-pinene	ene	y-terpinene	linalol	de linalyle	geranial	β-bisabolene δ-3-carène	ō-3-carène	p-cymene	oxyde	oxyde	Conformité
REF	%	%	%	%	· %	%	%	%	%	, %	, %	
BIC34-10	5,4	49,2	6,1	7,2	21,9	0,28	0,43	0,002	06,0	500'0	800'0	NC
BIC35-20	6,3	6'89	6,1	9'9	19,7	0,24	86,0	0,002	06,0	500'0	800'0	NC
BIC36-10+1std	5,1	46,6	8'9	9'6	23,5	0,27	0,41	0,002	0,28	500'0	800'0	NC
BIC37-10+2std	4,6	41,5	5,1	11,9	28,5	0,24	96,0	0,002	0,26	500'0	800'0	NC
BIC38-5	5,7	40,3	6,5	8'8	29,7	0,25	0,40	<0,005	0,20	£0'0	0,02	C
BIC39-10	5'5	43,0	6,2	8,1	28,0	0,24	96,0	<0,005	0,28	£0'0	0,02	NC
BIC40-20	4,9	47,8	5,4	7,7	25,7	0,23	96,0	0,004	0,44	£0'0	0,02	NC
BIC41-10+1std	5,2	40,5	9'9	10,5	29,2	0,22	96,0	<0,005	0,45	£0'0	0,02	NC
BIC42-10+1std	4,6	36,6	5,0	12,7	33,6	0,20	0,32	<0,005	0,40	60,0	0,02	NC
BIC43-5	5,4	35,9	6,0	12,7	31,6	0,27	0,37	<0,005	0,19	0,03	0,02	NC
BIC44-10	0'9	38,1	5,4	12,5	30,2	0,26	0,34	<0,005	0,19	500'0>	<0,005	NC
BIC45-20	4,7	43,6	5,1	11,1	27,3	0,25	0,32	0,004	0,19	500'0>	<0,005	NC
BIC46-10+1std	4,8	35,9	5,1	14,6	31,3	0,24	0,32	<0,005	0,18	500'0>	<0,005	NC
BIC47-10+2std	4,2	32,0	4,5	16,4	35,5	0,22	0,28	<0,005	0,16	<0,005	<0,005	NC
BICc48-5	6,3	37,3	2'9	9,1	9'08	06,0	0,42	500'0>	55'0	900'0	<0,005	C
BICc49-10	6,4	38,1	6,8	9,0	30,2	06,0	0,42	<0,005	0,55	900'0	600'0	O
BICc50-20	6,7	39,7	6'9	8,4	28,3	66,0	0,41	<0,005	95'0	800'0	600'0	O
BICc51-10+1std	6,1	36,0	6,4	11,3	31,3	0,28	0,40	<0,005	0,51	900'0	0,008	C
BICc52-10+2std	5,4	32,0	5,7	13,4	35,4	0,25	0,35	<0,005	0,46	500'0	0,008	NC
BICc53-5	6,1	33,2	6,0	13,0	32,4	0,33	96,0	<0,005	0,76	600'0	0,01	O
BICc54-10	6,3	34,7	6,1	12,5	31,0	76,0	0,37	<0,005	0,75	10'0	0,01	C
BICc55-20	8'9	37,6	6,4	11,4	28,1	0,47	96,0	<0,005	0,75	10,0	0,01	C
BICc56-10+1std	5,9	32,7	6,3	14,6	32,0	0,35	0,35	<0,005	0,21	600'0	0,009	C
BICc57-10+2std	5,3	29,1	5,1	16,4	36,1	0,31	0,31	<0,005	0,63	800'0	900'0	NC
BIC58-10-HW1	5,2	40,9	9'9	13,1	26,7	0,23	96,0	<0,005	0,46	900'0	900'0	NC

	o origina	oué nomil	ouéninat.v	lolouil	acétate	leiderán	onélodoid o		o cymono	c-limonène- t-limonène-	t-limonène-	
REF	%	%	%	%	de linalyle %	%	%	% %	%	oxyde %	oxyde %	Conformité
BIC58-10-HW1	5,2	40,9	9'5	13,1	26,7	0,23	96,0	<0,005	0,46	900'0	800'0	NC
BIC59-10-8HW7ac	5,1	39,7	9'9	7,5	34,0	0,22	96,0	<0,005	0,45	900'0	800'0	NC
BIC60-10-HW1	4,8	36,3	5,1	16,9	28,8	0,24	0,32	<0,005	0,18	<0,005	<0,005	NC
BIC61-10-8HW7ac	4,7	35,2	0'5	11,6	0'98	0,24	0,31	<0,005	0,17	500'0>	<0,005	NC
BIC62-10-HW1	6,1	26,3	5'9	13,6	28,7	0,29	0,40	<0,005	0,52	900'0	600'0	C
BIC63-10-8HW7ac	0'9	35,3	6,8	8,3	34,9	0,28	66,0	<0,005	05,0	900'0	800'0	C
BIC64-10-HW1	6,0	33,0	6,3	16,9	29,5	96,0	96,0	<0,005	0,22	0,010	0,010	NC
BIC65-10-8HW7ac	5,8	32,1	6,3	11,6	36,7	0,35	0,34	<0,005	0,30	600'0	600'0	NC
Bl66cft	1,1	7,9	6'0	21,3	61,0	0,13	89'0	0,01	0,51	0,02	0,03	0
BIL67	5,2	23,1	5,2	25,4	33,2	06,0	66,0	<0,005	0,02	<0,005	900'0	NC
BIL68-R	9'5	9'58	6,7	17,3	24,4	SE'0	0,45	<0,005	0,04	500'0>	500'0>	NC
BC69	4,5	32,2	4,9	16,3	32,9	09'0	0,43	<0,005	0,13	<0,005	800'0	NC
BCI70	3,2	29,2	2,7	15,8	37,6	0,31	99'0	<0,005	2,58	<0,005	900'0	NC
BA71	4,5	40,4	4,8	14,3	27,6	0,20	0,47	<0,005	0,22	<0,005	900'0	0
Norme												
Italie	5,5-9,5	30 - 45	6,0-10,0	3,0 -15,0	22 - 36	0,25 - 0,50	0,30 - 0,55					
Côte d'Ivoire	1,5 - 5	19 - 35	2,5 - 4,5	15-32	25 - 40	0,1 - 0,5	0,1 - 0,5					

TABLE 5.3: Teneurs relatives des composés normés de l'huile essentielle de bergamote

En rouge : teneurs anormales selon la norme associée; En bleu : teneurs anormales, témoins d'oxydation; C : conforme à la norme associée; D : dégradé; 0 : aucune norme correspondante; L : extrait au laboratoire; Norme AFNOR NF ISO 3520 (Fév 1999)

Sur notre échantillonage de départ (références et commerciaux) seulement 8 échantillons sont conformes à la norme AFNOR (NF ISO 855 (mai 2004)) type Italie.

Pour certains échantillons, leur non-conformité s'explique par la conversion vraissemblable du γ -terpinène en p-cymène par photo-oxydation. Ce serait le cas des échantillons BI5-R, BI6-R, BI7-R, BI9, BI15, BI17, BI18, BI23, BI24.

Par ailleurs, un faible taux de γ -terpinène peut être significatif d'une dégradation de l'échantillon ou d'une addition d'huile essentielle d'orange. L'utilisation de la norme est donc limitée dans ce cas là. Ainsi l'observation des teneurs en oxydes complète la comparaison à la norme. Celle-ci permet d'évaluer la dégradation potentielle de l'échantillon, pouvant ainsi modifier l'interprétation de la faible teneur en γ -terpinène.

Dans le cas des coupes effectuées au laboratoire, seuls les échantillons coupés à partir de 20% d'orange ne correspondent plus à la norme. Or, de nombreux échantillons commerciaux sont hors-norme vis-à-vis de plusieurs molécules.

Dans le chapitre 3.2.1.1, le suivi de certaines molécules spécifiques à l'huile essentielle de ho wood avait été envisagé. En raison de leur trop faible concentration et de la compléxité du profil moléculaire de l'huile essentielle de bergamote, cette méthode n'a pas été concluante.

5.1.2.3 Huile essentielle de citron

Dans le tableau 5.4 sont regroupés les pourcentages relatifs décrits dans la section 5.1.2. Ils ont été comparés à la norme relative à leur origine s'il elle existe.

ì	conformate	S	NC	C(Italie/cotier)	NC	NC	0	0	NC	NC	S	S	NC	NC	S	S	S	S	NC	S	NC	NC	9	U	S	S	S	NC	NC	U	S	S	O O
t-limonène	oxyde %	0,04	0,01	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01	10,0	10,0	10,0	10,0	0,01	10,0	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,009	800'0	100	0,01	10,0	0,01	0,01	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
c-limonène	oxyde %	0,04	0,01	<0,005	<0,005	0,01	0,01	0,01	10,0	10,0	10,0	10,0	0,01	10,0	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,007	0,007	0,006	900'0	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	10,0
6-3-carène	%	0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	0,005	0,000	900'0	0,007	0,000	0,000	0,000	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,000	0,001	0,002	0,004	0,000	0,000	0,004	0,005	0,005	900'0	0,000	0,000	0,000	0,004
9-bisabolène	%	0,60	0,57	0,52	0,59	0,65	0,47	0,45	0,42	95'0	0,45	0,42	95'0	0,49	0,50	0,53	0,49	0,48	0,46	0,47	0,45	0,42	0,38	95,0	0,53	0,52	0,53	0,51	0,45	0,52	0,49	0,41	0,55
acétate	de geranyle %	0,34	0,22	0,37	0,29	0,39	0,23	0,22	0,21	0,18	0,22	0,21	0,18	0,25	0,25	0,26	0,24	0,23	0,24	0,23	0,22	0,21	0,18	0,35	0,33	0,32	0,35	0,34	0,30	0,38	0,32	97,0	0,49
acétate	de neryle %	0,49	0,35	0,49	0,92	69'0	0,36	0,34	0,33	0,28	0,34	0,32	0,29	0,40	0,41	0,43	0,39	0,38	0,39	0,36	0,34	0,32	0,29	0,40	0,39	0,39	0,38	0,36	0,32	0,39	0,35	0,30	0,44
géranial	%	1,54	1,23	1,53	1,03	68'0	1,81	1,77	1,68	1,45	1,73	1,64	1,46	1,57	1,61	1,62	1,55	1,53	1,40	1,80	1,73	1,64	1,46	1,39	1,35	1,33	1,38	1,33	1,34	1,34	1,34	1,26	1,09
néral	%	0,85	0,76	06'0	0,67	65'0	1,10	1,06	66'0	0,92	1,06	1,01	16'0	1,00	1,02	1,03	0,99	0,98	0,94	1,10	1,05	1,00	68'0	68'0	0,89	0,88	0,84	0,82	0,81	0,84	0,79	0,72	0,83
c-terpinéol	%	0,17	0,17	0,13	0,52	0,46	0,19	0,23	0,22	0,20	0,17	0,16	0,15	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19	0,22	0,18	0,17	0,16	0,14	0,24	0,26	0,27	0,23	0,23	0,21	0,24	0,23	0,20	0,17
y-terpinène	%	8,41	8,08	9,36	11,15	68'6	10,31	16'6	9,75	8,30	9,90	9,76	8,19	10,63	10,64	10,63	10,53	10,37	9,93	10,31	9,89	9,37	8,34	9,51	9,56	9,24	8,45	8,13	7,46	8,28	8,04	7,25	9,35
Limonène	%	67,14	69,04	05,38	58,59	59,42	66,21	95,38	50'69	71,74	67,43	68,89	71,83	66,10	64,74	62,46	66,27	66,46	67,03	66,27	67,51	69,05	72,14	67,49	67,74	68,13	69,00	70,22	73,60	69,34	71,33	73,71	65,25
p-cymène	%	99'0	0,31	0,13	60'0	0,13	56,0	29'0	0,40	0,33	0,43	0,41	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,24	0,23	0,20	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,24
β-pinène	%	10,34	10,53	10,99	14,99	15,49	10,25	28'6	9,35	8,32	98'6	9,34	16,8	10,36	10,29	10,28	10,35	10,35	9,76	10,28	98'6	9,34	8,31	11,70	11,23	10,90	11,09	10,47	92'6	11,14	10,70	9,26	13,63
sabinène	%	1,70	1,87	1,81	2,58	2,52	1,76	1,71	1,64	1,49	1,70	1,63	1,48	1,72	1,71	1,71	1,72	1,73	1,65	1,76	1,70	1,63	1,48	1,90	1,82	1,79	1,80	1,71	1,56	1,81	1,72	1,55	2,15
a-pinène	%	1,78	1,81	1,85	1,87	1,73	1,77	1,74	1,67	1,54	1,73	1,66	1,53	1,74	1,72	1,72	1,73	1,73	1,61	1,77	1,70	1,61	1,43	1,89	1,85	1,74	1,83	1,75	1,62	1,84	1,76	1,62	1,97
a-thuyène	%	0,41	0,39	0,43	0,42	0,35	0,39	0,38	0,22	0,20	0,38	96,0	0,32	0,37	0,37	0,37	0,37	0,37	0,34	0,40	0,38	0,36	0,32	0,43	0,42	0,40	0,42	0,40	95'0	0,43	0,41	0,40	0,40
	REF	CI31	C132	Cl33m	CIL34	CIL35	CIC36-1	CIC37-5	CIC38-10	CIC39-20	CIC40-5	CIC41-10	CIC42-20	CIC43-5	CIC44-10	CIC45-20	CIC46-5	CIC47-10	CIC48-20	CIC49-1	CIC50-5	CIC51-10	CIC52-20	CIC53-5	CIC54-10	CIC55-20	CIC56-5	CIC57-10	CIC58-20	CIC59-5	CIC60-10	CIC61-20	CIC62-5

																						_								
	conformité	U	S	ပ	C	၁	0	C	NC	၁	၁	NC(Italie)	၁	NC	C	NC (p cym)	NC	NC(Italie)	C(cote d'ivoire)	NC(Italie)	NC	C(esp)	C(esp)							
t-limonène	oxyde %	10,0	10'0	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,05	0,02	<0,005	0,01	0,01	0,08	0,01	0,05	0,02	0,02
c-limonène	oxyde %	10,0	10,0	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	<0,005	<0,005	<0,005	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,05	0,07	0,04	0,01	0,02	0,01	0,13	0,01	0,10	0,01	10'0
6-3-carène	8	0,004	0,004	0,005	0,005	0,006	0,005	0,005	0,006	0,006	0,006	0,006	0,006	0,007	0,007	0,005	0,005	<0,005	<0,005	0,009	0,008	0,010	<0,005	0,011	0,005	0,007	0,005	0,005	0,020	<0,005
8-bisaholène	%	0,55	0,54	0,51	0,49	0,43	0,51	0,49	0,43	0,62	0,57	0,63	0,50	0,48	0,49	0,46	0,55	0,53	0,53	0,49	0,04	0,52	0,58	0,53	0,90	0,01	0,89	0,39	0,43	09'0
acétate	de géranyle %	0,47	0,45	0,52	0,49	0,42	0,52	0,48	0,41	0,29	0,30	0,28	0,15	0,15	0,15	0,44	0,47	0,49	0,68	0,17	0,08	0,21	0,29	0,26	0,32	0,24	0,52	0,34	0,29	0,36
acétate	de néryle %	0,44	0,43	15,0	0,43	0,39	15,0	0,43	0,38	0,32	0,33	0,31	0,22	0,23	0,26	0,39	0,45	0,43	0,42	0,42	0,19	0,32	0,41	0,33	0,43	0,25	0,42	0,40	0,36	95'0
géranial	%	1,34	1,33	1,31	1,22	1,11	1,29	1,20	1,08	1,90	2,11	1,97	2,13	2,00	1,67	2,01	2,29	1,91	1,90	1,05	96'0	1,16	1,22	1,51	96'0	2,00	1,55	1,48	1,63	1,31
néral	%	0,83	0,83	0,80	0,76	0,68	0,80	0,75	0,68	1,28	1,55	1,32	1,58	1,63	1,37	1,35	1,48	1,20	1,20	0,64	0,70	0,72	0,77	0,91	0,61	1,05	1,00	0,93	1,00	0,77
a-terpinène	, %	0,20	0,21	0,16	0,14	0,14	0,15	0,14	0,13	0,26	0,25	0,27	0,20	0,18	0,19	0,23	0,20	0,15	0,15	0,12	0,12	0,13	0,16	0,10	0,08	0,05	0,08	0,12	0,14	0,17
y-teminène	, %	9,24	9,46	9,46	8,84	7,82	9,19	8,73	7,88	7,84	7,50	7,78	8,44	8,58	8,62	9,90	10,92	9,48	9,46	6,36	6,12	7,75	8,21	8,04	7,44	8,90	7,34	6,92	10,21	8,89
limonène	8	65,43	64,90	67,59	68,55	72,75	66,72	67,56	71,24	71,26	71,26	71,32	72,35	72,13	72,50	67,80	65,07	62,02	61,90	70,74	68,22	68,02	67,67	67,40	80,69	66,31	68,28	65,73	66,05	63,34
p-cymène	%	0,24	0,24	0,24	0,24	0,24	0,24	0,24	0,24	0,35	0,35	0,35	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,24	0,24	0,83	2,89	0,71	0,22	0,53	0,58	1,14	0,58	2,89	0,52	0,23
8-pinène	%	13,21	12,78	13,48	12,76	11,34	13,23	12,55	11,11	9,20	9,19	9,09	8,22	8,48	8,53	9,87	10,70	13,57	13,55	10,96	12,63	11,95	11,48	11,60	10,82	12,59	10,69	12,03	11,00	13,78
sabinène	%	2,10	2,04	1,98	1,86	1,69	1,98	1,87	1,69	1,45	1,47	1,50	1,52	1,50	1,52	1,67	1,78	2,11	2,10	1,78	1,95	1,92	1,99	1,86	1,72	1,78	1,70	2,00	1,71	2,25
a-pinène	%	1,94	1,85	1,97	1,87	1,74	1,86	1,83	1,74	1,50	1,46	1,44	1,57	1,56	1,57	1,62	1,79	1,94	1,94	1,67	2,07	1,77	1,79	1,91	1,69	1,96	1,67	1,88	1,78	1,98
a-thuvène	, %	95,0	96,0	0,39	0,36	0,33	95,0	0,36	0,33	0,29	0,29	0,30	0,18	0,19	0,19	0,34	0,38	0,43	0,42	0,35	0,41	0,36	0,39	0,39	0,28	0,27	0,28	0,42	0,39	0,42
	Æ	CIC63-10	CIC64-20	CIC65-5	CIC66-10	CIC67-20	CIC68-5	CIC69-10	CIC70-20	CIC71-20	CIC72-20	CIC73-20	CIC74-20	CIC75-20	CIC76-20	CIC77-20	CIC78-20	CIC79+1std	CIC80+1std+0,2gac	CA81	CA82	CA83	CA84	CA85	CC186	CCI87-df	CCI88	CI89-df	Cli90	Cli91

	a-thuvène	anénia-n	sabinène	8-pinène	p-cymène	limonène	v-terpinène	loonimet."	néral	géranial	acétate	acétate	8. hisabolène	6.3-carono	c-limonène	t-limonène	
REF	, %	%	%	%	%		%	, %	%	%	de néryle %	de géranyle %	%	%	oxyde %	oxyde %	conformité
Cli92	0,42	1,93	2,12	13,02	0,23	64,20	8,87	0,16	0,82	1,39	0,54	96,0	19'0	<0,005	100	0,02	C(esp)
CE93	0,35	1,64	1,86	11,40	59'0	64,26	80'6	0,18	0,85	1,39	0,58	0,47	0,81	<0,005	0,03	6,03	C
CE94	0,38	1,90	2,17	12,82	0,25	65,35	8,49	0,15	0,87	1,41	0,42	0,28	0,62	<0,005	<0,005	10,0	O
CE95	0,38	1,74	1,87	10,65	80'0	68,11	7,65	0,18	1,05	1,05	0,31	0,21	0,54	0,005	<0,005	10,0	C
CE96	0,40	1,75	1,84	10,99	69'0	66,84	8,70	0,17	0,79	1,33	0,40	0,37	0,70	<0,005	0,02	0,03	C
CE97-5	0,38	1,69	1,77	10,48	55'0	68,27	8,17	0,16	0,73	1,25	0,38	0,34	0,64	0,005	0,02	0,02	NC
CE98-10	0,36	1,64	1,69	96'6	65,0	69,64	3,76	0,16	0,70	1,19	0,36	0,32	19'0	0,005	0,02	6,03	NC
CE99-20	0,32	1,51	1,53	8,82	0,48	72,37	68'9	0,14	0,64	1,08	0,33	0,29	55,0	900'0	0,05	0,02	O
CE100+1std+0,2gac	0,38	1,88	2,14	12,67	0,25	64,57	8,384	0,15	1,26	1,99	0,42	0,48	19'0	<0,005	<0,005	10,0	NC
CEL101	0,29	1,43	1,81	68'6	80'0	86,29	7,51	0,33	1,55	2,35	0,44	0,23	09'0	<0,005	0,01	10,0	NC
CEL102	0,32	1,52	1,80	72,6	0,10	67,91	8,12	0,33	1,07	1,67	0,34	0,15	6,53	<0,005	<0,005	10,0	NC
CEL103	0,34	1,49	1,76	10,35	80'0	64,71	9,93	92'0	0,73	1,08	0,78	99'0	0,78	<0,005	<0,005	<0,005	NC
CEL104	0,32	1,36	1,61	55,6	0,05	62,49	9,87	0,29	0,95	1,55	0,41	0,60	0,67	<0,005	<0,005	0,01	NC
CEL105	0,29	1,40	1,84	10,54	0,18	62,78	8,15	0,29	16,0	1,47	0,40	0,33	0,68	<0,005	0,01	0,01	NC(cotier, CI brésil)
CEL106-hd	0,27	1,23	1,51	8,03	0,12	71,59	7,72	0,35	0,83	1,12	0,37	0,20	0,37	<0,005	<0,005	0,02	0
CC107	0,32	1,33	1,45	8,12	50'0	64,81	8,86	0,35	2,02	3,12	0,51	0,51	0,72	900'0	10'0	0,03	0
CC108	0,39	1,47	1,12	6,11	1,70	70,55	8,60	0,20	1,11	1,79	0,74	0,78	0,60	0,005	0,05	0,02	0
CH09dt	0,02	0,10	0,11	89'0	0,17	4,68	0,81	2,18	6,04	13,42	11,71	12,45	14,16	<0,005	10,0	0,02	0
CI110dt	0,02	0,10	0,13	0,82	2,03	11,00	1,16	1,50	8,5	16,84	13,17	13,53	86'9	<0,005	0,10	0,05	0
Norme																	
Italie	0,2-0,5	1,5-3,0	1,5-3,0	10,0 - 16,5	0,05 - 0,35	60,0-68,0	8,0-12,0	0,1-0,3	0,6-1,2	0,8-2,0	0,2-0,5	0,30 - 0,65	0,45-0,9				
Espagne	0,2-0,5	1,5-3,0	1,5-3,0	10,0 - 16,5	traces - 0,4	60,0 - 70,0	8,0 - 12,0	0,09 - 0,35	0,4-1,0	0,6-2,0	0,30 - 0,60	0,20 - 0,65	0,45-0,9				
Côte d'Ivoire. Brésil	0,2-0,5	1,4 - 3,0	1,4-3,0	7,0 - 16,0	0,05 - 0,35	59,0 - 75,0	6,0-12,0	0,00 - 0,40	0,2 - 1,2	0,5 - 2,0	0,1-0,5	traces - 0,30	0,20 - 0,90				
Cotier	0,2-0,5	1,5 - 2,5	1,5-2,5	9,0-14,0	0,05 - 0,35	63,0 - 70,0	8,3-9,5	0,1 - 0,25	6,0-9,0	1,0 - 2,0	0,35 - 0,60	0,20 - 0,50	0,45-0,9				
Désertique	0,2-0,5	1,4 - 2,5	1,3-2,5	10,0-13,0	0,01 - 0,35	70,0 - 80,0	6,5-8,0	0,06 - 0,15	9,0-6,0	6,0-2,0	0,3-0,5	0,1-0,3	0,40-0,7				

TABLE 5.4: Teneurs relatives des composés normés de l'huile essentielle de citron

En rouge: teneurs anormales selon la norme associé; En bleu: teneurs anormales, témoins d'oxydation; C: conforme à la norme associée; NC: Non-conforme à la norme associée; D : dégradé; 0 : aucune norme correspondante; L : extrait au laboratoire; Norme AFNOR NF ISO 855 (Mai 2004) Dans le cas de l'huile essentielle de citron seuls 10 échantillons correspondent à la norme AFNOR NF ISO 855 (Mai 2004).

Certains échantillons sont faiblement hors-norme (éch.CI1-df-R, CI12-R, CI13-R, CI14-R) du fait d'une valeur en p-cymène trop élevée. Cela est probablement dû à l'instabilité du p-cymène face à l'oxydation. La norme paraît trop restrictive sur ce paramètre. Ainsi se justifierait en partie le grand nombre d'échantillons hors-norme.

Par ailleurs, beaucoup d'échantillons ont un faible taux d'α-terpinéol. Ces taux ne peuvent être dus ni à la dégradation ni à l'addition d'huile essentielle d'orange. Une fraude sur l'origine de l'huile essentielle pourrait l'expliquer. Selon la norme, les taux retrouvés sont similaires à ceux correspondant à une origine Côte d'Ivoire ou Brésil.

Il est important de noter que de nombreux échantillons défurocoumarinés présentent de faibles teneurs en β -bisabolène (éch.CI15-df, CI17-df, CI18-df, CI20-df, CI21-df, CI22-df, CI26-df). Cela est dû au procédé de purification.

Les échantillons coupés au laboratoire, ne sont quant à eux pas systématiquement horsnorme. Seules les coupes à 20% d'orange ne correspondent plus à la norme. Tels les échantillons de bergamote dans la section 5.1.2.2, un grand nombre d'échantillons commerciaux sont hors norme vis-à-vis de plusieurs molécules.

L'huile essentielle de citron hydro-distillée présente un profil moléculaire différent de celui obtenu par expression. Les remarques sont identiques à celles observées pour l'huile essentielle d'orange. De manière générale les baisses des teneurs en aldéhydes et une augmentation de celles des alcools sont plus significatives que dans le cas de l'huile essentielle d'orange.

5.1.2.4 Huile essentielle de mandarine

Le tableau 5.5 récapitule les teneurs des composés décrits en section 5.1.2. A ces teneurs ont été ajoutées celles du p-cymène et des Z et E-limonène—oxydes témoins importants de l'oxydation de l'huile essentielle de mandarine. Ces résultats ont été comparés à la norme type Italie quand cela est pertinent.

		conformité	c	C	C	٥	C	C	c	C	C	c	NC	NC	S	C(Italie)	NC	2	NC	NC	<u></u>	NC	NC	NC	NC	S	NC	9	S	2	2	S	S	NC	NC	NC	NC	NC	ņ
		confc	_	_)	_)	_)	_	_		a))o	_	_	_	_	_	2	_	_	_	2	2	2	2	2	2	2	2	_	N	N	N	N	N
t-limonène	oxide	88	<0,005	0,02	200'0	200'0	200'0	<0,005	<0,005	<0,005	0,02	200'0	900'0	0,02	10'0	80'0	800'0	0,005	60'0	10'0	200'0	0,02	20'0	600'0	0,10	0,02	0,02	0,02	900'0	900'0	900'0	200'0	200'0	200'0	0,02	0,02	<0,005	0,02	0,02
c-limonène	oxide	%	<0,005	10'0	500'0	900'0	<0,005	10'0	90'0	0,02	0,02	500'0>	<0,005	0,02	0,04	90'0	800'0	10'0	0,04	0,03	900'0	0,02	0,15	10'0	0,14	10'0	10'0	10'0	<0,005	500′0>	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	0,01	0,01	<0,005	0,01	10'0
p-cymène	*		9'0	0,82	0,52	0,54	5'0	0,71	1,03	0,94	76'0	0,53	0,43	98'0	1,32	1,91	72'0	1,03	1,16	1,05	99'0	92'0	5,19	1,14	2,51	86'0	1,02	1,01	0,43	0,43	0,44	0,51	0,51	0,51	86'0	76,0	1,02	1,03	1,02
ō-3-carène	%		<0,005	<0,005	0,001	<0,005	0,001	0,002	0,004	<0,005	<0,005	<0,005	0,001	<0,005	<0,005	0,04	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	0,02	0,01	0,02	<0,005	0,002	0,002	0,002	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
α-sinensal	%		06,0	66,0	96,0	0,41	0,42	0,33	0,25	0,28	06,0	0,34	0,44	0,17	0,33	0,26	0,04	0,31	0,01	0,03	6,0	66,0	0,01	0,31	0,24	0,32	0,33	0,34	0,44	0,43	0,42	96,0	96,0	96,0	0,37	0,35	0,31	0,37	0,37
N-methyle	anthanilate de méthyle	*	75'0	0,43	0,40	95'0	0,51	0,41	0,44	0,47	0,52	06,0	0,34	0,35	0,45	0,43	0,28	0,45	0,22	0,28	0,27	0,24	0,34	0,42	2,31	0,48	0,51	75'0	98'0	0,41	0,48	0,43	0,47	0,53	0,43	0,42	0,37	3,06	0,43
γ-terpinène	%		17,1	17,1	17,4	19,6	19,2	17,8	16,3	16,9	16,5	16,2	17,2	17,0	18,2	17,9	17,2	15,3	17,7	17,4	15,1	15,8	12,4	13,4	21,3	17,1	17,1	17,0	17,2	17,1	17,1	17,4	17,4	17,3	16,2	15,5	13,7	17,5	16,5
limonène	%		72,1	71,9	7,17	5,83	69,4	8'02	72,1	72,3	72,5	73,6	72,4	72,3	69,4	69,1	73,0	73,1	71,3	71,7	74,8	73,9	74,2	76,1	64,8	71,3	71,7	71,6	72,4	72,3	72,2	71,7	71,7	71,7	73,2	74,0	75,9	68,8	72,9
myrcène	%		1,77	1,75	1,75	1,74	1,78	1,73	1,75	1,82	1,83	1,80	1,73	1,81	1,75	1,57	1,76	1,75	1,82	1,83	1,77	1,75	1,53	1,75	0,72	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7	1,8	1,8	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7	1,8
β-pinène	%		1,49	1,45	1,42	1,61	1,58	1,40	1,57	1,47	1,47	1,37	1,36	1,53	1,60	1,60	1,42	2,09	1,67	1,55	1,26	1,25	1,16	1,23	0,35	1,4	1,4	1,4	1,3	1,3	1,3	1,4	1,4	1,4	1,3	1,3	1,1	1,5	1,4
α-pinène	*		2,16	2,07	2,02	2,22	2,18	2,20	2,24	2,06	2,10	2,00	1,88	2,11	2,26	3,02	1,97	2,05	2,41	2,20	1,86	1,75	1,53	1,89	0,22	1,9	1,9	1,8	1,8	1,8	1,8	2,0	1,9	1,9	1,9	1,8	1,7	2,1	2,0
		REF	M1r-R	MI2j-R	MI3-R	M4v-R	MISj-R	MI6j-R	MI7v-R	M8v-R	MI9j-R	MI10j-R	MI11r-R	MI12j	M113	MI14-df	MI15-df	MI16j	Ml17j-df	MI18v-df	MI19	MI20	MI21-df	MI22j	MI23-df	MICm24-5	MICm25-10	MCm26-20	MlCm27-5	MICm28-10	MCm29-20	MICm30-5	MICm31-10	MICm32-20	MIC33-5	MIC34-10	MIC35-20	MICf36-5	MICo37-5

	w ninàna	R.ninana	myrcène	imonène	v-terpinene	arimanian	(-smensal	ō-3-carene	p-cymene	c-IIIIollelle	-IIIIoliciic	
EE	%	%	%	%	, %	anthanilate de méthyle %	%	%	%	oxide %	oxide %	conformite
MICto41-10	1,80	1,30	1,8	74,3	15,6	66,0	0,35	900'0	1,02	10'0	0,02	S
MICto42-20	1,70	1,20	1,80	76,8	13,7	0,34	16,0	900'0	1,02	Ю'0	0,02	SC
MICto43-5	1,80	1,30	1,70	73,6	16,3	0,32	0,42	500′0>	0,41	\$00'0>	10'0	NC
MICto44-10	1,70	1,20	1,80	74,8	15,5	0,31	0,40	500′0>	66,0	<0,005	10'0	NC
MICto45-20	1,50	1,10	1,80	77,2	13,7	0,27	98'0	\$00'0>	98'0	<0,005	00'0	NC
MICto46-5	1,90	1,40	1,80	73,0	16,6	86,0	0,34	500,0>	0,49	00'0	10'0	NC
MICto47-10	1,90	1,30	1,80	74,2	15,7	96,0	0,32	500′0>	0,46	00'0	10'0	NC
MICto48-20	1,60	1,10	1,80	7,97	13,9	0,32	0,29	\$00'0>	0,41	00'0	10'0	NC
MIC49-5	1,80	1,30	1,70	74,2	16,1	0,32	0,41	\$00'0>	0,43	0,14	80'0	NC
MIC50-10	1,70	1,20	1,70	74,7	14,4	0,31	0,40	0,002	0,43	0,14	80'0	NC
MIC51-20	1,50	1,20	1,70	6'92	13,8	0,27	96,0	0,004	0,43	0,14	80'0	NC
MICo52-5	1,80	1,30	1,70	73,7	16,3	0,32	0,42	500,0>	0,41	\$00'0>	900'0	NC
MICo53-10	1,70	1,20	1,70	74,6	15,5	0,29	86,0	0,002	66,0	\$00'0>	900'0	NC
MICo54-20	1,60	1,20	1,70	0,77	13,7	0,26	96'0	0,004	0,35	<0,005	900'0	NC
MIC55-5	1,90	1,30	1,80	73,0	17,1	98'0	0,28	500,0>	0,52	0,005	200'0	NC
MIC56-10	1,80	1,30	1,80	74,2	16,0	0,35	0,26	500,0⊳	0,52	0,005	200'0	NC
MIC57-20	1,60	1,10	1,70	7,87	14,2	0,32	0,22	0,004	0,52	0,005	200'0	NC
MICo58-5	1,90	1,40	1,70	72,9	16,5	0,38	0,34	500,0⊳	0,49	<0,005	200'0	NC
MICo59-10	1,90	1,30	1,70	74,1	15,7	98'0	0,32	0,002	0,47	<0,005	200'0	NC
MICo60-20	1,70	1,10	1,70	76,5	13,9	0,32	0,29	0,004	0,42	<0,005	200'0	NC
MIC61-10+0.4std	1,90	1,30	1,70	73,9	15,5	18'0	0,30	0'0	1,0	0'0l	0,02	NC
MI62+0.4std	2,10	1,40	1,70	71,6	17,0	0,83	0,40	500,0⊳	8'0	0,01	0,02	NC
MIL63-hd	1,30	1,10	1,70	71,3	16,8	1,06	0,34	500,0⊳	0,45	0,01	10'0	0
M64hd	1,70	1,40	1,70	74,9	14,5	0,32	0,04	500,0⊳	1,78	0,03	0,02	NC
WIL65	1,10	1,00	1,50	69,7	17,7	0,55	0,54	500,0⊳	0,44	0,008	10'0	NC
MA66-df	1,20	06'0	1,70	77,1	12,3	0,34	0,24	200'0	2,35	0,13	20'0	0
MA67j	2,10	1,80	1,70	65,8	21,0	29'0	0,42	0,003	78'0	0,02	<0,005	0
MA68	1,50	1,00	1,80	79,0	10,1	0,43	0,22	0,032	1,48	0,04	20'0	0
MA69	1,60	1,00	1,50	77,4	10,2	0,49	0,20	<0,005	3,52	0,04	80'0	0
MB70v	1,80	1,40	1,70	72,5	16,6	0,24	0,29	<0,005	1,25	0,02	900'0	0
MB71v	1,90	1,40	1,70	9'69	19,0	99'0	0,46	500,0⊳	0,43	<0,005	<0,005	0
MB72v	1,70	1,30	1,60	72,6	15,9	0,15	0,02	0,002	2,71	0,12	0,1	0
MB73v	2,00	1,60	1,60	63,7	22,3	65'0	05'0	0,004	1,89	0,035	60'0	0
MB74	2,60	2,00	1,50	9'59	13,6	96'0	09'0	500,0⊳	5,61	0,17	0,20	0
MB75	2,00	1,40	1,80	72,0	16,0	0,42	10'0	<0,005	1,54	80'0	0,02	0
MCB76-10	1,80	1,30	1,80	74,4	14,4	88.0	Ю'0	0,002	1,54	80'0	0,02	
Norme Italie	2,0-3,0	1,2 - 2,0	1,5-2,0	65,0 - 75,0	16,0 - 22,0	09'0 - 06'0	0,20 - 0,50					

TABLE 5.5: Teneurs relatives des composés normés de l'huile essentielle de mandarine

En rouge : teneurs anormales selon la norme associée; En bleu : teneurs anormales, témoins d'oxydation; C : conforme à la norme associée; NC : Nonconforme à la norme associée; D : dégradé; 0 : aucune norme correspondante; L : extrait au laboratoire; Norme AFNOR NF ISO 3528 (Mai 1997)

La moitié des échantillons commerciaux sont conformes à la norme type Italie. Certains échantillons ne sont que faiblement hors-norme (éch. MI11j-R) avec un taux d'α-pinène légèrement faible. Pour cette molécule très volatile, le stockage prolongé de l'huile essentielle même dans de bonnes conditions peut entrainer une légère évaporation de ce composé.

Quelques échantillons ont un faible, voire très faible, taux d'α-sinensal. Ces taux ne peuvent être expliqués ni par une dégradation ni par une adultération de l'échantillon. On peut alors supposer une fraude sur l'origine de l'huile essentielle. En effet certains taux d'α-sinensal sont de même ordre que ceux des échantillons d'origine Brésil. De plus les échantillons de cette origine ont un profil de molécules normées semblable à celui de la mandarine type Italie. Toutefois, les teneurs en γ-terpinène, N-méthyle anthranilate de méthyle et α-sinensal peuvent être légèrement différentes pour une mandarine type Brésil. Pour exemple, l'échantillon MB75 est tout à fait conforme à la norme Italie sauf pour l'α-sinensal. Il se pourrait que certains échantillons soient faussement déclarés de type Italie. Néanmoins l'absence de norme sur l'origine Brésil, ne nous permet pas de l'affirmer avec certitude. Par ailleurs, les échantillons avec les plus faibles taux d'α-sinensal correspondent à des échantillons défurocoumarinés (éch. MI14-df, MI17j-df, MI18v-df, MI21-df), ce qui a pu entrainer la diminution de la teneur de cette molécule lors du procédé de purification, comme cela a été observé pour l'huile essentielle de citron.

L'échantillon hydrodistillé (éch. MIL63-hd) présente une teneur en α -sinensal légèrement plus basse que l'huile essentielle d'origine (éch. MIL65). De manière inattendue la teneur en NMAM est augmentée. L'échantillon hydro-distillé MI64-hd possède une teneur faible en α -sinensal et moyenne en NMAM.

Les échantillons coupés au laboratoire, sont hors norme vis-à-vis de l' α -pinène. Cependant les huiles de départ étaient déjà dans le bas de la fourchette établie par la norme. Seules les coupes à 20% d'orange ne correspondent plus à la norme pour des molécules autres que l' α -pinène. Par contre pour un grand nombre d'échantillons commerciaux plusieurs molécules sont hors-norme.

5.1.2.5 Huile essentielle de pamplemousse

Ci-dessous (cf. tableau 5.6) sont regroupés des composés décrits en section 5.1.2, obtenus après analyse GC-FID de la fraction volatile des huiles essentielles de pamplemousse. Ils ont ensuite été comparés à la norme.

	Conformité		o	NC	S	S	NC	NC	S	NC	S	C	S	S	SC	NC (D)	S	SC	o	NC	NC	S	S	S	SC	SC	S	S	S	S	o	S	NC	0	0	
E-limonène-	oxyde	88	0,01	10'0	0,02	10'0	10'0	0,02	50'0	80'0	90'0	0,03	0,03	90'0	0,04	0,55	50'0	0,02	0,01	0,02	0,02	0,02	0,03	90'0	0,02	0,04	90'0	20'0	0,16	0,17	0,18	0,03	0,02	0,01	0,0	
Z -limonène-	oxyde	88	0,01	500'0	<00'0>	10'0	900'0	10'0	0,02	0,04	0,10	0,04	0,03	80'0	80'0	78'0	0,02	0'04	0,01	0,02	0,02	0,03	0,04	90'0	0,02	90'0	80'0	0,12	0,28	0,28	0,33	0,01	0,01	0,01	10'0	
p-cymène	88		<0,005	<0,005	0,02	20'0	<0,005	10'0	10'0	0,40	0,03	<0,004	<0,005	50'0	50'0	90'0	£0'0	0,03	0,008	0,04	<0,005	<0,005	10'0	90'0	<0,005	600'0	10'0	Ю,0	0,10	0,10	60'0	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	
5-3-carène	88		<0,005	<0,005	<0,005	<00'0>	<0,005	<00'0>	0,003	900'0	0,003	0,017	<0,005	0,013	200'0	200'0	<00'0>	<0,005	0,005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	0,013	<0,005	<0,005	<0,005	0000	<0,005	<0,005	0,004	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005	
	*		0'03	0,02	0,03	0,25	10,0	0,22	0,22	0,24	10'0	0,28	0,04	10'0	06'0	0,15	0,24	0,22	0,13	0,02	90'0	0,04	50'0	0,26	0,57	0,51	0,48	0,43	0'03	0'03	SO'O	<0,005	98'0	<0,005	<0,005	8,0 - 10,0
Еß	caryophyllène	%	0,37	96,0	0,23	0,28	0,33	0,31	0,31	0,16	0,21	0,28	0,27	0,25	0,25	90'0	0,27	0,27	0,26	0,41	0,32	0,12	0,26	0,29	06,0	0,27	0,25	0,23	0,23	0,21	0,19	0,37	0,32	0,35	\Box	_
néral	88		0,04	90'0	<0,005	10,0	<0,005	10,0	0,02	200'0	90'0	0,02	0,02	0,04	0,02	0,02	10'0	0,02	0,04	0,04	0,03	0,02	0,03	0,02	0,02	0,04	0,04	80,0	0,04	0,04	0,04	0,04	90'0	90'0	0,11	0,02 - 0,04
décanal	88		0,3	0,3	0,3	6,0	0,3	6,0	6,0	0,2	0,3	0,3	0,3	0,2	0,2	0,2	6,0	0,3	0,3	0,3	0,4	0,3	0,3	0,3	0,4	0,4	0,4	0,4	0,3	0,3	0,3	0,4	0,4	0,3	<0,005	0,1 - 0,6
nonanal	88		90'0	90'0	50'0	50'0	50'0	50'0	90'0	0,02	90'0	20'0	90'0	50'0	0,02	0,04	60,0	90'0	90'0	90'0	90'0	90'0	50'0	90'0	0,04	90'0	90'0	90'0	90'0	90'0	90'0	0,04	0,04	0,04	0'04	0,04 - 0,1
limonène	88		92,7	93,1	94,1	83,8	83,8	93,7	83,3	93,4	94,3	93,4	93,0	94,5	94,4	86,4	93,5	92,4	93,2	91,9	93,1	94,7	93,2	93,2	92,9	92,8	92,7	92,4	93,2	93,2	93,2	92,2	0'06	83,3	92,9	95 - 36
myrcène	88		2,0	1,9	1,9	1,9	2,0	1,8	1,7	1,6	1,8	1,9	1,9	1,8	1,8	1,1	1,8	1,8	1,9	1,8	1,9	1,9	1,9	1,8	9,1	6,1	6,1	6,1	1,9	1,9	9,1	1,7	1,7	8,1	8,	1,5-2,5
octanal	88		6,0	6,0	6'0	0,2	6,0	6,0	6'0	0,2	6,0	0,4	9'0	6'0	0,2	0,2	6'0	0,4	5'0	0'3	0,2	0,4	0,4	0,2	6,0	0,3	6,0	6,0	6,0	6,0	0,2	0'1	0'1	9'0	<0,005	0,2-0,8
β-pinène	88		0,11	0,11	0,10	90'0	0'05	0'04	0,04	0,12	0'04	0,04	0,04	90'0	90'0	20'0	20'0	0,14	0,13	0,16	0,02	80'0	0,04	0,13	80'0	80'0	00'0	00'0	0,10	60'0	60'0	0,02	0'03	20'0	2,43	0,05-0,2
sabinène	88		9'0	9'0	0,4	0,3	0,2	0,3	0,3	0,4	0,4	9'0	0,3	0,5	0,5	6,0	0,4	9'0	8'0	9'0	0,2	9'0	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	6,0	0,4	0,4	0,4	0,2	0,4	8'0	9'0	0,1 - 0,6
α-pinène	88		5'0	5'0	5'0	5'0	5'0	5'0	5'0	5'0	9'0	9'0	0,5	5'0	9'0	9'0	5'0	9'0	5'0	9'0	5'0	9'0	5'0	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	9'0	9'0	0,5	0,3	0,3	0,5	9'0	0,2-0,6
		딾	PA1	PA2	PA3	PA4	PC5	PF6	PF7	PUS8	PUS9-df	PUS10	PUS11	PP12-df	PP13-df	P114	P115	PAS16	PAS17	Pi18	Pi19	Pi20-df	Pi21	Pi22	Pi23	PiC24-5	PiC25-10	PiC26-20	PiC27-5	PiC28-10	PiC29-20	PUSL30	PUSL31	PC32	PC33	Norme

TABLE 5.6: Teneurs relatives des composés normés de l'huile essentielle de pamplemousse

En rouge : teneurs anormales selon la norme associée; En bleu : teneurs anormales, témoins d'oxydation; C : conforme à la norme associée; NC : Nonconforme à la norme associée; D : dégradé; 0 : aucune norme correspondante; L : extrait au laboratoire; Norme AFNOR NF ISO 3053 (Jan 2005)

Dans ce cas, seuls 8 échantillons ne correspondent pas à la norme, ce qui est assez peu si l'on compare aux résultats obtenus pour les oranges. Cependant la norme sur les huiles essentielles de pamplemousse ne comporte que peu de molécules, souvent avec de larges gammes de naturalité (cf. nootkatone).

L'échantillon PI14 a un profil très atypique. Ceci pourrait être du à une importante dégradation de ce dernier. Cependant nous ne sommes pas en mesure d'affirmer qu'il s'agisse de l'unique raison.

5.1.3 Huiles essentielles de lavande et lavandin super

Les analyses réalisées sur GC-FID sur colonne polaire et apolaire ont permis l'identification de 98,5 à 99,9% des molécules de la fraction volatile des huiles essentielles de lavande et lavandin super. Pour chacune des huiles essentielles de lamiacées étudiées, il existe une norme AFNOR (NF ISO 3515 (déc. 2004), NF T75-305 (juil. 1992)) correspondant à une origine précise.

Le procédé employé est identique à celui de l'étude des huiles essentielle de citrus. Cependant contrairement aux normes correpondantes au citrus, la norme de la lavande inclus la teneur relative en camphre marqueur du lavandin super. Cette première observation pourra permettre d'exclure immédiatement des échantillons issus de fraude grossière. Par contre, les échantillons correspondant à la norme ne sont pas nécessairement authentiques. En effet, certaines manipulations comme l'ajout de linalol et acétate de linalyle peuvent équilibrer le profil moléculaire de l'huile adultérée.

Dans ce chapitre sont présentées les teneurs relatives des molécules normées. Nous avons de cette manière vérifié la conformité à la norme. Des molécules marqueurs d'oxydation de l'huile essentielle ont été ajoutées au profils normés utilisés ainsi les échantillons dégradés pourront être identifiés facilement.

Au contraire des huiles essentielles de citrus, nous ne pouvons nous affranchir des modifications apportées par l'oxydation dans la composition moléculaire car nous ne connaissons pas les produits de dégradation (polymérisation). Les teneurs relatives sont utilisées pour la suite de l'étude sans modification particulière.

A l'instar des huiles essentielles d'agrumes, les résultats des analyses chirales et isotopiques ne présentent aucune anomalie due à la dégradation.

Néanmoins, en industrie, lors d'un contrôle de qualité, les échantillons détectés comme étant trop dégradés, pourront être écartés dès cette étape.

5.1.3.1 Huile essentielle de la lavande

Dans le tableau 5.7 sont regroupées les teneurs des composés normés, auxquelles ont été ajoutées celles des oxydes de linalol afin d'évaluer l'oxydation potentielle de l'échantillon.

nène Z-β-ocimène F.44huvanol	Z-β-ocimène F.4thusnol	linalol + F.4thuvanol		cam	camphre	lavandulol	terpinène-4 ol aterpinéol		linalyle acétate + déranial	acétate de lavandulble	E-linalol-ox	Z-linalol-ox	Conformité
% %	%		5	%	%	%	%	. %	. yerallari %	we lavalitatiyis	%	%	COMPONIE
0,32 0,71 4,51 2,89	2,89			27,63	0,24	08'0	4,22	0,45	36,23	3,49	0,14	0,10	O)
0,94 4,20		4,08		56,89	0,35	0,92	3,75	09'0	35,64	3,89	60'0	20'0	S
4,13		4,28		28,31	0,41	1,17	4,78	0,72	31,84	3,94	0,15	0,10	၁
0,34 0,98 5,06 4,07		4,07	I	26,79	0,20	28'0	4,08	91,0	37,94	3,92	0,12	60'0	S
0,32 1,05 4,91 3,60		3,60	'	25,62	0,27	0,71	3,21	99'0	37,86	3,90	0,12	0,10	S
0,34 1,03 4,01 3,53		3,53		28,06	98'0	0,93	2,18	0,26	90'98	3,80	0,18	0,13	J
0,34 0,59 4,85 3,29		3,29		30,42	0,19	69'0	4,99	1,01	30,65	3,38	0,13	0,10	S
		3,32		32,19	0,16	1,20	5,11	1,64	27,48	2,90	0,10	80'0	S
1,04 3,67		3,77	_	26,78	0,32	78'0	3,99	0,40	34,79	4,58	0,16	60'0	S
		4,70		26,27	0,39	88'0	2,14	1,31	36,49	3,77	0,24	0,18	NC
1,24 2,11		2,02	-	24,74	1,80	0,74	2,41	0,43	40,92	3,46	90'0	20'0	S
1,31 3,82		3,82	_	27,96	0,28	1,00	5,39	29'0	30,13	3,86	0,12	60'0	SC
2,46		3,11		26,08	0,33	68'0	4,43	0,52	37,65	4,07	0,13	0,10	S
		2,50	-	33,08	0,39	0,62	1,63	1,13	33,89	2,65	0,24	0,19	NC
		1,33		36,42	0,57	89'0	2,10	22'0	37,13	1,92	0,16	0,20	NC
0,43 1,45 1,75 1,35		1,35		38,86	1,10	91,0	1,20	96'0	37,12	2,06	0,11	0,18	NC
		1,96		28,49	96,0	0,71	1,26	1,43	39,32	3,12	0,29	0,23	NC
1,91		1,21		27,68	0,25	0,84	4,33	0,63	37,32	4,09	0,14	60'0	NC
1,08 3,73		3,05		26,82	0,23	0,84	4,10	0,55	35,97	4,20	0,14	0,10	NC
1,03 3,85		3,40	\neg	28,35	19'0	06'0	2,08	0,30	36,43	3,68	0,02	0,13	SC
3,72		333	\neg	28,63	0,82	86.0	8,	0,34	36,45	3,57	0,18	0,13	S
1,47 3,45		3,16	\neg	29,15	1,27	860	1,79	0,42	38,61	3,34	0,17	0,13	오
0,94 3,50		308		30,32	95'0	0,82	1,89	0,27	37,66	3,35	0,02	0,12	2
0,89 3,32		2,93	-	31,34	0,53	92'0	1,79	0,26	98'30 38'30	3,17	0,02	0,11	2
1,15 3,38		3,00	\neg	30,57	0,75	08'0	1,80	0,31	37,68	3,25	0,16	0,12	S
1,09		2,84		31,57	0,71	92'0	1,71	0,29	38,32	3,08	0,16	0,11	NC
0,36 1,34 3,14 2,87		2,87		31,04	1,16	0,75	1,63	0,38	37,83	3,04	0,15	0,12	SC
0,34 1,27 2,97 2,72		2,72	-	32,02	1,10	0,71	1,54	96,0	38,46	2,88	0,15	0,11	NC
3,64		3,21	-	30'08	0,34	58'0	1,98	0,23	37,32	3,45	0,16	0,12	NC
0,89 3,45		3,04		31,08	0,32	08'0	1,88	0,22	37,98	3,28	0,15	0,11	NC
0,85 3,29		2,90	\Box	34,37	0,31	92'0	1,79	0,21	36,17	3,12	0,15	0,11	NC
82'0		2,68		31,82	0,29	17,0	1,86	0,20	40,90	2,89	0,13	0,10	S
0,35 1,10 4,87 3,93		3,93		27,13	0,43	98'0	388	0,20	37,86	3,79	0,12	60'0	S

	octan.one.3	limonène	1,8cinéole	E-8-ocimène	7-6-ocimène	linalol +	camphre	lavandulol	terpinène-4 ol	α-terpinéol	linalyle acétate	acétate	E-linalol-ox	Z-linalol-ox	,
REF	%		+β-phell %	%	%	c-4-thuyanol %	%		%	%	+ géranial %	de lavandulyle %	%	%	Conformité
LFC34-10	890	0,37	1,21	4,68	3,79	27,47	99'0	0,82	3,69	0,25	37,78	3,65	0,12	0,10	S
LFC35-20	99'0	0,41	1,44	4,30	3,50	28,14	1,12	8,20	3,31	0,35	37,62	3,39	0,12	0,10	NC
LFC36-5-5std	75,0	0,32	1,00	4,43	3,57	29,21	66,0	22'0	85'8	0,19	96'88	3,44	0,11	60'0	J
LFC37-5-8std	0,54	0,31	0,94	4,20	3,39	30,28	0,37	6,73	3,35	0,18	89'78	3,26	0,10	80'0	S
LFC38-10-5std	85'0	0,34	1,10	4,25	3,44	29,51	09'0	92'0	3,36	0,23	68'88	3,32	0,11	60'0	NC
LFC39-10-8std	0,55	0,32	1,04	4,03	3,26	30,57	25'0	1,71	3,18	0,22	39'46	3,15	0,10	80'0	NC
LFC40-20-5std	65'0	0,37	1,31	3,91	3,18	30,13	1,02	1,2	3,01	0,31	38,74	3,08	0,11	60'0	NC
LFC41-20-8std	95'0	0,35	1,24	3,70	3,02	31,15	26'0	29'0	2,85	0,30	38'35	2,92	0,10	80'0	NC
LFC42-5std	95'0	0,31	68'0	4,60	3,70	28,9	6,19	62'0	3,71	0,14	39,04	3,56	0,11	60'0	J
LFC43-8std	0,53	0,29	0,84	4,36	3,51	29,99	0,18	92'0	3,52	0,14	09'68	3,38	0,10	80'0	S
LFC44-5lin	65'0	0,32	0,93	4,82	3,88	30,28	0,19	0,83	88'8	0,15	36,13	8,73	0,11	60'0	S
LFC45-8linac	75'0	0,31	0,91	4,69	3,77	24,81	0,19	18'0	82'8	0,15	45'24	3,63	0,11	60'0	NC
LF46	0,39	0,25	0,40	1,83	3,93	24,67	0,53	69'0	30'8	0,48	46,65	2,30	0,34	0,22	C (autres)
LB47	1,44	96,0	1,18	3,66	2,24	30,41	0,26	0,74	3,00	1,01	35,24	3,08	0,12	80'0	S
Norme spontanée															
France %	traces - 2	5'0-0	0-1,5	4,0 - 10,0	1,5-6	25 - 38	traces - 0,5	>0,3	2,0-6,0	0-1	25 - 45	>5	0,15	0,12	
France "Maillette"	1 - 2,5	<0,3	2'0>	<2,5	<2	30 - 45	<1,2	<0,5	<1,5	0,5-1,5	33 - 46	<1,3			
Norme clonale															
Bulgarie	0,2-1,6	9'0>	<2,6	3,0-9,0	2,0-5,0	20 - 35	9'0>	>0,1	1,2-5	0,8-2	79 - 44	1 - 3,5			
Russie	40,6	√	3,5	3,0-8,0	2,0-5,0	20 - 35	9'0>	>0,1	1,2-5	0,5-2	79 - 44	1 - 3,5			
Australie	2,0-5,0	<0,5	<1,5	3,0-9,0	0,5-1	25 - 38	<0,5	>0,3	1,5-6,0	⊽	25 - 45	γ.			
Autres	8	⊽	\$>	1,0-10,0	0'9-5'0	20 - 43	<1,5	\$	8>	<2	25 - 47	8>			

TABLE 5.7: Teneurs relatives des composés normés de l'huile essentielle de lavande

En rouge : teneurs anormales selon la norme associée; En bleu : teneurs anormales, témoins d'oxydation; C : conforme à la norme associée; NC : Nonconforme à la norme associée; D : dégradé; 0 : aucune norme correspondante; L : extrait au laboratoire; Norme AFNOR NF ISO 3515 (Déc 2004) Sur la totalité des échantillons d'origine France 8 échantillons correspondent à la norme AFNOR NF T75-305 (juil. 1992).

L'échantillon type Bulgarie correspond bien à la norme, mais a un chémotype différent de ceux d'origine France. Il est donc difficile d'inclure cet échantillon à notre étude du profil moléculaire.

Au niveau des échantillons de lavande type France hors-norme, nous remarquons que certains possèdent toutes les caractérisques d'un mélange d'huiles essentielles de lavande et lavandin super. Ceci se traduit par une baisse des β -ocimènes accompagnée d'une nette augmentation du camphre (échantillons LF11 et LF16).

Par ailleurs, pour d'autres échantillons, on observe principalement une baisse des β -ocimènes. Une dégradation de l'huile essentielle pourrait constituer une expliquation. Or, les taux notamment en cis- β -ocimènes sont vraiment très faibles et les teneurs en linalol-oxydes ne sont pas anormalement élevées. L'existence de nombreux clones et variétés de lavande, crées en vu d'améliorer leur résistance aux maladies ou parasites, pourrait expliquer cela.

Egalement, l'ajout de standard de linalol et d'acétate de linalyle contribuerait aussi à entrainer une dilution des autres teneurs relatives.

Les analyses chirales et isotopiques apporteront des informations importantes à ce sujet. La maturité ou la période de récolte peuvent être une explication supplémentaire.

En ce qui concerne l'échantillon LF2-R adultéré au laboratoire, dès l'ajout de 5% de lavandin super dans la lavande (éch. LFC20-5), le cis- β -ocimène devient hors-norme. Cependant le taux initial de cis- β -ocimène était peu au dessus de la limite. Dans le cas de LF3-R plus riche en cette molécule, la baisse n'est pas visible. Le suivi de la teneur en cis- β -ocimène n'est pas pertinente pour chaque échantillon mais constitue néanmoins un premier indice de la qualité de l'échantillon. Le camphre quant à lui augmente ostensiblement à partir de 10% d'ajout de lavandin super. L'ajout de standard de linalol et d'acétate de linalyle pourra masquer en partie l'élévation de la teneur en camphre, mais diluera aussi la teneur en cis- β -ocimène.

La suite de l'étude permettra une meilleure compréhension de ces phénomènes.

5.1.3.2 Huile essentielle de lavandin super

Dans cette section sont regroupées les teneurs des composés normés. Le lavandin super contient des quantités en Z et E-β-ocimène inférieures à celles de la lavande. L'huile essentielle de lavandin possédant de moindre concentration de composés instables (ex :ocimènes), elle sera moins sensible à la dégradation. De plus ces composés ne sont pas normés, d'où la difficulté d'évaluer si l'échantillon est dégradé ou non. De plus l'augmentation des oxydes de linalol n'est pas toujours significative. C'est pourquoi aucun marqueur d'oxydation n'a été relevé. Du fait de cette caractéristique, la comparaison à la norme apportera moins d'enseignement.

Sur l'ensemble des échantillons seuls 8 correspondent à la norme. Cette constatation est surprenante, le lavandin super étant plus connu comme adultérant pour la lavande que comme huile essentielle adultérée. Là encore, une norme générale sans distinction d'origines n'est peut-être pas adaptée. Cependant tout comme la lavande les cultivars existants et la période de récolte peuvent être à l'origine de ces profils hors-norme.

	octanone-3	1.8 cinéole	linalol	camphre	lavandulol	Bornéol	terpinène-4-ol	Hexyl butyrate	linalyle acétate	acétate	
		+β phellandrene	+ E-4-thuyanol						+ géranial	de lavandulyle	conformité
RF	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	
LS1	8'0	3,3	33,5	4,8	0,4	2,6	0,2	5'0	36,3	1,3	S
LS2	9'0	3,8	28,9	5,1	0,2	1,9	00'03	9'0	43,5	1,6	U
LS3	9'0	3,8	28,9	5,1	0,2	1,9	0,03	9'0	43,5	1,6	S
LS4	8'0	3,3	32,7	4,9	0,4	2,7	0,2	5'0	37,5	1,5	0
LS5	2'0	3,1	34,2	4,3	0,2	3,1	0,2	8'0	37,7	1,4	J
PS-	8'0	2,6	34,9	4,2	6,0	3,0	1,0	6'0	37,1	1,4	U
LS7	1,0	3,3	31,2	4,7	6,0	2,1	0,1	9'0	40,9	1,6	S
LS8	1,0	4,8	32,1	4,9	6,0	3,6	0,2	9'0	35,0	1,3	0
LS9	9'0	3,0	35,6	4,6	9'0	3,4	5'0	9'0	34,6	1,4	S
.510	0,4	3,9	37,2	8,8	0,2	2,5	1,0	9'0	34,0	1,0	NC
Stf	9'0	2,5	34,6	4,4	2'0	2,1	6'0	9'0	38,9	1,5	ON
.512	9'0	3,2	29,2	1,7	0,2	5,1	<0,005	5'0	44,2	1,7	NC
.513	1,0	5,3	35,0	7,1	0,4	1,6	0,1	0,4	33,2	8'0	NC
.514	0,2	3,3	44,1	5,9	0,2	2,1	1,0	8'0	30,4	9'0	ON
S15	2'0	4,1	30,4	3,8	0,2	3,2	60,0	9'0	41,4	1,6	ON
.516	8'0	3,9	8'08	3,0	0,2	4,4	60'0	5'0	41,1	1,7	ON
517	2'0	3,2	38,6	4,8	6,0	2,4	6'0	2'0	33,8	0,2	NC
518	6'0	3,2	33,9	4,1	6,0	2,9	1,0	2'0	37,9	0,1	NC
S19	8'0	2,5	35,2	3,9	6,0	2,6	0,1	8'0	38,4	0,1	NC
S20	1,0	3,4	38,2	9'5	0,2	2,5	1,0	1,0	33,2	1,5	ON
S21	1,1	5,2	33,5	4,8	6,0	3,8	0,4	5'0	32,3	1,5	NC
522	6'0	5'5	39,6	5,3	0,2	3,6	0,2	2'0	26,6	2'0	ON
523	6'0	3,0	35,8	4,7	6,4	3,1	0,2	1,0	34,6	1,3	NC
S24	0,2	2,7	41,3	9'5	6,0	1,8	1,0	2'0	31,9	9'0	ON
525	1,0	5,3	35,6	0'2	6,0	1,7	1,0	6,0	31,7	5'0	ON
.526	6,0	3,5	41,8	5,5	6,0	2,1	1,0	9'0	30,0	5'0	ON
.527	0,4	2,8	34,2	4,3	0,2	2,9	1,0	0,4	37,5	1,0	ON
.528	8'0	7,5	22,6	4,4	0,4	8'8	1,8	0,4	26,6	1,3	ON
S29	1,0	3,5	41,9	9'5	0,2	1,6	1,0	9'0	29,2	9'0	ON
530	9'0	3,4	32,0	4,5	0,2	3,4	0,2	8'0	39,65	1,5	NC
.531	6,1	3,2	34,4	5,9	0,2	1,7	1,0	6,0	36,6	6,0	NC
.532	0,1	4,5	37,0	6,5	0,2	1,8	0,1	6,0	32,8	8'0	NC
rme	0,4-1,2	3,0-7,0	25 - 37	3,5-6,5	traces - 0,7	1,4-3	traces - 1	0,4-1,2	35 - 47	0,6-2,3	

En rouge: teneurs anormales selon la norme associé; En bleu: teneurs anormales, témoins d'oxydation; C: conforme à la norme associée; NC: Non-conforme à la norme associée; D: dégradé; 0: aucune norme correspondante; L: extrait au laboratoire; Norme AFNOR NF T75-305 (Déc 2004)

TABLE 5.8: Teneurs relatives des composés normés de l'huile essentielle de lavandin super

5.1.4 Discussion sur les résultats de l'analyse GC-FID

Nous connaissons maintenant de manière précise la composition des huiles essentielles étudiées. Tout d'abord les huiles essentielles sont sujettes à la dégradation, particulièrement celles de bergamote, citron, mandarine et lavande. Les bonnes conditions de conservation sont impératives. Ces échantillons sont donc malgré tout utilisables lors de la construction du modèle statistique (cf. section 4.8).

De plus, nous verrons qu'en ce qui concerne les analyses chirales, isotopiques ou profils des PMF, les résultats ne présentent aucune anomalie due à la dégradation.

Néanmoins, en industrie, lors d'un contrôle de qualité, les échantillons détectés comme étant soit trop dégradés soit particulièrement atypiques, pourront être écartés dès cette étape. En effet, d'une part, l'oxydation des huiles essentielles, pouvant être confirmée par la mesure d'indice de peroxyde, est susceptible de provoquer des réactions allergisantes chez certains individus. D'autre part, la méthodologie mise en place dans cette étude vise à une détection « fine » de l'adultération. Or, ce procédé devient trop lourd face à une fraude grossière.

De manière générale, nous avons eu un grand nombre d'huiles essentielles ne correspondant pas ou partiellement à la norme associée. Ceci a été remarqué tout aussi bien pour les huiles essentielles d'orange et de lavandin super réputées pour être des adultérants usuels et non des huiles essentielles adultérées. Il apparait alors qu'un profil hors-norme n'est pas nécessairement preuve d'une fraude sur une huile essentielle.

Par contre un profil hors norme signifie que l'huile n'est pas tout à fait de qualité attendue. C'est le cas des huiles essentielles de bergamote, citron et mandarine qui ont un fort taux de p-cymène et un faible taux de γ-terpinène, ou d'une lavande avec un faible taux de Z et E-β-ocimène. Si ce sont là les seules teneurs hors normes on peut suspecter une oxydation de l'huile due à une mauvaise conservation. S'il y a d'autres composés aux teneurs hors normes alors, on peut alors envisager une fraude.

Nous pouvons aussi nous interroger sur l'adaptation des normes aux huiles essentielles actuelles. De plus, une norme ne tient pas toujours compte des marqueurs spécifiques d'un adultérant potentiel (δ -3-carène de l'orange) ni des modifications des teneurs relatives les unes par rapports aux autres. Il est vrai que l'ajout d'une huile essentielle étrangère va modifier les teneurs relatives des unes par rapports aux autres, sans nécessairement modifier la conformité à la norme. Ainsi, pour exemple, le taux de monoterpènes de l'huile essentielle de madarine authentique est relativement constant et il ne peut avoir un fort taux de limonène associé à de forts taux de β -pinène et de γ -terpinène, même si le profil de l'huile essentielle est conforme à la norme AFNOR.

Il existe une limitation supplémentaire en l'absence d'évaluation de « distance » à la norme. En effet, les molécules hors-normes sont plus ou moins éloignées de la gamme de naturalité mais la simple comparaison à celle-ci n'est pas suffisante pour évaluer le degré de concordance avec l'échantillon.

Il s'agit alors de pallier ces inconvénients. C'est pourquoi, une méthode statistique est élaborée pour chacune des huiles essentielles étudiées (cf. chapitre 6). Ainsi les relations entre teneurs relatives sont prises en compte, ainsi que la similarité entre échantillons. Aussi plus l'échantillon est anormal, plus il s'écarte du lot. Cette méthode permet de remédier aux lacunes d'une simple étude du profil moléculaire de la fraction volatile des huiles essentielles.

Dans le cadre de l'étude des citrus, pour les coupes effectuées au laboratoire, seuls les échantillons coupés à partir de 20% d'orange ne correspondent plus à la norme. Or, de nombreux échantillons commerciaux sont hors-normes vis-à-vis de plusieurs molécules. Ceci tendrait à démontrer que nos échantillons adultérés le sont plus finement que les échantillons commerciaux. Ainsi la fraude commerciale, que nous avons tenté de reproduire, est différente et apparament plus facilement détectable. Cependant il est très intéressant d'être capable de détecter des fraudes plus « discrètes », car elles existent et pourraient être plus souvent utilisées dans le futur afin de déjouer des contrôles de plus en plus pointus.

Dans le but d'approfondir la connaissance des échantillons et de corréler les résultats obtenus lors de l'établissement du profil moléculaire, des analyses plus ciblées sont nécessaires.

5.2 Analyses chirales

De nombreuses molécules ont été choisies comme cibles d'analyses énantiomériques. Si l'analyse de l'α-pinène et sabinène dans les citrus est assez classique, celle du citronellal, l'α-terpinéol et du linalol l'est moins (sauf linalol pour la bergamote). Le but de cette étude est tout d'abord d'observer les ratios énantiomériques des huiles essentielles de référence afin d'identifier leur gamme de valeurs. En effet, si celle-ci est trop importante alors la détection de la fraude n'est pas possible. En revanche, si elle est resserrée les échantillons commerciaux et les échantillons adultérés au laboratoire sont étudiés. En effet, il est nécessaire d'avoir une concordance entre ces résultats pour que la détection d'une anomalie ait du sens.

Aussi nous veillons à ce que chaque analyse apporte une information supplémentaire ou approfondie car il est inutile de multiplier les analyses donnant exactement les mêmes indications. Usuellement, les énantiomères dans les citrus sont appelés (+) et (-). Dans les huiles où ils sont présents en forte abondance, l'appellation R et S est privilégiée pour les isomères de linalol,

acétates de linalyle et de lavandulyle. Ces termes sont relatifs à deux nomenclatures spécifiques (cf. section chapitre 1.1.1.3).

Pour chaque analyse, la teneur de l'un des isomères est indiquée (le taux du deuxième isomère étant le complément à 100%). Dans un souci d'homogénéité nous avons pris le parti de présenter le taux du même stéréo-isomère qu'il soit majoritaire ou non dans une huile essentielle donnée. Quand cela est jugé pertinent, la résolution entre les deux isomères et l'incertitude expérimentale sont également renseignées.

5.2.1 Analyse chirale des terpènes α-pinène et sabinène des citrus

Cette analyse est destinée à mettre en évidence l'addition d'huile essentielle d'orange dans les citrus. Elle a été effectuée sur un analyseur GC unidimensionnel et non pas sur un appareil GC multidimensionnel comme cela est fréquent. En conséquence, préalablement à l'injection, un fractionnement sur silice de l'échantillon a été nécessaire. Cette étape a permis d'isoler et de n'injecter que la fraction contenant les composés apolaires (monoterpènes et sesquiterpènes). L'analyse de l' α -pinène sur colonne supelco β dex 325 30 m \times 0,25 mm \times 0,25 μ m est satisfaisante.

En revanche, pour celle du sabinène, il n'a pas été possible de trouver une programmation en température permettant une résolution correcte des énantiomères. En effet, la fraction terpénique est riche en molécules et la purification préalable ne permet pas d'enlever les molécules parasites à l'analyse.

Par contre, la colonne cyclosil β 30 m \times 0,25 mm \times 0,25 μ m s'est révélée adaptée à cette séparation. Les chromatogrammes en sont les suivants :

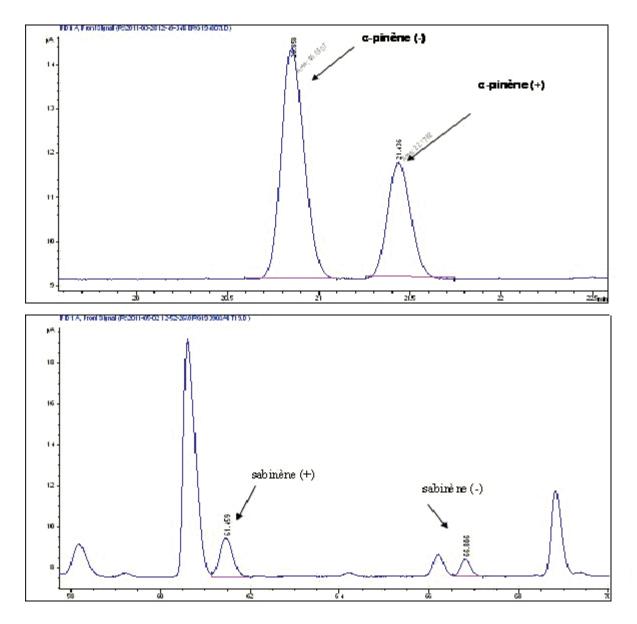


Figure 5.6: Profil énantio-GC-FID pour la chiralité des terpènes

A cause de la faible capacité de charge de la colonne chirale, la quantité injectée doit être contrôlé précisément pour avoir une résolution acceptable avec les molécules voisine de chaque stéréo-isomère du sabinène. Si la résolution est trop affectée alors l'incertitude d'intégration est plus importante.

Ci-dessous, sont présentés les facteurs de résolution entre les deux isomères de l' α -pinène, et celle entre le sabinène et la molécule inconnue éluée devant lui sur le chromatogramme :

Molécules	Résolutions
α -pinène (+) - (-)	2,6
Sabinène (+) - (-)	11,0

Table 5.9: Résolutions associées à la séparation des isomères de a-pinène et sabinène

L'incertitude de mesure se situe à plusieurs niveaux. Il existe une incertitude à l'injection à laquelle s'ajoute l'incertitude à l'intégration. Cette dernière est négligeable lorsque la résolution entre les deux isomères est supérieure à 2 et qu'aucune molécule ne vient perturber l'intégration. C'est le cas de l'α-pinène, molécule pour laquelle l'incertitude totale est équivalente à celle calculée (cf. chapitre 4.7.1). Ce n'est pas le cas pour les stéréoisomères du sabinène, qui malgré une importante résolution entre eux, ont une résolution avec les molécules voisines un peu faible et dont l'incertitude d'intégration est augmentée (cf tableau 5.9).

Lors de cette étude toutes les huiles essentielles ont été intégrées de la même manière, ce qui limite l'influence de cette incertitude. Dans le cas des huiles essentielles d'orange et pamplemousse, pour connaître l'incertitude totale, il faut se référer au tableau 5.10 selon la teneur de la molécule dans la fraction analysée.

Molécules	HE	Incertitude injection $\%$	Incertitude intégration %	Incertitude totale %
α-pinène (-) %	Bergamote citron	1	Négligeable	1
α-pmene (-) /0	Mandarine	1	Négligeable	1
	Orange pamplemousse	2	Négligeable	Tableau 5.1
Sabinène (+) %	Citrus	2	4,0	6

Table 5.10: Incertitudes associées à la séparation des isomères de a-pinène et sabinène

5.2.1.1 Huile essentielle d'orange

Afin de compléter les données de la littérature, quelques échantillons d'orange ont été analysés. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau 5.11 suivant :

	α-pinène (-)	sabinène (+)
REF	%	%
Littérature[99]		94,6-97,9
Littérature[98]	0-1	
Laboratoire	0.3-6.7	81,8-98,0
OB1	0,23	94,0
OB2	0,56	97,0
OB3	1,66	89,2
OB4	0,46	97,2
OB5	0,53	91,5
OCR6	0,80	92,1
OCR7	0,22	96,1
OEV8	1,83	94,0
OEV9	1,42	93,4
0110	0,58	91,8
Ol11s-df	0,52	92,8
Ol12d	0,43	95,4
Ol13s	1,46	93,6
OM14s-df	0,52	97,5
Oi15-df	0,70	95.6
Oi16	0,99	93,6
Oi17	1,10	92,7
Oi18	0,66	95,2
Oi19	0,17	99,8
Oi20	0,91	95,8
Oi21	0,20	95,4
Oi22	1,83	91,4
Oi23dt		
Oi24-hd	0,49	97,2

Table 5.11: Teneurs relatives des isomères a-pinène (-) et sabinène (+) pour l'huile essentielle d'orange

Malgré le grand nombre d'huiles essentielles d'orange ne correspondant pas à la norme AFNOR (ISO/FDIS 3140 (Mai 2011)) sur le profil moléculaire 5.1.2.1, les valeurs obtenues par analyse chirale sont tout à fait comparables à la littérature. D'emblée nous remarquons que ces deux molécules sont proches d'être otpiquement pures.

L'inconvénient majeur de cette analyse pour la discrimination de la fraude est la faible teneur de ces molécules dans l'huile essentielle d'orange comparativement à celles de bergamote et de citron. Par contre les teneurs sont similaires avec les huiles essentielles de mandarine et pamplemousse.

5.2.1.2 Huile essentielle de bergamote

Les résultats présentés ci-dessous (cf. tableau 5.12), vont permettre d'évaluer le potentiel de cette analyse dans la discrimination de la fraude.

	α-pinène (-)	Sabinène (+)
REF	% pinene ()	%
Littérature [100]	52,0 - 78,0	
Littérature [99, 108]		14,1-18,8
Littérature[109]	71,1 - 67,3	
Littérature [110]		13,7-16,3
Littérature [111]		14,3-14,6
BI1-R	66,2	17,8
BI2-R	69,0	16,3
BI3-R	68,4	16,4
BI4-R	68,0	16,8
BI5-R	68,5	17,1
BI6-R	68,6	17,0
BI7-R	67,3	16,3
BI8	68,9	15,2
Bl9	67,7	17,7
BI10	65,7	17,0
BI11	54,6	22,3
Bl12	62,8	21,4
BI13	65,9	17,2
BI16	67,4	18,6
BI17	70,9	14,3
BI18	69,9	14,5
BI19	70,4	14,3
Bl20-df	66,4	17,5
Bl21	66,2	18,2
Bl22-df	67,1	17,8
Bl23	66,5	18,3
Bl24	66,1	17,6
Bl25	67,2	17,3
Bl26	66,5	16,3
Bl27-df	66,8	17,7
Bl28-df	66,5	20,0
Bl29-df	74,4	18,0
Bl30-df	65,6	17,6
Bl31-df	71,3	22,0
Bl32-df	66,6	17,9
BIC33-5	64,8	18,8
BIC34-10	62,8	19,8
BIC35-20	60,2	22,6
BIC36-10+1std	62,8	19,8
BIC37-10+2std	62,8	19,8

	α-pinène (-)	Sabinène (+)
	%	%
BIC38-5	66,8	17,6
BIC39-10	64,9	18,9
BIC40-20	61,1	21,4
BIC41-10+1std	64,9	18,9
BIC42-10+1std	64,9	18,9
BIC43-5	67,4	17,4
BIC44-10	65,3	18,6
BIC45-20	61,5	21,2
BIC46-10+1std	65,3	18,6
BIC47-10+2std	65,3	18,6
BICc48-5	68,4	16,0
BICc49-10	68,4	15,7
BICc50-20	68,4	15,1
BICc51-10+1std	68,4	15,7
BICc52-10+2std	68,4	15,7
BICc53-5	69.0	15,9
BICc54-10	68,9	15,7
BICc55-20	68,8	15,0
BICc56-10+1std	68,9	15,7
BICc57-10+2std	68,9	15,7
BIC58-10-HW1	69,0	16,3
BIC59-10-8HW7ac	69,0	16,3
BIC60-10-HW1	68,4	16,4
BIC61-10-8HW7ac	68,4	16,4
BIC62-10-HW1	68,9	18,9
BIC63-10-8HW7ac	68,9	18,9
BIC64-10-HW1	68,4	18,9
BIC65-10-8HW7ac	68,4	18,9
Bl66dt		
BIL67	68,4	16,5
BIL68-R	68,2	16,1
BC69	67,8	16,7
BCI70	65,4	18,7
BA71	63,2	20,3

Table 5.12: Teneurs relatives des isomères a-pinène (-) et sabinène (+) pour l'huile essentielle de bergamote

Rouge: valeurs anormales; Orange: valeurs limites

Dans le tableau 5.12, les échantillons BI14-df et BI15 n'ont pas pu être analysés en raison d'une quantité d'huile essentielle trop limitée. L'huile essentielle BI66dt est déterpénée, cette analyse n'a donc pas pu être effectuée.

En ce qui concerne le sabinène, d'après nos résultats et la littérature (cf. tableau 5.13) nous avons pu définir des valeurs anormales et des valeurs limites. Pour l'α-pinène, la difficulté est plus grande, car la littérature sur ce sujet est peu abondante et les gammes de valeurs indiquées sont assez différentes.

Trois valeurs paraissent un peu élevées mais ne sont pas anormales comparées aux valeurs données par H. Casabianca et C.Chau.[103] L'analyse chirale de l'α-pinène semble moins discriminante au niveau des échantillons commerciaux car seuls 2 échantillons ont une valeur élevée en α-pinène (-) contre 4 pour le sabinène (+). Par ailleurs, en raison du peu de littérature cette analyse est plus difficile à interpréter et nous disposons d'assez peu d'échantillons de référence pour établir nos propres valeurs limites. L'analyse chirale de l'α-pinène n'est donc pas conservée pour la suite de l'étude.

A partir d'une coupe à 10 % d'huile essentielle d'orange, les ratios énantiomériques sur les deux molécules deviennent limites voire suspects. Cependant, la fourchette de valeurs indiquée dans la littérature pour la chiralité du sabinène est assez large et en conséquence, le rapport énantiomérique après un ajout d'huile essentielle d'orange ne devient pas automatiquement anormal.

5.2.1.3 Huile essentielle de citron

L'analyse énantiomérique de l'α-pinène (-) et du sabinène (+) a été effectuée sur les échantillons d'huile essentielle de citron. Les résultats sont présentés ci-dessous (cf. tableau 5.13).

	α-pinène (-)	Sabinène (+)
REF	%	%
Littérature [99]	70,0 - 66,0	
Littérature [100]	,,-	13,6-14,8
Littérature[116]		25,5-31,5
Cl1df-R	69,0	16,3
Cl2a-R	67,4	15,7
Cl3h-R	67,9	15.4
CI4p-R	69,9	15,4 14,7
Cl5e-R	71,1	15,5
Cl6h-R	69,1	16
CI7-R	69,2	14,5
CIB-R	68,7	14,3
CI9-R	68,3	13,5
CI10-R	68,3	13,1
CI11-R	68,6	14,3
CI12-R	68,6	13,1
CI12-R	68,6	12,5
CI13-R CI14-R	68,7	14,1
CI14-R CI15-df	68,5	16,6
C115-01	69,5	16,2
		10,2
CI17-df CI18-df	71,3	14,7 16,0
	68,1	
CI19	70,4	14,7
Cl20-df	69,7	17,6
Cl21-df	69,4	14,8
Cl22-df	67,2	21,4
CI23	69,3	19,0
CI24	71,2	17,1
CI25	69,8	16,5
Cl26-df	70,2	18,8
CI27	69,7	17,3
CI28	70,8	16,8
Cl29-df	69,2	15,5
Cl30-df	70,2	14,5
Cl31	66,5	16,4
Cl32	67,5	
Cl33m	67,5	16,0
Cl34	66,9	14,4
CI35	74,3	11,5
CIC36-1	67,2	15,9
CIC37-5	66,1	16,3
CIC38-10	65,2	17,1
CIC39-20	63,1	18,6
CIC40-5	66,1	16,3
CIC41-10	65,2	17,1
CIC42-20	63,1	18,6
CIC43-5	67,5	15,8
CIC44-10	68,9	15,9
CIC45-20	69,5	16,0
CIC46-5	67,4	14,9
CIC47-10	67,4	15,0
CIC48-20	67,4	15,1
CIC49-1	67,2	15,9
CIC50-5	66,1	16,3
CIC51-10	65,2	17,1
CIC52-20	63,1	18,6
CIC53-5	68,3	13,3
CIC54-10	68,2	13,6
CIC55-20	67,9	13,9

	α-pinène (-)	Sabinène (+)
	%	%
	,,,	,,,
CIC56-5	67,8	13,5
CIC57-10	66,5	14,2
CIC58-20	64,3	14,9
CIC59-5	67,8	13,5
CIC60-10	66,5	14,2
CIC61-20	64,3	14,9
CIC62-5	71,1	15,5
CIC63-10	71,1	15,7
CIC64-20	71,1	15,9
CIC65-5	71,1	15,5
CIC66-10	69,7	15,5
CIC67-20	69,1	15,5
CIC68-5	71,1	16,2
CIC69-10	69,7	17,0
CIC71-20+0,5std	69,1	18,3
CIC72-20+1std+0,2gac	64,3	14,9
CIC73-20+1std	64,3	14,9
CIC74-20+1std+0,2gac	64,3	14,9
CIC75-20+1std	67,4	18,6
CIC76-20+0,5std	67,4	18,6
CIC77-20+1std+0,2gac	67,4	18,6
CIC78-20+1std+0,2gac	67,4	18,6
CIC71-20+0,5std	67,4	14,9
CIC79+1std	69,8	14,6
CIC80+1std+0,2gac	69,8	14,6
CA81	65,8	17,9
CA82-df	69,2	16,8
CA83	70,4	15,7
CA84	68,8	13,4
CA85	68,5	16,8
CCI86	68,3	
CCI87-df	69,1	17,0 18,5
CCI88	69,5	14,7
Cl89-df	68,1	25,3
Cli90	71,7	15,3
Cli91	69,9	
Cli92	69,5	16,1 15,2
CE93	69,8	14,6
CE94	63,8	
CE95	68,0	13,8 13,6
CE96		
CE97-5	66,9	14,1
CE97-5 CE98-10	65,9	14,9
	63,4 69.8	16,5
CE99-20	69,8	14,6 14,3
CE100+1std+0,2gac CEL101	65,3	
CEL101	68,2	14,9
CEL102 CEL103	68,5	13,4 13,2
	69,3 70.5	15,2
CEL104	70,5	15,7
CEL105	67,8	15,6
CEL106-hd	62,8	15,5
CC107	61,3	17,1
CC108	70,0	23,5
CI109dt	67,8	13,5

 $Table 5.13: \ \textit{Teneurs relatives des isomères a-pinène (-) et sabinène (+) pour l'huile essentielle de citron$

 $Rouge: valeurs\ anormales\,;\ Orange: valeurs\ limites\,;\ Bleu: valeurs\ atypiques$

Les résultats obtenus sont similaires à ceux obtenus pour la bergamote.

Pour le sabinène, d'après nos résultats et la littérature (cf. tableau 5.13), nous avons pu définir des valeurs anormales et des valeurs limites.

Au niveau de l'α-pinène, les plages indiquées dans la littérature sont différentes, ce qui complique l'interprétation. Cependant l'analyse des échantillons commerciaux ne montre aucune réelle anomalie au niveau de l'α-pinène comparée à celle du sabinène qui présente au moins 6 anomalies. Pourtant les échantillons adultérés au laboratoire ont des résultats hors-gamme pour les deux molécules à partir d'un ajout de 10 % d'orange, ou pour l'une ou l'autre, suivant l'adultération effectuée.

Sur la base des résultats des échantillons commerciaux, seule l'analyse du sabinène est conservée pour la suite de l'étude.

5.2.1.4 Huile essentielle de mandarine

En ce qui concerne l'huile essentielle de mandarine, voici les résultats obtenus pour l'analyse énantiomérique de l' α -pinène (-) et du sabinène (+).

DEE		Sabinène (+)
REF	%	%
Littérature [99]		76,2-80,5
Littérature [127]		77,6-81,6
Littérature [124]		79,8-80,5
Littérature [70]	51,4-55,6	80,7-83,3
Laboratoire	52,0-55,2	
MI1-R	54,4	76,0
Ml2j-R	54,6	81,1
MI3-R	54,3	77,6
MI4v-R	56,0	77,8
MI5j-R	55,5	78,3
Ml6j-R	58,6	79,8
MI7v-R	58,9	80,1
MI8v-R	52,7	77,5
MI9j-R	53,2	76,5
MI10j-R	52,9	77,5
MI11r-R	54,0	75,9
Ml12j	54,4	78,3
MI13	55,5	77,6
Ml14-df	61,6	75,2
MI15-df	54,3	78,4
Ml16j	54,2	58,8
Ml17j-df	55,3	79,4
MI18v-df	54,5	78,7
MI19	52,8	77,3
MI20	52,0	80,8
Ml21-df	54,2	78,8
Ml22j	51,6	78,9
MI23-df	54,0	71,3
MICm24-5	54,5	80,9
MICm25-10	54,4	80,7
MICm26-20	54,2	80,3
MICm27-5	53,9	76,0
MICm28-10	53,9	76,0
MICm29-20	53,8	76,2
MICm30-5	54,2	77,6
MICm31-10	54,2	77,6
MICm32-20	54,0	77,5
MIC33-5	54,0	77,5
MIC34-10	53,7	81,9
MIC35-20	53,0	83,1
MICf36-5	51,3	84,3
MICo37-5	54,6	81,1
MICo38-10	53,0	83,1

	α-pinène (-)	Sabinène (+)
	%	%
MICo39-20	51,3	84,3
MICto40-5	53,7	81,9
MICto41-10	53,0	83,1
MICto42-20	51,3	84,3
MICto43-5	53.4	77,1
MICto44-10	52,4	79,5
MICto45-20	50,7	80,5
MICto46-5	53,6	78,7
MICto47-10	52,6	80,5
MICto48-20	50,7	81,7
MIC49-5	53,4	77,1
MIC50-10	52,4	79,5
MIC51-20	50,7	80,5
MICo52-5	53,4	77,1
MICo53-10	52,4	79,5
MICo54-20	50,7	80,5
MIC55-5	53,6	78,7
MIC56-10		· ·
MIC57-20	52,6	80,5
	50,7	81,7
MICo58-5	53,6	78,7
MICo59-10	52,6	80,5
MICo60-20	50,7	81,7
MIC61-10+0.4std	53,0	83,1
MI62+0.4std	54,6	81,1
MIL63-hd	56,5	76,3
MI64-hd	53,0	76,8
MIL65	52,9	77,5
MA66-df	49,3	68,6
MA67j	56,4	79,9
MA68	48,0	85,1
MA69	46,9	86,4
MB70v	56,5	79,0
MB71v	55,5	75,9
MB72v	53,9	76,5
MB73v	57,4	78,7
MB74	54,7	76,0
MB75	53,4	78,4
MCB76-10	52,0	80,8

Table 5.14: Teneurs relatives des isomères a-pinène (-) et sabinène (+) pour l'huile essentielle de mandarine

Rouge: valeurs anormales; Orange: valeurs limites; Bleu: valeurs atypiques

L'excès énantiomérique du sabinène de l'orange est plus proche de celui de la mandarine qu'il ne l'était de celui de la bergamote et du citron. Cependant, contrairement aux huiles essentielles précédentes plus riches en sabinène, les teneurs en sabinène de l'orange et de la mandarine

sont similaires d'où une influence plus importante de l'ajout d'huile essentielle d'orange sur l'excès énantiomérique. A quelques exceptions près il est assez difficile de conclure avec la seule observation des résultats. De plus, nous avons quelques valeurs atypiques (en bleu). L'existence de différents cultivars peut être à l'origine de ces résultats. En ce qui concerne les échantillons adultérés, seule une addition de 20 % d'orange pourra être parfois visible, car un des deux et parfois les deux ratios énantiométiques atteignent des valeurs limites voire suspectes.

5.2.1.5 Huile essentielle de pamplemousse

Seuls quelques échantillons d'huile essentielle de pamplemousse ont été analysés, et les résultats sont proposés dans le tableau 5.15 ci-dessous :

REF	α-pinène (-) %	Sabinène (+) %
Littérature[100]	8,0	
Laboratoire	0,3 - 11	85,0-98,0
PA1	3,4	90,7
PF7	0,7	96,4
PUS9-df	5,8	66,4
PUS10	10,5	84,7
PUS11	0,6	93,4
PP12-df	9,8	93,8
PI15	1,5	87,9
PAS16	2,7	88,5

Table 5.15: Teneurs relatives des isomères a-pinène (-) et sabinène (+) pour l'huile essentielle de pamplemousse

En ce qui concerne l'α-pinène (-), certaines teneurs semblent plus élevées que celle obtenues pour l'orange. Cependant la gamme des résultats est très large et l'ajout d'huile essentielle d'orange ne sera pas visible. Dans le cas du sabinène, les excès énantiomériques sont similaires à ceux de l'huile essentielle d'orange donc l'analyse n'est pas non plus pertinente. Cette analyse n'a donc pas été poursuivie pour l'huile essentielle de pamplemousse.

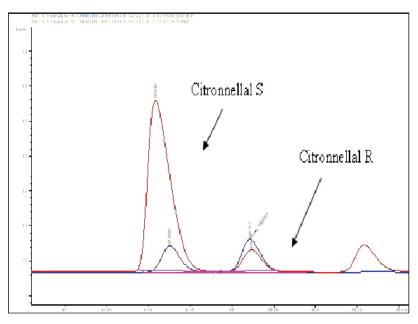
5.2.2 Analyse chirale du Citronnellal des huiles essentielles de citrus

Dans ce chapitre, les possibilités, par la mesure du ratio énantiomérique du citronnellal, d'identifier l'addition d'huile essentielle d'orange, d'huile essentielle distillée ou encore de citronnellal synthétique dans le cas du citron, sont évaluées.

Le cas de l'huile essentielle de bergamote n'a pas été étudié car cela ne semblait pas pertinent au vu de la faible teneur de citronnellal et des techniques analytiques déjà existantes.

Comme précédemment l'analyse nécessite un prétraitement de l'échantillon, afin de limiter les risques de coélution mais permet aussi de concentrer le citronnellal tout en protégeant la colonne par élimination des composés lourds alors en forte concentration. Ce fractionnement

est indispensable pour l'orange et le pamplemousse car il existe une coélution du citronnellal R avec le β -cubébène (cf section 4.1).



En rouge : chromatogramme d'un citron

En bleu : chromatogramme du standard de citronnellal

Figure 5.7: Profil énantio-GC-FID pour la chiralité du citronnellal

La résolution obtenue dans ces conditions est la suivante :

Molécules	Résolution
Citronnellal (R) – (S)	2,5

Table 5.16: Résolution associée à la séparation des isomères de citronnellal

L'incertitude de mesure correspond à l'incertitude de l'injection, l'incertitude d'intégration étant jugée négligeable au regard de la résolution.

Molécules	HE	Incertitude	Incertitude	Incertitude
Molecules	injection %	intégration $\%$	totale %	
Citronnellal S (-)	Citrus	1	Négligeable	1

Table 5.17: Incertitudes associées à la séparation des isomères du citronnellal

Les résultats obtenus sont présentés ci-dessous. En plus du pourcentage relatif en citronnellal R, sa teneur dans l'huile essentielle a été ajoutée, contribuant à l'interprétation des résultats.

5.2.2.1 Huile essentielle d'orange

Dans le tableau 5.18 sont synthétisés les résultats obtenus pour les huiles essentielles d'orange:

	Citronnellal R	Citronnellal
REF	%	%
OB1	53,2	0,04
OB2	53,5	0,05
OB3	56,9	0,05
OB4	54,8	0,05
OB5	57,0	0,04
OCR6	54,1	0,05
OEV8	53,9	0,04
OI10	52,6	0,03
Ol11s-df	56,0	0,05
Ol12d	58,0	0,05
Ol13s	58,1	0,03
OM14s-df	52,8	0,03
Oi15-df	53,9	0,03
Oi16	57,3	0,04
Oi17	54,1	0,04
Oi18-df	56,7	0,06
Oi19	53,8	0,04
Oi21	56,0	0,04
Oi22	54,2	0,04
Oi23dt	58,5	1,48

Table 5.18: Teneurs relatives de l'isomère du citronnellal R et teneur totale pour l'huile essentielle d'orange

Malgré le fractionnement sur silice préablable éliminant le β -cubébène , il subsiste une coélution avec l'isomère (R) du citronnellal, qui a nécessité l'utilisation de la GC-MS. Le composé identifié semble être la E-dihydrocarvone qui lors de l'étape de purification, ne peut-être éliminée de la fraction d'intérêt. En effet, ce composé est, tout comme le citronnellal, élué avec la fraction des composés moyennement polaires.

Nous ne disposons pas de points de comparaison avec la littérature, néanmoins les teneurs en citronnellal R obtenues sont homogènes et comprises entre 52,6 % et 58,5 %.

5.2.2.2 Huile essentielle de citron

Dans le tableau 5.19 sont présentés les résultats obtenus pour les huiles essentielles de citron :

	Citronnellal R	Citronnellal
REF	%	%
		70
Littérature[116]	, ,	
Laboratoire	7,1-10,2	0.44
Cl1 df-R	8,4	0,11
Cl2a-R	9,9 9,7	0,08
Cl3h-R	9,7	0,09
Cl4p-R	8,7	0,10
Cl5e-R	8,8	0,09
Cl6h-R	8,6	0,10
CI7-R	8,5	0,11
CI8-R	10,2	80,0
CI9-R	10,4	0,10
CI10-R	9,9	80,0
CI11-R	30,0	0,09
CI12-R	26,5	0,09
CI13-R	29,0 30,2	0,09
CI14-R	30,2	0,10
CI15-df	8,9 11,2	0,07
CI16	11,2	80,0
CI17-df	25,9	0,05
CI18-df	8,4	0,09
CI19	8,4	0,11
Cl20-df	12,7	0,02
Cl21-df	13,3	0,02
Cl22-df	26,7	0,05
CI23	26,7 16,3	0,04
CI24	11,4	0,04
CI25	41,9	0,05
Cl26-df	15,1	0,02
CI27	42,4	0,05
CI28	31,5	0,06
Cl29-df	38,0	0,08
Cl30-df	11,5	0,02
Cl31	8,8	0,12

	Citronnellal R	Citronnellal
	%	%
Cl33m	9,8	0,10
CIC36-1	10,1	90,0
CIC37-5	11,2	0,06
CIC38-10	12,1	0,06
CIC39-20	14,6	90,0
CIC43-5	10,1	90,0
CIC44-10	10,6	0,06
CIC45-20	11,4	0,06
CA81	13,4	0,05
CA82-df	11,1	0,01
CA83	11,1 11,2	0,05
CA84	9,6	0,07
CA85	13,8	0,05
CCI86	21,1	0,02
CCI87-df	29,8	0,06
Cl89-df	6,2	0,09
Cli90	9,4	0,09
Cli91	8,5	0,13
Cli92	8,4	0,13
CE93	8,3	0,15
CE94	10,8	0,10
CE96	11,3 12,7	0,12
CEL102	12,7	90,0
CEL102-D	14,6	90,0
CEL103	11,9	0,12
CEL104	7,4	0,11
CEL105	7,8	0,12
CEL106-hd	9,8	90,0
CC108	11,4	0,11
Cl109dt	10,5	0,15

Table 5.19: Teneurs relatives de l'isomère du citronnellal R et teneur totale pour l'huile essentielle de citron

 $En\ rouge: valeurs\ anormales$

Les échantillons de référence ont des résultats correspondant à ceux de la littérature à l'exception des échantillons CI11-R, CI12-R, CI13-R, CI14-R qui pourtant ont été fournis par un producteur "de confiance". Nous n'avons malheureusement pas pu obtenir d'explication de sa part. Une coélution spécifique à certains échantillons de référence (éch. CI11-R, CI12-R, CI13-R, CI14-R) a été envisagée. Cette dernière hypothèse a été réfutée à l'aide de l'analyse en GC-MS. En effet, une telle analyse a été réalisée avec des conditions expérimentales identiques (colonne, gradient de température) et aucune coélution n'a été détectée. En conséquence, ces résultats hors norme induisent une grande variabilité dans nos échantillons de référence et ne nous permettent pas d'interpréter les résultats des échantillons commerciaux.

Les résultats obtenus pour l'huile essentielle de citron distillée montrent que l'expression à froid et la distillation ne produisent pas exactement le même excès énantiomérique (éch. CEL102, CEL106-hd). Il se pourrait aussi que la technique d'extraction soit à l'origine de différents ratios chiraux, tout comme c'est le cas pour certains alcools (cf. section 1.1.1.3). Aussi l'échantillon CEL102 laissé quelques semaines à la lumière à 30-40 °C montre une légère racémisation du citronnellal.

5.2.2.3 Huile essentielle de mandarine

Dans le tableau 5.20 sont synthétisés les résultats obtenus pour les huiles essentielles de mandarine :

REF	Citronnellal R %	Citronnellal %
Litterature [25]	91,1 - 96,1	
MI1-R	92,6	0,03
Ml2j-R	91,1	0,03
MI3-R	90,8	0,04
MI4v-R	87,9	0,04
MI5j-R	90,5	0,03
Ml6j-R	88,5	0,02
MI7v-R	86,9	0,02
MI10j-R	91,9	0,03
MI11r-R	92,8	0,05
MI13	90,3	0,02
MI15-df	92,3	0,05
MI16j	85,3	0,02
MI17j	91,6	0,02
MI18v	91,6	0,03
MI21	89,1	0,02
Ml22j	86,2	0,02
MI23	88,7	0,06
MID64	89,1	0,01
MA66	87,0	0,03
MA67j	87,5	0,02
MB70v	92,0	0,03
MB72v	77,0	0,02
MB73v	88,1	0,03
MB75	88,2	0,02

 $En\ rouge:\ valeurs\ anormales$

Table 5.20: Teneurs relatives de l'isomères du citronnellal R et teneur totale pour l'huile essentielle de mandarine

La chiralité est très différente de celle de l'orange et les teneurs totales en citronnellal sont similaires, ce qui permettrait de remarquer l'ajout éventuel d'huile essentielle d'orange. Cependant d'après les valeurs relatives aux échantillons de référence, un seul échantillon commercial a une teneur en citronnellal R un peu faible. Cette analyse ne parait pas pertinente pour notre étude.

5.2.2.4 Huile essentielle de pamplemousse

Dans le tableau 5.21 sont présentés les résultats obtenus pour les huiles essentielles de pamplemousse :

	Citronellal R	Citronellal	
REF	%	%	
PA1	60,4	0,03	
PA2	60,4	0,04	
PA3	65,2	0,03	
PF6	71,4	0,05	
PF7	72,2	0,05	
PUS8	70,4	0,01	
PUS9-df	79,9	0,05	
PUS10	77,5	0,06	
PUS11	77,4	0,05	
PP12-df	65,2	0,04	
PI15	76,5	0,05	
PAS16	77,2	0,05	
Pi20-df	84,2	0,08	
Pi21	77,3	0,05	
PUSL30	80	0,06	
PUSL31	87,0	0,07	

Table 5.21: Teneurs relatives de l'isomères du citronnellal R et teneur totale pour l'huile essentielle de pamplemousse

En vert : valeurs "normales"

Les chromatogrammes des échantillons trop dégradés n'ont pu être interprétés.

Cette analyse semble intéressante pour l'huile essentielle de pamplemousse car l'excès énantiomérique est significativement différent de celui de l'orange. Cependant tout comme dans l'orange, il existe sur certains échantillons une coélution avec la E-dihydrocarvone. Cette analyse a nécessité l'utilisation du GC-MS, mais dans le cas du pamplemousse, la E-dihydrocarvone est parfois en concentration conséquente et l'utilisation d'une méthode d'extraction d'ion en GC-MS ne permet pas de s'en affranchir.

Les deux échantillons extraits au laboratoire (éch. PUSL30, PUSL31) ont un fort excès énantiomérique, ce qui n'est le cas d'aucun échantillon commercial analysé à l'exception de l'échantillon Pi20df.

Par manque de littérature et d'homogénéité dans les résultats due à une coélution, cette analyse semble difficilement exploitable en l'état.

5.2.3 Linalol et α -terpineol des huiles essentielles de citrus (sauf bergamote)

Dans un premier temps, le potentiel de cette analyse va être évalué sur quelques échantillons, car la littérature est assez réduite sur le sujet et pas toujours en accord. Pour ce faire, un nombre significatif de chaque huile essentielle est analysé afin d'observer le comportement du rapport énantiomérique des deux molécules cibles. En effet, il est important que les huiles essentielles de référence possèdent des valeurs avec un écart-type relativement faible afin que la gamme de référence ne soit pas trop grande.

L'idée est de se servir de ces analyses comme indicateur de l'ajout d'huile essentielle d'orange. Bien que la littérature n'aille pas dans ce sens, nous étudierons la pertinence de cette analyse en cas d'ajout d'huile essentielle hydro-distillée.

Tout comme pour les terpènes cette analyse est effectuée sur un GC unidimensionnel, l'échantillon est d'abord purifié sur colonne de silice afin de conserver la fraction alcoolique. Ensuite deux analyses différentes sont nécessaires afin d'adapter la colonne et le programme de température à la séparation des deux composés chiraux. Une méthode spécifique a dû être élaborée pour le linalol dans les huiles essentielles de citron, de mandarine, d'orange et de pamplemousse. Celle déjà en place pour la bergamote ou lavande n'a pu être adaptée. En effet la quantité de linalol dans les premières citées est inférieure à 1% alors qu'elle est de 3 à 20% dans les huiles essentielles de bergamote et lavande. La dilution est donc beaucoup moins importante et de nombreuses molécules peuvent être coéluées alors qu'elles ne sont pas détectées lorsque la dilution est plus grande.

Les chromatogrammes des analyses de l'α-terpinéol sur colonne 6-tertiobutyl dimethylsilyl, 2,3-diethyl-β-cyclodextrine (50% dilué PS086) 25m x 250 μm x 0,25 μm (Méga, Legano, Italie)(cf. figure 5.8) et du linalol sur colonne Cyclosil B 30m x 250 μm x 0,25 μm (agilent technologies, Santa Clara, USA)(cf. figure 5.9) sont présentés ci-dessous. L'incertitude d'intégration est identique à celle évaluée pour l'α-pinène (cf. tableau 5.22)

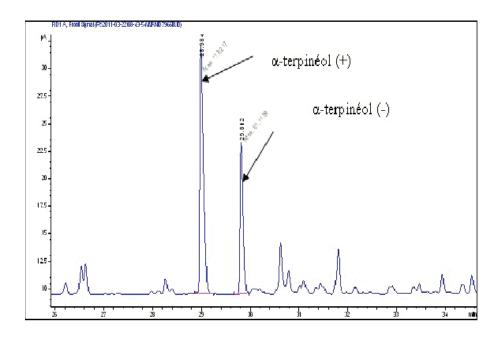


Figure 5.8: Profil énantio-GC-FID pour la chiralité de l'a-terpinéol

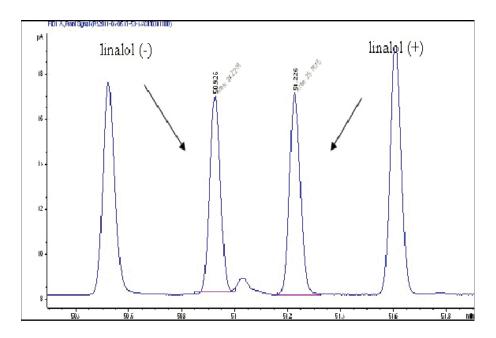


Figure 5.9: Profil énantio-GC-FID pour la chiralité du linalol

Molécules	Résolutions	
α -terpinéol (+) - (-)	6,4	
Linalol (+) - (-)	2,4	

Table 5.22: Résolution associée à la séparation des isomères de l'a-terpinéol et du linalol

L'incertitude d'intégration est identique à celle évaluée pour l'α-pinène (tableau 5.23)

Molécules	HE	Incertitude injection %	Incertitude intégration %	Incertitude totale %
Linalol (-) %	Citrus	1	Négligeable	1
α-terpinéol (+)%	Citrus	1	Négligeable	1

Table 5.23: Incertitudes associées à la séparation des isomères de l'a-terpinéol et du linalol

Ensuite sont présentés les résultats obtenus pour cette étude. Avec le pourcentage relatif en linalol (-) et α -terpineol (+), les teneurs de ces molécules dans l'huile essentielle sont reportées, en vue d'une aide à l'interprétation des résultats.

5.2.3.1 Huile essentielle d'orange

Dans le tableau 5.24 sont synthétisés les résultats obtenus pour les huiles essentielles d'orange :

	Linalol (-) R	Linalol	α -terpineol (+)	α-terpinéol
REF	(%)	(%)	(%)	(%)
Litterature[103]	14,0-15,0			
OB1	7,8	0,42	3,5	0,07
OB2	7,8	0,42	1,6	0,05
OB3	36,5	0,45	2,3	0,05
OB4	11,0	0,43	5,9	0,05
OB5	6,6	0,45	3,2	0,04
OCR7	12,7	0,45	0,0	80,0
OEV8	6,3	0,28	5,7	0,04
OEV9	10,1	0,42	4,5	0,07
Ol10	5,5	0,40	5,0	0,02
Ol11s-df	11,6	0,36	3,8	0,06
Ol12d	18,6	0,59	3,6	0,05
Ol13s	9,1	0,48	4,9	80,0
OM14s-df	6,9	0,45	4,3	0,04
Oi16	10,6	0,35	6,4	0,05
Oi17	6,2	0,37	23,9	80,0
Oi19	5,9	0,51	2,7	0,04
Oi23dt	8,1	9,63	4,1	2,09

Table 5.24: Teneurs relatives des isomères du linalol (-) et a-terpineol (+) et teneurs totales pour l'huile essentielle d'orange

en rouge : valeurs anormales

Les résultats de l'huile essentielle d'orange sont beaucoup plus constants que pour les autres huiles essentielles étudiées. Seuls les résultats des échantillons OB3 et Oi17 sont différents. Cependant, en ce qui concerne le linalol, nos résultats ne correspondent que partiellement à la littérature.

5.2.3.2 Huile essentielle de citron

Dans le tableau 5.25 sont présentés les résultats obtenus pour les huiles essentielles de citron :

REF	Linalol (-) R %	Linalol %	α-terpinéol (+) %	α-terpinéol %
Littérature [98]	56,8-71,5		73,1-86,3	
Littérature[99] industrial lemon	52,8		75,2	
Littérature [115, 116]	51,99-74,64			
	32,0			
Littérature [103]	46,0			
Cl1 df-R	50,0	0,10	73,2	0,16
Cl2a-R	54,8	0,12	75,2	0,18
Cl3h-R	55,3	0,12	72,4	0,16
Cl4p-R	59,0	0,10	82,1	0,15
Cl5e-R	55,6	0,09	75,0	0,15
Cl6h-R	51,4	0,10	77,3	0,16
CI7-R	59,9	0,16	77,1	0,24
Cl15-df	56,1	0,07	75,4	0,04
CI16	45,1	0,09	70,1	0,19
Cl17-df	68,6	80,0	73,8	0,10
Cl18-df	47,6	0,11	75,9	0,16
CI19	53,1	0,10	79,5	0,14
Cl20-df	38,5	0,06		0,02
Cl21-df	50,0	0,06		0,02
Cl22-df	45,0	0,06	63,4	0,07
Cl23	36,4	0,06	74,4	0,06
Cl24	66,6	80,0	69,4	0,09
Cl25	86,6	0,09	88,0	0,15
Cl26-df	66,7	0,04	69,2	0,05
Cl27	97,1	0,09	90,2	0,15
Cl28	62,1	0,12	47,0	0,08
Cl29-df	33,5	0,16	67,2	0,06
Cl30-df	50,4	0,06		0,02
Cl31	54,1	0,12	75,0	0,17
Cl33m	69,0	0,12		0,13
CA81	42,9	0,09	78,6	0,12
CA82	51,0	0,07	71,8	0,12
CA83	50,0	0,07	71,2	0,13
CA85	48,7	0,06	72,0	0,10
CCI86	48,2	0,04	72,8	80,0
CCI87-df	42,6	0,07	67,7	0,05
CI89	48,3	0,11	77,0	0,12
Cli90	52,2	0,12		0,14
Cli91	56,0	0,12	80,8	0,17
Cli92	64,9	0,1	75,8	0,16
CE93	56,0	0,12	72,7	0,18
CE94	60,6	0,12	77,5	0,15
CEL105	50,0	0,16	79,4	0,29
CI109dt	59,3	0,25		2,18

Table 5.25: Teneurs relatives des isomères du linalol (-) et a-terpineol (+) et teneurs totales pour l'huile essentielle de citron

En rouge : valeurs anormales ; en orange : valeurs limites $\,$

Le citron cit0311 extrait au laboratoire à une teneur relative en linalol (-) légèrement inférieure à ce que l'on peut trouver dans la plupart des publications. Cependant le procédé d'extraction n'est pas tout à fait identique, car au laboratoire nous avons recours à l'extraction

des zestes par solvant. Ceci peut expliquer cette légère différence car le linalol est réactif en milieu acide [106].

Seuls les résultats obtenus sur des huiles essentielles extraites au laboratoire par H.Casabianca et al. [106] sont à l'inverse des résultats présentés dans la littérature, et de la plupart de nos résultats. Ceci n'est pas expliqué à ce jour, car la réactivité en milieu acide tend à racémiser le linalol et non à inverser les rapports des énantiomères (cf. section 3.2.2.1). Il semblerait alors que le ratio énantiomérique du linalol dans les citrus soit variable.

Nous remarquons que les teneurs relatives en linalol (-) inférieures à 50% sont le plus souvent accompagnées d'une faible teneur en linalol total. Ceci ne confirme pas l'hypothèse de la coupe avec de l'huile essentielle d'orange car cette dernière possède un fort taux de linalol comparé au citron. D'autre part une huile essentielle de citron hydrodistillée comporte aussi un taux de linalol relativement plus haut que l'huile essentielle issue de l'expression à froid. De plus l'hydrodistillation aura aussi tendance à racémiser le linalol. Ces résultats ne sont pas exploitables en l'état. En effet, l'analyse GC-MS montre une coélution en analyse chirale unidimensionnelle. De plus la dégradation d'échantillon semble perturber l'analyse. Cette méthode n'est pas pertinente pour la mesure de l'excès énantiomérique du linalol dans l'essence de citron

Au niveau de l'α-terpinéol les anomalies sont moins fréquentes et flagrantes. Cela est sans doute dû au fait que l'orange en contient moins que le citron et donc l'influence d'une coupe sur les résultats est limitée. Les valeurs les plus faibles en α-terpinéol (+) sont accompagnées d'une faible teneur de ce composé. Cela semble correspondre à l'addition d'huile essentielle d'orange dans celle de citron. Cependant assez peu d'échantillons sont atypiques et cette analyse ne semble pas plus pertinente que celle de l'α-pinène et du sabinène.

5.2.3.3 Huile essentielle de mandarine

Pour les huiles essentielles de mandarine les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 5.26 :

	Linalol (-) R	Linalol	α-terpinéol (+)	α-terpinéol
REF	%	%	%	%
Littérature [98]	13,1-19,8		69,6-76,8	
Litterature[103]	4,0-6,5			
MI1r-R	23,8	0,1	71,9	0,14
Ml2j-R	18,6	0,11	72,0	0,14
MI3-R	17,8	0,09	58,5	0,11
MI4v-R	18,2	0,16	72,9	0,25
MI5j-R	17,6	0,13	66,2	0,16
Ml6j-R	31,6	0,12	59,9	0,15
MI7v-R	31,0	0,11	60,3	0,17
MI11j-R	29,5	0,1	70,1	0,11
MI12j	31,8	0,11	58,6	0,15
MI15-df	25,8	0,09	71,1	0,11
MI16j	21,6	0,1	66,2	0,15
Ml17j-df	22,8	0,1	63,8	0,12
MI18v-df	19,4	0,12	64,9	0,2
MI19	21,3	0,17	57,6	0,19
MI20	24,2	0,1	66,9	0,13
MI21	19,2	0,29	69,2	0,66
Ml22j	22,2	0,12	34,3	0,36
Ml64-hd	18,8	0,2	58,0	0,24
MA66	26,8	0,14	57,5	0,29
MA67j	17,9	0,14	52,8	0,32
MA68	25,4	0,12	52,7	0,3
MA69	19,1	0,19	71,2	0,5
MB73v	32,3	0,15	53,6	0,16

Table 5.26: Teneurs relatives des isomères du linalol (-) et a-terpineol (+) et teneurs totales pour l'huile essentielle de mandarine

En rouge: valeurs anormales

Les résultats de l'analyse du linalol sont difficiles à interpréter. Peu de résultats correspondent aux données de la littérature et quatre échantillons de référence (éch. MI1r-R, MI6j-R, MI7v-R, MI11j-R) sont hors gamme. De plus les données présentées dans la littérature ne sont pas en accord. Ces constatations sont identiques à celle effectuées pour les échantillons d'essence de citron. De la même manière une coélution perturbe le déroulement de l'analyse en GC unidimensionnelle.

En ce qui concerne l'α-terpinéol, un grand nombre de résultats ne correspondent pas aux résultats obtenus dans la littérature et c'est aussi le cas des échantillons de référence MI3-R, MI6j-R et MI7v-R. Il est donc là encore difficile de s'appuyer sur ces résultats, qui apportent finalement plus de questions que de réponses.

L'existence de nombreux hybrides et cultivars peuvent aussi être une des causes à l'origine de tant de variations[136].

5.2.3.4 Huile essentielle de pamplemousse

Les chiralités de l' α -terpinéol du pamplemousse et de l'orange sont identiques, donc l'analyse n'a pas été poursuivie. Les résultats ne sont pas présentés ici. Dans le tableau 5.27 sont présentés les résultats de l'analyse chirale du linalol pour l'huile essentielle de pamplemousse.

	Linalol (-) R	Linalol
REF	%	%
Littérature[103]	32,043,0	
PA1	70,3	0,14
PA2	30,8	0,14
PA3	46,9	0,13
PA4	58,8	0,09
PC5	71,7	0,10
PF6	38,3	0,10
PF7	34,9	0,05
PUS8	74,3	0,10
PUS9-df	50,0	0,12
PUS10	34,1	0,13
PUS11	50,0	0,10
PP12-df	20,45	0,04
PP13-df	70,0	0,10
PI14	32,3	0,09
PI15	56,1	0,07
PAS16	65,9	0,12
PAS17	45,6	0,10
Pi18	64,4	80,0
Pi19	34,5	0,11
Pi20-df	28,1	0,15
Pi21	47,7	0,11
PUSL30	25,9	0,15

Table 5.27: Teneurs relatives des isomères du linalol (-) et a-terpineol (+) et teneurs totales pour l'huile essentielle de pamplemousse

En rouge : valeurs anormales

Pour les mêmes raisons que pour les essences de citron et de mandarine, les résultats ne sont pas évidents à interpréter.

5.2.4 Analyse chirale du linalol, acétates de linalyle et de lavandulyle

La bergamote, la lavande et le lavandin super sont des plantes qui produisent une huile essentielle à fort taux de linalol et d'acétate de linalyle. L'acétate de lavandulyle est lui spécifique aux lamiacées.

Cette analyse est destinée à détecter l'addition de ces mêmes molécules d'origine synthétique dans les huiles essentielles citées ci-dessus. Le linalol et l'acétate de linalyle sont en quantité

suffisante pour que l'échantillon soit injecté sans purification préalable. Le cas de l'acétate de lavandulyle est un peu plus complexe car l'utilisation d'un GC unidimensionnel entraine certaines coélutions. En effet, le terpinène-4-ol et l'acétate de lavandulyle S ont le même temps de rétention sur la colonne chirale adaptée. Une purification sur gel de silice a été nécessaire. L'analyse du linalol et de l'acétate de linalyle doit être effectuée sur un échantillon largement dilué car une colonne chirale est de faible capacité. L'acétate de lavandulyle ne sera alors plus visible. En conséquence, l'analyse de l'acétate de lavandulyle est traitée séparément sur échantillon moins dilué et purifié.

La colonne adaptée pour les trois molécules est la colonne 6-tertiobutyle triméthylsilyle, 2,3-diethyl-β-cyclodextrine (50% dilué PS086) 25m x 250 μm x 0,25μm (Méga, Legano, Italie). L'identification du linalol S a nécessité une analyse d'une huile essentielle connue à laquelle a été ajoutée une faible quantité de linalol, ceci afin de ne pas confondre cet isomère avec un des isomères de l'oxyde de linalol.

Les chromatogrammes sont les suivants :

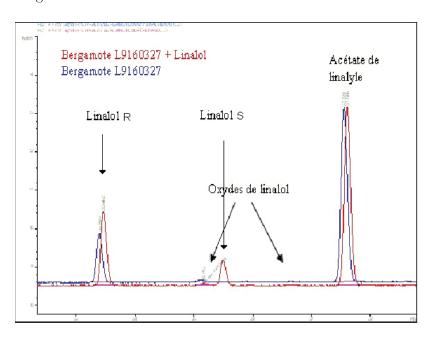


FIGURE 5.10: Chromatogramme de la séparation des stéréoisomères de linalol, acétate de linalyle

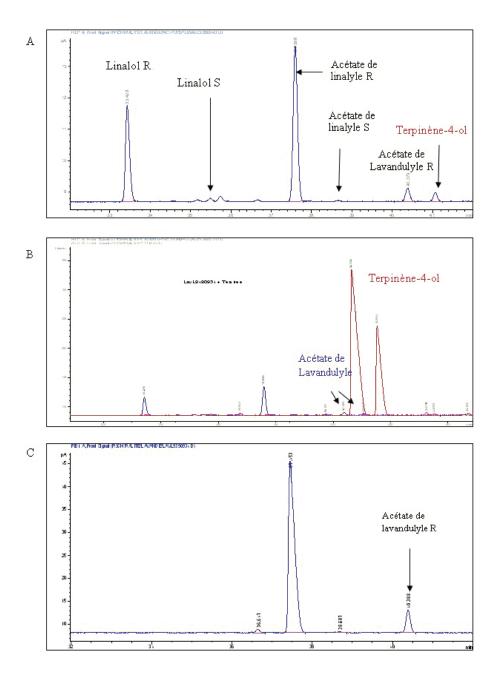


FIGURE 5.11: Chromatogrammes de la séparation des stéréoisomères de linalol, acétate de linalyle et acétate de lavandulyle

A : Chromatogramme d'une lavande avant purification; B : Chromatogramme d'une lavande avec l'ajout de terpinène-4-ol; C : Chromatogramme de la lavande (A) après purification.

La résolution est excellente sur cette colonne pour le linalol et l'acétate de linalyle.

Molécules	Résolutions
Linalol R-S	7,0
Acétate de linalyle R-S	4,6

Table 5.28: Résolution associée à la séparation des isomères du linalol et de l'acétate de linalyle

Tout comme pour les terpènes l'incertitude totale correspond à la somme de l'incertitude d'injection et d'intégration. Bien que la résolution soit supérieure à 2 dans les deux cas, l'incertitude d'intégration n'est pas négligeable ici. En effet, la présence d'oxyde de linalol et la faible teneur de l'isomère S pour l'acétate de linalyle augmentent significativement l'incertitude d'intégration pour ces deux molécules.

Molécules	HE	Incertitude injection %	Incertitude	Incertitude
			intégration	totale %
			%	
Linalol R %	Lavande	0,3	0,5	0,8
Liliaioi it /0	Bergamote	1	0,5	1,5
Acétate de linalyle R %	Lavande	0,3	0,4	0,7
Acetate de linaryle it 70	Bergamote	0,3	0,4	0,7

Table 5.29: Incertitudes associées à la séparation des isomères du linalol et de l'acétate de linalyle

5.2.4.1 Huile essentielle de ho wood

L'huile essentielle de ho wood (*cinnamomum camphora*) est une source de linalol abondante. Ainsi dans le tableau 5.30 sont synthétisés les résultats obtenus pour les huiles essentielles de ho wood :

	Linalol R %	Acétate
REF	70	de linalyle R %
Littérature*[131]	96,2	
Littérature [110]	97-97,9	
HW1	94,9	
HW2	94,8	
HW3	98,2	
HVV4	95,3	
HW5	95,7	
HVV6	98,6	
HVV7-20std	87,5	
HWac8	98,2	98,2
HWac9-20std	87,6	87,6

Table 5.30: Teneurs relatives des isomères du linalol R et acétate de linalyle R pour l'huile essentielle de ho wood

* feuilles

Nous avons pu étudier les ratios énantiomériques de 6 huiles essentielles de shiu ou ho wood. Certains excès énantiomériques sont plus faibles que ceux prévus par la littérature. Cependant il existe assez peu de publications sur le sujet. Nous avons acétylé une de ces huiles essentielles au laboratoire ainsi qu'un mélange de shiu et de linalol de synthèse. Cette expérience montre que l'acétylation conserve la chiralité. Aussi un ajout de 20% de linalol synthétique abaisse significativement l'excès énantiomérique.

5.2.4.2 Huile essentielle de bergamote

Dans le tableau 5.31 sont présentés les résultats obtenus pour les huiles essentielles de bergamote :

	Linalol R	Acétate de linalyle
REF	%	%
Littérature [100]	>99	>99,5
Littérature [109]	>99,5	,-
Litterature [108]	99,9-100	99,5-100
Litterature [99]	99,4-99,7	99,7-99,9
BI1-R	99,7	99,7
BI2-R	99,8	99,7
BI3-R	99,8	99,7
BI4-R	99,1	99,2
BI5-R	99,1	99,2
BI6-R	99,4	99,7
BI7-R	99,0	99,3
BI8	99,0	96,5
BI9	99,5	98,2
BI10	99,1	99,2
BI11	99,1	99,7
BI12	99,3	99,7
BI13	99,3	99,6
Bl14-df	99,3	99,7
BI15	99,3	99,7
BI16	99,2	99,7
BI17	99,0	99,3
BI18	99,3	99,3
BI19	99,5	99,3
Bl20-df	98,9	99,0
Bl21	99,0	99,7
Bl22-df	99,6	99,6
Bl23	99,4	99,4
Bl24	98,7	99,7
Bl25	99,0	99,4
Bl26	98,8	98,9
Bl27-df	99,4	99,6
Bl28-df	99,6	96,8
Bl29-df	98,3	99,1
Bl30-df	99,3	99,5
Bl31-df	99,5	98,4

	Linalol R	Acétate de linalyle
	%	%
	,,,	70
Bl32-df	99,2	99,7
BIC33-5	99,7	99,7
BIC34-10	99,7	99,7
BIC35-20	99,7	99,7
BIC36-10+1std	85,0	93,1
BIC37-10+2std	70,1	76,7
BIC38-5	99,8	99,7
BIC39-10	99,8	99,7
BIC40-20	99,8	99,7
BIC41-10+1std	92,9	97,0
BIC42-10+1std	70,0	77,77
BIC43-5	99,8	99,7
BIC44-10	99,8	99,7
BIC45-20	99,8	99,7
BIC46-10+1std	92,8	97,1
BIC47-10+2std	70,2	77,5
Bl66dt	99,5	98,7
BIL67	99,6	99,7
BIL68-R	99,0	99,3
BC69	99,3	99,5
BCI70	99,8	99,8
BA71	99,7	99,7
BIC58-10-HW1	98,1	99,7
BIC59-10-8HWac8	99,1	99,4
BIC60-10-HW1	98,4	99,7
BIC61-10-8HWac8	99,2	99,4
BIC62-10-HVV1	98,1	99,7
BIC63-10-8HWac8	99,1	99,4
BIC64-10-HVV1	98,4	99,7
BIC65-10-8HWac8	99,2	99,4
BIC60-10-HWC9-20std	96,5	97,5

Table 5.31: Teneurs relatives des isomères du linalol R et acétate de linalyle R pour l'huile essentielle de bergamote

En rouge : valeurs anormales

D'après H. Casabianca et al., le linalol R dans la bergamote ne doit pas être inférieur à 99 % mais A.Mosandl et al sont plus restrictifs et proposent une limite inférieure de 99,5 %. En raison de l'incertitude d'intégration, surtout sur les petites teneurs, nous avons préférez considérer les échantillons comme suspects si la teneur en linalol R est inférieure à 99 %.

Au niveau de l'acétate de linalyle, la littérature propose une gamme de résultats supérieure à 99,5 %. Nos résultats correspondent à la littérature. Néanmoins compte-tenu de l'incertitude

de mesure, la valeur limite inférieure pour les deux molécules est de 99%. Ainsi nous avons pu déjà remarquer des teneurs en acétate de linalyle R suspectes. Cependant les échantillons auxquels ont été ajoutés 5% ou 8% de standards synthétiques de linalol ou acétate de linalyle observent une baisse nette de l'excès énantiomérique du composé R. Ceci n'a pas été observé sur les échantillons commerciaux. En effet pour quelques échantillons (éch. BI9, BI20-df, BI24, BI29-df, BI31-df) le linalol R ou l'acétate de linalyle R sont très faiblement en dessous de 99 %. Seuls les échantillons BI8 et BI28-df ont une teneur en acétate de linalyle R plus faible. En rechanche l'ajout de ho wood n'est pas toujours visible, suivant l'excès énantiomérique de l'huile essentielle de ho wood utilisée. L'ajout du mélange « huile essentielle d'ho wood et linalol synthétique » modifie quant à lui significativement l'excès énantiomérique.

5.2.4.3 Huile essentielle de lavande

Le tableau 5.32 présente les résultats obtenus pour les huiles essentielles de lavande :

		1: 115	Acétate de	Acétate de
		Linalol R	linalγle R	lavandulγle R
REF		%	%	%
Litterature [108]		95,5-98,2	96,5-100	
Litterature[103]		95,5-100		
	<1h	02.07		
Litterature [106]	hydrodistillation	93-97		
Litterature[100]	>1h	<85		
	hydrodistillation			
Litterature [130]		>91,7	>95	
Laboratoire			>98,8	
LF1-R		96,4	99,5	100
LF2-R		95,6	99,4	100
LF3-R		95,4	99,4	100
LF4-R		97,3	99,4	100
LF5-R		95,2	99,4	100
LF6-R		95,1	99,5	100
LF7-R		96,7	99,5	100
LF8		92,0	99,4	100
LF9		96,7	99,4	100
LF10		92,0	99,5	100
LF11		97,1	99,4	100
LF12		95,5	99,4	100
LF13		95,6	99,4	100
LF14		93,7	99,5	100
LF15		96,2	99,1	100
LF16		96,2	99,2	100
LF17		92,6	99,5	100
LF18		92,7	99,5	100
LF19		95,4	99,5	100
LFC20-5		95,1	99,5	100
LFC21-10		95,0	99,5	100
LFC22-20		94,9	99,5	100
LFC23-5-5std		88,1	93,4	100
LFC24-5-8std		84,4	88,4	100
LFC25-10-5std		88,0	93,4	100
LFC26-10-8std		84,4	88,4	100
LFC27-20-5std		87,9	93,4	100
LFC28-20-8std		84,2	88,4	100
LFC29+5std		88,2	93,4	100
LFC30+8std		84,5	88,4	100
LF31		95,6	99,5	100
LF32		94,2	99,5	100
LFC29+5HWac9-20std		94,4	98,0	100
LFC30+8HWac9-20std		93,8	97,3	100
LFC29+5HWC8		96,1	99,5	100
LFC29+8HWC9		96,2	99,4	100

Table 5.32: Teneurs relatives des isomères du linalol R, acétate de linalyle R et acétate de lavandulyle R pour l'huile essentielle de lavande

 $Rouge: valeurs\ anormales\,;\ Orange: valeurs\ limites$

Les différentes publications présentent des résultats pas toujours en accord. Les résultats obtenus pas H.Casabianca et J.B Graff (laboratoire) sont plus restrictifs que ceux trouvés dans la littérature. L'absence d'article concernant l'acétate de lavandulyle ne nous permet pas la

comparaison avec nos résultats. Cependant, il semblerait que l'acétate de lavandulyle ne soit pas l'objet d'adultération.

Les ajouts de standard de linalol entrainent une baisse de la teneur en linalol R en dessous de 90 %. Une telle baisse de la concentration n'a pas été remarquée sur les échantillons commerciaux. Par contre les ajouts de ho wood et de mélange ho wood et 20% de standard synthétique à hauteur de 5% et 8% demeurent invisibles (éch. LFC29+5HWC8, LFC29+8HWC9), au regard des résultats du linalol.

Nos résultats pour l'acétate de linalyle R lors de cette étude sont tous supérieurs à 99%, ce qui est plus élevé que les données de la littérature. De même les études précédentes conduites au laboratoire, sur plus de 250 échantillons, tendent à montrer une présence d'acétate de linalyle R supérieure à 98,8%.

Ainsi que pour le linalol, l'ajout de 5% ou 8% de ho wood acétylée n'est pas remarquable. Par contre si l'huile essentielle de ho wood a été préalablement mélangée avec 20% linalol synthétique, l'excès énantiomérique devient trop faible (éch. LFC29+5HWac9-20std, LFC30+8HWac9-20std).

En faisant l'hypothèse que la distribution suit la loi normale, nous pouvons alors établir un intervalle de tolérance pour les valeurs de l'acétate de linalyle dans la lavande.

	Acétate de linalyle (R) (%)
Moyenne %	99,4
Ecart type σ	$0,\!2$
Tolérance t* σ %	0,6
limite inférieure %	98,8

Table 5.33: Intervalle de tolérance des teneurs relatives obtenu pour l'acétate de linalyle R dans la l'huile essentielle de lavande

La limite inférieure est identique à celle obtenue lors de l'étude sur 250 échantillons. L'analyse nous permet de dire qu'à aucun d'entre eux n'a été ajouté d'acétate de linalyle de synthèse. Concernant l'ajout de l'acétate de linalyle d'origine naturelle, il n'est pas possible de l'affirmer avec certitude.

Quant à l'adultération par ajout de linalol de synthèse ou d'origine naturelle, cette analyse ne nous apporte aucun enseignement. En effet, l'ajout de linalol de synthèse doit être important pour être formellement identifié (cf. section 3.2.2)

5.2.4.4 Huile essentielle de lavandin super

Le tableau 5.34 présente les résultats obtenus pour les huiles essentielles de lavandin super :

	Linalol R	Acétate	Acétate
	Lilialoi R %	de linalyle R	de lavandulyl R
REF	/0	%	%
Littérature[103]	97-100	97,5-100	
LSF1	94,0	99,6	100
LSF2	97,0	100	100
LSF3	96,6	99,6	100
LSF4	96,4	99,6	100
LSF5	97,9	99,7	100
LSF6	96,7	99,6	100
LSF7	97,8	99,7	100
LSF8	97,0	99,6	100
LSF9	91,0	99,6	100
LSF10	97,0	99,5	100
LSF11	91,2	99,6	100
LSF12	96,8	99,7	100
LSF13	97,1	100	100
LSF14	97,6	99,7	100
LSF15	96,5	100	100
LSF16	96,4	99,6	100
LSF17	98,0	99,7	100
LSF18	97,5	99,6	100
LSF19	96,9	99,6	100
LSF20	97,8	99,7	100
LSF21	97,2	99,6	100
LSF22	97,5	99,7	100
LSF23	97,79	99,7	100
LSF24	97,3	99,7	100
LSF25	96,8	99,6	100
LSF26	97,6	99,7	100
LSF27	97,3	99,6	100
LSF28	97,9	99,6	100
LSF29	97,4	99,6	100
LSF30	98,0	99,6	100
LSF31	97,7	99,6	100
LSF32	97,1	99,7	100

Table 5.34: Teneurs relatives des isomères du linalol R, acétate de linalyle R et acétate de lavandulyle R pour l'huile essentielle de lavandin super

Le faible risque d'adultération du lavandin super a rendu son étude moins attractive et donc peu d'études ont été publiées. Concernant le linalol, les remarques sont identiques à celles faites sur la lavande (cf. section 5.2.4.3).

Les valeurs d'excès énantiomérique que nous obtenons pour l'acétate de linalyle sont en moyenne plus élevées que dans le cas de la lavande. Cependant les excèse énantiomérique des deux huiles essentielles sont trop proches pour que cette analyse puisse les distinguer.

5.2.5 Discussion

Dans le cadre de l'étude des citrus, des analyses énantiomériques fréquemment rapportées dans la littérature ont été reproduites sur nos échantillons. En parallèle, d'autres molécules ont

été étudiées visant à une meilleure détection de la fraude, notamment dans le cas de l'huile essentielle de pamplemousse. Certains rapports énantiomériques sont révélateurs d'adultération, tandis que d'autres ont été moins évidents à interpréter.

Pour toutes les analyses de terpènes dans les huiles essentielles de citrus, si l'on compare les résultats des échantillons commerciaux aux coupes effectuées au laboratoire, peu d'échantillons semblent anormaux alors que l'ajout expérimental d'huile essentielle d'orange est bien visible. Cette constatation est inattendue compte-tenu de la difficulté à corréler les échantillons commerciaux à la norme en comparaison aux échantillons adultérés avec de l'huile essentielle d'orange (cf. section 5.1).

Dans le cas de l'huile essentielle de bergamote, il est possible que l'ajout d'huile essentielle de citron soit privilégié. Bien qu'elle soit plus onéreuse que celle d'orange, cette adultération présenterait l'avantage d'être plus discrète. Dans le cas de la mandarine et du citron, il est possible que la fraude fréquente consiste à utiliser une huile essentielle d'une autre origine géographique moins onéreuse. L'analyse chirale est impuissante dans ce cas.

De manière générale cette analyse manque de sensibilité, tant par la faible proportion d'αpinène et de sabinène dans l'huile essentielle d'orange que par la difficulté à établir précisément des limites de tolérance. Ce désavantage est pallié par l'analyse statistique de ces résultats avec la composition moléculaire des huiles essentielles correspondantes à l'exception de l'huile essentielle de pamplemousse dont la composition moléculaire est trop proche de celle d'orange.

L'analyse du citronnellal dans l'huile essentielle de citron a montré des résultats peu homogènes au niveau des échantillons de référence. La variabilité de ces résultats peut avoir plusieurs origines. L'erreur d'analyse ayant été écartée par l'utilisation de la GC-MS, l'existence de cultivars émergeants peu étudiés pourrait en être une.

Une deuxième hypothèse serait que ces échantillons ne soient pas réellement authentiques. Cependant, la chiralité du citronnellal est le seul paramètre atypique concernant ces huiles essentielles de référence. De plus, elle semble légèrement instable dans le temps ce qui pourraient aussi expliquer la variabilité des résultats.

L'analyse en GC-C/py-IRMS du citronnellal ne révèle rien d'anormal. Il semblerait que les ratios énantiomériques de ces échantillons soient naturels. L'analyse éantiomérique du citronnellal n'est donc pas conservée en raison d'une gamme de naturalité de l'excès énantiomérique du citronnellal R trop importante.

Cette même analyse sur l'huile essentielle de mandarine a montré des résultats beaucoup plus homogènes. Cependant sur l'ensemble des échantillons analysés seulement un semble avoir un résultat anormal. Bien que tous les échantillons n'aient pas été analysés avec cette méthode, aucune corrélation avec les résultats de la chiralité des terpènes n'a été observée. En effet, aucun des échantillons anormaux pour la première analyse ne l'est pour la seconde. Il est probable que l'adultération avec des terpènes d'orange ait été privilégiée face à l'ajout de l'huile essentielle d'orange complète. L'analyse chirale n'a donc pas été poursuivie, dans un premier temps.

Concernant le pamplemousse, il serait très intéressant de trouver une analyse chirale discriminante car aucune n'a été concluante jusqu'alors. Cependant les résultats obtenus sont encore une fois complexes à interpréter. Sachant que le citronnellal semble se racémiser dans le temps (cf. citron section 5.2.2.2), il est difficile de connaître la cause de l'hétérogénéité des résultats. L'absence de littérature et de données sur le sujet, ne nous permet pas de corrélation avec ces résultats. L'utilisation de la GC multidimensionnelle serait sans doute plus pertinente pour cette analyse.

De là, la pertinence de l'analyse chirale du linalol et de l'α-terpinéol ont été investiguée. L'étude a été étendue à tous les citrus.

L'analyse du linalol est complexe à interpréter. Les résultats pour les huiles essentielles de citron, mandarine, pamplemousse manquent d'homogénéité, tant au niveau de notre étude que de la littérature. Il se peut que le ratio énantiomérique du linalol soit sensible à de nombreux paramètres tels que la méthode d'extraction de l'huile essentielle ou le pH. De plus nous avons démontré l'existence d'une coélution. En raison de la non sélectivité des ions celle-ci n'a pu être résolue. Pour finir la dégradation des échantillons au cours du temps apportent des pics parasites coélués avec les isomères du linalol. Pour toutes ces raisons cette étude ne sera approfondie pour les huiles essentielles de mandarine et citron qu'en cas d'absence d'analyses plus performantes.

Dans le cas de l'huile essentielle de pamplemousse, l'échantillon extrait au laboratoire (éch. Pi25) a une teneur en linalol (-) plus proche de celles des huiles essentielles d'orange. Nous avons étudié cet échantillon via le GC-MS et aucune coélution n'a été observée. Il en est de même pour les échantillons PF6 et PA2 qui sur GC-MS ont respectivement un ratio proche de 20/80 et 15/85. En conséquence, cette analyse pourrait ne pas être suffisamment discriminante. Néanmoins, l'analyse chirale du pamplemousse mériterait une étude approfondie avec un appareillage adapté (GC multidimensionnelle) et sur un plus grand nombre d'échantillons.

Les analyses du linalol, acétates de linalyle et de lavandulyle ont été plus aisées à interpréter. Il existe en effet un grand nombre d'études sur le sujet.

Dans le cas de la bergamote, de légères anomalies dans les résultats des échantillons commerciaux ont été observés bien que les échantillons adultérés montrent d'importants écarts de ratios énantiomériques avec les références. Il existe deux explications à cela. Soit l'échantillon est adultéré en vu de le faire correspondre à la norme et l'ajout de molécules synthétiques est

très faible. Soit l'ajout provient de ho wood (acétylé ou non) dont l'excès énantiomérique est très légèrement plus faible que celui de l'huile essentielle de bergamote.

Dans le cas des lamiacées, cette analyse n'est pas assez sensible pour évaluer si une légère quantité de linalol synthétique a été ajoutée. En effet la racémisation du linalol au cours de l'hydro-distillation perturbe la détection de l'adultération. De ce fait, si l'excès énantiomérique du linalol est élevé dans l'huile essentielle de départ alors l'ajout de linalol devra être conséquent avant d'être visible.

En ce qui concerne l'acétate de linalyle, aucun échantillon commercial n'a de valeurs suspectes. L'ajout d'huile essentielle de ho wood remplaçant l'acétate de linalyle de synthèse est une explication possible. Néanmoins, ces analyses étaient auparavant efficaces lors du contrôle de l'authenticité des échantillons commerciaux. Il semblerait alors que les techniques d'adultération aient changé et que l'ajout de linalol et d'acétate de linalyle ne soit plus d'actualité. Malgré tout, cette analyse demeure un indicateur important pour le suivi dans le temps de l'évolution des techniques de fraude. L'analyse de l'acétate de lavandulyle est abandonnée car d'après les résultats, cette molécule n'est pas sujette à l'adultération. Il est vrai que sa présence est en bien moindre quantité que le linalol et l'acétate de linalyle.

Cette étude chirale a prouvé la pertinence de l'analyse du sabinène pour les huiles essentielles de citrus et de l'α-pinène dans le cas de la mandarine. Les résultats de ces analyses ont beaucoup plus de poids lorsqu'ils sont corrélés avec les profils moléculaires obtenus (cf chapitre 6.1.3). L'analyse des linalol et acétate de linalyle, n'est plus aussi pertinente qu'elle a pu l'être. Mais l'analyse isotopique de ces molécules, permettra quant à elle, de valider l'hypothèse selon laquelle les échantillons sont adultérés à l'aide d'huile essentielle de ho wood.

Pour conclure, les analyses chirales du sabinène pour tous les citrus et de l'α-pinène pour la mandarine sont les plus pertinentes et sont sélectionnées pour la méthodologie de contrôle de la naturalité. Celles des linalol et acétate de linalyle pour les huiles essentielles de bergamote et lavande permettent l'identification d'échantillons adultérés. L'efficacité de cette dernière permet également de limiter ce type de pratique.

5.3 Analyses isotopiques

Cette analyse est plus délicate à mettre en oeuvre que l'analyse chirale car nécessite un appareillage spécifique complexe et onéreux. Cependant elle est indispensable en complément à l'analyse chirale. En effet nous avons démontré les limitations de cette dernière dans certains cas. De plus certaines molécules ne sont pas chirales et sont nécessairement analysées via l'analyse isotopique, dans le cadre d'une étude ciblée (ex : citral).

Ainsi certains terpènes ont été étudiés dans le but premier de détecter l'ajout d'huile es-

sentielle d'orange à celle de pamplemousse. Les terpènes sélectionnés sont présents en quantité significative dans l'huile essentielle d'orange. Ensuite l'étude isotopique des linalol et acétate de linalyle vient compléter l'analyse chirale pour une détection de la fraude la plus exhaustive possible. Enfin le citral et le N-méthyle anthranilate de méthyle non chiraux ont été analysés.

5.3.1 L'analyse isotopique du carbone 13

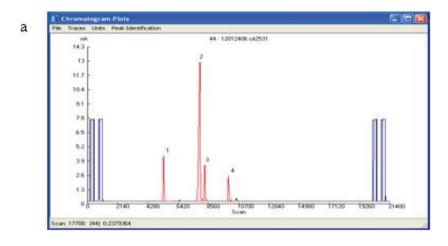
5.3.1.1 Empreinte isotopique des terpènes des huiles essentielles de citrus

Les résultats de l'analyse de l'α-pinène, sabinène, myrcène et limonène des citrus sont présentés sous forme de profil isotopique formant l'empreinte isotopique typique de l'huile essentielle. L'utilisation de l'α-pinène comme standard interne permet de s'affranchir de la correction de chaque valeur en comparaison à un standard certifié. Nous estimons alors que chaque terpène étudié subit la même déviation lors de son analyse par GC-C-IRMS ¹³C en comparaison avec son analyse en AE-IRMS. Le profil isotopique obtenu est indépendant de l'origine géographique, et de toutes autres variations pouvant être dues au climat au terroir et à la période de récolte. Le profil est donc caractéristique du type d'huile essentielle.

L'analyse de ces 4 molécules est réalisée en deux parties (cf. section 4.6.1.2), car le limonène, en grande abondance, ne se situe pas dans la gamme de mesure des autres molécules. L'incertitude de mesure est importante pour le myrcène qui situé en fin d'isotherme lors de la première analyse, n'est pas élué à température optimale. Ceci explique une largeur de pic élevée et donc une moins bonne répétabilité de la mesure. Cependant l'isotherme appliqué constitue le meilleur compromis entre toutes les contraintes de l'analyse isotopique. L'incertitude du sabinène est variable d'une huile essentielle à l'autre car le β -pinène élué peu avant, influence sa valeur isotopique. Concernant les huiles essentielles d'orange et pamplemousse, le β -pinène est présent en faible concentration et donc n'influence pas la mesure du sabinène, ce qui explique une meilleure répétabilité de la mesure du sabinène pour ces huiles essentielles.

5.3.1.1.1 Analyse des huiles essentielles de bergamote et citron

Voici les chromatogrammes (cf. figure 5.12) correspondant à une huile essentielle de citron, profil similaire à celui de la bergamote. Le graphe b présente le profil du limonène et est identique pour tous le citrus. Les molécules 1, 3, et 4 sont les molécules cibles de cette analyse. Voici les chromatogrammes obtenus sur colonne innowax $60 \times 0.25 \times 0.25$:



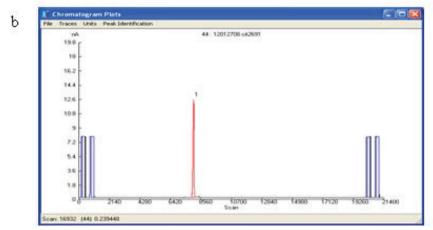


FIGURE 5.12: Chromatogramme de la séparation des terpènes pour l'analyse isotopique des huiles essentielles de citron et bergamote

a : représente les molécules 1 : α -pinène 2 : β -pinène 3 : sabinène 4 : myrcène b : représente le chromatogramme du limonène

A partir de ces chromatogrammes le logiciel calcule les valeurs isotopiques. Il a ensuite été possible de présenter les résultats sous forme de profil isotopique pour les huiles essentielles de citron et de bergamote. L'incertitude de mesure est la suivante :

$\delta^{13}{ m C}$	Incertitude (‰)
$\delta^{13} CSabinène$ - α -pinène	6,0
$\delta^{13} \mathrm{CMyrc\grave{e}ne}$ - α -pin\grave{e}ne	4,5
$\delta^{13} CLimonène$ - α -pinène	2,3

Table 5.35: Incertitudes associées à la mesure isotopique du sabinène, myrcène, limonène

Le graphe 5.13 présente une partie des échantillons de citron et bergamote. Ces résultats sont comparés à ceux de l'orange afin d'estimer la capacité discriminante de cette analyse.

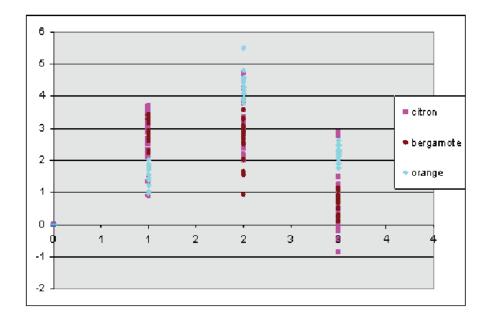


FIGURE 5.13: Profils isotopiques d'huiles essentielles de citron, bergamote et orange

Les profils de l'huile essentielle de citron et de bergamote sont très similaires. Cette analyse ne pourra être utilisée pour mettre en valeur l'ajout d'huile essentielle de citron dans celle de bergamote. Par contre le profil de l'huile essentielle d'orange est assez différent. Il est donc possible que cette analyse soit pertinente.

Ci-dessous dans les figures 5.14; 5.15; 5.16 et 5.17 sont présentés les résultats obtenus pour les huiles essentielles de bergamote et de citron :

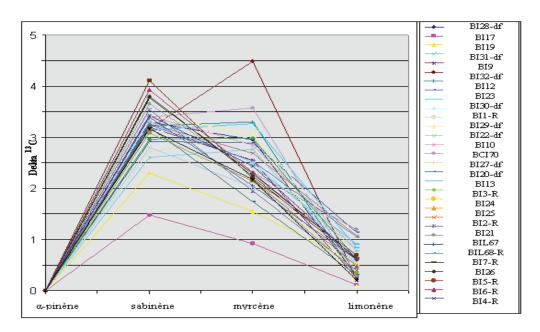


FIGURE 5.14: Profils isotopiques de l'ensemble des échantillons de bergamote

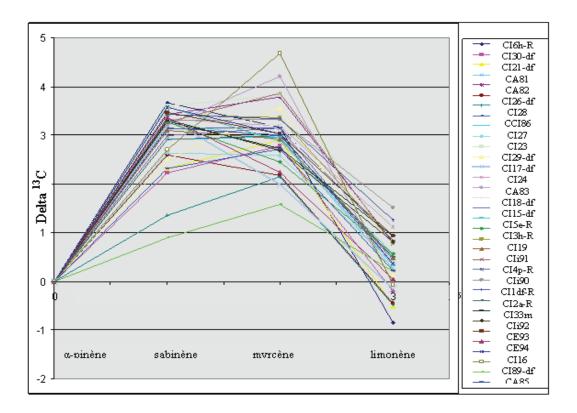


FIGURE 5.15: Profils isotopiques de l'ensemble des échantillons de citron

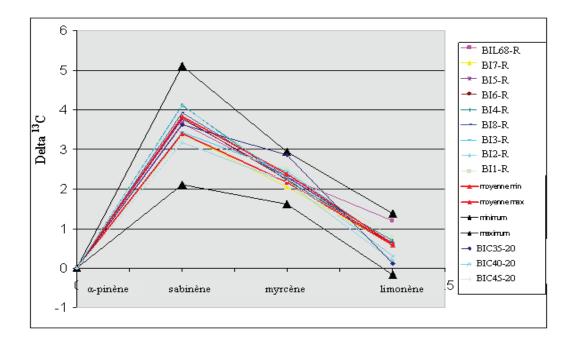


FIGURE 5.16: Profils isotopiques des huiles essentielles de bergamote de référence, de coupes, ainsi que les profils moyens, minimum et maximum

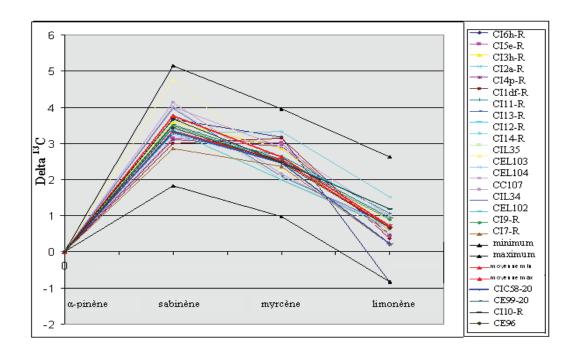


FIGURE 5.17: Profils isotopiques des huiles essentielles de citron de référence, extraites au laboratoire, de coupes, ainsi que les profils moyens, minimum et maximum

De nombreux profils semblent résulter d'un mélange entre l'huile essentielle d'orange et de bergamote ou de citron. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons isolé quelques profils d'échantillons dits de référence et ceux d'échantillons adultérés au laboratoire, et nous avons effectué leur empreinte isotopique. Ces expériences montrent que le mélange de l'huile essentielle d'orange avec celles de bergamote ou citron ne modifie pas significativement le profil isotopique.

Dans un souci de précision, nous avons voulu déterminer l'intervalle de tolérance et de confiance de profil à partir des échantillons de référence. Pour ce faire l'hypothèse de la distribution gaussienne a été admise, mais n'a pas été vérifiée.

L'intervalle de confiance (en rouge) de la moyenne et un profil minimum et maximum ont alors été établis. L'intervalle de confiance est assez réduit pour toutes les molécules à l'exception du sabinène. L'intervalle de tolérance est quant à lui relativement important. Le profil minimum est un peu différent du maximum en ce qui concerne sa forme. De plus, il est important de remarquer que la coupe à 20% d'orange n'est pas hors zone de tolérance et est même invisible dans le cas du citron.

5.3.1.1.2 Analyse de l'huile essentielle de mandarine

Le chromatogramme de l'huile essentielle de mandarine est différent des précédents car il présente une concentration en sabinène et β -pinène nettement plus faible. Cependant la teneur en sabinène sature à une intensité inférieure à 1nA et malgré une résolution acceptable, sa valeur isotopique est influencée par celle du β -pinène (pic 2). Cette influence perturbe la discrimination de la fraude car la teneur en β -pinène varie d'une huile essentielle à l'autre et donc son influence sur la valeur isotopique du sabinène également. Voici le chromatogramme (cf. figure 5.18) obtenu sur colonne innowax $60 \times 0.25 \times 0.25$:

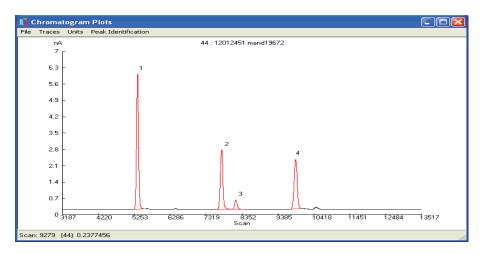


FIGURE 5.18: Chromatogramme de la séparation des terpènes pour l'analyse isotopique des huiles essentielles de mandarine

1 : α-pinène 2 : β-pinène 3 : sabinène 4 : myrcène

Nous avons analysé un grand nombre d'huiles essentielles de mandarine afin d'évaluer la perturbation amenée par le β -pinène sur cette méthode.

Il en ressort que la répétabilité de l'analyse est affectée par la faible intensité du sabinène et la présence du β -pinène, mais ces valeurs restent néanmoins acceptables.

$\delta^{13}{ m C}$	Incertitude (‰)
$\delta^{13} CSabinène$ - α -pinène	8,3
$\delta^{13} \mathrm{CMyrc\grave{e}ne}$ - α -pin\grave{e}ne	5,4
$\delta^{13} CLimonène$ - α -pinène	2,3

Table 5.36: Incertitudes associées à la mesure isotopique du sabinène, myrcène, limonène pour l'huile essentielle de mandarine

Malgré cette constatation, nous avons évalué le pouvoir discriminant de cette analyse entre l'huile essentielle d'orange et de mandarine (cf. figure 5.19).

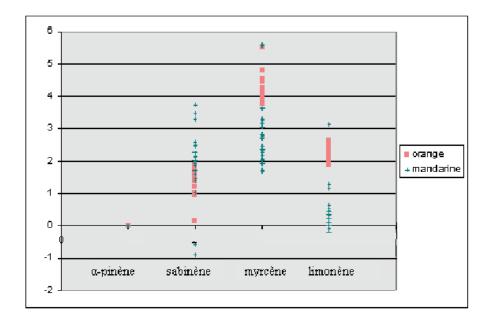


FIGURE 5.19: Profils isotopiques d'huile essentielle d'orange et mandarine

L'empreinte isotopique de l'huile essentielle d'orange est différente de celle de l'huile essentielle de mandarine, cette analyse pourrait donc s'avérer utile dans notre étude.

Le graphe 5.20 représente le profil isotopique des échantillons dits de référence, afin d'observer la reproductibilité du profil.

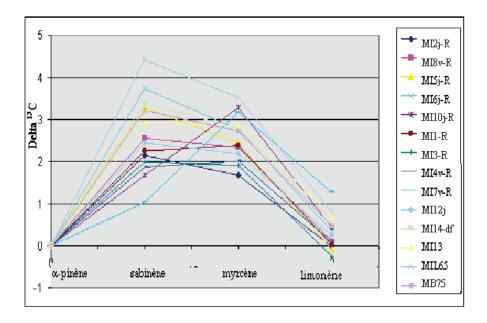


FIGURE 5.20: Profils isotopiques des huiles essentielles de mandarine de référence

Les profils isotopiques des huiles essentielles de mandarine sont très variables en ce qui concerne le sabinène. Cela confirme que l'influence de β -pinène n'est pas négligeable. Par ailleurs,

certains profils sont très similaires à l'orange bien que ce soit des échantillons de référence. C'est vraisemblablement dû à la présence du β -pinène insuffisamment résolu qui diminue la valeur isotopique du sabinène. Ainsi l'écart mesuré entre l' α -pinène et le sabinène apparaît plus faible qu'il ne l'est en réalité.

5.3.1.1.3 Analyse des huiles essentielles d'orange et du pamplemousse

Le pamplemousse et l'orange ont des profils chromatographiques similaires. Le β -pinène est présent en faible teneur, il ne perturbe donc pas l'analyse du sabinène. Nous avons dans un premier temps comparé les profils de pamplemousses authentiques et adultérés avec la moyenne des profils d'orange afin d'estimer l'utilité d'approfondir cette analyse. Voici, figure 5.21, le chromatogramme obtenu sur colonne innowax 60x0,25x0,25:

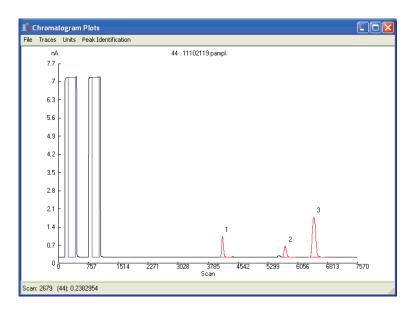


FIGURE 5.21: Chromatogramme de la séparation des terpènes pour l'analyse isotopique des huiles essentielles d'orange et pamplemousse

$1: \alpha$ -pinène 2: sabinène 3: myrcène

L'incertitude sur le profil isotopique a été calculée à partir d'une série de 6 analyses sur un échantillon d'orange. Elle est identique à celle du pamplemousse car les profils chrommatographiques sont semblables.

$\delta^{13}\mathrm{C}$	Incertitude (‰)
$\delta^{13} CSabinène$ - α -pinène	1,9
$\delta^{13} \mathrm{CMyrc\grave{e}ne}$ - α -pin\grave{e}ne	4,5
$\delta^{13} C Limonène$ - α -pinène	2,3

Table 5.37: Incertitudes associées à la mesure isotopique du sabinène, myrcène, limonène pour l'huile essentielle de pamplemousse

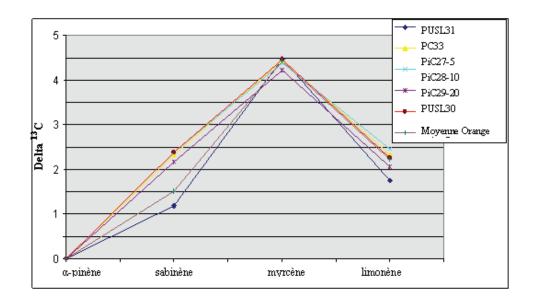


FIGURE 5.22: Profil isotopique d'huile essentielle de pamplemousse et orange

L'analyse de deux pamplemousses PUSL31, PUSL30 extraits au laboratoire montrent deux profils très différents dont un très ressemblant à l'orange. De plus les échantillons adultérés ne semblent pas avoir été significativement modifiés.

5.3.1.2 Valeurs isotopiques des linalol et acétate de linalyle des huiles essentielles de bergamote et de lamiacées

Cette analyse vise à détecter l'ajout de linalol et acétate de linalyle (respectivement 1 et 2 sur la figure 5.25) dans les huiles essentielles de bergamote et de lamiacées.

Les résultats sont présentés ici sous forme de rapports isotopiques, aussi appelés valeurs isotopiques, car cette analyse ne comporte pas assez de molécules pour l'élaboration d'un profil isotopique. Dans le cas des lamiacées, la mesure de l'acétate de lavandulyle (noté 3 sur la figure 5.25) n'a pas été possible. Il est en effet coélué avec le propionate d'hexyl sur colonne polaire, colonne plus adaptée à notre analyse. Voici le chromatogramme (cf. figure 5.23) d'une lavande obtenue sur colonne innowax 60x0,25x0,25:

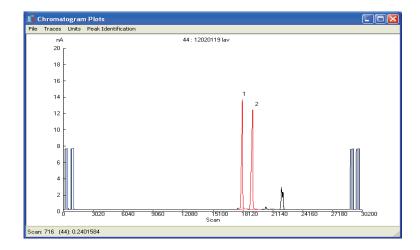


FIGURE 5.23: Chromatogramme de la séparation du linalol et acétate de linalyle pour la mesure isotopique

1 : linalol 2 : acétate de linalyle

Le chromatogramme ne comportera que le linalol dans le cas du ho wood et concernant la bergamote uniquement les linalol et acétate de linalyle.

Molécules	Moyennes en	Incertitude (%)	Moyennes en
	GC-C-IRMS δ^{13} C		AE-IRMS δ^{13} C (‰)
Linalol	(‰) -28,5	1,12	-28,7
Acétate de linalyle	-35,8	0,81	-36,3

Table 5.38: Comparaison des résultats des mesures isotopiques du ¹³C du linalol et acétate de linalyle en GC-C-IRMS et AE-IRMS

L'incertitude de mesure est réduite et les valeurs obtenues en GC-C-IRMS sont distantes de celles obtenues en AE-IRMS de moins de 0,5 ‰. Aucune correction n'a donc été appliquée. Les standards de linalol et d'acétate de linalyle d'origine naturel ou synthétique, à notre disposition, ont été analysés afin d'évaluer le potentiel discriminant de cette analyse lors de l'ajout de ces molécules.

Extraits naturels	Linalol Õ ¹³ C (‰)	Acétate de linalyle Ō ¹³ C (‰)	
shiuh	-25,0		
Howood	-27,7		
Menthacitrata3	-27,7		
René Laurent	-24,5		
Bois de rose sanofi	-28,4		
Aromatics 3	-26,5		
Coriander RC Treatt	-27,4		
Orange RC Treatt	-28,1		
Orange RC Treatt	-29,6		
Ho RC Treatt	-26,1		
Ho wood charis seijo	-28,0		
Synthétiques			
Littérature [105]	-33,0 – -27,0		
Littérature [131]	-28,9 – -24,9	-37,D – -35,8	
Fluka	-28,6	-35,7	
Givaudan	-26,8		
Aldrich	-32,8	-28,9	
Interchim	-27,5		
Glidden	-26,9		

Table 5.39: Résultats des mesures isotopiques du ¹³C du linalol et acétate de linalyle en GC-C-IRMS d'échantillons synthétiques ou extraits naturels

Les rapports isotopiques des standards sont variables mais correspondent à la gamme de valeurs des plantes en C3 en ce qui concerne le linalol, excepté l'échantillon Aldrich. L'analyse ne permettra pas de révéler l'ajout de standard de linalol dans la majorité des cas. Par contre, elle est particulièrement intéressante pour la détection de l'ajout d'acétate de linalyle dans la plupart des cas (sauf Aldrich). Néanmoins, l'analyse du linalol reste indispensable car elle permettra ultérieurement de corréler les valeurs isotopiques des molécules biologiquement liées et ainsi de donner du poids à l'analyse (cf. sections 6.1.1 et 6.1.5).

5.3.1.2.1 Huile essentielle de ho wood

L'analyse chirale ne permet pas dans la plupart des cas de détecter l'ajout d'huile essentielle de ho wood acétylée ou non. L'étude isotopique de cette huile essentielle a été testée afin de fournir une alternative à l'étude énantiomérique. Les résultats obtenus sont les suivants :

	Linalol	Acétate
	δ ¹³ C (‰) de linalyl	
REF		δ ¹³ C (‰)
HVV1	-28,62	
HW2	-28,52	
HW3	-26,07	
HVV4	-28,71	
HW5	-27,10	
HVV6	-25,18	
HW7-20std	-25,18	
HWac8	-25,18	-29,05
HWac9-20std	-25,86	-30,97

Table 5.40: Résultats des mesures isotopiques du ¹³C du linalol et acétate de linalyle en GC-C-IRMS des échantillons de ho wood

Les résultats sont hétérogènes pour les huiles essentielles de ho wood. Certains sont comparables à la valeur du standard synthétique qui a été utilisé.

L'acétylation du linalol produit un acétate de linalyle appauvri en carbone 13. L'écart entre l'acétate de linalyle et le linalol est différent pour les deux acétylations. Ceci est probablement dû à des conditions de réaction un peu différentes (concentration initiale, température...)

5.3.1.2.2 Huile essentielle de bergamote

Sont présentées ici les valeurs isotopique en carbone 13 pour le linalol et l'acétate de linalyle de l'huile essentielle de bergamote.

	Linalol	Acétate		
	l .	de linalyle		
REF	δ ¹³ C (‰)	δ ¹³ C (‰)		
Littérature [109]	-27,826,5	-27,728,5		
BI1-R	-26,2	-26,8		
BI2-R	-20,2 27.2	-20,0		
BI3-R	-27,2 -27,2	-27,6		
BI4-R	-27,2 -28,1	-27,0 27.4		
BI5-R		-27,4 27.2		
	-27,7 27.0	-27,2		
BI6-R	-27,9	-27,2		
BI7-R	-27,8	-27,3		
BI8	-27,5	-28,1		
BI9	-26,2	-29,5		
BI10	-28,7	-31,5		
BI12	-25,0	-25,9		
BI13	-26,7	-26,9		
BI17	-30,3	-30,7		
BI18	-27,4	-28,7		
BI19	-27,6	-28,8		
Bl20-df	-26,1	-26,9		
Bl21	-25,8	-26,6		
Bl22-df	-25,1	-25,4		
Bl23	-25,2	-26,5		
Bl24	-26,8	-27,0		
Bl25	-26,9	-27,3		
Bl26	-26,9	-29,8		
BI27	-25,0	-25,8		
Bl28-df	-26,0	-27,9		
Bl29-df	-24,7	-25,7		
Bl30-df	-25,2	-26,2		
Bl31-df	-25,7	-29,4		
Bl32-df	-26,6	-27,1		
BIC33-5	-26,2	-26,8		
BIC34-10	-26,2	-26,8		
BIC35-20	-26,2	-26,8		
BIC36-10+1std	-27,2	-27,5		
BIC36-10+1std	-26,5	-27,0		
BIC37-10+2std	-27,3	-27,7		
BIC37-10+ho	-25,9	-27,5		
BIC37-10+shiu	-26,7	-27,5		
BIC38-5	-27,2	-27,6		
BIC39-10	-27,2	-27,6		
D1000-10	21 ₁ 2	21,0		

	Linalol δ ¹³ C (‰)	Acétate de linalyle
		δ ¹³ C (‰)
BIC40-20	-27,2	-27,6
BIC41-10+2std	-27,6	-27,0
BIC41-1012std	-27,6	-20,3
BIC41-10+1shiu	-26,6	-27,6
BIC42-10+1stid	-26,3	-25,6
BIC42-10+1std	-20,3	-23,8
BIC43-5	-27.3	-27,7
BIC44-10	-27.2	-27,7
BIC45-20	-27,2 -27,2 -27,2	-27,7
BIC46-10+1std	-26,3	-25,6
BIC46-10+1std	-27,3	-27,7
BIC47-10+2std	-27,6	-28,5
BIC47-10+ho	-27,7	-27,7
BIC47-10+shiu	-26,5	-27,6
BICc48-5	-26,2	-26,8
BICc49-10	-26,2	-26,8
BICc50-20	-26,2	-26,8
BICc51-10+1std	-26,3	-25,6
BICc52-10+2std	-27,6	-28.5
BICc53-5	-27,2	-27,7
BICc54-10	-27,2	-27,7
BICc55-20	-27,2	-27,7
BICc56-10+1std	-26,3	-25,6
BICc57-10+2std	-27,6	-28.5
BIC58-10-HW1	-27,6	-26,8
BIC59-10-8HW7ac	-26,2	-28,6
BIC60-10-HW1	-27,7	-27,7
BIC61-10-8HW7ac	-27,7 -27,2	-28,6
BIC62-10-HW1	-27,6	-26,8
BIC63-10-8HW7ac	-26,2	-28,6
BIC64-10-HW1	-27,7	-27,7
BIC65-10-8HW7ac	-27,2	-28,6
BIL67	-27,9	-30,1
BIL68-R	-25,7	-26,3
BC69	-28,0	-27,7
BCI70	-25,8	-26,2
BA71	-27,9	-29,3

En rouge : valeurs anormales ; en orange : valeurs intermédiaires ; en bleu : valeurs légèrement hautes

FIGURE 5.24: Résultats des mesures isotopiques du 13 C du linalol et acétate de linalyle en GC-C-IRMS des échantillons de bergamote

Les échantillons BI11, BI14-df, BI15, BI16 n'ont pu être analysés par manque d'échantillon. Les échantillons de référence ont des valeurs isotopiques comprises entre -26,2 et -27,5 ‰ pour le linalol et -26,8 et -28,1 ‰ pour l'acétate de linalyle, ce qui est conforme à la littérature.

Au regard des échantillons adultérés l'ajout de standard synthétique de linalol, dans la mesure où le linalol synthétique est bien choisi, n'est pas détectable avec cette analyse. Certains échantillons de linalol peuvent cependant avoir un rapport isotopique suffisamment bas pour que l'ajout soit détecté.

En comparaison avec les échantillons de référence et la littérature, des valeurs isotopiques de l'acétate de linalyle anormalement basses ont été remarquées. L'ajout d'huile essentielle de ho wood acétylée pourrait en être à l'origine (éch. BIC59-10-8HW7ac, BIC61-10-8HW7ac, BIC63-10-8HW7ac) ainsi que l'ajout d'une grande quantité de standard synthétique (éch. BIC47-10+2std, BICc52-10+2std, BICc57-10+2std).

Cependant l'échantillon BIL67 extrait au laboratoire présente également une valeur atypique. Une valeur isotopique de l'acétate de linalyle inhabituellement basse ne démontre pas nécessairement l'ajout d'acétate de linalyle de synthèse. L'anormalité devra être confirmée par l'intermédiaire de l'analyse isotopique du deutérium. L'échantillon BI29 a des valeurs isotopiques de linalol et acétate de linalyle supérieures aux références, cependant comme les deux valeurs sont atypiques, cette variation est probablement la conséquence de variations naturelles (climat, terroir, période de récoltes....).

5.3.1.2.3 Huile essentielle de lavandin super

Les résultats des échantillons d'huile essentielle de lavandin super sont homogènes. Ils ont été résumés dans le tableau suivant :

	Linalol δ^{13} C (‰)	Acétate de linalyle δ^{13} C (‰)
Moyenne	-26,2	-25,8
Ecart-type	0,76	0,82
Ecart-type relatif %	2,9	3,2

Table 5.41: Résultats des mesures isotopiques du ¹³C du linalol et acétate de linalyle en GC-C-IRMS des échantillons de lavandin super

5.3.1.2.4 Huile essentielle de lavande

Dans le tableau 5.42 sont regroupés les résultats obtenus pour l'huile essentielle de lavande.

REF	Linalol δ ¹³ C (‰)	Acétate de linalyle δ ¹³ C (‰)
Littérature[106]	-27,825,4	
Littérature[132]	-30,325,2	-31,227,1
LF1-R	-27,5	-26,0
LF2-R	-26,8	-25,9
LF3-R	-27,7	-26,6
LF4-R	-27,3	-26,1
LF5-R	-27,4	-26,2
LF6-R	-27,8	-25,5
LF7-R	-27,6	-24,7
LF8-R	-26,3	-30,8
LF9	-27,5	-26,9
LF10	-27,6	-26,0
LF11	-26,7	-25,8
LF12	-27,3	-26,5
LF13	-28,0	-25,7
LF14	-27,7	-26,2
LF15	-28,0	-31,0
LF16	-26,0	-28,0
LF17	-28,1	-26,2
LF18	-27,8	-26,5
LF19	-28,0	-25,9
LFC20-5	-26,9	-26,2
LFC21-10	-26,2	-26,2
LFC22-20	-25,9	-26,2

	Linalol δ ¹³ C (‰)	Acétate de linalyle δ ¹³ C (‰)
LFC23-5-5std	-27,3	-26,9
LFC24-5-8std	-27,1	-27,1
LFC25-10-5std	-27,3	-26,9
LFC26-10-8std	-27,1	-27,1
LFC27-20-5std	-27,3	-26,9
LFC28-20-8std	-27,1	-27,1
LF46	-27,5	-24,9
LB47	-28,1	-26,6
LFC29+5stdfluka	-27,3	-26,9
LFC29+5stdinterchim	-27,4	-25,3
LFC29+5stdshiu	-26,9	-26,0
LFC29+5stdho	-27,6	-26,0
LFC30+8stdinterchim	-26,2	-25,3
LFC30+8stdfluka	-27,1	-27,1
LFC30+8stdrctreatt	-27,5	-26,3
LFC30+8stdho	-27,4	-26,0
LFC30+8stdshiu	-26,5	-25,9
LFC30+8stdrctreatt	-27,5	-26,6
LF33v	-27,5	-25,5
LF34-6shiu	-26,2	-25,5
LF35-12shiu	-27,1	-25,9
LF36-16shiu	-26,2	-26,6

Table 5.42: Résultats des mesures isotopiques du 13C du linalol et acétate de linalyle en GC-C-IRMS des échantillons de lavande

Les valeurs isotopiques du linalol dans l'huile essentielle de lavande sont en moyenne plus basses que dans le lavandin super. Cependant cette analyse n'est pas utilisée pour la détection de l'ajout de lavandin super dans la lavande car elle est peu sensible en comparaison à la variation du profil moléculaire qu'induit un tel mélange.

Trois valeurs sont véritablement atypiques en comparaison à nos références, conséquence possible d'un ajout d'huile essentielle de ho wood acétylée. De telles valeurs peuvent résulter d'un ajout d'acétate de linalyle de synthèse, mais l'analyse chirale a démontré l'absence de ce type de fraude concernant notre échantillonnage.

Cependant d'après la littérature [134], l'acétate de linalyle peut aussi avoir de telles valeurs naturellement.

5.3.1.3 Valeurs isotopiques du citral et acétate de géranyle du citron

L'objectif poursuivi avec cette analyse est la détection d'ajout de citral et d'acétate de géranyle d'origine naturelle ou synthétique dans l'huile essentielle de citron. La mesure de l'acétate de néryle, initialement prévue, n'a pas été possible en raison de la présence d'un grand nombre de coélutions particulièrement sur des échantillons oxydés. Cependant l'analyse du citral et de l'acétate de géranyle suffisent à la détection d'un échantillon adultéré, la probabilité d'un ajout unique d'acétate de néryle étant limitée.

Les résultats sont présentés sous forme de valeurs isotopiques car cette analyse ne comporte pas assez de molécules pour que l'élaboration d'un profil isotopique présente de l'intérêt. Voici le chromatogramme (cf. figure 5.25) obtenu sur colonne DBXLB 30x0,25x0,25:

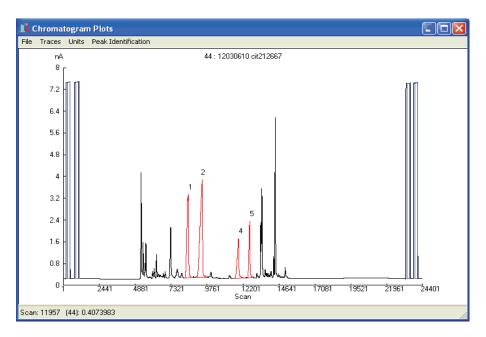


FIGURE 5.25: Chromatogramme de la séparation du citral, acétate de néryle et géranyle pour l'analyse isotopique des huiles essentielles de citron

1 : néral 2 : géranial 3 : acétate de néryle 4 : acétate de géranyle

La répétabilité de la mesure a été évaluée (cf. tableau 5.43)

$\delta^{13}{ m C}$	Incertitude (‰)
$\delta^{13} C$ Néral	2,8
$\delta^{13} CG \acute{e} ranial$	2,1
δ ¹³ C Acétate de géranyle	3,0

Table 5.43: Incertitude de mesure de l'analyse isotopique du ¹³C sur GC-C-IRMS pour le néral (1), géranial (2) et acétate de géranyle (3)

L'incertitude expérimentale obtenue est plus importante que celle établie par le constructeur à partir d'un gaz de référence. Cette constatation est cohérente dans la mesure où le bruit de fond du chromatogramme de l'échantillon induit une erreur de calcul plus importante que lors de l'injection d'un gaz de référence. Afin de réduire l'impact de l'incertitude expérimentale, chaque valeur a été corrigée selon le protocole décrit dans la section 4.6.1.

Le néral est coélué avec le géraniol sur la colonne DBXLB. Cependant la concentration en géraniol est négligeable pour la plupart des échantillons. Principalement les échantillons extraits au laboratoire en contiennent des teneurs significatives. Cependant la valeur isotopique après purification est identique à celle qui avait été obtenue malgré la coélution. Ceci s'explique par la forte similarité entre ces molécules qui possèdent le même squelette carboné. De plus la purification entraine un risque de fractionnement isotopique. La mesure du néral est donc obtenue sans purification de l'échantillon, l'écart avec la mesure du géranial permettant de vérifier qu'il n'y a pas d'anomalie. En, effet ces deux valeurs sont très liées car il s'agit de deux isomères.

Pour certains échantillons très dégradés, les valeurs obtenues sont indicatives, mais l'incertitude de mesure est très importante.

			Acétate				Acétate
	Néral	Géranial	de géranyle		Néral	Géranial	de géranyle
	δ ¹³ C (‰)	δ ¹³ C (‰)	δ ¹³ C (‰)		δ ¹³ C (‰)	δ ¹³ C (‰)	
REF			8 ° C (‰)		` ′	0 0 (700)	δ ¹³ C (‰)
Littérature [62]	-24,527,5	-24,527,5					
Lemongrass**	-12,0	-12,0					
Laboratoire	-26,526,7	-26,526,7	25.0				
Moyenne standards	-29,0	-28,8	-35,0	CICEC E	25.2	25.4	20.2
Cl1df-R Cl2a-R	-26,4 -27,6	-25,6 -27,3	-28,7 -29,7	CIC56-5 CIC57-10	-25,2 -25,2	-25,4 -25,4	-28,3 -28,3
CI2a-R CI3h-R	-27,6 -25,7	-27,3 -26,1	-29,7 -28,9	CIC57-10 CIC58-20	-25,2 -25,2	-25,4 -25,4	-20,3 -28,3
CI3n-R CI4p-R	-25,7 -26,3	-26,1 -26,9	-20,9 -30,4	CIC59-5	-25,2 -25,2	-25,4 -25,4	-20,3 -28,3
CI5e-R	-26,3 -25,8	-26,3	-30,4	CIC60-10	-25,2 -25,2	-25,4 -25,4	-20,3 -28,3
CI6h-R	-25,0	-25,7	-20,0	CIC61-20	-25,2 -25,2	-25,4	-20,3
Cl7bio-R	-24,7	-26,7	-29,1	CIC62-5	-25,7	-25,4	-20,3
CI8-R	-25,7	-26,7	-28,8	CIC63-10	-25,7 -25,7	-25,1	-20,7
CI9-R	-26,4	-26,7	-20,0	CIC64-20	-25,7	-25,7	-28,6
CI10-R	-25,2	-25,4	-29,0 -28,3	CIC65-5	-25,8	-26,2	-28,8
CI11-R	-25,2	-26,5	-30,8	CIC66-10	-25,8 -25,8	-26,2	-28,8
Cl12-R	-25,9 -25,9	-26,6	-30,0	CIC67-20	-25,8 -25,8	-26,2 -26,2	-20,0
Cl12-R Cl13-R	-25,5 -26,1	-26,7	-31,0	CIC68-5	-25,8 -25,8	-26,2	-20,0 -28,8
Cl14-R	-25,3	-26,4	-32,0	CIC69-10	-25,8	-26,2 -26,2	-20,0 -28,8
Cl15df	-27,8	-20,4	-32,6	CIC70-20	-25,8	-26,2	-28,8
CI16*	-23,5	-26,4	-29,7	CIC71-20+0,5std	-27,0	-26,2	-28,3
CI17-df	-25,0	-26,6	-32,5	CIC72-20+1std+0,2gac	-27,4	-27,0	-31,9
C117-G1	-25,5	-26,4	-28,9	CIC73-20+1std	-27,4	-27,0	-27,3
Cl20-df*	-27,0	-26,3	-36,6	CIC75-20+1std	-27,9	-27,7	-32,3
Cl21-df*	-27,1	-26,4	-36,5	CIC76-+0,5std	-27,8	-27,4	-29,4
CI23	-28,0	-28,3	-32,3	CIC77-20	-27,8	-27,6	-29,2
CI24	-26,3	-27,1	-30,2	CIC78-20	-27,8	-27,7	-29,2
CI25*	-25,6	-26,2	-32.1	CIC79+1std	-26,2	-26,6	-28,8
CI27	-29,1	-29	-32,2	CA81	-27,4	-26,8	-30,2
CI28	-28,6	-28,7	-35,0	CA82-df	-27,0	-26,0	-29,7
Cl29-df	-27,5	-27,2	-32,9	CA83	-26,5	-27,0	-30,9
Cl30-df	-26,0	-25,6	-34,6	CA84	-27,0	-26,9	-29,0
Cl33m	-23,7	-24,0	-27,0	CA85	-28,1	-28,3	-29,4
CI34	-26,3	-26,7	-29,5	CCI87-df	-27,8	-28,5	-35,9
CI35	-25,9	-25,6	-27,0	CCl88+1std+0,2gac	-25,5	-27,2	-32,8
CIC37-5	-27,6	-27,3	-29,7	Cl89-df	-27,3	-27,1	-29,0
CIC38-10	-27,6	-27,3	-29,7	Cli90	-25,1	-23,3	-28,5
CIC39-20	-27,6	-27,3	-29,7	Cli91	-24,1	-23,7	-26,8
CIC40-5	-27,6	-27,3	-29,7	Cli92*	-24,7	-22,4	-28,7
CIC41-10	-27,6	-27,3	-29,7	CE93	-23,5	-23,2	-27,3
CIC42-20	-27,6	-27,3	-29,7	CE94	-25,2	-25,3	-28,7
CIC43-5	-27,6	-27,3	-29,7	CE95	-25,6	-25,1	-27,4
CIC44-10	-27,6	-27,3	-29,7	CE96	-25,2	-25,4	-27,3
CIC45-20	-27,6	-27,3	-29,7	CE97-5	-25,2	-25,4	-27,3
CIC46-5	-27,4	-27,1	-29,6	CE98-10	-25,2	-25,4	-27,3
CIC47-10	-27,3	-25,7	-29,6	CE99-20	-25,2	-25,4	-27,3
CIC48-20	-27,0	-26,6	-29,3	CEL101	-25,5	-25,2	-29,1
CIC49-1	-27,6	-27,3	-29,7	CEL102	-26,5	-25,8	-28,2
CIC50-5	-27,6	-27,3	-29,7	CEL102-D	-25,9	-24,6	-28,1
CIC51-10	-27,6	-27,3	-29,7	CEL103	-25,3	-25,6	-29,0
CIC52-20	-27,6	-27,3	-29,7	CEL104	-27,3	-26,6	-29,9
CIC53-5	-27,6	-27,3	-29,7	CEL105	-25,1	-25,3	-29,9
CIC54-10	-27,6	-27,3	-29,7	CELD106	-25,3	-24,3	-27,6
CIC55-20	-27,6	-27,3	-29,7	CC107	-24,0	-24,2	-27,2
CIC56-5	-25,2	-25,4	-28,3	CC108	-24,0	-24,2	-27,2
				CI109dt	-26,8	-29,9	-29,9

Table 5.44: Résultats des mesures isotopiques du ¹³C du citral et acétate de géranyle en GC-C-IRMS des échantillons de citron

En rouge : valeurs anormalement basses ; En orange : valeurs limites ; En bleu : valeurs anormalement hautes * résultats indicatifs en raison d'un forte dégradation

^{**} Moyenne résultats obtenus au laboratoire

Les huiles essentielles CI18-df, CI31, CI32, n'ont pu être analysées par manque d'échantillon. Les valeurs isotopiques du néral et géranial très fortement liées, sont différentes au maximum de 1‰. Ceci a été observé tant pour le standard utilisé que pour les échantillons de référence. En cas d'adultération, les deux isomères sont simultanément ajoutés (citral), les deux rapports isotopiques évoluent donc ensemble. Les valeurs isotopiques du citral synthétique sont inférieures à celles des échantillons naturels. Celles de l'acétate de géranyle sont significativement inférieures à celles des échantillons de référence. La synthèse des publications de l'étude effectuée au laboratoire et des échantillons de référence, a permis d'établir des valeurs, indicatrices d'un ajout possible de citral ou d'acétate de géranyle (en rouge), des valeurs limites (en orange) ou des valeurs anormalement hautes significatives d'une dégradation ou d'un éventuel ajout de lemongrass (bleu).

En effet, il a été remarqué que le vieillissement entraine un fractionnement isotopique (ech. CEL102-D). Les valeurs isotopiques sont plus hautes, ce qui signifie que le citral est enrichi en carbone 13. L'évaporation de citral sans atome de carbone 13 « plus léger » expliquerait ces résultats. Cependant les échantillons identifiés comme dégradés dans la section 5.1.1 n'ont pas nécessairement de fortes valeurs isotopiques .

Le lemongrass, plante en C4 riche en citral dont l'huile essentielle est moins onéreuse que celle de citron, possède un δ^{13} C de valeur moyenne à -12 ‰. L'intérêt de son utilisation serait sa valeur isotopique en deutérium similaire à celle du citral dans le citron. Un ajout de citral provenant du lemongrass pourra être invisible en analyse isotopique du carbone 13, suivant la proportion ajoutée et le rapport isotopique du citral de l'huile essentielle de départ.

Pour cette analyse, les échantillons CI11-R, CI12-R, CI13-R, CI14-R, ont des valeurs en acétate de géranyle inférieures aux valeurs de référence. Cette différence est inexpliquée à ce stade, l'analyse isotopique en deutérium aidera à l'interprétation. Aussi l'échantillon fourni par l'INRA de Corse (éch. CC107, CC108) a des valeurs isotopiques hautes, ce qui tend à prouver que certaines valeurs isotopiques peuvent être naturellement hautes.

D'autre part, la distillation de l'huile essentielle augmente le rapport isotopique. Cependant les valeurs isotopiques appartiennent toujours à la gamme de naturalité. C'est pourquoi, l'analyse isotopique sur le citral d'un mélange huile essentielle issue de l'expression et huile essentielle hydro-distillée n'est pas pertinente.

5.3.1.4 Discussion sur les résultats de l'analyse isotopique du carbone 13

L'analyse isotopique du carbone 13 a été testée en complément de l'analyse chirale sur certains terpènes des citrus et le linalol et l'acétate de linalyle pour la bergamote et les lamiacées. Le néral, le géranial et l'acétate de géranyle ne sont pas des molécules chirales, l'analyse isotopique est donc la seule possible pour étudier l'ajout éventuel de ces molécules d'origine synthétique ou naturelle.

L'analyse isotopique des terpènes n'est pas pertinente car elle ne permet pas d'identifier l'ajout d'huile essentielle d'orange, contrairement à l'analyse chirale du sabinène. De plus, la mise en œuvre de la méthode est complexe et il n'est pas toujours possible d'obtenir des résultats fiables.

A l'inverse l'analyse isotopique en carbone 13 de l'acétate de linalyle, semble judicieuse dans certains cas et apporte une information complémentaire à l'analyse chirale. Cette dernière n'est pas toujours en mesure de détecter l'adultération, notamment en cas d'ajout d'huile essentielle de ho wood. Dans un premier temps l'analyse du linalol ne semble pas intéressante, cependant elle permet de vérifier la naturalité de l'acétate de linalyle. En effet les valeurs isotopiques de ces deux molécules sont biologiquement liées, la différence entre les valeurs isotopiques de ces deux molécules pourra être suivie, notamment dans le cas d'une valeur isotopique de l'acétate de linalyle très basse.

Certaines valeurs isotopiques de l'acétate de linalyle sont très basses, ce qui peut être naturel ou dû à l'adultération par molécules d'origine synthétique ou naturelle. L'analyse isotopique du deutérium est alors indispensable à l'interprétation de ces résultats.

En ce qui concerne l'analyse du citral, au regard des résultats obtenus à partir des échantillons de référence, adultérés et commerciaux, cette analyse est pertinente. Les rapports isotopiques du néral et géranial (citral) sont très liés car ce sont deux isomères. L'adultération fera évoluer le rapport isotopique des deux molécules simultanément. Le suivie de l'écart entre les deux valeurs permettra de contrôler que l'analyse n'a pas été faussée, par une coélution éventuelle, par exemple.

L'analyse isotopique du deutérium sur ces molécules cibles est complémentaire et permettra via le traitement statistique des différents paramètres une interprétation précise des résultats. Cette méthode nous permet de nous affranchir de l'établissement de valeurs limites de tolérance qui peut paraître arbitraire tant l'analyse isotopique est complexe à mettre en œuvre et la variation naturelle semble parfois importante.

5.3.2 L'analyse isotopique du deutérium

Le deutérium existe en abondance bien plus faible que le carbone 13. De ce fait, l'incertitude de l'analyse isotopique du deutérium est importante en raison de sa très faible abondance. La reproductibilité de la mesure n'est pas suffisante. En effet selon la configuration de l'appareil (tube à pyrolyse, colonne chromatographique) et la molécule analysée, les valeurs obtenues peuvent varier de $20-40~\delta^2 H$.

L'écart-type relatif sur une vingtaine de mesures non successives est de plus de 10 % pour les molécules étudiées. C'est pourquoi chaque valeur obtenue est corrigée (cf. section 4.6.2). L'incertitude de mesure est alors celle donnée par le constructeur, c'est-à-dire 4 % (répétabilité). Cependant nous corrigeons par rapport à nos propres mesures de valeurs isotopiques de standards et non par rapport à une valeur certifiée par l'IAEA (international Atomic Energy Agency). Il est alors possible d'observer un décalage entre les rapports isotopiques mesurés et ceux rapportés par la littérature. Malgré cela les conclusions de cette étude et des différentes publications sont identiques car il s'agit principalement d'un décalage dû à chaque appareillage, plus qu'à l'échantillonnage. Ce décalage a été évalué quand cela était pertinent permettant ainsi de connaître l'origine (appareillage, échantillon) du décalage entre les valeurs de cette étude et celles publiées.

5.3.2.1 Valeurs isotopiques des linalol et acétate de linalyle des huiles essentielles de bergamotes et de lamiacées

Cette analyse vise à compléter les résultats obtenus en analyse isotopique du carbone 13. Les possibilités de discriminer l'ajout de molécules synthétiques ou naturelles sont investiguées en analysant différents standards de linalol et d'acétate de linalyle.

Extraits naturels	Linalol δ ² Η (‰)		Acétate de linalyle δ ² Η (‰)
Littérature [129]	-307265		-280276
Shiu	-276	RCtreatt9h52703	-236
Howood	-271	extrait lavande (90%)	-215
RCtreatt9h52701	-261		
Menthacitrata3	-259		
René Laurent	-251		
Basilic	-246		
Bois de rose sanofi	-236		
Aromatics 3	-208		
Coriander RC Treatt	-205		
Synthétiques			
Littérature[129]	-212180		
Littérature[132]	-209 – -185		-181 – -172
Fluka	-175		-149
Agnelspe	-170		
Givaudan	-147		
Sarsyntex	-136		
Aldrich	-107		
Interchim	-181		-160
Glidden	-202		

Table 5.45: Résultats des mesures isotopiques du ²H du linalol et acétate de linalyle en GC-C-IRMS d'échantillons synthétiques ou extraits naturels

En moyenne, pour les deux molécules, nos résultats semblent plus élevés que ceux donnés par la littérature. Nous ne nous servirons donc pas des publications comme aide à la détermination de valeurs limites de tolérance. La mesure isotopique en AE-IRMS du linalol et acétate de linalyle démontre un décalage d'environ 20 % de nos standards synthétiques. Ce décalage semble correspondre à la différence observée entre nos rapports isotopiques et ceux publiés. Il est donc principalement dû à l'appareillage. Les valeurs isotopiques des standards synthétiques sont intéressantes car bien inférieures à celles des molécules naturelles.

5.3.2.1.1 Huile essentielle de ho wood

Dans le tableau 5.46 sont regroupés les résultats obtenus pour l'huile essentielle de ho wood.

REF	Linalol δ ² H(‰)	Acétate de linalyle δ ² Η (‰)
HW/1	-298	
HW2	-296	
HW3	-275	
HVV4	-302	
HW5	-285	
HVV6	-264	
HVV7 -20std	-217	
HVV8	-264	-238
HW9 -20std	-238	-217

Table 5.46: Résultats des mesures isotopiques du ²H du linalol et acétate de linalyle en GC-C-IRMS des échantillons de ho wood

A l'inverse de l'analyse isotopique du carbone 13, l'acétylation du linalol de l'huile essentielle de ho wood produit un acétate de linalyle enrichi en deutérium comparé au linalol précurseur. Cette valeur isotopique de l'acétate de linalyle ainsi crée correspond aux valeurs obtenues pour les huiles essentielles de bergamote et lavande. Les valeurs isotopiques du linalol semblent quant à elles globalement moins fortes que celles des huiles essentielles de lavande et bergamote.

5.3.2.1.2 Huile essentielle de bergamote

Dans le tableau 5.47 sont présentés les résultats obtenus pour l'huile essentielle de bergamote.

	Linalol	Acétate
	2	de linalvle
REF	δ ² H (‰)	δ ² H (‰)
Laboratoire	-250	-220
BI1-R	-243	-226
BI2-R	-243	-234
BI3-R	-238	-23 4 -218
BI4-R	-247	-210
BI5-R	-247	-232
BI6-R	-246	-223 -194
BI7-R	-248	-220
BI8	-249	-222
BI9	-270	-239
BI10	-288	-234
BI11	-250	-215
Bl12-bio	-272	-210
BI13	-236	-205
BI17	-281	-254
BI18	-255	-227
Bl19	-285	-232
Bl20-df	-254	-243
Bl21	-239	-211
Bl22-df	-252	-231
Bl23	-227	-216
Bl24	-251	-209
Bl25	-239	-214
Bl26	-275	-244
Bl27	-246	-212
Bl28-df	-238	-225
Bl29	-281	-243
Bl30	-251	-208
Bl31-df	-284	-247
Bl32-df	-257	-238
BIC33-5	-243	-226
BIC34-10	-243	-226
BIC35-20	-243	-226
BIC36-10+1std	-240	-223
BIC36-10+1std	-222	-221
BIC37-10+2std	-208	-183
BIC37-10-5HW1	-263	-225
BIC37-10-5HW6	-276	-224
BIC38-5	-238	-218
BIC39-10	-238	-218

	Linalol	Acétate
		de linalvle
	δ ² H (‰)	δ ² H (‰)
BIC40-20	-238	-218
BIC41-10+2std	-218	-187
BIC41-10-5HW1	-252	-215
BIC41-10-8HW6	-256	-217
BIC42-10+1std	-239	-202
BIC42-10+1std	-250	-227
BIC43-5	-259	-234
BIC44-10	-259	-234
BIC45-20	-259	-234
BIC46-10+1std	-258	-212
BIC46-10+1std	-250	-233
BIC47-10+2std	-218	-193
BIC47-10-5HW1	-281	-233
BIC47-10-5HW6	-278	-234
BICc48-5	-243	-226
BICc49-10	-243	-226
BICc50-20	-243	-226
BICc51-10+1std	-239	-202
BICc52-10+2std	-218	-187
BICc53-5	-259	-234
BICc54	-259	-234
BICc55	-259	-234
BICc56-10+1std	-258	-212
BICc57-10+2std	-218	-193
BIC58-10-HW1	-252	-226
BIC59-10-8HW7ac	-243	-193
BIC60-10-HW1	-281	-234
BIC61-10-8HW7ac	-259	-198
BIC62-HWac8	-252	-226
BIC63-HWac8	-281	-234
BIC64-HWac8	-258	-218
BIC65-5HVV1	-252	-226
BIC66-5HW1	-281	-234
BIC67-5HW1	-258	-218
BIL69	-238	-219
BIL70-R	-226	-204
BC71	-238	-218
BCI72	-232	-221
BA73	-239	-214

Table 5.47: Résultats des mesures isotopiques du ²H du linalol et acétate de linalyle en GC-C-IRMS des échantillons de bergamote

En rouge : valeurs anormales ; en orange : valeurs limites

Dans le tableau 5.47 l'échantillon BI16 disponible en trop faible quantité n'a pas été analysé.

Les rapports isotopiques obtenus correspondent à des résultats déjà observés lors d'études effectuées au laboratoire.

La comparaison des valeurs isotopiques des échantillons de référence et des échantillons adultérés permet de remarquer certaines valeurs anormalement hautes ou basses (en rouge). L'ajout d'une large quantité d'une molécule synthétique augmente significativement la valeur isotopique, tandis que l'ajout de ho wood a tendance à baisser la valeur isotopique du linalol. Le rapport isotopique de l'acétate de linalyle reste quant à lui constant (cf. section 5.3.2.1.1). De nombreux échantillons possèdent des valeurs anormalement hautes (éch. BI9, BI10 ,BI12-bio, BI17 BI19, BI26, BI29, BI31-df).

Quelques valeurs d'acétate de linalyle sont hautes (en orange), ce qui pourrait indiquer un ajout de cette molécule d'origine synthétique. Cependant l'échantillon BIL68-R qui a été extrait au laboratoire possède aussi une valeur similaire. De plus l'analyse chirale ne confirme pas la première hypothèse. Ces valeurs ne sont donc pas nécessairement le reflet d'une adultération. Cependant le traitement statistique des résultats est indispensable à leur interprétation.

5.3.2.1.3 Huile essentielle de lavandin super

Les résultats des échantillons d'huile essentielle de lavandin super sont homogènes. Ils ont été synthétisés dans le tableau 5.48 :

	Linalol δ ² H (‰)	Acétate de linalyle δ ² H (‰)
Moyenne	-242	-227
Ecart-type	7,89	11,78
Ecart-type relatif (%)	3,26	5,2

Table 5.48: Résultats des mesures isotopiques du ²H du linalol et acétate de linalyle en GC-C-IRMS des échantillons de lavandin super

Les résultats présentés dans le tableau 5.48 sont inférieurs aux données de la littérature concernant la lavande, mais correspondent par contre aux résultats que nous avons obtenus pour la lavande.

5.3.2.1.4 Huile essentielle de lavande

Dans le tableau 5.49 ci-dessous sont rapportés les résultats obtenus après l'analyse d'échantillons de lavande.

REF	Linalol δ ² Η (‰)	Acétate de linalyle δ ² Η (‰)
Littérature[132]		-272238
Littérature[129]		-270238
LF1-R	-236	-227
LF2-R	-234	-225
LF3-R	-242	-233
LF4-R	-241	-230
LF5-R	-225	-216
LF6-R	-247	-232
LF7-R	-241	-224
LF8-R	-239	-223
LF9	-229	-222
LF10	-229	-220
LF11	-231	-216
LF12	-232	-222
LF13	-252	-242
LF14	-236	-226
LF15	-275	-251
LF16	-263	-242
LF17	-233	-221
LF18-bio	-249	-237
LF19	-253	-244
LFC20-5	-230	-206
LFC21-10	-231	-211
LFC22-20	-232	-209

	Linalol δ ² H (‰)	Acétate de linalyle δ ² H (‰)
LFC23-5-5std	-221	-202
LFC24-5-8std	-209	-194
LFC25-10-5std	-221	-202
LFC26-10-8std	-209	-194
LFC27-20-5std	-221	-202
LFC28-20-8std	-209	-194
LF31	-258	-257
LF32	-236	-232
LFC29+5stdfluka	-221	-202
LFC29+5stdinterchim	-221	-207
LFC29+5HW1	-229	-207
LFC29+5HVV6	-235	-209
LFC30+8stdinterchim	-202	-200
LFC30+8stdfluka	-209	-194
LFC30+8stdrctreatt	-226	-211
LFC30+5HVV1	-235	-209
LFC30+5HVV6	-229	-207
LFC30+8stdrctreatt	-212	-209
LF33v	-240	-219
LF34-6HW6	-226	-217
LF35-12HW6	-228	-216
LF36-16HW6	-241	-216

Table 5.49: Résultats des mesures isotopiques du ²H du linalol et acétate de linalyle en GC-C-IRMS des échantillons de lavande

Ces résultats montrent à nouveau un décalage d'environ 20 ‰ avec la littérature. Ces différentes expériences confirment le potentiel discriminant de ces analyses lors de l'ajout de linalol et acétate de linalyle d'origine synthétique ou naturelle. Au regard des valeurs isotopiques des échantillons commerciaux, seuls deux d'entre eux présentent des valeurs anormales (éch. LF15, LF16).

5.3.2.2 Valeurs isotopiques du citral et acétate de géranyle dans l'huile essentielle de citron

Cette analyse est complémentaire à l'analyse isotopique du carbone 13. La possibilité de discriminer l'ajout de molécules synthétiques ou naturelles est étudiée en analysant différents standards de citral et d'acétate de géranyle. L'analyse AE-IRMS montre un écart d'environ 50

‰ avec la GC-py-IRMS pour le citral. Ces molécules sont en effet plus sensibles aux conditions d'expérimentation que le linalol et acétate de linalyle.

Extraits naturels	Néral δ ² Η (‰)	Géranial δ ² Η (‰)	Acétate de géranyle δ ² Η (‰)
Litterature[118]	-303264	-303266	
Nat standard RC Treatt	-274	-276	
Nat extra RC treatt	-264	-268	
Synth international flavor and fragrance	-258	-267	
Synthétiques			
Litterature [118]	-197 – 29	-177 – 38	
Sigma	-44	-17	
Citral charabot	-43	-12	
Citral 95% Acros synth	-6	11	
Lemarom et givaudan L52782	5	25	
Synth ventos	10	8	
Citral syo1414 perlarom	11	19	
Synth Lancaster	71	57	-262
Std11	-175	-180	

Table 5.50: Résultats des mesures isotopiques du ²H du néral, géranial et acétate de géranyle en GC-C-IRMS d'échantillons synthétiques ou extraits naturels

A deux exeception près, les standards synthétiques de citral présentent des valeurs isotopiques bien supérieures à celles des extraits naturels. En revanche l'acétate de géranyle synthétique possède une valeur proche de la gamme des molécules naturelles (cf. tableau 5.50), mais a également un rapport isotopique très différent de ceux obtenus pour les huiles essentielles de citron. Les standards « extraits naturels » semblent avoir des valeurs isotopiques plus faibles que les résultats que nous avons obtenus pour l'huile essentielle de citron (cf. tableau 5.51). Ceci démontre la pertinence de cette analyse quant à la détection de l'ajout de citral synthétique ou naturel.

Le tableau 5.51 synthétise les résultats obtenus pour les huiles essentielles de citron. Dans la littérature dont nous disposons, seul le rapport isotopique du néral a été mesuré en raison de coélution au niveau du pic du géranial. Or en cas d'ajout de citral, les deux valeurs sont nécessairement modifiées, donc le contrôle d'une seule valeur peut s'avérer suffisant. Cependant nous avons pris le parti d'analyser les deux molécules constituant le citral, afin d'être vigilant sur les mesures, car elles doivent impérativement être similaires. En effet sur colonne innowax, aucune coélution n'a été observée sur le pic du géranial. en rechanche il existe dans certains cas, une coélution au niveau du pic de néral. Cependant comme cela a été expliqué dans la section 5.3.1.3 la coélution n'a pas d'influence sur la valeur obtenue. De plus la mesure du géranial permet de vérifier que la valeur isotopique du néral est exacte.

REF	Néral δ ² H (‰)	Géranial δ ² Η (‰)	Acétate de géranyle δ ² Η (‰)		Néral δ ² Η (‰)	Géranial δ ² H(‰)	Acétate de géranyle δ ² H (‰)
Littérature[118]	-306252						
CI1df-R	-220	-230	-155	CIC57-10	-243	-245	-162
Cl2a-R	-169	-183	-135	CIC58-20	-243	-245	-162
Cl3h-R	-174	-184	-148	CIC59-5	-243	-245	-162
CI4p-R	-174	-186	-144	CIC60-10	-243	-245	-162
Cl5e-R	-170	-186	-138	CIC61-20	-243	-245	-162
Cl6h-R	-195	-215	-199	CIC62-5	-174	-187	-138
Cl7bio-R	-234	-244	-164	CIC63-10	-177	-192	-141
CI8-R	-170	-182	-162	CIC64-20	-184	-198	-145
CI9-R	-207	-218	-161	CIC65-5	-170	-186	-138
CI10-R	-243	-245	-162	CIC66-10	-170	-186	-138
CI11-R	-168	-194	-119	CIC67-20	-170	-186	-138
Cl12-R	-244	-251	-117	CIC68-5	-170	-186	-138
CI13-R	-180	-205	-107	CIC69-10	-170	-186	-138
CI13-R CI14-R	-184	-207	-111	CIC70-20	-170	-186	-138
Cl15df	-61	-59	-146	CIC71-20+0,5std	-127	-165	-156
CI16	42	-24	-154	CIC71-2010,3std	-79	-122	-237
CI17df	-232	-254	-215	CIC73-20+1std	-81	-125	-164
CI19	-234	-253	-164	CIC74-20+1std+0,2gac	-80	-123	-223
Cl20df	-31	-14	-231	CIC75-20+1std	-78	-118	-164
Cl21df	-19	-25	-182	CIC75-20+1std CIC76-20+0,5std	-122	-157	-139
Cl21df	-27	72	-265	CIC76-20+0,3std CIC77-20+1std+0,2gac	-79	-124	-220
C122d1	-38	-56	-116	CIC77-20+1std+0,2gac	-78	-124	-224
Cl23	47	19	-140	CIC70-20+1std+0,2gac	-70	-123	-166
C124 C125	-25	5	-228	CIC80+1std+0,2gac	-82	-121	-165
Cl26df	-102	-65	-366	CA81	-250	-243	-180
C128d1	52	60	-184	CA82	-230	-243	-234
C127 C128	5	-15	-244	CA83	-172	-189	-177
Cl29df	24	25	-215	CA84	-241	-250	-163
Cl30df	87	78	-199	CA85	-75	-250	-164
CI33m	-190	-206	-188	CC186	-146	-176	-139
CI34	-230	-244	-181	CCI87df	59	49	-201
CI35	-230	-244	-166	CCI88	-57	-96	-140
CIC36-1	-169	-230 -183	-135	Cl89bio	-121	-128	-150
CIC37-5	-169	-183	-135	Cli90	-203	-184	-154
CIC38-10	-169	-183	-135	Cli91	-203	-214	-173
CIC39-20	-169	-183	-135	Cli92	-219	-214	-173
CIC40-5	-169	-183	-135	CE93	-227	-219	-158
CIC40-3	-169	-183	-135	CE94	-33	-213 -76	-140
CIC41-18 CIC42-20	-169	-183	-135	CE95	-253	-262	-169
CIC43-5	-169	-183	-135	CE96	-233 -216	-202	-173
CIC44-10	-169	-183	-135	CE97-5	-216	-229	-173
CIC44-10 CIC45-20	-169	-183	-135	CE98-10	-216	-229	-173
CIC46-5	-172	-185	-136	CE99-20	-216	-229	-173
CIC46-3 CIC47-10	-176	-190	-140	CEL101	-249	-223	-167
CIC47-10 CIC48-20	-176	-196	-143	CEL101	-249 -255	-254	-188
CIC49-1	-169	-183	-143	CEL102 CEL102-D	-244	-254	-145
CIC50-5	-169	-183	-135	CEL102-D	-244	-245	-145
CIC50-5 CIC51-10	-169	-103 -183	-135	CEL103	-252 -252	-244 -257	-191
CIC51-10 CIC52-20	-169	-103 -183	-135 -135	CEL104 CEL105	-292 -233	-257 -242	-175
CIC52-20 CIC53-5	-169	-183	-135 -135	CELD106	-233 -222	-242 -240	-175 -163
CIC53-5 CIC54-10	-169	-103 -183	-135 -135	CC107	-222 -239	-240 -253	-171
CIC54-10 CIC55-20	-169	-183 -183	-135 -135	CC107 CC108	-239 -247	-253 -271	-171
CIC55-20 CIC56-5	-169	-183 -245	-135 -162	CI109 dt	-247 -221	-27 I -236	-167

Table 5.51: Résultats des mesures isotopiques du 2H du citral et acétate de géranyle en GC-C-IRMS des échantillons de citron

En rouge : valeurs anormales ; en orange : valeurs suspectes $\,$

Le décalage de 50 ‰ est en effet observé. L'écart est en partie dû à l'appareil de mesure comme expliqué précédemment. Malgré ce décalage, certains échantillons de référence ont des rapports isotopiques toujours supérieurs à ceux présentés par la littérature, cela provient probablement d'une particularité inhérente aux échantillons concernés. Néanmoins ces différentes expériences démontrent le potentiel discriminant de cette analyse face à un ajout de citral et d'acétate de géranyle de synthèse. Un très grand nombre d'échantillons commerciaux montrent des rapports anormalement hauts, pour le citral, et également bas pour l'acétate de géranyle (en rouge), ceci tendant à prouver l'ajout de molécules synthétiques.

Les échantillons de référence CI11-R, CI12-R, CI13-R, CI14-R, ont de faibles valeurs isotopiques de l'acétate de géranyle en comparaison aux autres références. Ceci étant probablement de la variabilité naturelle car l'ajout de cette molécule synthétique abaisse la valeur isotopique.

5.3.2.3 Valeurs isotopiques du N-méthyl anthranilate de méthyle de l'huile essentielle de mandarine

Afin d'évaluer la pertinence de cette analyse, des échantillons d'origine naturelle ou synthétique ont été analysés. Les résultats ont été rapportés dans le tableau 5.52.

Extraits naturels	NMAM δ ² H (‰)
NMAM Nat	-82
Synthétiques	
NMAM NL2	-123
NMAM NI 3	-127
NMAM NI 4	-130
NMAM alfa caesar 1	-110
NMAM alfa caesar 2	-130

Table 5.52: Résultats des mesures isotopiques du ²H du NMAM en GC-Py-IRMS d'échantillons synthétiques ou extraits naturels

Ces résultats montrent que la différence entre molécules synthétiques ou naturelles devrait être suffisante pour déterminer l'ajout de NMAM synthétique dans la mandarine. Par contre le NMAM issu d'un extrait naturel possède une valeur peu différente des échantillons de mandarine étudiés.

Malgré la correction appliquée (cf. chapitre 4.6.2), l'incertitude de mesure est une limite à la discrimination, principalement quand la différence entre les valeurs à discriminer est proche de l'incertitude. Dans le tableau 5.48 est présenté l'écart-type relatif calculé sur une dizaine de mesures non consécutives.

Dans le tableau 5.53 se trouvent les résultats des échantillons de référence, commerciaux ainsi que ceux des échantillons adultérés au laboratoire. A notre connaissance il n'existe pas de publication sur le sujet, ce qui complique l'interprétation des résultats.

		1
	NMAM	
REF	δ ² H (‰)	
Laboratoire	-4966	
MI1r-R	-63	MICo39-:
Ml2j-R	-64	MICto41-
MI3-R	-69	MICto42-
MI4v-R	-61	MICto43
MI5j-R	-63	MICto44-
Ml6j-R	-61	MICto45-
MI7v-R	-58	MICto46
MI8v-R	-69	MICto47-
Ml9j-R	-73	MICto48-
MI10j-R	-62	MIC49-
MI11r-R	-61	MIC50-1
MI12j	-83	MIC51-2
MI13	-75	MICo52
MI14-df	-62	MICo53-
MI15-df	-68	MICo54-
MI16j	-75	MIC55-
MI17j-df	-79	MIC56-1
MI18v	-67	MIC57-2
MI19	-60	MICo58
MI21	-62	MICo59-
Ml22j	-64	MICo60-:
MI23df	-58	MIC61-10+0
MICm24-5	-55	MI62+0.4
MICm25-10	-57	MI62+0.4std
MICm26-20	-56	MIL63-F
MICm27-5	-61	MI64-h
MICm28-10	-61	MIL65
MICm29-20	-61	MA67)
MICm30-5	-69	MA69
MICm31-10	-69	MB70\
MICm32-20	-69	MB71\
MIC33-5	-64	MB72\
MIC34-10	-64	MB73\
MIC35-20	-64	MB74
MICf36-5	-72	MB75
MICo37-5	-64	MCL77
MICo38-10	-64	MFC78
	•	

	NMAM
	δ ² Η (‰)
	` ′
MICo39-20	-64
MICto41-10	-64
MICto42-20	-64
MICto42-26	-61
MICto44-10	-61
MICto45-20	-61
MICto46-5	-69
MICto47-10	-69
MICto48-20	-69
MIC1048-20 MIC49-5	
	-61
MIC50-10	-61
MIC51-20	-61
MICo52-5	-61
MICo53-10	-61
MICo54-20	-61
MIC55-5	-69
MIC56-10	-69
MIC57-20	-69
MICo58-5	-69
MICo59-10	-69
MICo60-20	-69
MIC61-10+0.4std	-81
MI62+0.4std	-78
MI62+0.4stdfeuille	-65
MIL63-hd	-50
Ml64-hd	-67
MIL65	-59
MA67j	-57
MA69	-55
MB70v	
MB71v	-59
MB72v	-60
MB73v	-74
MB74	-55
MB75	-86
MCL77	-52
MFC78	-76

Table 5.53: Résultats des mesures isotopiques du ²H Du NMAM en GC-C-IRMS des échantillons de mandarine

En rouge: teneurs anormales

Selon les résultats obtenus sur nos échantillons adultérés, l'ajout de standard synthétique est détecté. Par contre l'ajout de NMAM naturel dans les mêmes quantités ne modifie pas

significativement le rapport isotopique.

L'échantillon MICf36-5 auquel 5% d'huile essentielle de petitgrain mandarinier ont été ajoutés, présente une valeur isotopique anormalement basse par rapport aux autres échantillons. Cependant l'ajout d'une telle proportion de feuilles augmente par ailleurs la teneur relative en NMAM de façon très significative et nous dispense de l'analyse isotopique.

Des échantillons de référence ont des valeurs anormales, ce qui est inattendu dans la mesure où ces échantillons ne présentaient pas d'autre anomalie. Il est probable qu'un ajout de NMAM ait été effectué pour que l'échantillon soit conforme à la norme. Nous qualifierons tout de même l'ensemble de ces échantillons de référence pour les autres analyses.

5.3.2.4 Discussion sur les résultats de l'analyse isotopique du deutérium

L'analyse isotopique du deutérium est complexe à mettre en œuvre, mais est particulièrement adaptée à la détection d'ajout de molécules naturelles ou synthétiques. Cette analyse est complémentaire de l'analyse chirale qui est parfois limitée pour la détection de ce type d'adultération.

Les résultats obtenus sont globalement plus élevés que ceux rapportés dans la littérature quelque soit la molécule cible. Ceci confirme qu'il s'agit bien d'un décalage dans les valeurs inhérent à l'appareillage et non aux échantillons. Ce décalage ne restreint pas l'application de cette méthode car nos conclusions se recoupent.

Cette analyse permet de détecter avec succès sur des échantillons commerciaux l'ajout de ho wood, acétylé ou non, sur les huiles essentielles de bergamote et lamiacées. Aucun échantillon commercial n'a visiblement été adultéré à l'aide de molécules synthétiques. Ceci confirme que les techniques d'adultération ont évolué.

Le cas du citral et de l'acétate de géranyle est différent, car la fraude la plus fréquente sur les échantillons commerciaux consiste en l'ajout de ces composés d'origine synthétique. En effet, ces molécules n'étant pas chirales, elles échappent au contrôle par chromatographie énantiosélective, méthode simple à mettre en œuvre. Ainsi cette pratique est toujours d'actualité contrairement aux huiles essentielles de lamiacées pour lesquelles l'ajout de molécules synthétique semble abandonnée.

En ce qui concerne le NMAM, une seule molécule est analysée, car elle n'est pas biologiquement liée à d'autres molécules présentent en quantité suffisante. Ceci complique l'interprétation des résultats. De plus l'absence de publication à ce sujet est une limitation supplémentaire. L'analyse de l'azote 15 pourrait être corrélée à ces résultats pour renforcer leur importance [43].

5.3.3 L'analyse isotopique de l'azote 15

Nous ne disposons pas du matériel commercial nécessaire pour effectuer cette analyse en GC-C-IRMS. Un dispositif d'analyse de l'azote 15 (cf. section 2.2.2.3) a été testé sans succès. Nous avons donc utilisé un analyseur élémentaire AE-IRMS qui ne permet pas la séparation préalable des composés. Cette technique est réalisable dans la mesure où l'échantillon possède une seule molécule azotée. Dans le cas contraire le résultat obtenu correspondra à la valeur isotopique moyenne des atomes d'azote 15 présents dans l'ensemble des composés injectés.

En raison d'un diamètre de tube à combustion bien plus important, l'AE-IRMS n'est pas une technique très sensible en comparaison à la GC-C-IRMS. De plus le NMAM ne contient qu'un unique atome d'azote, cette analyse est donc moins sensible que celle du carbone ou du deutérium. Une pré-concentration de la molécule à analyser est nécessaire. La méthode de purification doit être élaborée afin d'éliminer tout risque de fractionnement isotopique.

5.3.3.1 Valeurs isotopiques du N-méthyl anthranilate de méthyle de l'huile essentielle de mandarine

Avec le méthyl-anthranilate, le NMAM sont les seules molécules de l'huile essentielle de mandarine à contenir un atome d'azote. Toutefois, la concentration du méthyl-anthranilate est négligeable en comparaison de celle du NMAM. Le protocole d'extration du NMAM est décrit en section 4.2 et nécessite une grande quantité d'échantillon qui doit être traitée lors du fractionnement sur colonne de silice. Or nous ne disposons pas toujours du volume nécessaire d'huile essentielle. Dans le tableau 5.54 sont présentés les résultats obtenus.

		NMAM
REF		δ ¹⁵ N
	Italie	3,62 - 4,66
	Brésil	6.04
Littérature[43]	Argentine	8,32
	Synthétique	-5,042,71
	Petit grain	3,58 - 4,21
Ml2j-R		2,11
MI3-R		3,35
MI4v-R		2,46
MI5j-R		2,57
MI8v-R		0,75
MI9j-R		-0,09
MI10j-R		4,00
MI11r-R		1,30
MI12j		-0,28
MI13		-5,66
MI14-df		-0,91
MI15-df		1,86
MI16j		2,09
MI17j-df		2,43
MI19		4,41
Ml22j		1,31
MI23-df		0,95
MIL63-hd		6,11
Ml64-hd		4,16
MIL65		5,28
MA68		9,82
MA69		11,78
MB71v		4,83
MB72v		7,38
MB73v		6,59
MB74		5,62
MIC61-10+0.4std		0,25
Ml62+0.4std		0,21
MI62+0.4stdfeuille		4,49
MFC78		9,91

Table 5.54: Résultats des mesures isotopiques du ¹⁵N du NMAM en AE-IRMS des échantillons de mandarine

En rouge : valeurs anormales, en orange : valeurs intermédiaires

Le nombre d'échantillons est trop réduit pour permettre une solide interprétation. Néanmoins à l'aide des résultats rapportés par la littérature nous pouvons avoir une analyse critique sur ceux obtenus.

Les résultats de MI9j-R, MI10j-R ne sont pas surprenants car leurs rapports isotopiques en deutérium sont déjà suspects. La valeur du MI8v-R est quant à elle estimée faible en comparaison aux échantillons authentiques.

Concernant les échantillons d'origine Brésil ou Argentine les données correspondent à la littérature. Le potentiel discriminant de cette analyse est accru pour ces origines en raison de l'importante différence existante avec les valeurs isotopiques des standards synthétiques.

Les valeurs isotopiques obtenues pour les feuilles sont très différentes. L'origine géographique, de climat, de terroir peuvent en être la cause.

Les perspectives de cette analyse semblent intéressantes, mais les résultats nécessitent d'être etoffés.

5.3.4 Discussion sur l'analyse isotopique

Comme décrit précédemment, l'utilisation de l'appareillage GC-C/py-IRMS est complexe mais s'est montré particulièrement performant dans le cas des huiles essentielles de bergamote, citron, mandarine, et lamiacées. En effet les analyses isotopiques du carbone 13 et deutérium des linalol et acétate de linalyle (bergamote, lavande), du citral et acétate de géranyle (citron) et les analyses isotopiques du deutérium et de l'azote 15 du NMAM (mandarine) se sont révélées particulièrement intéressantes.

La possibilité de réaliser la même analyse sur des isotopes différents permet la comparaison des résultats apportant ainsi une information alternative ou complémentaire à l'analyse chirale. De plus cela permet de limiter les risques de confusion entre variabilité naturelle et adultération et éventuellement remarquer une erreur analytique survenue lors de l'une des analyses isotopiques.

De manière générale, l'analyse de différents isotopes stables affine la détection de la fraude.

5.4 Analyse des flavones polymethoxylées (PMF) des citrus

Cette analyse a pour but d'identifier l'ajout d'huile essentielle d'orange dans les huiles de citrus non défurocoumarinées, par étude du profil moléculaire des PMF spécifiques à chaque citrus. Tout autres types d'ajout n'apporte pas de modification dans le profil de PMF de l'échantillon.

Ces molécules ne sont éluées qu'à haute température en chromatographie gazeuse. Cette étude a donc nécessité une colonne haute température résistante à plus de 300 °C. L'étude des PMF en GC-MS sur colonne DBXLB a permis d'élaborer une méthode rapide et simple à mettre en place. La sélection d'ions relatifs et spécifiques à chaque PMF permet de s'affranchir des coélutions existantes malgré la purification préalable (cf. section 4.5.3).

Dans un premier temps les profils de PMF et d'hydroxy-poly-méhoxyflavone (OH-PMF), ont été élaborés pour chaque huile essentielle de citrus. Les résultats obtenus pour les huiles essentielles de bergamote, mandarine et pamplemousse sont comparés aux profils PMF présentés dans la littérature [1, 4-23, 38]. De manière générale les profils PMF sont très variables (cf. section 1.1.1.2.2), ce qui complexifie l'interprétation des résultats. Les résultats de cette étude ne correspondent pas totalement aux profils présentés dans la littérature, en raison de la variabilité naturelle décrite plus haut et aussi d'une méthodologie analytique très différente.

En plus des bases de données du laboratoire, une étude de la fragmentation a été effectuée afin de compléter les premières informations. La figure 5.26 présente les principaux ions fragments créer lors de l'ionisation électronique dans le détecteur MS [19]. Dans le tableau 5.55 ont été rapportés les principaux ions fragments observés lors de l'analyse GC-MS. De là nous avons pu emettre une hypothèse quant à la structure de la PMF inconnue.

FIGURE 5.26: Structure générale des PMF et leurs fragments principaux

PMF							Principa	ux ions fra	ments					
Noms	abbréviations	R1	R2	R3	R4	M^{+}	[M-Me] ⁺	[M-MeO]	[M-CHO] ⁺	$\mathbb{A}^{\textcolor{red}{+}}$	[A-CO]*	[A-Me] ⁺	B1 ⁺	B2 ⁺
Tetramethyl-O-scutellarin	SCU	Н	Н	Н	MeO	342	327	311	313	210	182	195	132	135
4',5,7,8 Tetramethoxyflavone	TETRA	H	MeO	H	H	342	327	311	313	210	182	195	132	135
Tangeritin	TAN	Н	MeO	Н	MeO	372	357	341	343	240	212	225	132	135
Sinensetin	SIN	Н	Н	MeO	MeO	372	357	341	343	210	182	195	162	165
Nobiletin	NOB	Н	MeO	MeO	MeO	402	387	371	373	240	212	225	162	165
Hexamethylquercetagetin	QUER	MeO	Н	MeO	MeO	402	387	371	373	210	182	195	162	165
Hexamethoxyflavone <u>non identifiée</u>	HEX	MeO?	MeO?	Н?	MeO	402	387	371	373	240	212	225	162	135
Heptamethoxyflavone	HEPT	MeO	MeO	MeO	MeO	432	417	401	403	270	242	225	162	165

Table 5.55: Masses des principaux ions fragments des PMF identifiées

a. La différence principale entre SCU et TETRA réside dans l'abondance de l'ion moléculaire. Il est bien plus conséquent pour TETRA. b. La structure de cette hexaméthoxyflavone est probablement celle indiquée grâce aux principaux ions fragments identifiés par MS, mais ceci n'a pas été confirmé par aucune autre analyse ou publication.

Sur le spectre (cf. figure 5.26) de masse sont détaillées les fragmentations de l'hexaméthyl-flavone :

Abundance

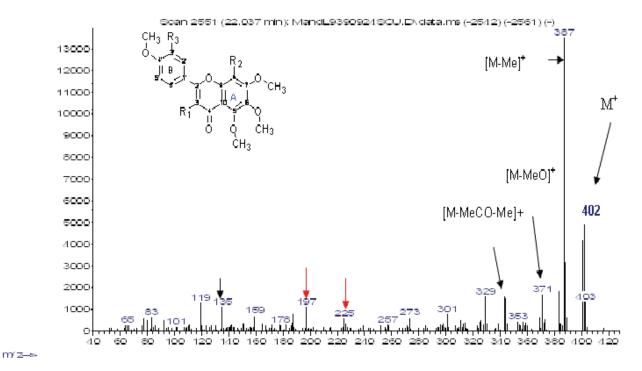


Figure 5.27: Spectre de masse de l'hepta-PMF inconnue

Les fragments 225 et 197 (flèches rouges) correspondent à la fragmentation et au réarrangement du cycle A (cf. figure 5.26). On retrouve ces fragments chez la NOB et TAN qui possèdent un groupement méthoxy en R2, par contre ces fragments ne sont pas produits pour les molécules qui ont un hydrogène en R2. Le fragment 135 correspond à la fragmentation et réarrangement du cycle B (cf. figure 5.26) On retrouve ces fragments dans les spectres de la SCU et la TAN qui ont un hydrogène en R3. De plus, le fragment M⁺, a une abondance relativement élevée ce qui est le cas des molécules avec un groupement méthoxy en R1. De là on peut penser que cette hexa-PMF possède un groupement méthoxy en R1 et R2.

Les répétabilités de l'appareillage et de l'extraction ont été étudiées. Un même échantillon purifié six fois a permis la mesure de l'incertitude d'injection et de purification.

PMF	Incertitudes injection + purification (%)
HEX	6,4
TAN	3,3
SCU	5,3
HEPT	5,8
QUER	6,0
NOB	3,9
SIN	21,1

Table 5.56: Incertitudes d'analyse des PMF

L'incertitude de mesure est relativement élevée, principalement pour la SIN qui a un pic de trop faible intensité avec la méthode SIM d'où une erreur d'intégration importante. La mesure de la teneur relative en SIN sera tout de même prise en compte dans la suite de cette étude, sans négliger son incertitude de mesure élevée.

Les PMF des huiles essentielles d'orange et de citron ont été quantifiées à l'aide de standard de TAN et NOB. La quantification comporte elle aussi une incertitude supplémentaire due à la calibration par étalonnage externe. Elle a été évaluée à l'aide d'une répétition de 6 injections de citron. L'incertitude expérimentale sur la somme TAN + NOB est de 5,5 %. Cette incertitude est élevée cependant le but de cette quantification est d'estimer l'ajout potentiel d'orange, beaucoup plus riche en PMF et non de réellement connaître la teneur en PMF dans le citron.

5.4.1 Profil de l'huile essentielle d'orange

Ci-dessous (cf. figure 5.28) le chromatogramme des PMF de l'orange avant purification et en méthode SCAN.

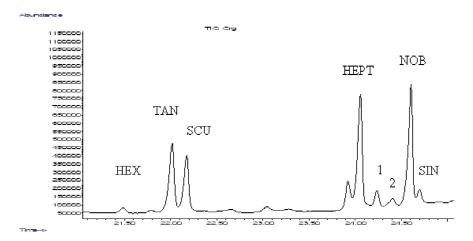


FIGURE 5.28: Profil (SCAN) des PMF d'une huile essentielle d'orange

 $1: {\rm QUER~plus~Hydroxyhexam\'ethoxyflavone}~;~2: {\rm Hydroxypentam\'ethoxyflavone}~+~{\rm Hydroxyt\'etram\'ethoxyflavone}$

Ci-dessous (cf. figure 5.29) le même profil après purification et en mode SIM

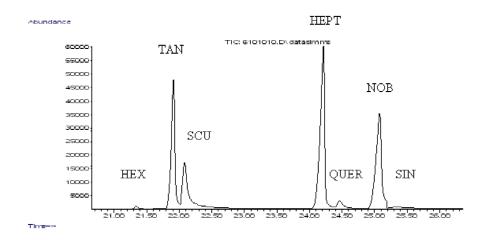


FIGURE 5.29: Profil (SIM) d'une huile essentielle d'orange

En mode SIM, les teneurs relatives diffèrent par rapport à celles obtenues en mode SCAN car les ions sélectionnés ne représentent qu'une fraction de la molécule. L'abondance des ions sélectionnés n'est pas entièrement représentative de l'abondance de la molécule dans l'échantillon. Ainsi, pour exemple, le pic correspondant au composé TAN apparaît sur le chromatogramme plus abondant que ceux des composés SCU, HEPT et NOB alors qu'en réalité leur teneur est

similaire. Une sélection plus importante d'ions aurait permis une meilleure représentation de la teneur effective de la molécule, mais les PMF ne possèdent pas suffisamment d'ions sélectifs.

Le Tableau 5.57 présente les résultats des analyses semi-quantitative et quantitative obtenues sur 18 échantillons d'huile essentielle d'orange de différentes origines géographiques.

	TAN	SCU	HEPT	NOB	QUER	SIN	TAN+ NOB
Profil 1	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(ppm)
Littérature [7]	20-39	11-17	17-25	25-34	0-1	4-17	1250-1700
Littérature [18]	5-41	11-13	19-25	21-29	0-4	2-30	520-1530
Littérature [24]	7-9	15	18-19	13-25	5-6	26-30	1943-5177
Moyenne échantillons	22,5	14,5	28,1	30,5	2,2	2,1	2273
Ecart-type	2,23	1,11	2,37	1,88	0,47	0,49	479
Profil 2							
Littérature [7]	17-18	13-15	33-50	30-18	0-1	3	2999-4000
Littérature[18]	17-28	12-15	30-41	19-26	1-5	5-6	780-1710
Littérature[18]	17-25	12-14	31-37	20-23	4-7	3-5	720-1530
Moyenne échantillons	18,3	10,5	42,4	23,7	3,0	2,0	2125
Ecart-type	2,97	2,82	7,12	4,2	0,70	0,84	1064

Table 5.57: Profil de PMF avec chaque pourcentage relatif des échantillons d'huile essentielle d'orange et les teneurs quantifiées de TAN et NOB.

Nous avons distingué deux groupes de profils au regard des pourcentages de HEPT et NOB. Chaque groupe contient 9 échantillons. Ces profils ont aussi été observés dans la littérature. A partir de ces résultats quantitatifs en TAN et NOB la teneur de chaque molécule a été évaluée.

	TAN	SCU	HEPT	NOB	QUER	SIN	Total
	(ppm)	(ppm)	(ppm)	(ppm)	(ppm)	(ppm)	(ppm)
Littérature [7]	600-1000	200-600	300-700	500-1000	0-30	140-300	3800-6940
Littérature [18]	380-800	160-600	420-2000	250-1100	40-80	50-300	1690-3430
Littérature [18]	160-680	180-620	400-1130	340-1540	0-190	40-1780	1640-5840
Littérature [24]	441-1407	977-2331	1197-2741	1502-3770	409-828	1901-4253	6417-15330
Profil 1							
OB2	1177	765	1589	1976	125	160	5792
OB4	2253	1343	2912	2562	260	290	9620
OB5	1204	706	1570	1535	102	42	5159
OCR6	955	632	1263	1063	100	65	4078
Oi19	1066	715	1256	1272	120	83	4512
Oi21	1376	908	1714	1813	139	85	6035
Oi22	1032	652	1168	1165	92	80	4188
OC25	1007	428	765	1153	38	72	3463
Profil 2							
Littérature [7]	500-700	450-500	1000-2000	900-700	0-40	100	5989-8000
Littérature [15]	480	310	840	520	130	90	2370
Littérature [18]	1570-3570	380-730	210-420	550-1230	340-800	60-230	1570-3570
Littérature [18]	380-800	160-600	420-2000	250-1100	40-80	50-300	1300-4840
OB1	691	514	1206	921	132	105	3569
OEV8	1315	1078	2987	2341	329	295	8345
OEV9	810	484	1478	799	74	95	3740
OI10	790	301	1925	842	115	74	4047
OI12d	782	340	1605	920	112	57	3816
OI13s	79	24	26	66	1	1	196
OM14sdf	1308	880	4054	2235	350	264	9091
Oi16	998	522	1542	758	104	75	3999
Oi17	1011	449	1800	920	96	43	4320

Table 5.58: Teneurs de chaque PMF des échantillons d'huile essentielle d'orange et les teneurs totales

Il apparait que les origines Brésil, Costa-Rica et Corse présentent un profil similaire. Cependant un de nos échantillons d'origine Brésil possède un profil du type 2. Le profil 2 semblerait correspondre aux origines européennes telles qu'Espagne et Italie. Néanmoins une importante quantité d'échantillons serait nécessaire pour valider cette hypothèse par ailleurs non-confirmée dans les différentes publications.

La grande variabilité des profils de PMF, y compris en intragroupe, n'est pas un atout dans la discrimination de la fraude.

5.4.2 Profil de l'huile essentielle de la bergamote

La figure 5.30 représente le chromatogramme des PMF de la bergamote.

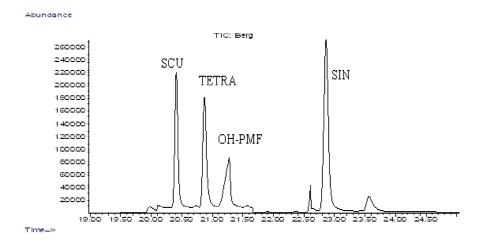


FIGURE 5.30: Profil (SIM) d'une huile essentielle de bergamote

Un grand nombre d'échantillons de bergamote est défurocoumariné afin d'éliminer les composés photosensibilisants de cette huile essentielle. De ce fait, cette analyse n'est pertinente que pour un nombre réduit d'échantillons dont les résultats sont présentés ci-dessous dans le tableau 5.59. Nous n'avons pas procédé à l'étude quantitative dans le cas de la bergamote, car l'étude du profil moléculaire semi-quantitatif est suffisant pour détecter l'ajout d'huile essentielle d'orange dans la bergamote.

	TAN	SCU	TETRA	NOB	QUER	SIN
REF	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
Littérature[23]		+				+
BI1-R	0,0	18,6	7,1	12,2	0,0	62,0
BI2-R	0,0	25,3	14,6	10,3	0,0	49,8
BI3-R	0,0	25,0	13,1	11,1	0,0	50,8
BI4-R	0,0	24,0	15,9	12,6	0,0	47,5
BI6-R	0,0	25,9	16,2	11,9	0,0	46,0
BI8	0,0	3,0	16,6	13,2	0,0	67,3
BI9	0,0	17,3	10,4	11,6	0,0	60,7
BI10	0,0	18,2	8,8	12,7	0,0	60,3
BI13	0,0	20,9	8,3	11,3	0,0	59,5
BI21	0,0	0,0	0,0	9,9	0,0	90,1
BI25	0,0	30,8	13,5	9,6	0,0	46,0
BI26	0,0	16,7	31,4	10,7	0,0	41,2
BI28-df	23,7	10,2	0,0	19,2	0,0	47,0
BI31-df	0,0	13,7	0,0	7,5	34,7	44,2
BIL67	0,0	46,2	9,9	14,2	0,0	29,7
BA71	14,0	21,6	0,0	1,5	9,8	53,2

Table 5.59: Profil des PMF avec leurs teneurs relatives des échantillons d'huile essentielle de bergamote

En rouge: valeur atypique

La composition en PMF obtenue pour l'huile essentielle de bergamote est différente des profils rapportés dans la littérature. Une tétramethoxyflavone ainsi que de la NOB ont été décelées, ce qui n'avait pas été le cas dans les études publiées. L'utilisation d'une méthode SIM en GC-MS, très sensible, peut en être la raison.

Le profil des PMF de la bergamote est très différent de celui de l'orange. Les échantillons de référence ou extraits au laboratoire ne possèdent ni TAN ni HEPT. Bien que les profils soient très variables, l'ajout d'orange est donc décelable par la présence de TAN et HEPT. Les deux échantillons possédant de la TAN et HEPT (éch. BI28-df et BA71), sont très probablement issus d'un mélange huile essentielle de bergamote et orange. Ceci avait déjà été démontré avec l'analyse chirale.

La présence de PMF dans les échantillons BI28-df er BI31-df est inattendue car ces échantillons ont été défurocoumarinés. Une défurocoumarinisation partielle ou un ajout d'huile essentielle d'orange a posteriori peuvent en être les raisons.

L'échantillon BI31-df contient une grande quantité de QUER pour une raison inexpliquée. L'huile essentielle d'orange n'en contient que de faible teneur.

5.4.3 Profil de l'huile essentielle de citron

La figure 5.31 représente des chromatogrammes de citron obtenus à partir d'une analyse effectuée en mode SCAN après extraction des ions 327, 357, 387 et 417.

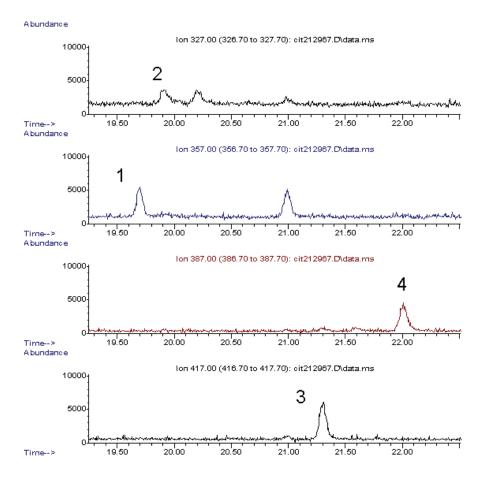


FIGURE 5.31: Chromatogramme des ions 327, 357, 387, 417 des PMF d'une huile essentielle de citron

1. TAN 2. SCU 3. HEPT 4. NOB

Les citrons non défurocoumarinés ont été analysés. Tous les échantillons adultérés n'ont pas été testés, car cette analyse n'est pertinente qu'en cas d'ajout d'huile essentielle d'orange. Le tableau 5.60 contient les résultats de l'étude des PMF dans l'huile essentielle de citron :

	TAN	SCU	HEPT	QUER	NOB	SIN	Total
REF	(ppm)	(ppm)	(ppm)	(ppm)	(ppm)	(ppm)	(ppm)
Littérature citron*	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Littérature [24] Lime Jamaïque	467	665	ND	ND	488	414	2034
Littérature [24] Lime Mexique	736	655	858	504	2415	1034	6202
Authentiques	730	033	636	304	2415	1034	0202
CEL101	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CEL102	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CEL103	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CEL104	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CEL105	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CIL35	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CIL34	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Cl2a-R	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Cl3h-R	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CI4p-R	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Cl5e-R	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Cl6h-R	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CI8-R	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CI9-R	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CI12-R	ND 6.7	ND ND	ND 0,5	ND ND	ND 6,4	ND ND	ND 13,6
CI7bio-R CI11-R	6,7 7,3	ND ND	2,3	ND ND	3,3	ND ND	12,9
CI10-R	3,6	ND ND	5,0	ND ND	3,3	ND ND	11,7
CI13-R	4,7	1,2	3,0	NQ	3,7	NQ NQ	12,6
Cl14-R	3,0	1,0	2,8	NQ NQ	5,5	NQ NQ	12,3
Commerciaux	3,0	',0	2,0	14.00	3,3	140	12,3
Cl26df	2,1	ND	ND	ND	1,1	ND	3,2
Cl29df	3,1	ND	1,4	ND	1,2	ND	5,7
CI19	3,5	ND	1,5	ND	2,1	ND	7,0
CC107	1,1	ND	ND	ND	6,1	ND	7,2
Cli92	5,2	ND	ND	ND	2,3	ND	7,4
CC108	6,4	ND	0,9	ND	2,1	ND	9,4
Cl33m	8,4	ND	2,6	ND	4,4	ND	15,4
CA85	5,3	2,5	3,5	0,4	3,8	0,8	16,4
CA83	9,2	2,7	4,8	0,3	6,7	1,0	24,7
CI27	5,7	4,0	6,0	0,9	6,8	1,6	24,9
Cl25	7,2	5,9	8,3	1,3	9,7	1,8	34,2
CI23	33	1,1	2,5	ND 4.4	11,2	0,4	48,2
CA81	18,4	7,9	20,5	1,1	16,6	1,2	65,6
CI28	38,8	12,2	23	1,8	27,5	2,8	106,1
Adultérés CIC36-1	10	6,9	11,3	1.1	13	0,8	42.1
CIC35-1	57,8	39	71	1,1 6,5	75,2	4,7	43,1 254,1
CIC37-5 CIC38-10	112,4	78	135	12,6	144,9	8,3	491,2
CIC39-20	191,1	14ND	251	23,1	283,5	16,6	905,3
CIC56-5	56,9	35,8	67,8	6,0	66,8	4,2	237,3
CIC57-10	110,2	71,5	130,6	12	130,4	8,3	462,9
CIC58-20	215,8	144,7	254,2	24,3	258,2	16,9	914,1
Théoriques	_ : - !-					1-	
+5% théorique	18,0	8,0	21,0	3,0	12,5	2,5	65,0
+10% théorique	36,0	16,0	42,0	6,0	25,0	5,0	130,0
+20% théorique	72,0	32,0	84,0	12,0	50,0	10,0	260,0

 ${
m ND}$ non détecté; ${
m NQ}$ non quantifiable; En rouge : valeur anormalement haute; en bleu : présence de PMF inattendues pour des échantillons défurocoumarinés.

Table 5.60: Teneurs en PMF des échantillons d'huile essentielle de citron et les teneurs quantifiées de TAN et NOB

^{*[6, 10, 12, 14-17, 20-24]}

Tout d'abord, après observation des résultats pour les échantillons de référence et les huiles essentielles extraites au laboratoire, il apparaît que pour la plupart aucune PMF n'a été détectée. Ce qui correspond aux résultats observés dans la littérature. Cependant certains échantillons authentiques possèdent de faibles teneurs en PMF, avec un profil moléculaire parfois semblable à l'orange. C'est pourquoi la quantification est indispensable à cette étude des PMF dans le citron.

En ce qui concerne les échantillons commerciaux plusieurs profils de PMF sont identifiés. Certains sont similaires à ceux de l'huile essentielle d'orange. Par contre aucun échantillon commercial ne semble avoir un profil similaire à celui de l'huile essentielle de lime qui contient des teneurs importantes en sinensetin d'après l'étude menée par A.O. Wheatley et al. [24]. Cette analyse ne nous a pas permis d'étayer l'hypothèse de l'adultération avec de l'huile essentielle de lime.

L'étude de l'adultération avec l'huile essentielle d'orange présente des abondances de PMF bien plus importantes pour les échantillons adultérés au laboratoire que celles de nos échantillons commerciaux. Parmi les échantillons commerciaux, l'échantillon CI28, pourtant le plus riche en PMF ne serait adultéré qu'avec 2% d'huile essentielle d'orange contenant 4500 ppm de PMF, ce qui paraît être une fraude peu rentable. Il est vrai que l'huile essentielle d'orange adultérante est relativement riche en PMF. Il est probable qu'une huile essentielle d'orange ajoutée soit relativement pauvre en PMF afin de rendre la fraude rentable mais discrète.

Les échantillons d'orange dont nous disposons sont à l'exception de l'échantillon OI13s, très riches en PMF. Afin de pouvoir élaborer des adultérations théoriques, permettant une interprétation approfondie des résultats, nous avons démontré la linéarité de l'ajout d'huile essentielle d'orange sur la teneur en PMF. Ceci a été effectué sur les teneurs en TAN et NOB mesurées.

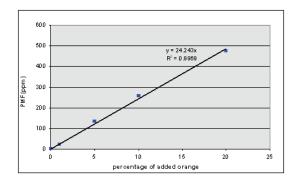


FIGURE 5.32: Teneurs en ppm des PMF mesurées (TAN + NOB) en relation avec le pourcentage d'ajout d'huile essentielle d'orange

Sur ce graphique l'ordonnée à l'origine est de 0 car l'échantillon de citron de départ ne possède pas de PMF.

Les teneurs obtenues pour les coupes théoriques sont dans la gamme des échantillons commerciaux CI25, CI23, CA81, CI28, ce qui étaye la thèse de l'adultération avec une huile essentielle d'orange relativement pauvre en PMF. Les échantillons cités sont très probablement issus d'un mélange d'huiles essentielles de citron et d'orange.

Ainsi qu'il a été remarqué préalablement une huile essentielle de citron peut contenir de faible teneur en PMF, ce qui complique l'interprétation des teneurs en PMF inférieures à 17 ppm retrouvées dans les échantillons commerciaux.

L'échantillon CA85 contient 16.5 ppm de PMF et le profil moléculaire correspond à celui d'une orange. Il se pourrait qu'il soit lui aussi la résultante d'un ajout d'huile essentielle d'orange dans celle de citron. Cependant d'autres analyses devront le confirmer.

Pour les échantillons restants, les teneurs sont très faibles et les profils moléculaires diffèrent de ceux de l'orange. Il est probable que la présence de PMF soit naturelle dans ces cas là. Par contre les deux échantillons en bleu (éch. CI26df, CI29df) dans le tableau 5.60 bien que défurocoumarinés, sont légèrement colorés et ont été analysés. Il n'est pas possible de dire si les PMF détectées proviennent d'un ajout d'huile essentielle d'orange postérieur à la défurocoumarinisation ou si ce procédé a été incomplet.

En parallèle la détection éventuelle d'auraptène ou de molécules augmentant l'absorbance UV (cf. section 3.2.1.2) a été étudiée. Aucune de ces molécules n'a été détectée dans la fraction lourdes des échantillons d'essence de citron.

5.4.4 Profil de l'huile essentielle de mandarine



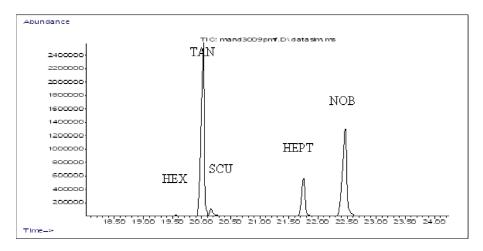


FIGURE 5.33: Profil (SIM) d'une huile essentielle de mandarine

La pertinence de l'analyse a été évaluée sur l'huile essentielle de mandarine. Les résultats des échantillons non défurocoumarinés sont présents ci-dessous.

Le tableau 5.61 synthétise les résultats obtenus	Le	tableau	5.61	synthétise	les	résultats	obtenus	:
--	----	---------	------	------------	-----	-----------	---------	---

	HEX	TAN	SCU	HEPT	QUER	ИОВ	SIN	PMF/fraction volatile
REF	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
	ND	57,0-73,9	0,1-0,2	8,0-14,1	ND	17,9-28,5	0,0-0,1	
Littérature[18]	ND	60 <i>,</i> 5-73,9	0,1-0,2	8,0-12,3	ND	18,0-26,9	0,1-0,3	
	ND	33,7-70,2	0,0-0,0	7,4-32,5	ND	22,2-24,1	0,3-3,6	
MI1r-R	0,3	82,0	0,0	5,3	0,0	12,5	0,0	0,17
MI2j-R	0,4	66,9	0,4	7,7	0,0	24,6	0,0	0,22
MI3-R	0,1	66,8	1,0	4,7	0,0	27,4	0,06	0,23
MI4v-R	0,2	50,3	2,1	12,4	0,0	35.0	0,0	0,1
MI6j-R	0,4	23,2	13,9	30,2	2,4	28.0	2.0	0,17
MI7v-R	0,6	38,2	10,8	34,1	2,2	14,1	0,0	
MI8v-R	0,5	74,5	1,1	9,4	0,0	14,4	0,1	0,34
MI9j-R	2,3	72,3	1,0	11,0	0,0	13,2	0,3	0,75
MI10j-R	0,7	68,5	0,3	12,7	0,0	17,9	0,0	0,21
MIL65	0,2	53,4	2,1	15,4	0,0	28,4	0,4	0,25
MI11j	0,5	74,5	1,1	9,4	0,0	14,4	0,1	
MI12	0,3	85,1	0,0	6,3	0,0	8,3	0,0	
MI15j	0,5	79.0	0,3	9,0	0,0	11,3	0,0	0,19
MI16r	0,4	66,3	0,5	8,4	0,0	24,3	0,0	0,26
MI20	0,4	85,9	0,0	7,6	0,0	6,1	0,0	
MI22j	0,3	74,8	0,3	7,5	0,0	17,1	0,0	
MA67j	0,7	72,9	0,0	13.0	0,0	13,5	0,0	
MA68	1,9	45,2	4,7	35,4	0,0	12,7	0,0	
MA69	1,1	65,3	0,6	22,7	0,0	10,4	0,0	
MB70v	0,4	83,3	0,0	8,2	0,0	8,2	0,0	0,35
MB71v	1,1	57,7	2,4	16,0	0,0	22,8	0,0	
MB73v	0,1	55,5	1,6	7,2	0,0	35,3	0,3	
MB75	0,1	55,3	2,6	5,4	0,0	36,4	0,3	
MCL77	0,0	53,7	0,0	0,0	0,0	46,3	0,0	
MIC33-5	0,2	65,7	1,0	10,4	0,0	22,8	0,1	
MIC34-10	0,1	62,7	1,5	11,9	0,1	23,6	0,1	
MIC35-20	0,1	60,2	2,0	12,9	0,2	24,4	0,2	

Table 5.61: Teneurs en PMF des échantillons d'huile essentielle mandarine et les teneurs quantifiées de Tan et Nob

En rouge : valeur anormale; en bleu : profil atypique

La mandarine est une huile essentielle traditionnellement utilisée sans purification préalable, car elle ne contient pas de furocoumarines photosensibilisantes.

Deux échantillons (éch. MI6j-R, MI7v-R, en bleu) présentent un profil similaire à celui d'une orange, ce qui ne correspond pas aux résultats obtenus pour les échantillons adultérés au laboratoire. Ces échantillons sont par ailleurs conformes aux résultats de référence et ont même été désignés comme des huiles essentielles de référence. Ce résultat est donc inexpliqué.

L'huile essentielle de mandarine est plus riche en PMF que celle d'orange, ce qui explique que l'addition d'huile essentielle d'orange dans la mandarine ne fasse pas varier significativement le profil moléculaire des PMF. De plus en cas d'ajout de terpènes d'orange ou d'huile distillée, le profil des PMF reste inchangé.

Seul l'échantillon MA68 semble présenter une teneur en SCU représentative de l'addition d'huile essentielle d'orange. Par ailleurs, l'étude statistique des rapports entre PMF dans le but de discriminer les mélanges d'huiles essentielles de mandarine et d'orange, ne s'est pas avérée concluante.

5.4.5 Profil de l'huile essentielle de pamplemousse

La figure 5.34 présente le chromatogramme relatif à l'analyse du pamplemousse

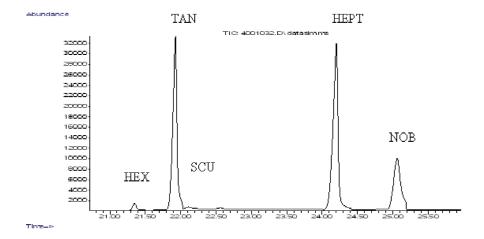


Figure 5.34: Profil (SIM) d'une huile essentielle de pamplemousse

Dans le tableau 5.62 sont rapportés les résultats de l'étude

	HEX	TAN	SCU	HEPT	QUER	NOB	SIN	PMF/fraction volatile
REF	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
Littérature ^[24]	ND	44,4	1,3	24,2	ND	30,1	ND	
Littérature[17]	ND	34,1	6,8	17,1	ND	27,3	14,8	
PA1	1,5	36,7	1,5	42,3	0,10	18,6	0,05	0,07
PA2	1,1	36,0	0,5	44,6	0,16	18,1	0,40	
PA3	2,0	37,7	0,3	45,7	0,08	14,3	ND	0,05
PA4	2,1	35,5	1,5	43,6	ND	17,5	0,12	0,11
PC5	2,0	33,9	0,8	46,6	0,08	16,5	0,07	90,0
PF6	1,3	38,3	1,1	38,7	0,13	19,9	0,60	0,13
PF7	1,3	35,6	1,2	42,0	0,06	20,1	ND	0,05
PUS8	1,2	35,7	1,3	44,2	ND	17,8	0,20	0,09
PUS11	0,5	25,3	0,2	56,7	0,01	17,4	0,03	90,0
PI14	1,5	33,3	1,0	42,6	0,17	21,8	ND	0,24
PI15	1,7	40,5	0,2	45,8	ND	11,9	0,02	0,09
PAS16	1,3	46,0	1,1	34,7	0,06	16,9	0,30	
PAS17	2,2	10,8	3,8	54,2	ND	28,8	ND	0,09
Pi18	1,4	32,3	0,4	44,9	ND	21,0	ND	0,11
Pi19	1,1	26,4	1,6	46,6	0,29	23,7	0,26	0,11
Pi21	0,7	31,4	0,8	45,2	0,20	21,6	0,60	
Pi22	2,0	33,9	0,8	46,6	0,08	16,5	0,07	
Pi23bio	0,0	39,2	1,6	20,1	ND	39,1	ND	
PUSL30	0,1	14,5	1,7	15,5	0,19	66,9	1,36	
PUSL31	0,5	19,5	13,6	27,7	4,10	32,4	2,20	
PC32	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
PiC24-5	1,4	31,6	1,2	49,4	0,74	15,6	ND	
PiC25-10	0,6	25,5	3,3	42,2	1,02	17,4	ND	
PiC26-20	0,8	23,5	5,7	39,2	2,26	21,8	ND	

Table 5.62: Teneurs en PMF des échantillons d'huile essentielle de pamplemousse et les teneurs quantifiées de TAN et NOB

En rouge : valeur anormale

Les profils des échantillons commerciaux semblent différents de ceux des échantillons d'orange par des quantités notablement supérieures en HEX et inférieures en SCU. De plus on remarque que les échantillons adultérés présentent une modification significative de leur profil comparé à celui du pamplemousse d'origine.

Néanmoins l'échantillon PUSL31, extrait au laboratoire, possède un profil identique à celui d'une orange. Cette observation corrobore les conclusions de l'analyse isotopique, où ce même échantillon avait un profil identique à l'orange.

5.4.6 Discussion

Chaque citrus possède un profil moléculaire de PMF spécifique. La bergamote et le citron en possèdent peu ou pas du tout. L'orange, la mandarine et le pamplemousse quant à eux contiennent des teneurs similaires.

Nos résultats ne correspondent pas toujours totalement à ceux rapporter par la littérature, mais restent néanmoins comparables. Ceci peut s'expliquer par le fait que nous utilisons une méthodologie différente. En effet, nous ne détectons qu'une sélection d'ions caractéristiques et non les molécules entières comme expliqué au chapitre 4.5.3.

De manière générale, les profils de PMF, ainsi que les teneurs en ppm sont très variables pour un citrus donné. Il n'a pas été possible de faire de lien entre la maturité du fruit, l'origine géographique (sauf peut-être pour l'orange) et le profil obtenu. L'influence de la technique d'extraction, ou du cultivar auquel appartient le fruit est probablement responsable de ces variations. Dans certains cas, pour la bergamote et le citron la pertinence de cette analyse a été prouvée. Malgré l'orientation de l'industrie vers des huiles essentielles purifiées, cette étude nous a permis une meilleure compréhension et connaissance de nos échantillons, aidant ainsi à l'interprétation de certains résultats obtenus via d'autres techniques analytiques. L'analyse pourra être mise en œuvre pour les huiles essentielles de bergamote et citron non défurocoumarinées. Cependant les échantillons de bergamote discriminés ici comme étant adultérés, l'étaient déjà par l'analyse chirale.

En ce qui concerne le pamplemousse et la mandarine, l'analyse semblait pertinente au premier abord au regard des profils PMF. Cependant la variabilité des profils évoquée plus haut a rendu impossible la détection des cas d'adultération.

Deux échantillons de mandarine (éch. MI6j-R, MI7v-R tableau 5.61) de référence ont des profils de PMF équivalent à l'orange et ceci est probablement dû à des fruits d'autres origines, à un cultivar ou un hybride différent. La possibilité qu'il s'agisse de tangerine ou de tangor a été étudiée. D'après W.C. Ooghe et C.M. Detavernier [9] et A.O wheatley et al. [24] le profil de PMF de la tangerine est semblable à celui de la mandarine. Au cour de la première étude, de nombreux hybrides de tangor ont été analysés dont certains présentent un profil de PMF semblable à ceux de l'orange et donc aux deux échantillons MI6j-R, MI7v-R. Cependant un tangor venu de l'INRA de Corse présentent des excès énantiomériqes des terpènes identiques à l'orange, ce qui n'est pas le cas de MI6j-R, MI7v-R. En effet ces huiles essentielles sont conformes pour tout autre type d'analyse. Pour finir d'après E.M. Gaydou, J.P Bianchini, et R.P Randriamiharisoa ces profils de PMF ne correspondent pas non plus à celui d'un mélange de l'huile essentielle d'origine avec une tangerine, une clémentine ou une king mandarine [7]. Ces profils de PMF atypiques pourraient provenir de variétés d'hybrides non envisagées ici.

Le pamplemousse semble, ainsi que nous l'avions remarqué lors de l'analyse isotopique,

posséder un cultivar affichant des résultats très similaires à ceux de l'huile essentielle d'orange. Seule la présence de nootkatone le différencie réellement d'une orange. En raison de la complexité d'interprétation des résultats et l'impossibilité à prouver l'ajout d'huile essentielle d'orange, l'analyse des PMF n'est pas maintenue pour la détection de l'adultération des huiles essentielles de pamplemousse et mandarine.

Il est possible ainsi que l'hypothèse qui avait déjà été émise lors de l'analyse chirale de la mandarine (citronnellal) que l'ajout de terpènes d'orange soit privilégié, auquel cas cette analyse n'est pas adaptée.

En conclusion seule l'analyse des PMF des huiles essentielles de citron (voire de bergamote) est pertinente pour notre étude.

5.5 Analyse thermogravimétrique

Une huile essentielle, particulièrement celle non distillée, possède en plus de la fraction volatile, une fraction lourde. Elle contient les molécules non volatiles, non analysables en GC à 300°C. Dans le but d'évaluer la pertinence de la mesure de la fraction lourde pour notre étude, un échantillonage de chaque type d'huiles essentielles a été analysé par ATG.

5.5.1 Les huiles essentielles de citrus

5.5.1.1 Huile essentielle d'orange

Les résultats d'analyses ATG des huiles essentielles d'orange sont présentés dans le tableau 5.63 :

	Résidu
REF	(%)
OB1	3,27
OB2	2,41
OB3	2,32
OB4	1,20
OCR6	0,43
OCR7	3,21
OEV8	3,14
Ol10	3,40
Ol11s-df	2,55

	Résidu
	(%)
Ol12d	2,63
OM14s-df	2,16
Oi15-df	0,19
Oi16	2,86
Oi17	2,98
Oi18bio-df	0,51
Oi19	2,20
Oi21	2,25
Oi23dt	2,51

Table 5.63: Résidus des huiles essentielles d'orange

.

Le taux de résidus des huiles essentielles d'orange non défurocoumarinées se situe entre 2 - 3 %. Les échantillons OI11s-df et OM14s-df ont des résidus supérieurs à ceux attendus pour des huiles défurocoumarinées.

5.5.1.2 Huile essentielle de bergamote

Les résultats d'analyses ATG des huiles essentielles de bergamote ont été regroupés dans le tableau 5.64:

	Résidu
REF	(%)
BI1-R	4,26
BI2-R	3,50
BI3-R	3,94
BI9	4,90
BI10	5,30
BI11	8,34
Bl12-bio	0,09
BI13	4,28
Bl14-df	5,93
BI15	9,74
BI17	2,29
BI18	2,37
BI19	2,32
Bl20-df	0,35

	Résidu
	(%)
Bl21	5,10
Bl22-df	0,22
Bl23	0,27
Bl25	3,43
BI27	0,36
Bl28-df	0,24
Bl29	0,09
BI30	0,16
Bl31-df	0,35
Bl32-df	1,02
Bl66dt	0,13
BCI70	0,19
BA71	3,03

Table 5.64: Résidus des huiles essentielles de bergamote

En rouge : résidu anormalement haut

A l'exeption de BI14-df les huiles essentielles défurocoumarinées présentent de manière attendue une teneur en résidus moins importante.

Le résidu des échantillons de référence se situe aux environs de 4% ce qui est un peu plus élevé que pour l'huile essentielle d'orange. Ceci est dû à la forte présence en bergaptène (furocoumarine) dans l'essence de bergamote.

L'échantillon BI15 a un résidu anormalement élevé.

5.5.1.3 Huile essentielle de citron

Le tableau 5.65 présente les résultats d'analyse ATG pour l'huile essentielle de citron :

	Résidu
REF	(%)
Cl1df-R	0,28
Cl2a-R	1,32
Cl3h-R	1,41
Cl4p-R	1,41 2,11 2,57
Cl5e-R	2,57
Cl6h-R	1,03 1,72 0,21
Cl7bio-R	1,72
CI15-df	0,21
CI16	2,28 0,23
Cl17-df	0,23
CI18-df	1,02
CI19	2,12
Cl20-df	0,77
Cl21-df	1,14
Cl23	0,93
Cl24	4,06
Cl25	2,50
Cl26-df	0,42
Cl27	2,41
Cl28	0,72

	Résidu
	(%)
Cl29-df	0,61
Cl30-df	0,98
Cl31	1.73
Cl32	2 <mark>7,1</mark> 2,70
Cl33m	2,70
CA81	1,33
CA82-df	0,54
CA83	1,51
CA85	1,49
CCI86	2,84
CCI87-df	0,45
Cl89bio-df	0,07
Cli90	2,03
Cli91	1,67
Cli92	4,71
CE93	3,47
CE94	2,18
CEL105	8,56
Cl109dt	1,07
Cl110dt	0,82

Table 5.65: Résidus des huiles essentielles de citron

En rouge : résidu anormalement haut

En vert : résidu très important de l'huile essentielle de citron extraite au laboratoire

Les échantillons de référence ont un résidu proche de 2 %, ce qui est légèrement plus faible que pour les essences d'orange. La totalité des échantillons défuroucoumarinés présente de faibles résidus.

L'échantillon extrait au laboratoire CEL105 (en vert) et surtout l'échantillon commercial CI32 (en rouge) ont des fractions lourdes anormalement élevées.

5.5.1.4 Huile essentielle de mandarine

Les résultats d'analyse ATG des huiles essentielles de mandarine sont synthétisés dans le tableau 5.66 :

	Résidu
REF	(%)
MI1r-R	2,00
Ml2j-R	2,25
MI3-R	2,62
MI4v-R	2,01
MI5j-R	1,89
Ml6j-R	3,70
MI7v-R	3,73
Ml10j-R	0,94
MI12	1,16
MI14-df	0,45
MI15j	1,89
MI16r	1,93

	Résidu
	(%)
MI17j-df	0,08
MI18v-df	0,16
MI20	5,36
Ml21-df	0,25
Ml22j	2,25
Ml23-df	0,32
Ml64-hd	0,15
MA66-df	0,31
MA67j	3,22
MB70v	2,26
MB73v	2,80
MB75	3,05

Table 5.66: Résidus des huiles essentielles de mandarine

En rouge : résidu anormalement haut

Les résidus des huiles essentielles de référence varient entre 1,9 et 4 %. La variabilité de ces teneurs est plus importante que pour les essences précédentes. Les différentes maturités, et les nombreux cultivars utilisés pourraient être responsables de cela (mandarine verte, jaune ou rouge).

De manière attendue les huiles défurocoumarinées ont de faibles fractions lourdes.

5.5.1.5 Huile essentielle de pamplemousse

Le tableau 5.67 présente les résultats d'analyse ATG pour l'huile essentielle de pamplemousse :

REF	Résidu (%)
PA1	0,27
PA2	7,72
PA3	6,08
PC5	4,95
PF6	4,10
PF7	4,09
PUS8	5,99
PUS9-df	1,64
PUS10	37,74
PUS11	4,20
PP13df	0,002

REF	Résidu (%)
PP12-df	27,49
PI14	8,15
PI15	4,46
PAS16	5,85
Pi18	8,52
Pi19	4,92
Pi21	4,67
Pi22	6,19
Pi23bio	5,66
PUSL30	26,06

Table 5.67: Résidus des huiles essentielles de pamplemousse

En rouge : résidu anormalement haut

En vert : résidu très important de l'huile essentielle de citron extraite au laboratoire

L'ensemble des résidus est extrêmement variable, mais semble en moyenne plus élevé que celui des huile essentielles d'orange. Ceci s'expliquant probablement par la présence de fortes teneurs en auraptène (furocoumarine).

Les résidus des échantillons commerciaux PUS10, PP12-df (en rouge), ainsi que celui du PUSL30, échantillon extrait au laboratoire (vert), semblent quant à eux anormalement élevés.

5.5.2 Les huiles essentielles de lamiacées

5.5.2.1 Huile essentielle de lavande

Les résultats d'analyse ATG des huiles essentielles de lavande ont été regroupés dans le tableau 5.68 :

REF	Résidu (%)
LF1-R	0,64
LF4-R	1,67
LF5-R	1,47
LF8	1,58
LF10	3,39
LF12	1,39
LF14	1,41
LF17	1,80

Table 5.68: Résidus des huiles essentielles de lavande

Les résidus des huiles essentielles de lavandes analysées semblent assez homogènes autour de 1.5 %. Seul LF10 a une teneur en molécules lourdes anormalement élevée.

Ces teneurs sont plus faibles que pour les citrus, car il s'agit d'huile essentielle distillée, procédé entrainant principlement les molécules volatiles.

5.5.2.2 Huile essentielle de lavandin super

Le tableau 5.69 présente les résultats d'analyse ATG pour l'huile essentielle de lavandin super :

REF	Résidu (%)
Laboratoire	0,8-1,0
LSF1	0,72
LSF2	1,49
LSF3	0,92
LSF4	0,81
LSF9	0,50
LSF12	0,85
LSF13	0,98
LSF14	0,91
LSF15	1,09
LSF16	0,96
LSF18	1,06
LSF21	1,40
LSF27	1,00

Table 5.69: Résidus des huiles essentielles de lavandin super

Les résultats obtenus pour les huiles essentielles de lavandin super sont en accord avec ceux obtenus précédemment au laboratoire. Le résidus de l'huile essentielle de lavandin super semble en moyenne plus faible que celui de la lavande.

5.5.3 Discussion

Le procédé de défurocoumarinisation élimine la majorité des molécules lourdes. Les échantillons défurocoumarinés doivent donc posséder un résidu inférieur. Si ce n'est pas le cas (éch. BI14-df, OI11s-df, OM14s-df) une forte évaporation de la fraction volatile peut expliquer cela. De la même manière, certains échantillons présentent des taux très elevés de molécules lourdes. Ces échantillons correspondent à des huiles essentielles datant de 2009, donc l'évaporation des volatils malgré la conservation au réfrigérateur est très probablement à l'orgine de l'augmentation du pourcentage résiduel lors de l'analyse ATG.

Les échantillons extraits au laboratoire (éch. PUSL30, CEL105) ont de très forte teneurs en molécules lourdes, car le procédé d'extraction a entrainé la solvatation de cire.

Les huiles essentielles de citrus ont des teneurs caractérisques assez proches les unes des autres. Les huiles essentielles de bergamote et pamplemousse semblent avoir une fraction lourde plus riche que les autres, alors que celles de citron apparaissent comme les plus pauvres. Il en est de même pour les huiles essentielles de lamiacées, où l'on observe un résidu plus faible pour le lavandin super. Cependant la différence entre les résidus reste faible. De plus la variabilité naturelle et celle induite par les conditions de conservation demeurent importante. Cette analyse ne parait pas pertinente pour notre étude.

5.6 Spectroscopie proche infrarouge de réflexion

Cette analyse permet d'avoir une vue d'ensemble de l'échantillon (fraction volatile et non volatile) et de discriminer statistiquement les spectres des huiles essentielles authentiques et celles adultérées. Idéalement cette technique pourrait, à l'avenir, remplacer l'analyse du profil moléculaire en analyse de contrôle de routine dans l'industrie. En effet, la spectroscopie proche infrarouge de réflexion présente l'avantage d'un appareillage miniaturisé, facile d'emploi et le temps d'analyse est inférieur à 1 minute.

Néanmoins, cette analyse est très sensible aux variations de surface ou de température de l'échantillon. Ceci nécessite un grand nombre de répétitions d'analyse afin que la distinction entre deux huiles essentielles s'établisse réellement sur des facteurs intrinsèques aux échantillons et non à des paramètres extérieurs variables lors des prises de mesure.

5.6.1 Analyses des citrus

L'étude de l'adultération des citrus n'est pas aisée par proche infrarouge car les spectres de chaque huile essentielle sont très proches. La figure 5.35 représente les spectres normalisés des citrus :

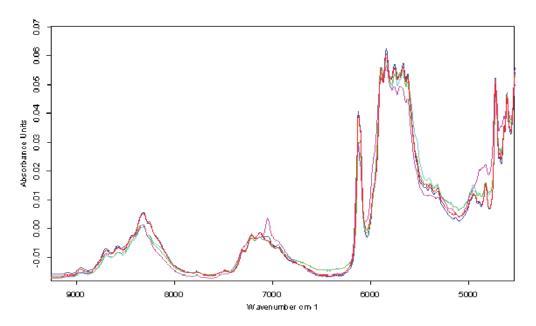


Figure 5.35: Spectres PIR des huiles essentielles de citrus

En rose : spectre HE de bergamote, en rouge : spectre He de pamplemousse, en vert : spectre HE de citron, en turquoise : spectre HE de mandarine en bleu spectre HE d'orange

Il est possible de statistiquement différencier les spectres des essences de citron, de bergamote, de mandarine et d'orange en utilisant les dérivées secondes et la normalisation vectorielle des spectres. Voici la carte factorielle obtenue, permettant de bien différencier les huiles essentielles de citrus à l'exception du pamplemousse :

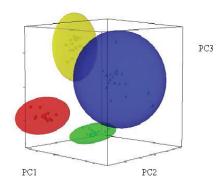


FIGURE 5.36: Carte factorielle des citrus (sans HE de pamplemousse). En bleu la bergamote, en vert l'orange, en rouge la mandarine et en jaune le citron

Les ellipsoïdes sont distinctes et ne se croisent pas. L'ellipsoïde bleue des bergamotes est plus importante ce qui démontre une plus grande variabilité de composition de cette huile. Lors de nos essais, la présence de nombreux échantillons commerciaux probablement adultérés explique cette variabilité. L'essence de bergamote est celle dont la composition moléculaire est le plus affectée par l'ajout d'huile essentielle d'orange. C'est pourquoi la concernant, cette analyse est certainement plus adaptée à la détection de la fraude.

Par contre afin que la fraude reste discrète des composés d'origine naturelle ou synthétique peuvent être ajoutés, comme le linalol ou l'acétate de linalyle dans le cas de la bergamote, le citral pour celui du citron ou encore le NMAM pour la mandarine. Ces modifications apportées à l'huile essentielles ne sont pas visibles sur un spectre NIR et vont contribuer à rendre l'échantillon semblable aux échantillons de référence.

Concernant le pamplemousse et l'orange, les bandes d'absorption du limonène couvre la majorité du spectre. Des essais de soustraction de spectres du limonène (spectre pamplemousse - 0.92*spectre limonène) afin de faire apparaître des différences éventuellement masquées par le limonène, n'ont pas apporté d'éléments discriminants. De plus, du fait de la sensibilité de la technique l'incertitude de mesure est significativement augmentée.

5.6.2 Analyses des lamiacées

Cette étude a été initiée par un stagiaire de licence dans le laboratoire de technique vibrationnelle au SCA. Les analyses ont été effectuées sur des lavandes, lavandins (super, grosso, abrial).

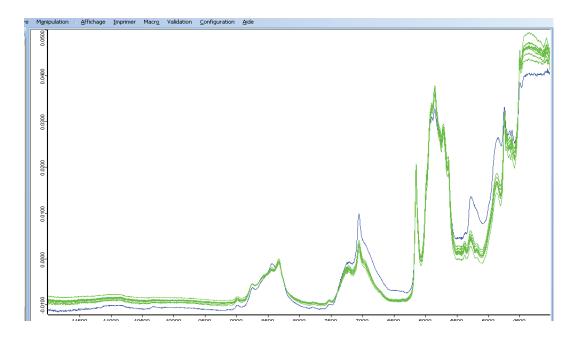


FIGURE 5.37: Spectres infrarouges de lavande (bleu) et lavandin super (vert)

Il n'y a pas de différences fondamentales entre les spectres, il s'agit principalement de différences d'intensité. Ces différences sont exploitées pour l'analyse statistique afin de distinguer graphiquement les substances étudiées.

Ainsi, des échantillons de lavande coupées par du lavandin super à 10 % 20 % et 50 % ont été analysés. Grâce à l'analyse statistique ACP et l'analyse de classification automatique hiérarchisée, on obtient le graphe 3D et les différents groupes suivants :

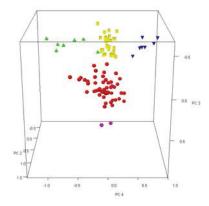


FIGURE 5.38: ACP sur les lavandes (jaune), lavandins (rouge) et coupes (vert 10% de lavandin dans la lavande, bleu 20%, violet 50%)

Cependant le modèle est constitué d'un nombre réduit d'échantillons. La grande quantité de points provient de la répétition des mesures pour s'affranchir au mieux de l'incertitude de mesure. La représentation de chaque mesure à été préférée à la représentation de la moyenne des mesures d'un même échantillon afin que la variabilité de la mesure puisse être appréciée. Dans le but de valider ce modèle, un grand nombre d'échantillons supplémentaires sont nécessaires.

5.6.3 Analyses des lavandes

Nous avons donc poursuivi ce travail, avec l'échantillonnage de l'étude en nous concentrant sur la lavande et les mélanges lavande et lavandin super. Nous avons cherché à développer un test d'identité permettant de classifier un échantillon dans un des groupes prédéfinis, sans passer par une représentation graphique.

La figure 5.39 représente des spectres de lavandes et lavandins super et d'un mélange.

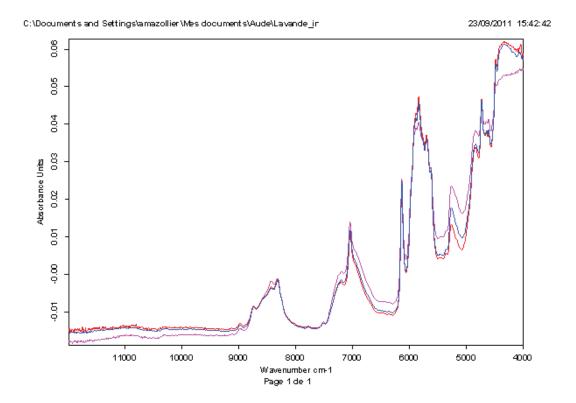


FIGURE 5.39: Spectres d'huile essentielle de lavande (bleu), huile essentielle de lavandin super (rose) et de huile essentielle de lavande coupée à 20% de lavandin (rouge).

Au regard des spectres, l'ajout de 20% de lavandin super n'est pas visible. Le traitement statistique des spectres est donc indispensable.

En utilisant seulement les échantillons fiables, une analyse discriminante, appelée test identité dans le logiciel opus, peut-être mise en place. Le but de cette méthode est de détecter la fraude sur les lavandes, il est donc intéressant d'intégrer des lavandes coupées au laboratoire dans le modèle. Avec les échantillons suivants :

- groupe 1 : les échantillons de lavandes authentiques
- groupe 2 : les échantillons de lavandes coupés à 50 %

Pour cette analyse, l'opérateur prédéfinit les groupes (ici les groupe 1 et 2 cités plus haut) et le test statistique montre que, dans notre cas, les deux groupes sont statistiquement distincts à un degré de confiance de 97 %. Cependant nous n'avons pu établir de groupes statistiques différents pour des huiles essentielles avec un ajout inférieur 50 % de lavandin super dans la lavande. Pourtant dès à 5-10 % d'addition de lavandin super la teneur en camphre est significativement élevée. Cette analyse ne semble pas très sensible, en comparaison à l'analyse du profil moléculaire de la fraction volatile. L'étude amorcée précédemment semblait plus sensible,

cependant le test identité demande un échantillonnage plus solide et complet que l'ACP. Au moment de l'étude, nous ne disposions pas d'un échantillonnage suffisamment complet et fiable. Cette analyse n'a pas été maintenue, dans le but de se concentrer sur la mise en place d'une méthodologie, contournant les difficultés rencontrées pour la mise à disposition d'un solide échantillonnage. Une étude approfondie devrait permettre le développement d'un test identité fonctionnel pour le contrôle de routine dans l'industrie.

5.6.4 Discussion

Cette analyse n'a pas été maintenue pour ce projet, ce qui ne signifie pas qu'elle n'a pas d'avenir. Cependant elle nécessite un important travail d'incrémentation de base de données, avec l'analyse d'un grand nombre d'échantillons authentiques. La mesure du spectre d'un échantillon donné doit être répétée de nombreuses fois dans le temps, afin de prendre en compte l'incertitude de mesure. Des recherches approfondies pourraient peut-être permettre de développer, pour l'industrie, une méthodologie intéressante.

5.7 Bilan des analyses sélectionnées

Ces nombreuses expériences nous ont permis d'acquérir une solide connaissance de nos échantillons et une meilleure vue d'ensemble sur les pratiques actuelles de la fraude. La suite de cette étude consiste à élaborer une méthodologie fiable de détection de la fraude avec un nombre réduit d'analyses. Pour ce faire en considérant les résultats obtenus nous avons décidé de conserver l'analyse des profils moléculaires indispensables à la bonne connaissance de l'échantillon. Toutefois une analyse statistique est mise en place afin de valoriser l'information apportée et de rapidement discriminer un échantillon atypique. Pour une meilleure compréhension de la fraude, ou parfois pour améliorer la discrimination, cette analyse est complétée par les analyses détaillées dans le tableau 5.70 suivant :

HE étudiées	GC-FID	Chiralité	Isotopie			Autres
			Carbone 13	Deuterium	Azote 15	
Bergamote	Profil moléculaire, teneur relative en δ-3-carène, rapports de teneurs relatives	Linalol, acétate de linalyle, Sabinène	linalol, acétate de linalyle	Linalol, acétate de linalyle		PMF (GC)
Citron	Profil moléculaire, teneur relative en δ-3-carène, rapports de teneurs relatives	sabinène	Citral	Citral		PMF (GC)
Mandarine	Profil moléculaire, teneur relative en δ-3-carène, rapports de teneurs relatives	∞Pinène, Sabinène,		NMAM	NMAM	
Pamplemousse		Citronnellal, linalol à approfondir				
Lavande fine	Profil moléculaire, teneur relative en camphre, rapports de teneurs relatives	Linalol, acétate de linalyle, acétate de lavandulyle	Linalol, acétate de linalyle	Linalol, acétate de linalyle		

Table 5.70: Récapitulatif des analyses sélectionnées pour la mise en place de la méthodologie visant à identifier la fraude des huiles essentielles de citrus et lavande

Chapitre 6

Analyse des résultats -Méthodologie dégagée pour le contrôle de l'authenticité

6.1 Analyses statistiques – Arbre de décision

De nombreuses données ont été obtenues. L'outil statistique constitue aussi une aide à la prise décision afin de répondre à la problématique initiale, en considérant l'ensemble des résultats.

Comme décrit précédemment dans la section 5.7, la réduction maximale du nombre d'analyses est indispensable à la discrimination de la fraude. Nous nous sommes attachés dans un premier temps à l'étude du profil GC-FID.

Les échantillons extraits au laboratoire ayant des teneurs relatives très différentes des autres échantillons n'ont pas été inclus dans les analyses utilisant ces paramètres (sauf exception). En revanche, ils présentent des abondances isotopiques et excès énantiomériques conformes et peuvent être inclus dans les tratements statistiques des analyses complémentaires. En raison d'une importante variabilité du profil moléculaire suivant l'origine géographique, pour les huiles essentielles de bergamote, citron et mandarine, les modèles sont construits seulement pour le type Italie. Idéalement ce processus devrait être adapté à chaque origine géographique. Nous ne disposions pas de quantité suffisante d'échantillons des différentes origines pour élaborer des modèles robustes pour chacune d'entre elles. Cependant ces échantillons sont intégrés au traitement statistique en tant qu'échantillons inconnus afin d'observer leur comportement dans le modèle. Dans certains cas cela constituera une première approche de l'adultération.

Ensuite l'analyse discriminante est mise en place utilisant les paramètres sélectionnés pour l'ACP. Ceci afin de développer une méthodologie plus facile d'emploi en proposant une dis-

crimination rapide et chiffrée plutôt que graphique des échantillons. Cette méthodologie est adaptée à l'industrie lors des contrôles de production ou au cours du processus d'achats.

Les échantillons de référence constituent un groupe statistiquement représentatif des huiles essentielles sur le marché. Il y a donc une faible probabilité pour qu'un échantillon éloigné graphiquement de ce groupe, le soit en raison d'une variabilité naturelle, si bien sûr l'échantillon est réellement de l'origine indiquée. Ces modèles sont par ailleurs dynamiques et doivent être incrémentés au fils des analyses avec des échantillons à la naturalité confirmée. Plus la base de données de référence sera étoffée, plus la méthode sera robuste et fiable.

A l'inverse au niveau des analyses complémentaires, les analyses chirales et isotopiques en carbone 13 sont relativement indépendantes de l'origine géographique, et autres facteurs de variabilité naturelle. Les valeurs isotopiques en deutérium et azote 15 ainsi que les profils PMF sont quant à eux sensibles à l'origine géographique.

Cependant lorsque les effets de la fraude sont suffisamment évidents, la fraude peut-être démontrée, quelque soit l'origine de l'échantillon de départ. Ainsi les échantillons adultérés d'autres origines qu'Italie pour les huiles essentielles de citrus et France pour les celles de lavande peuvent tout de même être détectés.

Ces analyses statistiques ont un double intérêt :

- Lorsque les échantillons sont extérieurs à l'ellipse de densité des références sur la première ACP, ces analyses permettent une meilleure compréhension de la fraude.
- Lors qu'ils paraissent authentiques, des analyses plus ciblées permettent de confirmer ou non leur authenticité, ou de révéler une adultération plus « fine ».

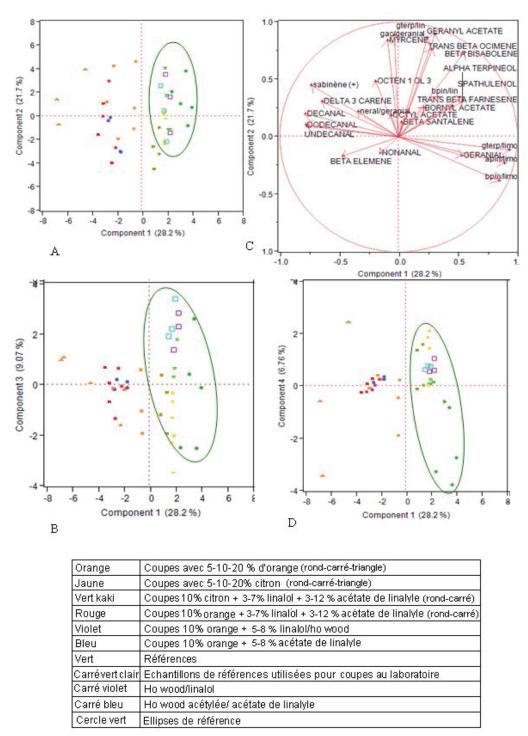
De plus l'utilisation de deux types d'analyses statistiques, permet une importante fiabilité des résultats. Il faut cependant garder à l'esprit que l'analyse discriminante nécessite un échantillonage consistant, authentique et fiable.

6.1.1 Synthèse des données pour la bergamote

La figure 6.1 représente le modèle construit pour l'huile essentielle de bergamote et les différentes adultérations connues. Trois plans ont été représentés afin d'obtenir un pourcentage d'information au dessus de 65%.

L'ajout de terpènes d'orange amène des modifications dans la composition moléculaire statistiquement similaires à celles de l'ajout d'huile essentielle d'orange qui est constituée à plus de 97% de terpènes. Cela a été démontré pour les huiles essentielles de citron et mandarine (cf. section 6.1.3 et 6.1.4). En conséquence, nous n'avons pas effectué de coupes avec des terpènes d'orange pour l'étude des huiles essentielles de bergamote.

Le modèle (cf. figure 6.1) n'inclut pas d'échantillon distillé ou de coupes avec de l'huile essentielle de bergamote distillée car cette fraude n'a pas été évoquée dans la littérature. L'ajout d'essence de ho wood acétylée ou non est équivalent à l'ajout de linalol et/ou d'acétate de linalyle synthétiques, ces fraudes ont donc été étudiées simultanément.



A: composante principale 1 en fonction composante principale 2; B: composante principale 2 en fonction composante principale 3; D: composante principale 2 en fonction composante principale 4; C: cercle des corrélations.

FIGURE 6.1: Modèle ACP pour l'identification de la fraude des huiles essentielles de bergamote

Cette analyse statistique exprime 65,8 % de l'information initiale sur trois plans (A, B, C) utilisant quatre composantes principales (PC1, PC2, PC2, PC4) (cf. figure 6.1).

Le plan A (cf. figure 6.1) discrimine les échantillons de référence de ceux adultérés avec de l'orange (huile essentielle ou terpènes) avec ajout (à partir de 5%) et sans ajout de linalol, acétate de linalyle ou ho wood. C'est aussi le cas sur les plans B et C (cf. figure 6.1).

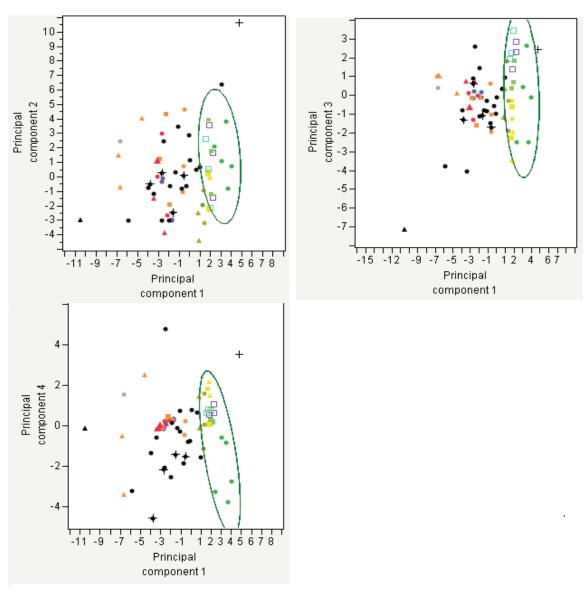
Le plan B (cf. figure 6.1) distingue une coupe à 20 % avec l'huile essentielle de citron.

Sur le plan C (cf. figure 6.1) les coupes avec l'huile essentielle de citron sont déplacées vers le haut de la figure. Cependant les points restent inclus dans l'ellipse de densité, ce qui signifie que la discrimination est insuffisante, les conclusions sont identiques concernant l'ajout exclusif de ho wood ou de ho wood. Avec ce traitement statistique ces adultérations semblent les plus discrètes. Compte-tenu du coût non-négligeable de l'huile essentielle de citron, c'est cependant celle qui permet le plus faible bénéfice du point de vue du fraudeur. L'incrémentation de ce modèle avec des références devrait permettre de réduire l'écart-type et d'obtenir une discrimination supérieure.

L'ajout de ho wood acétylé ou non est quant à lui détecté par analyse isotopique.

Le cercle des corrélations (D, cf. figure 6.1) montre l'importante correspondance entre les hautes valeurs de sabinène (+) et de δ -3-carène dû à l'ajout d'orange.

Les échantillons commerciaux ont ensuite été injectés dans le modèle statistique figure 6.2:



Orange	Coupes avec 5-10-20 % d'orange (rond-carré-triangle)		
Jaune	Coupes avec 5-10-20% citron (rond-carré-triangle)		
Vert kaki	Coupes 10% citron + 3-7% linalol + 3-12 % acétate de linalyle (rond-carré)		
Rouge	Coupes10% grange + 3-7% linalol + 3-12 % acétate de linalyle (rond-carré)		
Violet	Coupes 10% orange + 5 % linalol/ho wood + acétate de linalyle		
Bleu	Coupes 10% orange + 8 % linalol/ho wood + acétate de linalyle		
Vert	Références		
Carrévert clair	ir Echantillons de références coupés au laboratoire		
Carré violet	Ho wood/linalol		
Carré bleu	Ho wood acétylée/ acétate de linalyle		
Noir	Echantillon commerciaux		
Vert-marron	Echantillon extrait au laboratoire		
Violet pale	Echantillon distillé au laboratoire		
Triangle noir	Bl29-df		
Croix rond	BI11, BI12, BI28-df, BI31-df		
Cercle vert	Ellipses de référence		
Croix noir	BI27-df		

Figure 6.2: Injection des échantillons commerciaux dans le Modèle

A : composante principale 1 en fonction composante principale 2; B : composante principale 1 en fonction composante principale 3; C : composante principale 1 en fonction composante principale 4.

L'échantillon BI29-df en particulier (cf. figure 6.2) est très éloigné des références. Afin d'en comprendre la raison, nous avons injecté dans le modèle un mélange d'échantillon de bergamote avec l'huile essentielle hydro-distillée, dans le but de les comparer. Graphiquement le déplacement est important vers la gauche et se situe dans la même direction que l'échantillon en question. Il se peut en effet que cet échantillon provienne de l'hydrodistillation de fruit. L'analyse chirale du linalol pourra aider à l'interprétation de ces résultats.

La majorité des échantillons n'est pas incluse dans l'ellipse de densité et est très probablement adultérée (cf. figure 6.2). Les échantillons BI11, BI12, BI28-df, BI31-df (notés 2, cf. figure 6.2) sont, certainement d'après l'analyse chirale des terpènes, issus de mélanges avec de l'huile essentielle d'orange. De nombreux autres échantillons commerciaux se situent dans la même région. Cependant, l'analyse chirale n'a pas validé l'adultération à l'huile essentielle d'orange pour ces derniers. Il pourrait alors s'agir de mélange avec de l'huile essentielle de citron (voir section 5.2.1.2), cependant cette représentation graphique ne permet pas de le confirmer, les échantillons concernés n'avoisinant pas particulièrement les coupes à l'huile essentielle de citron.

L'analyse discriminante (cf. tableau 6.1) est donc effectuée sans pouvoir alimenter la base des échantillons de référence. Les échantillons de références sont dans le groupe 1 (en vert à droite sur le graphe B 6.1) Tous les échantillons commerciaux semblent adultérés et appartiennent au groupe 2 (à gauche sur graphe A 6.1). Le groupe 3 contient les échantillons auxquels ont été ajoutés de l'huile essentielle de ho wood acétylée ou non. Les échantillons BI12 et BI32-df proches ou inclus dans l'ellipse de densité sur les 3 plans, ont été considérés comme inconnus lors de l'analyse discriminante afin d'observer leur classement après le traitement statistique.

Effectifs	Groupes	Distances groupe 1	Distances groupe 2	Distances groupe 3
9	Groupe 1	8 - 31	22 - 75	216 -305
50	Groupe 2	19 - 92	9 - 58	237 - 310
5	Groupe 3	182 - 467	182 - 464	7 - 42
BI12		84	64	316
BI32-df		78	109	298

Table 6.1: Résultat de l'analyse discriminante de l'huile essentielle de bergamote

L'ensemble des échantillons (cf. tableau 6.1) respectivement classés dans les groupe 1, 2, 3 ont effectivement une distance plus courte avec le centroïde de leur groupe respectif, a l'exception d'un. En effet un échantillon commercial, le BI21 est équidistant des groupes 1 et 2.

L'adultération de cet échantillon n'est donc pas validé.

L'échantillon BI12 (cf. tableau 6.1) apparaît plus proche des échantillons adultérés, tandis que l'échantillon BI32-df est lui plus proche des références.

Les résultats des analyses complémentaires seront étudiées pour conclure sur ces deux échantillons.

Analyses complémentaires

Ainsi qu'il a été démontré dans la section 5.2.4.2, les échantillons BI24, BI29-df, BI20-df ont un excès énantiomérique inférieur à la normale en ce qui concerne le linalol. Ceci peut être dû à l'ajout d'huile essentielle de bergamote hydro-distillée, ho wood, ou d'un faible taux de linalol de synthèse. L'échantillon BI31-df présente un excès énantiomérique d'acétate de linalyle hors gamme de naturalité. Cet échantillon a probablement été adultéré avec de l'acétate de linalyle de synthèse. Les échantillons BI8 et BI28-df ont, quant à eux, un excès énantiomérique d'acétate de linalyle inférieur à la gamme de naturalité. Un ajout d'acétate de linalyle de synthèse est à suspecter. L'analyse isotopique de ces deux molécules est indispensable à l'interprétation de ces résultats.

Par ailleurs, l'analyse de PMF (cf. chp 5.4.2) avait mis en évidence un probable ajout d'huile essentielle d'orange pour les échantillons BI28-df et BA71.

Afin d'obtenir la meilleure des discrimination nous avons suivi l'évolution des rapport isotopiques suivant :

- $-\delta^2$ Hdu linalol (diminuant en raison d'ajout de ho wood) et du linalol-acétate de linalyle (la différence varie en raison d'ajout d'une seule des deux molécules, ou d'ajout de ho wood acétylé ou non)
- $-\delta^{13}$ Cdu acétate de linalyle et du linalol acétate de linalyle (la valeur isotopique de l'acétate de linalyle varie en raison d'ajout de cette molécules de synthèse ou de ho wood acétylé, celle du linalol reste stable)

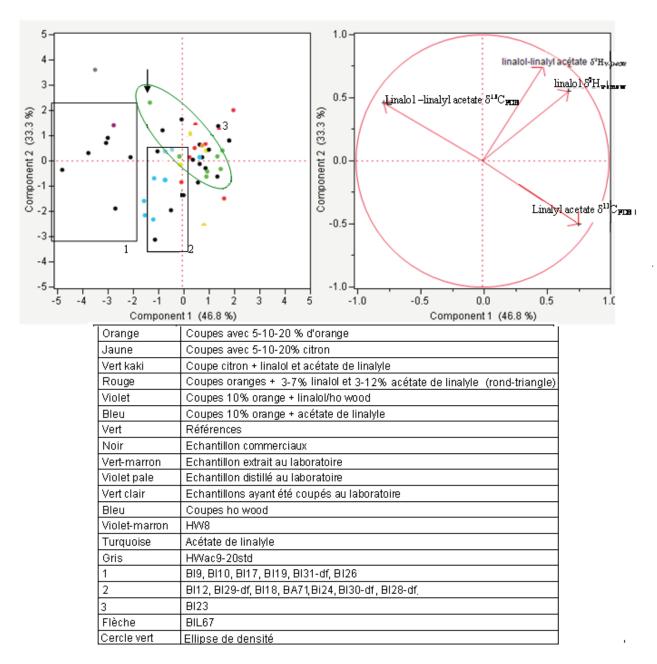


FIGURE 6.3: ACP des analyses isotopiques du linalol et acétate de linalyle de l'huile essentielle de bergamote

A : composante principale 1 en fonction composante principale 2; B : cercle des corrélations.

Le graphe 6.3 représente 65,5% des variations, ce qui est suffisant pour l'interprétation des résultats.

Au regard des échantillons fraudés au laboratoire, les échantillons regroupés en 1 (cf. figure 6.3) résultent certainement d'un mélange avec de l'huile essentielle de ho wood acétylée. Ceci confirme les résultats de la première analyse statistique où ils avaient déjà été détectés comme

adultérés.

Les échantillons situés dans le cercle 2 (cf. figure 6.3) sont quant à eux, très probablement issus d'un mélange d'huiles essentielles de bergamote et de ho wood. Seul l'échantillon BI29-df était suspect après analyse chirale du linalol et acétate de linalyle. En effet, en fonction de l'excès énantiomérique de l'huile essentielle de ho wood (95 à 98,8%) l'influence sur la chiralité de l'échantillon adultéré n'est pas systématique, l'analyse isotopique est donc indispensable à la détection d'ajout d'huile essentielle de ho wood.

L'échantillon BI29-df (cf. figure 6.3) déjà suspecté de provenir d'un mélange avec de l'huile essentielle de bergamote hydro-distillée, semble aussi contenir de l'huile essentielle de ho-wood. Cette adultération complexe, permettrait une économie substantielle. Cet échantillon tend à prouver l'existence de techniques de fraude plus élaborées que celles envisagées dans un premier temps. Dès lors au regard de ces résultats et de ceux de l'ACP précédente, l'échantillon BI29-df pourrait constituer un mélange avec plus de 20% d'huile essentielle de bergamote hydro-distillée.

L'analyse isotopique (cf. figure 6.3) ne confirme pas l'ajout de linalol de synthèse dans l'échantillon BI31-df, en raison d'un ajout supposé trop faible.

L'échantillon BI12 malgré un profil moléculaire proche des références et des excès énantiomériques de linalol R et acétate de linalyle R normaux, est adultéré. En effet cet échantillon contient probablement de l'huile essentielle de ho wood. L'échantillon BI32-df est quant à lui conforme.

L'analyse chirale des terpènes confirment l'adultération de l'échantillon BA71 par ajout d'huile essentielle d'orange, tandis que les analyses isotopiques démontrent l'ajout de ho wood non acétylé sur ce même échantillon.

Sur le marché, il existe aussi des huiles essentielles de ho wood elles-mêmes mélangées avec du linalol de synthèse. Ce mélange d'huile essentielle a été acétylé (en gris sur le graphe 6.3) et est révélé par l'analyse isotopique. En cas d'ajout de ce type de mélange à une huile essentielle de bergamote, les analyses chirale et isotopique en permettent la détection.

Globalement les fraudes sur les échantillons commerciaux semblent plus conséquentes que celles effectuées au laboratoire, car mieux discrimées graphiquement.

Les fraudes formellement identifiées sont les suivantes :

- Ajout d'huile essentielle de ho wood acétylée (6 cas)
- Ajout d'huile essentielle de ho wood (3 cas)
- Ajout d'huile essentielle d'orange (au moins 4 cas)
- Ajout d'huile essentielle de citron (cf. section 5.2.1.2)
- Ajout d'huile essentielle d'orange/citron et de ho wood acétylée ou non (au moins 3 cas)
- Faible ajout de linalol et acétate de linalyle synthétique pour satifaire la norme (au moins 3 cas)
- Probable ajout d'huiles essentielles hydro-distillée et de ho wood acétylée (au moins 1 cas).

La totalité des échantillons commerciaux d'huile essentielle de bergamote a été démontrée comme adultérés.

Arbre de décision

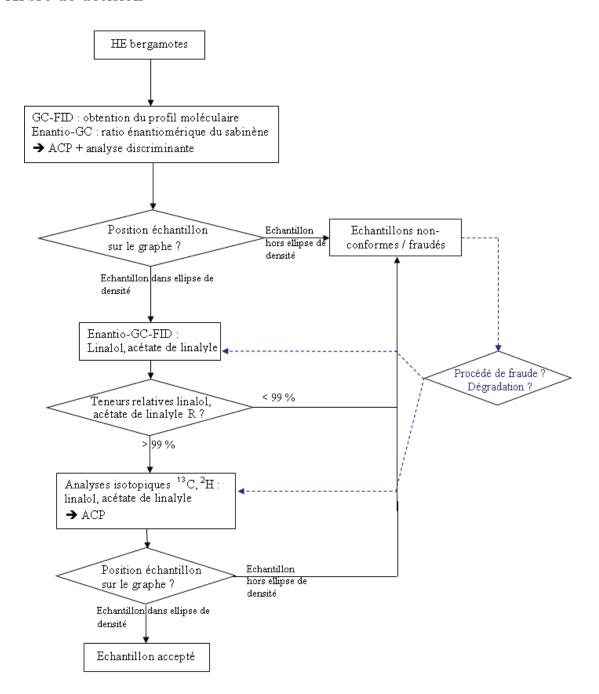
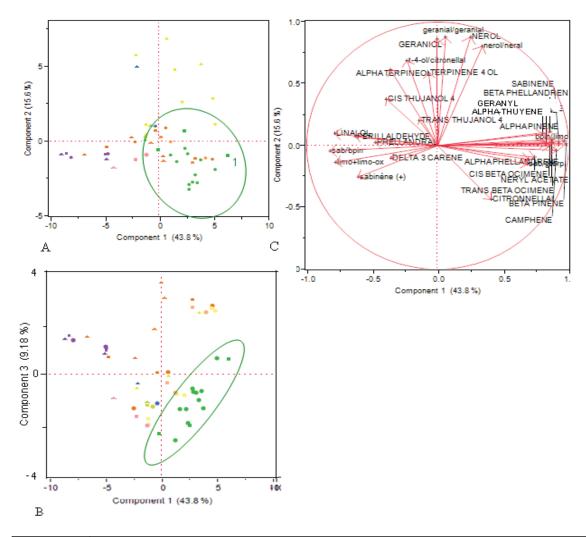


FIGURE 6.4: Arbre de décision pour le contrôle de naturalité de l'huile essentielle de bergamote

flèche bleue pointillée : Chemin facultatif pour les échantillons très différents des références mais important pour mieux comprendre les procédés de fraudes et éventuellement distinguer fraude et dégradation (analyses complémentaires anormales sont significatives de la fraude)

6.1.2 Synthèse des données pour le citron

La figure 6.5 représente le modèle construit pour l'huile essentielle de citron et les différentes adultérations connues.



Marron	Coupes avec 5-10-20 % d'orange (rond-carré-triangle)		
Jaune	Coupes avec 5-10-20 % citron hydro-distillé (rond-carré-triangle)		
Vert clair	Coupes avec 5-10-20 % lime (rond-carré-triangle)		
Rose saumon	Coupes avec 5-10-20 % terpènes d'orange (rond-carré-triangle)		
Orange	Coupes avec 5-10-20 % orange hydro-distillée (rond-carré-triangle)		
Violet	Coupes 20% orange+0,5 % et 1 % citral et Coupes 20% orange distillée+ 1 % citral (carré-triangle-rond)		
Bleu	Coupes 20% citron distillé ou lime + 1 % citral et 0,2 % acétate de géranyle (triangle-rond)		
Vert foncé	Echantillons de références		
Carré vert	Echantillons de référence utilisés pour coupesau laboratoire		

FIGURE 6.5: Modèle ACP pour l'identification de la fraude des huiles essentielles de citron

 $A: composante \ principale \ 1 \ en \ fonction \ composante \ principale \ 2 \ ; \ B: composante \ principale \ 1 \ en \ fonction \ composante \ principale \ 3 \ ; \ C: cercle \ des \ corrélations$

Deux plans ont suffit à la représentation de 68.9% des variations initiales, dont la majorité se situe sur la composante principale 1 (CP 1). Sur le plan A (cf. figure 6.5), les échantillons de référence sont bien regroupés, tandis que les mélanges d'huile essentielle de citron issue de l'expression avec celles issues de l'hydrodistillation (jaune), et celles de lime (vert clair), sont discriminés. Les échantillons auxquels des molécules synthétiques de citral et acétate de géranyle ont été ajoutées sont clairement distingués des échantillons de référence (cf. figure 6.5).

En ce qui concerne les échantillons de référence, sauf dans le cas du numéro 1 sur le plan A de la figure 6.5, toute fraude est identifiable dès 5 % d'ajout quelque soit l'aldultérant. Ce plan ne suffit donc pas toujours à la discrimination. Sur le plan B, les échantillons sont toujours relativement bien regroupés. La discrimination des adultérations avec l'huile essentielle d'orange issue de l'expression ou de l'hydro-distillation, et des terpènes d'orange, est meilleure.

On remarque par ailleurs que les modifications de la composition moléculaire de l'échantillon de départ apportées par l'ajout de terpènes d'orange ou l'ajout d'huile essentielle d'orange sont comparables.

Le cercle des corrélations (cf. figure 6.5) montre que les échantillons coupés avec de l'huile essentielle d'orange sont décalés vers le bas à gauche en raison de teneurs élevées en δ -3-carène, et en sabinène (+). Ceci n'est pas le cas des échantillons adultérés avec de l'huile essentielle de citron hydrodistillée déplacés vers le haut en raison de fortes teneurs en alcools.

Après injection des échantillons commerciaux dans le modèle, la figure 6.6 est obtenue :

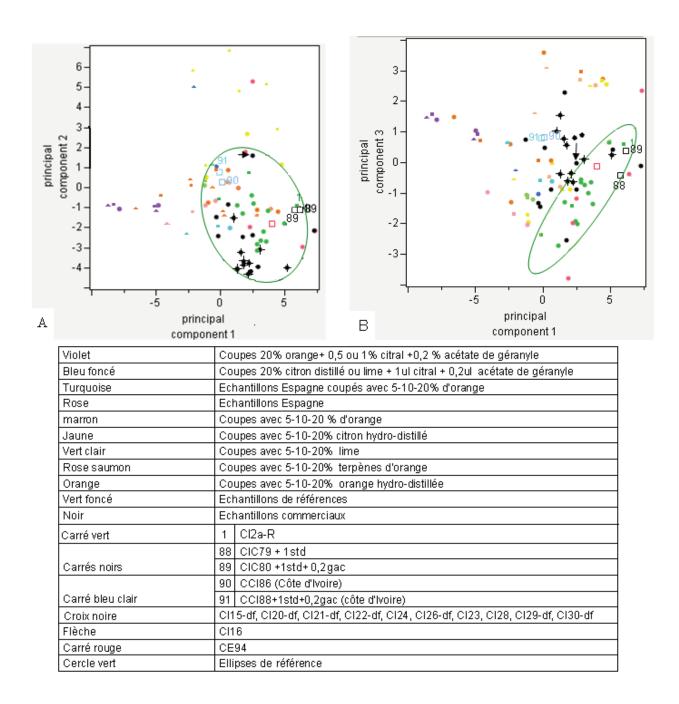


Figure 6.6: Injection des échantillons commerciaux dans le Modèle

A: composante principale 1 en fonction composante principale 2; B: composante principale 1 en fonction composante principale 3

Les points notés 88 et 89 (cf. figure 6.6), représentent l'échantillon CI2a-R auquel a été ajouté uniquement du citral (CIC79+1std) ainsi que de l'acétate de géranyle (CIC80-1std+0,2gac). Ils sont déplacés par rapport à l'échantillon CI2a-R, mais demeurent inclus dans les ellipses de densité.

L'ajout de citral à des échantillons issus de mélanges huiles essentielles de citron et d'orange (en violet sur la figure 6.6) ne permet pas de rendre la fraude plus discrète. Nous n'avons pas ajouté d'acétate de géranyle car nous avons pu observer le peu de différence qu'il induisait entre les échantillon 88 et 89.

Pour être détecté, le seul ajout de citral et acétate de géranyle nécessite l'analyse isotopique.

Les échantillons figurés par une croix noire (cf. figure 6.6) ont de très faibles teneurs en α-terpinéol. Ainsi que cela a été expliqué dans le chapitre 5.1.2.2, ceci peut être dû à l'origine géographique de l'échantillon, ou autre hypothèse, à leur défurocoumarinisation pour les échantillons concernés.

Parmi ces échantillons, ceux en dehors de l'ellipse de densité sur le plan B 6.6 (éch. CI20-df, CI22-df, CI23, CI24, CI28,) sont probablement issus d'un mélange avec de l'huile essentielle d'orange, car déplacés dans la même direction que les coupes avec de l'orange.

Parmi les échantillons cités ci-dessus, CI23, CI24 et CI28 n'ont pas été défurocoumarinés, leurs faibles teneurs en α-terpinéol provient donc certainement de l'origine géographique. Il est donc possible que le mélange avec de l'huile essentielle d'orange, soit destiné à les rendre comparables à des échantillons type Italie.

Les échantillons restants (éch. CI15-df, CI21-df, CI26-df, CI29-df, CI30-df), sont contenus dans l'ellipse densité sur les deux plans (6.6). Cette analyse tend à démontrer que le faible taux d'α-terpinéol est dû au procédé de défurocoumarinisation.

Afin de ne pas charger le graphique (cf. figure 6.6) les échantillons d'origines Argentine et Côte d'Ivoire n'ont pas été ajoutés à l'exception des échantillons CCI86 et CCI88+1std+0,2gac. En effet l'échantillon CCI86 d'origine Côte d'Ivoire n'est pas graphiquement semblable aux origines Italie. A cette échantillon ont été ajouté du citral et de l'acétate de géranyle (ech. CCI88+1std+0,2gac), dans le but d'évaluer l'impact d'ajouts de citral et acétate de géranyle pour rapprocher un échantillon Côte d'Ivoire d'une origine Italie. De l'huile essentielle d'orange n'a pas été ajoutée car la teneur en limonène de l'échantillon d'origine était déjà supérieure à la norme Italie (AFNOR NF ISO 855 (mai 2004)).

Sur le plan B (cf. figure 6.6) l'échantillon CCI88+CCI88+1std+0,2gac est nettement discriminé, l'ajout de citral ne compensant pas la différence de composition moléculaire. Cet échantillon n'a pas permis de démontrer la possibilité de commercialiser un échantillon d'origine Côte d'Ivoire comme étant d'origine Italie. Cependant l'utilisation d'un échantillon type Côte d'ivoire de composition plus adatpée pourrait le permettre, la gamme de naturalité de l'origine Côte d'Ivoire étant très étendue.

L'échantillon fléché CI16 (cf. figure 6.6) n'est pas nettement discriminé mais n'est pas inclus dans l'ellipse de densité sur le plan B. Cet échantillon pourrait être issu d'un mélange avec de l'huile essentielle de citron hydro-distillée.

Les échantillons d'origine Espagne sont représentés en rose sur le graphique (cf. figure 6.6). Les échantillons les plus éloignés des références correspondent aux échantillons extraits au laboratoire. Il est à remarquer que l'ajout d'huile essentielle d'orange déplace aussi un échantillon type Espagne vers la gauche (en turquoise). Un échantillon d'origine Espagne fortement déplacé dans le même sens que les échantillons adultérés pourra être suspecté. Des analyses complémentaires doivent obligatoirement valider les premières observations car le modèle reste adapté à l'origine Italie.

L'échantillon CE94 (cf. figure 6.6) a été pointé en rouge, car cet échantillon peut aisément être confondu avec une origine Italie sur ce graphe. Comme nous le démontrons par la suite cet échantillon contient du citral et acétate de géranyle synthétique. Il est donc possible de « rectifier » en citral et acétate de géranyle des huiles essentielle type Espagne, initialement plus pauvres en ces molécules, afin de les commercialiser sous une appellation origine Italie.

L'ensemble des échantillons commerciaux exceptés trois (ech. CI17df, CI19, CI33m), proches des références sur les deux plans (seuls point noirs inclus dans l'ellipses de densité su le plan B cf. figure 6.6), semble adultéré. Cependant les échantillons commerciaux ne semblent pas particulièrement corrélés aux fraudes effectuées au laboratoire. Les analyses complémentaires serviront à valider la naturalité de ces échantillons.

D'après l'ACP nous avons identifié trois groupes. Le groupe 1 constitué des références (en vert en bas à droite sur le plan A de la figure 6.2), le groupe 2 est constitué des échantillons fraudés à l'huile essentielle d'orange (marron, orange et saumon sur la gauche sur le plan A de la figure 6.2) et lime (en vert clair sur la figure 6.2), puis le groupe 3 avec celle de l'huile essentielle de citron hydro-distillée (en jaune en haut sur le plan A de la figure 6.2). Les échantillons CI17-df, CI19, CI33m comparables aux références sont testés afin de vérifier la cohérence de l'analyse discriminante et de l'ACP. L'échantillon CI16, est d'après le plan A de la figure 6.6, probablement issu d'un mélange avec de l'huile essentielle de citron hydro-distillé. Il a été testé via l'analyse discriminante afin de valider cette hypothèse. Les échantillons défurocoumarinés CI15-df, CI21-df, CI26-df, CI29-df, CI30-df, sont testés afin de vérifier que la faible teneur en α-terpinéol est due au procédé de défurocoumarinisation. Les échantillons commerciaux restants ont été considérés comme appartenant au groupe 2 des échantillons adultérés.

Effectif s	Groupes	Distances groupe 1	Distances groupe 2	Distances groupe 3
14	groupe 1	14 - 37	23 - 77	47 -100
46	groupe 2	23 - 102	10 - 50	30 - 90
11	groupe 3	56 - 124	30 - 96	13 - 47
CI16	inconnu	1368	1314	1319
CI17-df	inconnu	280	303	357
CI19	inconnu	791	915	990
CI33m	inconnu	67	125	174
CI15-df	inconnu	434	465	497
CI21-df	inconnu	125	98	122
CI26-df	inconnu	104	68	89
CI29-df	inconnu	452	523	576
CI30-df	inconnu	107	86	117

Table 6.2: Résultat de l'analyse discriminante de l'huile essentielle de citron

Lors de la validation, l'échantillon CI2a-R appartenant au groupe 1, a une distance inférieure avec le centroïde du groupe 2. Cet échantillon est à l'origine de nombreuses adultérations, c'est pourquoi il est statistiquement plus proche des échantillons adultérés. Ceci pourra être corrigé en étoffant le modèle avec d'autres références.

Les échantillons CI19, CI33m, CI17-df sont plus proches des références. Ils ne semblent pas adultérés.

Les échantillons CI15-df, CI29-df sont plus proches du groupe 1, tandis que CI21-df, CI26-df, CI30-df sont proches du groupes 2. Il est donc possible que la défurocoumarinisation soit à l'origine des différences des échantillons CI15-df, CI29-df et les échantillons CI21-df, CI26-df, CI30-df tendent à être adultérés.

L'échantillon CI16, est très éloigné et équidistant des trois groupes. D'après le plan A de la figure 6.6, il est probablement issu d'un mélange avec de l'huile essentielle de citron hydrodistillée. Cependant du fait de la une grande variabilité naturelle des huiles essentielles il est difficile de corréler nos échantillons fraudés avec les fraudes commerciales.

Les analyses complémentaires vont alors compléter ces premières informations.

Analyses complémentaires

L'analyse PMF a été corrélée avec la teneur en δ -3-carène, sabinène (+) et la teneur en PMF totale. Cette corrélation permet de distinguer les échantillons adultérés avec de l'orange (huile essentielle par expression, hydro-distillation, terpènes). Elle permet également d'évaluer l'authenticité des échantillons d'autres origines qu'Italie.

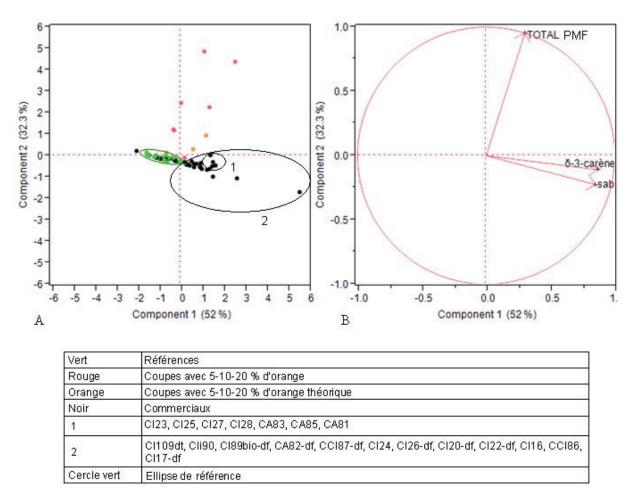


FIGURE 6.7: ACP des résultats des analyses de PMF, teneurs en δ -3-carène et sabinène (+) de l'huile essentielle de citron

Les échantillons regroupés en 1 sont probablement adultérés avec de l'huile essentielle d'orange, compte tenu des hautes teneurs en PMF, tandis que les autres regroupés en 2 (cf. figure 6.7) le sont par de l'huile essentielle d'orange défurocoumarinée, hydrodistillée ou des terpènes d'orange, indiqués par les fortes teneurs en sabinène (+) et δ -3-carène et normales en PMF. Ceci confirme les premiers résultats obtenus (cf. figure 6.6).

Le graphique A (cf. figure 6.7) représente 74,3% des variations c'est pourquoi un seul plan est représenté ici. Cette analyse statistique a permis de prouver l'adultération des échantillons

type Argentine CA81, CA83, CA85 (groupe 1) et CA82-df (groupe 2).

En parallèle, l'échantillon CI17-df (cf. figure 6.7) est ici discriminé. En effet la teneur en δ-3-carène parait trop élevée pour être issue d'une huile essentielle de citron authentique. Ceci est à l'encontre des résultats de l'analyse discriminante précédente. Cet échantillon pourrait être adultéré.

Ensuite l'échantillon CI16 qui pouvait résulter d'un mélange avec de l'huile essentielle de citron hydrodistillée sur la figure 6.6, apparaît ici (cf. figure 6.7) comme étant adultéré avec de l'huile essentielle d'orange.

Par contre les échantillons CI15df, CI21df, CI29df, CI30df, discriminés sur la première ACP, n'apparaissent pas anormaux d'après les résultats de cette analyse car ils n'ont probablement pas été adultérés par de l'orange. A l'inverse les échantillons CI19, CI33m sont encore une fois semblables aux échantillons de référence.

Enfin, nous avons appliqué le même traitement statistique aux résultats des analyses isotopiques du carbone 13 et deutérium du citral et de l'acétate de géranyle. Nous avons dans ce cas conservé tous les paramètres analysés en ¹³C et ²H car permettent la détection d'ajout de molécules synthétiques. La mesure isotopique du citral en ¹³C permet quant à elle la détection du citral provenant de lemongrass.

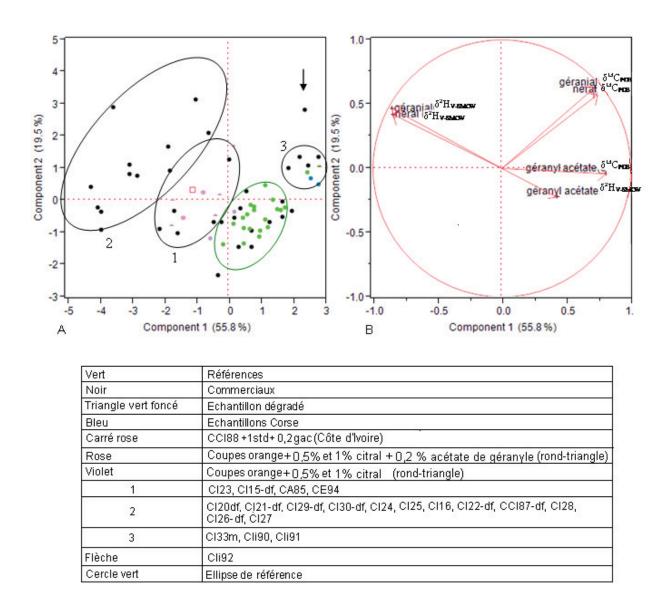


FIGURE 6.8: ACP des résultats des analyses isotopiques du citral et de l'acétate de géranyle de l'huile essentielle de citron

A : composante principale 1 en fonction composante principale 2; B : cercle des corrélations.

Le plan A (cf. figure 6.8) représente 75,4 % des variations c'est pourquoi deux composantes principales sont suffisantes.

Sur le cercle des corrélations (cf. B; 6.8), les valeurs isotopiques du néral et géranial (citral) en carbone 13 et deutérium sont respectivement corrélées. Ceci était attendu comme détaillé dans le chapitre 5.3.2.3. Les valeurs isotopiques de l'acétate de géranyle sont quant à elles anti-corrélées avec celle du citral car l'ajout de cette molécule synthétique abaisse sa valeur isotopique à l'inverse du citral. Cette anti-corrélation démontre que dans la plupart des échan-

tillons ces trois molécules sont ajoutées. C'est le cas des échantillons se trouvant dans le cercle 2 situé aux plus fortes valeurs de citral et faibles en acétate de géranyle (cf. figure 6.8).

Le cercle 1 contient les échantillons auxquels ont seulement été ajoutés du citral car peu déplacés selon l'axe de l'acétate de géranyle.

A partir de ce graphique (cf. figure 6.8), il apparaît que les échantillons adultérés ont des valeurs isotopiques de deutérium bien plus élevées que nos échantillons fraudés. Cela peut être dû à la quantité de citral ou d'acétate de géranyle ajoutée qui serait beaucoup plus faible que dans les échantillons commerciaux. Cependant à partir des échantillons dont nous disposons, ajouter de plus grandes quantités de citral aurait augmenté la teneur de ces molécules de façon trop importante. Il est alors possible d'imaginer que des échantillons d'origine Côte d'Ivoire, Brésil ou désertique (Norme AFNOR NF ISO 855 (mai 2004)) ont pu être utilisés car ces huiles essentielles contiennent naturellement des teneurs inférieures en citral. Aussi il pourrait s'agir de mélange avec des huiles essentielles reconstituées où le citral présent est exclusivement d'origine synthétique. Les deux cas de figure sont probablement rencontrés.

L'échantillon CIi92 a des valeurs isotopiques en carbone 13 du citral significativement plus hautes que celles des échantillons de référence. Il est possible que du citral provenant du lemongrass ait été ajouté à cet échantillon.

Dans le cercle 3 (cf. figure 6.8) sont situés des échantillons montrant des valeurs isotopiques en carbone 13 plus hautes que la majorité des références. Cependant ils restent proches de certains échantillons authentiques, ou dégradés.

Les échantillons CI15-df, CI21-df, CI29-df, CI30-df (cf. figure 6.8), ne paraissant pas adultérés avec de l'orange, ils sont contenus dans les cercles 1 et 2 et seraient donc adultérés avec du citral et de l'acétate de géranyle synthétique.

Seul l'échantillon CI19, proche des références sur l'ensemble des graphes, ne comporte aucune anomalie toutes analyses confondues. L'authenticité de cet échantillon semble comfirmée.

En ce qui concerne l'origine Espagne, seul l'échantillon CE94 (cf. figure 6.8) est probablement adultéré. Concernant les autres origines, seuls les échantillons CA84, CCI86, similaires aux références sur la figure 6.8, ne paraissent pas adultérés.

En conclusion, nous avons identifié des échantillons d'huile essentielle de citron auxquels

avaient probablement été ajoutés :

- de l'huile essentielle d'orange (au moins 4 cas)
- des terpènes d'orange ou de l'huile essentielle d'orange hydro-distillée (au moins 19 cas)
- ajout de citral et/ou acétate de géranyle synthétique pour compenser une première fraude,
 ou augmenter la qualité de l'huile essentielle et donc son prix (cf. section 3.2.1.2)
- Ajout d'huile essentielle de citron reconstituée (plus 75 % des cas pour ces deux derniers points)

L'ajout d'huile essentielle de citron hydrodistillée ou de lime n'a pas formellement été identifié.

La majorité des échantillons commerciaux s'est révélée être adultérée. La plupart des adultérations sont mises en évidence dès la première ACP (cf. figure 6.6) et ont toujours été confirmées par au moins une analyse complémentaire. La fiabilité du modèle est ainsi démontrée.

Arbre de décision

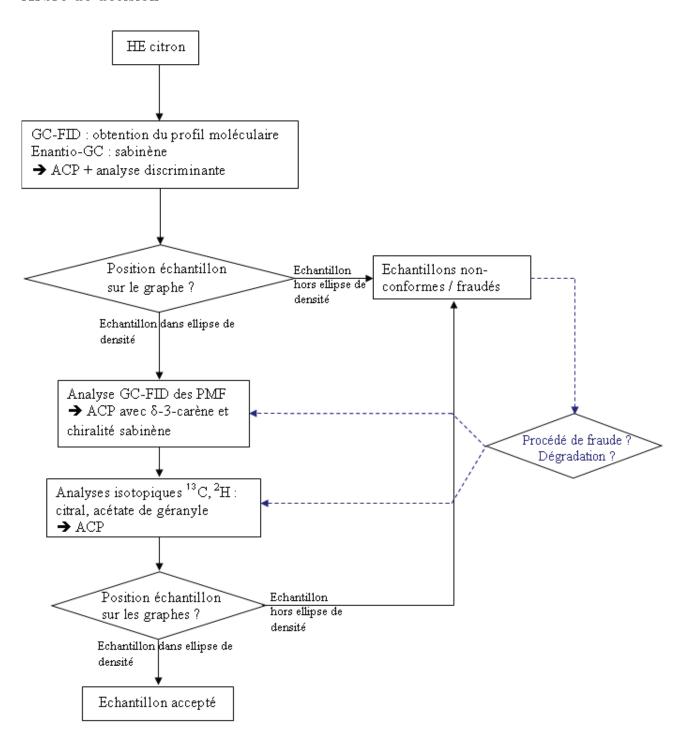


Figure 6.9: Arbre de décision pour le contrôle de naturalité de l'huile essentielle de citron

flèche bleue pointillée : Chemin facultatif pour les échantillons très différents des références mais important pour mieux comprendre les procédés de fraudes et éventuellement distinguer fraude et dégradation (analyses complémentaires anormales sont significatives de la fraude)

6.1.3 Synthèse des données pour la mandarine

La figure 6.10 représente le modèle construit pour l'huile essentielle de mandarine et les différentes adultérations connues.

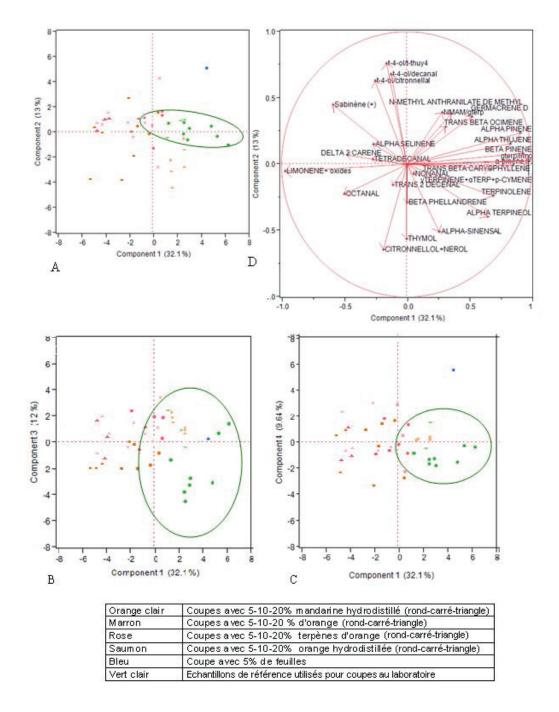


FIGURE 6.10: Modèle ACP pour l'identification de la fraude des huiles essentielles de mandarine

A : composante principale 1 en fonction composante principale 2; B : composante principale 1 en fonction composante principale 3; C : composante principale 2 en fonction composante principale 4; D : cercle des corrélations.

Ce modèle (cf. figure 6.10) représente 66,7 % des variations initiales, dont la majorité se situe sur la composante principale 1 (CP 1). Nous avons choisi de représenter un plan supplémentaire (en utilisant le PC4) afin de traiter un maximum d'informations.

Sur le plan A (cf. figure 6.10), les échantillons de référence sont groupés à droite du graphique. Les coupes à 5-10-20 % de mandarine hydrodistillée sont déplacées vers le bas de la figure, selon les fortes teneurs en alcools et les coupes à 5 % de feuilles vers le haut, vers les hautes teneurs en NMAM (cf. D, figure 6.10). Par contre les échantillons adultérés avec l'orange (issue de l'expression ou de l'hydro-distillation ou les terpènes) sont déplacées vers la gauche, d'après les axes du limonène, δ-3-carène et du sabinène (+) (cf. D, figure 6.10). La discrimination de tous ces types de fraude est possible sur ce plan.

Les plans B et C (cf. figure 6.10) permettent une meilleure identification du type de fraude ainsi qu'une meilleure comparaison des similarités entre échantillons. Les trois plans sont nécessaires pour observer exhaustivement les similarités entre échantillons. Le plan C permet d'abaisser le seuil de détection d'ajout d'orange (cf ellipse de densité figure 6.10)

En ce qui concerne l'huile essentielle de mandarine, la norme AFNOR NF ISO 3528 (nov 1997) n'est valide uniquement pour le type Italie. Ainsi qu'il a été détaillé dans la section 3.2.1.3, les huiles essentielles provenant d'Argentine ou du Brésil produisent des chémotypes significativement différents. Afin de vérifier cette hypothèse nous avons appliqué cette ACP aux échantillons de référence type Italie ainsi qu'aux échantillons des différentes origines (cf. figure 6.11).

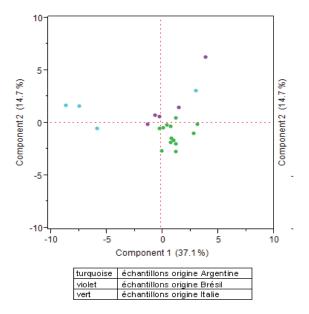


FIGURE 6.11: Application aux différentes origines des huiles essentielles de mandarine

À l'exception d'un seul, les échantillons d'origine Brésil sont proches de ceux de type Italie. Toutefois ces échantillons restent séparés sur le graphe.

Les échantillons d'origine Argentine sont quant à eux statistiquement très différents, l'un d'entre eux semble proche d'un type Brésil. Ce résultat est inexpliqué.

Les échantillons type Argentine sont injectés dans le modèle avec les échantillons type Italie, afin d'observer leur comportement (cf. figure 6.11).

Après injection des échantillons commerciaux (traités comme des inconnus) dans le modèle, la figure 6.12 est obtenue :

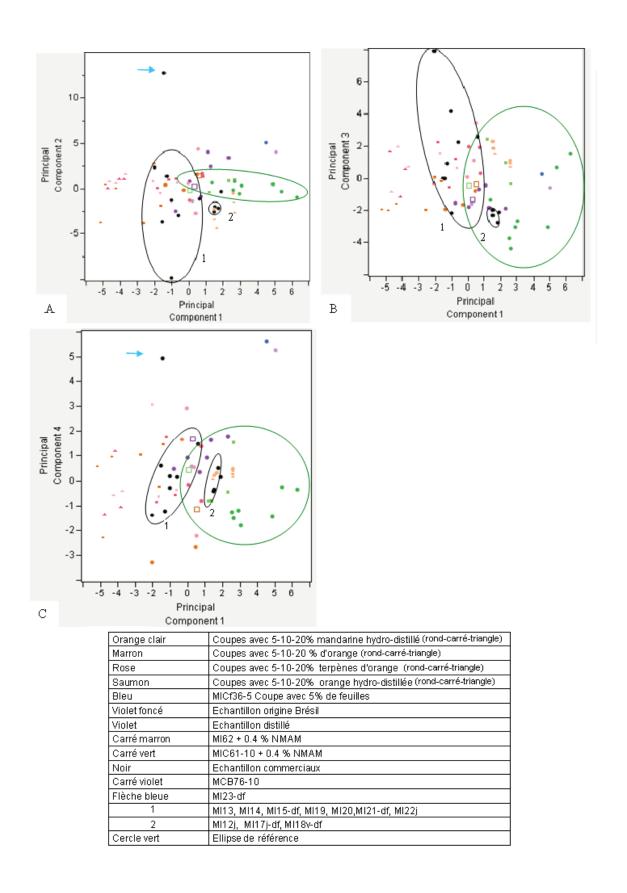


FIGURE 6.12: Injection des échantillons commerciaux dans le Modèle

A : composante principale 1 en fonction composante principale 2; B : composante principale 1 en fonction composante principale 3; C : composante principale 2 en fonction composante principale 4.

Les échantillons dans le cercle 1 (cf. figure 6.12) ont très probablement été adultérés avec de l'huile essentielle d'orange, en raison de leurs positions proches des coupes oranges effectuées au laboratoire. Cependant pour l'échantillon MI13, tout en haut sur le graphe B 6.12, la fraude est possiblement un peu plus complexe, car éloigné des échantillons du cercle 1 sur les plans A et B. Cet échantillon a donc des similitudes avec ceux du cercle 1, mais demeure cependant assez différent.

Les échantillons dans le cercle 2 (cf. figure 6.12) pourraient être issus d'un mélange avec de l'huile essentielle distillée.

Au regard de l'échantillon MI62 + 0.4 % NMAM (cf. figure 6.12), l'ajout de NMAM ne modifie que très légèrement le profil moléculaire de l'huile essentielle. En effet l'ajout de NMAM doit être limité pour rester dans des teneurs de la gamme de naturalité.

Les échantillons de type Brésil (cf. figure 6.12) sont regroupés sur les 3 plans mais sont statistiquement différents des références de type Italie. D'après l'échantillon MCB79-10, l'ajout d'huile essentielle d'orange à un échantillon d'origine Brésil ne permet pas de masquer la différence d'origine.

L'échantillon MI23-df (fléché en bleu cf. figure 6.12) est très atypique sur les plans A et C, d'après cette méthode nous ne pouvons le corréler à aucun type de fraude. Cet échantillon non-conforme à la norme AFNOR NF ISO 3528 (nov 2008) pour un grand nombre de teneurs, contient notamment un pourcentage élevé en NMAM. L'échantillon MICf36-5 était destiné à démontrer que l'échantillon MI23-df avait été pollué par la présence de feuilles lors du procédé d'extraction. Cette expérience ne permet pas de valider l'hypothèse.

L'échantillon MI16j est le seul comparable aux références sur les 3 plans (cf. figure 6.12). Il est pourtant légèrement hors norme, cependant une dégradation et non une adultération de ce dernier pourrait en être à l'origine.

L'analyse discriminante (cf. tableau 6.3) a été mise en place avec les échantillons de référence définis auparavant. Les échantillons commerciaux ont été fractionnés en plusieurs groupes. Le groupe 2 correspondant au coupes avec de l'orange, le 3 regroupant les coupes avec de la mandarine hydrodistillée et le 4 celles avec l'huile essentielle issue des feuilles. Aucun échantillon commercial n'a été ajouté à ces échantillons authentiques, tandis que les échantillons regroupés en 1 (cf. figure 6.12) sont classés dans le groupe des échantillons adultérés (groupe 2) et l'échantillon MI23-df est classé dans le groupe 4.

Effectif s	Groupes	Distance	Distance	Distance	Distance
		groupe 1	groupe 2	groupe 3	groupe 4
11	groupe 1	16 - 43	63 - 125	54 -117	26314 -
					27705
35	groupe 2	48 -143	8 - 49	24 -105	25701 -
					26854
6	groupe 3	46 - 83	31 - 84	5 - 20	26285 -
					27181
2	groupe 4	26925	26359	26756	25
MI18v-df	inconnu	284	419	420	27830
MI12j	inconnu	137	206	192	28568
MI17j-df	inconnu	504	579	630	31359
MI16j	inconnu	1586	1596	1609	30169

Table 6.3: Résultat de l'analyse discriminante de l'huile essentielle de mandarine

Après validation, aucun échantillon n'est mal classé. Les 4 échantillons inconnus sont plus proches du groupe 1 (cf. tableau 6.3). L'échantillon MI16j est équidistant et éloigné des groupes 1, 2, et 3. Cet échantillon est probablement adultéré ou tout au moins pas de qualité attendue.

Les échantillons MI18v-df, MI12j et MI17j-df ne sont pas réellement discriminés par cette analyse, les analyses complémentaires sont indispensables pour conclure dans ces cas là. A noter, que les échantillons MI18v-df et MI17j-df peuvent être légèrement différents des références en raison du procédé de défurocoumarinisation.

Analyse isotopique du NMAM

Les résultats des analyses isotopiques du deutérium et de l'azote 15 du NMAM sont présentés sur la figure 6.13

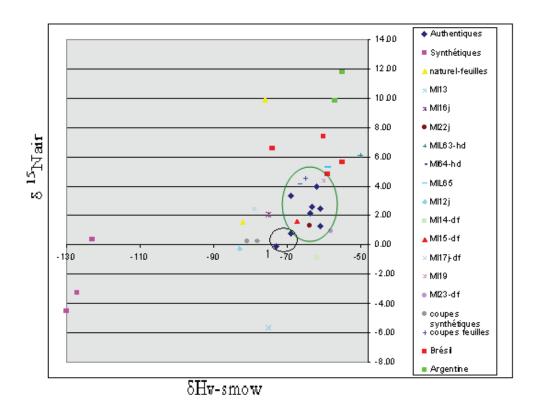


FIGURE 6.13: Résultats des analyses isotopiques du NMAM de ²H en fonction de celle de ¹⁵N

D'emblée nous remarquons que les valeurs isotopiques en deutérium et azote sont complémentaires car toutes deux distinctes entre les échantillons naturels et synthétiques. De plus les coupes effectuées au laboratoire sont significativement translatées vers la gauche en comparaison avec les échantillons de référence ayant été utilisés pour les coupes. Il sont ainsi discriminées des naturels. Cependant la concentration intrinsèque du NMAM dans une essence naturelle est faible, d'où des ajouts très limités en cas de fraude, donc difficiles à identifier.

Deux échantillons de feuilles ont été analysés, présentant des résultats très différents. Un complément d'analyse est requis pour une meilleur compréhension de l'ajout de NMAM issu des feuilles de mandarinier dans un échantillon.

Les échantillons dans le cercle 1 (cf. figure 6.13) présentent les plus faibles valeurs de δ^{15} N parmi les références. De plus ils ont des valeurs δ^2 H assez basses. Ces échantillons avaient été choisis comme références avant que l'analyse isotopique ne soit complétée. Aucune autre analyse

n'est suspecte et le profil chromatographique ne présente aucune anomalie. Il semblerait que ces échantillons soient bien des références concernant la composition moléculaire. Par contre une faible quantité de NMAM synthétique a probablement été ajoutée afin que ces échantillons respectent la norme AFNOR NF ISO 3528 (nov. 1997)

Les échantillons MI12J, MI13 et MI14-df (cf. figure 6.13) contiennent visiblement du NMAM de synthèse, car ils ont des valeurs de δ^{15} N très inférieures à la normale. L'échantillon MI13 a une valeur isotopique de l'azote équivalente aux NMAM synthétiques, il s'agit vraissemblablement d'une huile essentielle de mandarine reconstituée (cf. 3.2.1.3).

Les échantillons MI16j, MI17j-df sont plus complexes à interpréter, car ils ont une position intermédiaire entre les référérences et un échantillon de feuilles (cf. figure6.13). Il se pourrait cependant que du NMAM provenant de feuilles ait été ajouté.

La présence de feuilles lors de l'extraction serait une autre explication, cependant les échantillons MI16j et MI17j-df présentent des profils moléculaires proches des références, tandis que la présence de feuilles tendrait à modifier significativement la composition moléculaire (cf. point bleu figure 6.12).

MI23-df a un taux de NMAM anormalement élevé. Cependant sa position sur le graphique n'est pas aisément interprétée. En effet cet échantillon demeure proche des références avec néanmoins une valeur de δ^{15} N faible, mais possède une valeur de δ^{2} H comparable au références. Nous n'avons pu conclure sur cet échantillon.

L'échantillon MI22j (cf. figure 6.13) détecté comme étant un mélange avec de l'huile essentielle d'orange, ne semble pas avoir de valeurs isotopiques anormales. Il est probable qu'il n'y ait pas eu d'ajout de NMAM dans cette huile essentielle.

Concernant les échantillons d'origine Brésil ou Argentine, seul un des échantillons (MB73v) a une valeur de deutérium suspecte. L'absence de norme sur ces origines peut expliquer l'absence de fraude, car il n'est alors pas nécessaire d'ajuster la teneur en NMAM pour être conforme.

L'adultération de l'huile essentielle de mandarine présente des résultats variables. Certaines adultérations sont grossières et la comparaison à la norme ainsi que le suivi de la teneur en δ-3-carène semblent suffisants. D'autres ajouts d'huile essentielle d'orange sont plus discrets au regard du profil GC-FID, mais sont détectés par l'analyse statistique (cf. figure 6.13).

Enfin, l'ajout unique de NMAM n'est pas détecté par le traitement statistique du profil mo-

léculaire et seule l'analyse isotopique démontre l'ajout de NMAM synthétique. Cette analyse est dans ce cas indispensable à la détection de la fraude. Cependant ces ajouts peuvent être suffisamment faibles pour ne pas être détectables. De plus le nombre d'échantillons de référence analysés doit être augmenté pour affiner et fiabiliser l'interprétation des résultats.

La méthodologie mise en place a permis d'identifier différents types de fraude de l'huile essentielle de mandarine par addition de :

- huile essentielle d'orange défurocoumarinée, hydro-distillée, terpènes d'orange (au moins 7 cas)
- huile essentielle de mandarine distillée (au moins 1 cas)
- Ajout d'huile essentielle de mandarine reconstituée (au moins 1 cas)
- ajout de NMAM synthétique pour compenser une première fraude ou pour faire correspondre l'huile essentielle à la norme AFNOR NF ISO 3528 (nov 2008) (au moins 6 cas)

Arbre de décision

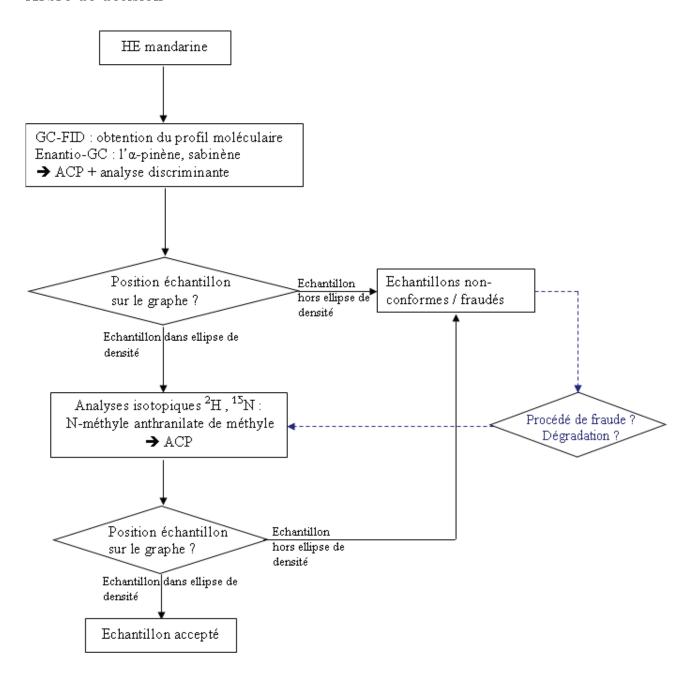


FIGURE 6.14: Arbre de décision pour le contrôle de naturalité de l'huile essentielle de mandarine flèche bleue pointillée : Chemin facultatif pour les échantillons très différents des références mais important pour mieux comprendre les procédés de fraudes et éventuellement différencier fraude et dégradation (analyses complémentaires anormales sont significatives de la fraude)

6.1.4 Synthèse des données pour le pamplemousse

En ce qui concerne le pamplemousse, aucune analyse statistique employant les teneurs relatives des constituants de la fraction volatile ne s'est révélée pertinente. En raison de l'importante similitude des profils moléculaires, nous n'avons pas dégagé d'analyse pouvant permettre d'évaluer l'ajout d'huile essentielle d'orange dans le pamplemousse, principale fraude connue. Les analyses chirales du citronnellal et du linalol pourront être développée sur GC multidimensionnelle afin d'étudier la possibilité de discriminer l'ajout d'huile essentielle d'orange (cf. 5.2.2.3).

Concernant l'analyse de la composition moléculaire, il semblerait que la teneur en nootkatone soit souvent plus faible qu'elle ne l'était auparavant. Cependant ces teneurs correspondent à la gamme proposée par la norme NF ISO 3053 (janv 2005). De plus dans la littérature, certains cultivars possédant de faibles teneurs en nootkatone ont été étudiés (cf section 3.2.1.4). Le fait que l'huile essentielle de pamplemousse de l'INRA de Corse ne possède pas de nootkatone étaye cette hypothèse. Le suivi de cette molécule n'est donc pas indiqué pour l'évaluation de la fraude des huiles essentielles de pamplemousse. Au regard de nos résultats le δ -3-carène semble spécifique à l'orange. Dans la majorité des publications il n'est pas détecté ou à des teneurs inférieurs à 0,015%. Seuls S.I. Kirbaslar et al rapportent des teneurs pouvant allez jusqu'à 0,05% [44, 60, 65, 72, 73].

L'optimisation d'une méthode en analyse chirale ciblant le linalol ou le citronnellal, si elle se révélait discriminante, permettrait d'avoir une méthode plus robuste de détection de la fraude sur l'huile essentielle de pamplemousse.

A présent il n'existe donc pas de méthodologie pour la détection de la fraude sur l'huile essentielle de pamplemousse.

6.1.5 Synthèse des données pour la lavande

La figure 6.15 représente le modèle construit pour l'huile essentielle de lavande et ses différentes adultérations. Tout comme pour l'huile essentielle de bergamote l'ajout de ho wood et de standards de linalol et acétate de linalyle de synthèse ont été assimilés pour cette première ACP.

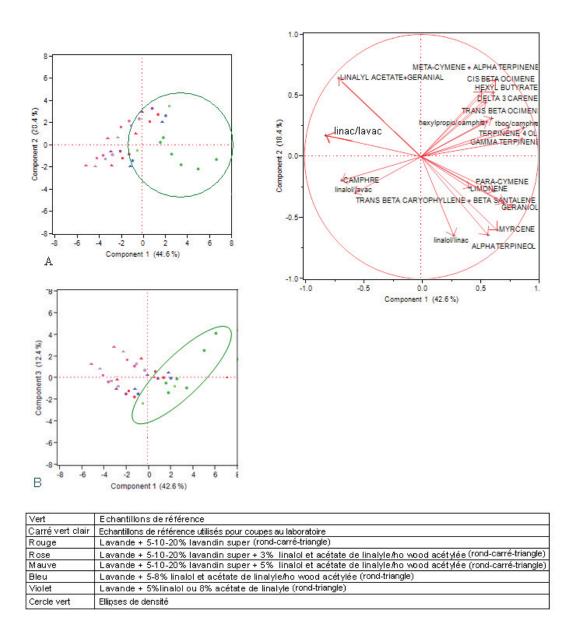


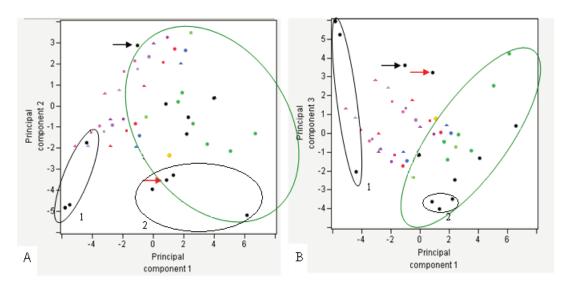
FIGURE 6.15: Modèle ACP pour l'identification de la fraude des huiles essentielles de lavande

A : composante principale 1 en fonction composante principale 2; B : composante principale 1 en fonction composante principale 3; C : cercle des corrélations.

Ce modèle (cf. figure 6.15) représente 73,4 % des variations initiales, dont la majorité se situe sur la composante principale 1 (CP 1).

Sur le plan A, les échantillons de référence sont regroupés sur la droite du graphique. Les coupes avec du lavandin déplacent les échantillons vers la gauche et le bas du graphique selon l'axe du camphre (cf. C; 6.15). L'ajout de linalol et d'acétate de linalyle déplace les échantillons plus fortement vers la gauche selon les axes liés aux teneurs de linalol et acétate de linalyle. Le plan B, permet une discrimination complète de la plupart des fraudes envisagées. Seules les uniques ajouts de linalol et acétate de linalyle ne sont pas toujours mis en évidence (Cf. ellipse plan B 6.15). L'analyse isotopique est indispensable dans ce cas là.

L'injection dans le modèle des échantillons commerciaux permettra une évaluation de l'adultération des huiles essentielles de lavande figure 6.16.



Vert	Echantillons de référence	
Carré vert clair	Echantillons de référence utilisés pour coupesau laboratoire	
Orange	LB46 (Bulgarie)	
Rouge	Lavande + 5-10-20% lavandin super (rond-carré-triangle)	
Rose	Lavande + 5-10-20% lavandin super + 5% standards (rond-carré-triangle)	
Mauve	Lavande + 5-10-20% lavandin super + 8% standards (rond-carré-triangle)	
Bleu	Lavande + 5% linalol ou 8% acétate de linalyle (rond-triangle)	
Violet	Lavande + 5-8%linalol et acétate de linalyle (rond-triangle)	
Noir	Echantillons commerciaux	
Flèche noir	LF47 (clone)	
Flèche rouge	LF14	
1	LF11, LF15, LF16	
2	LF17, LF18, LF13, LF9, LF10, LF19, LF12	
Cercle vert	Ellipses de densité	

Figure 6.16: Injection des échantillons commerciaux dans le Modèle

A: composante principale 1 en fonction composante principale 2; B: composante principale 1 en fonction composante principale 3.

L'échantillon LF11 a été identifié par le producteur comme étant pollué par un nettoyage incomplet du réacteur après une précédente distillation de lavandin super. Avec un déplacement similaire sur l'ACP, LF15 et LF16 semblent aussi résulter d'un mélange avec de l'huile essentielle de lavandin super. Il n'est pas possible, via cette analyse statisitique, d'identifier l'origine du mélange avec le lavandin super. Il peut s'agir d'une pollution comme d'une fraude (cf. figure 6.16).

Dans le cercle 1 (cf. figure 6.16), l'échantillon pollué LF11 est le moins déplacé. Ceci tendrait à prouver que la proportion ajoutée de lavandin super est plus révélatrice d'une fraude que d'une pollution accidentelle. Dans le cas où l'ajout de ho wood serait démontré par l'analyse isotopique cette hypothèse sera confirmée.

L'échantillon LF14 pourrait lui aussi provenir d'un mélange avec du lavandin super, car il est déplacé selon l'axe du camphre ainsi que des Z et E-β-ocimènes sur le plan A. Il est également situé dans la même zone que les échantillons adultérés sur le plan B (cf. figure 6.16).

Les échantillons commerciaux en bas de graphique sont pauvres en Z et trans-β-ocimène. Si les LF15 et LF16 (bas cerlce 1, cf. figure 6.16) sont déplacés vers les fortes teneurs en camphre témoin du lavandin super, ce n'est pas le cas des LF17, LF18 et LF14 (bas cercle 2, cf. figure 6.16). Pour ces échantillons les faibles teneurs en E-β-ocimène peuvent aussi être dues à une dégradation de l'échantillon. Les échantillons LF17, LF18 ont de fortes teneurs en oxydes ce qui étaye la thèse de la dégradation de ces échantillons et non de leur adultération.

Les échantillons LF13, LF9, LF10, LF12 et LF19 sont quant à eux comparables aux références. Ces échantillons sont probablement authentiques.

L'échantillon LB47 correspond à un clone de lavande qui n'est pas soumis à la norme AF-NOR NF ISO 3515 (déc. 2004), car son profil moléculaire est très atypique (cf. figure 6.16).

Pour l'analyse discriminante (cf. tableau 6.4), Les échantillons LF13, LF9, LF10, LF12 et LF19 sont ajoutés à la base des échantillons authentiques. Les échantillons adultérés et commerciaux identifiés comme fraudés sont classés dans le groupe 2. Le comportement des échantillons LF14, LF17, LF18 est observé (aucun groupe préétabli), via cette analyse discriminante, afin de pouvoir conclure quant à leur éventuelle adultération.

Effectifs	Groupes	Distance groupe 1	Distance groupe 2
12	groupe 1	30 - 36	18 - 100
29	groupe 2	34 - 89	4 - 39
LF14	inconnu	533	519
LF17	inconnu	1007	1083
LF18	inconnu	2447	2401

Table 6.4: Résultat de l'analyse discriminante de l'huile essentielle de lavande

Le modèle n'est pas validé car un échantillon (éch. LF5-R) de référence est mal classé. Cet échantillon a servi comme origine à de nombreuses adultérations effectuées au laboratoire, c'est pourquoi il en est statistiquement proche. L'analyse d'un plus grand nombre d'échantillons éliminera ce problème. L'échantillon LF14 est plus proche des échantillons adultérés. Les échantillons LF17 et LF18 sont éloignés et presque équidistants des deux groupes. Ces échantillons ne semblent pas correspondre à de la lavande fine d'origine France, cependant ils n'apparaissent pas nécessairement adultérés avec de l'huile essentielle de lavandin super.

Ce modèle (cf. tableau 6.4) demande à être étoffé afin d'être validé et encore plus performant.

Analyses complémentaires

Les analyses complémentaires permettent d'observer plus précisément l'ajout de linalol et acétate de linalyle ou d'huile essentielle de ho wood acétylée ou non. L'analyse chirale a permis d'affirmer qu'aucun échantillon n'avait été adultéré par ajout de ces molécules d'origine synthétique (cf. section 5.2.4.2). L'analyse isotopique permet la détection de l'ajout d'huile essentielle de ho wood acétylée ou non dans les huiles essentielles de lavande. Les échantillons des différentes origines peuvent être comparés.

Afin d'obtenir la meilleure des discrimination nous avons suivi l'évolution des rapport isotopiques suivant :

- δ²Hdu linalol acétate de linalyle (la différence varie en raison d'ajout d'une seule des deux molécules, ou d'ajout de ho wood acétylé ou non)
- $-\delta^{13}$ Cde l'acétate de linalyle et du linalol acétate de linalyle (la valeur isotopique due acétate de linalyle varie en raison d'ajout de cette molécule de synthèse ou de ho wood acétylé, celle du linalol reste stable)

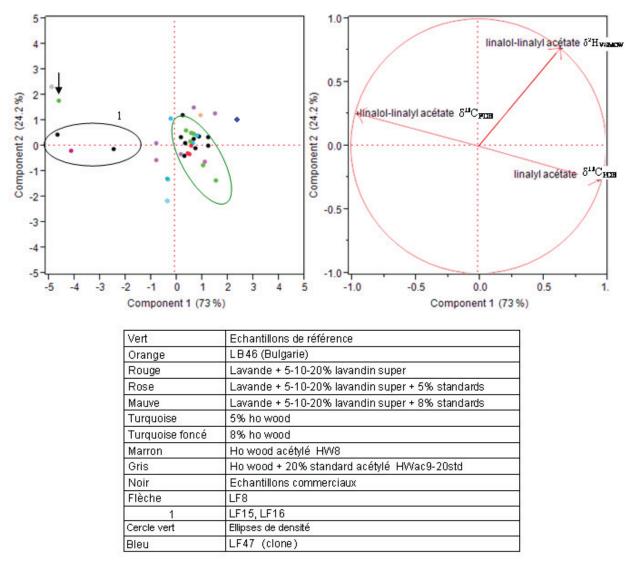


FIGURE 6.17: ACP des résultats des analyses isotopiques du linalol et acétate de linalyle

A : composante principale 1 en fonction composante principale 2 ; B : cercle des corrélations.

L'échantillon LF8 (cf. figure 6.17) est proche de l'échantillon HWac9-20std car tous deux ont de plus faibles rapports isotopiques en carbone 13 pour l'acétate de linalyle. Par contre sa valeur isotopique en deutérium se situe dans la moyenne. D'après la littérature [134], une faible valeur isotopique en carbone 13 ne signifie pas systématiquement une adultération. De plus, une adultération avec un mélange de ho wood et de linalol synthétique aurait été détectée par l'analyse chirale. Les faibles rapports isotopiques en carbone 13 non corrélés avec des valeurs en deutérium anormales peuvent être naturels.

En ce qui concerne LF15 et LF16 (cf. figure 6.17) leur proximité avec l'échantillon de ho wood acétylé semble indiquer l'adultération de ces échantillons. Par ailleurs, ils ont été identifiés

comme coupés avec de l'huile essentielle de lavandin super. En effet l'ajout de linalol et acétate de linalyle issus du ho wood acétylé, permet une plus grande économie ainsi que la diminution de la teneur relative en camphre caractéristique du lavandin super.

Les échantillons LF11 et LF14 ne présentent aucune anomalie en analyses isotopiques, Si l'on sait que LF11 a été pollué avec du lavandin super, il pourrait en être de même pour LF14. La fraude n'est pas démontrée dans ce cas là.

Enfin, les échantillons LF17 et LF18 ne semblent pas adultérés. Ces échantillons ont subit des dégradations menant à une légère variation du profil moléculaire.

Les procédés d'adultération utilisés pour les huiles essentielles de lavande semblent moins complexes et moins fréquents que pour les huiles essentielles de citrus. Nous avons seulement identifié deux échantillons probablement issus d'un mélange d'huile essentielle de lavande, de lavandin super et de ho wood acétylée. Par contre les risques de pollution avec du lavandin super ne sont pas négligeables chez les distillateurs.

Arbre de décision

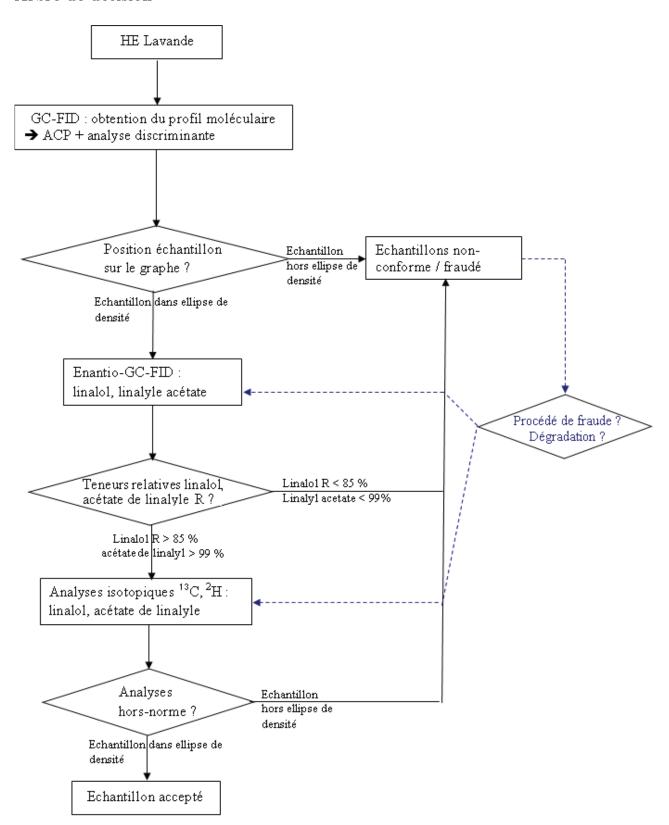


FIGURE 6.18: Arbre de décision pour le contrôle de naturalité de l'huile essentielle de lavande

flèche bleue pointillée : Chemin facultatif pour les échantillons très différents des références mais important pour mieux comprendre les procédés de fraudes et éventuellement différencier fraude et dégradation (analyses complémentaires anormales sont significatives de la fraude)

6.1.6 Conclusion

Nous avons développé une méthodologie visant à détecter la fraude en analysant statistiquement en premier lieu le profil moléculaire de la fraction volatile de l'huile essentielle. En ce qui concerne les citrus, les résultats de l'analyse chirale des monoterpènes (α-pinène, sabinène) ont été ajoutés à cette analyse statistique pour une discrimination affinée. Seuls quelques cas nécessitent l'intervention d'analyses plus spécifiques pour être certain de l'adultération. Les analyses complémentaires ont aussi permis une meilleure compréhension de la fraude et d'identifier partiellement les procédés d'adultération actuels.

Les modèles ont pu être développés uniquement pour les origines Italie des citrus et France des lavandes. Pour les autres origines, une étude plus approfondie serait nécessaire. Néanmoins, en ce qui concerne les citrus et en l'absence de modèle, le suivi de la teneur en δ -3-carène, ainsi que les analyses chirales et isotopiques permettent de détecter de manière fiable la fraude sur les échantillons d'origines autres qu'Italie.

Toujours pour les citrus, lors du traitement statistique des profils moléculaires, les échantillons commerciaux sont rarement regroupés sur tous les plans avec les échantillons adultérés au laboratoire. Il apparaît alors que la fraude commerciale est difficile à reproduire, laissant parfois supposer des adultérations plus complexes. De plus il n'a pas été non plus possible de reproduire parfaitement une adultération ni d'en évaluer le pourcentage d'adultérant ajouté, tant les compositions des huiles essentielles peuvent être quantitativement variables. Cependant malgré l'impossibilité de détailler certains procédés frauduleux ainsi que le taux effectif de la coupe, la méthodologie mise en place permet la détection d'adultérations même « fines », ce qui était le but premier de cette étude.

L'incrémentation en continu des données statistiques par de nouveaux échantillons de référence et adultérés rendra dans le temps les modèles plus robustes et discriminants.

Conclusion générale

Les huiles essentielles sont un ensemble de molécules volatiles extraites d'un végétal dont la synergie leurs confèrent des propriétés olfactives et thérapeutiques propres. Leur utilisation est de plus en plus répandue de nos jours. Leur coût élevé entraine de nombreuses fraudes afin que la marge des fournisseurs soit augmentée ou aussi pour que le prix de vente corresponde à la réalité du marché. De plus l'existence de normes restrictives, normalisant la composition moléculaire, provoque l'addition de composés normés afin que l'huile essentielle lui corresponde. Pour s'assurer de l'authenticité des huiles essentielles compte tenu des origines variétales et géographiques, il est indispensable d'avoir des bases de données les plus exhaustives possibles, composées d'échantillons authentiques, et frauduleux (commerciaux et adultérés au laboratoire).

Deux phénomènes intrinsèques aux végétaux, l'énantio-sélectivité, et la discrimination isotopique au cours biosynthèses des molécules, permettent un contrôle d'authenticité. Ainsi certaines molécules révélatrices de fraude sont ciblées. Nous avons lors de cette étude développé des analyses énantiosélectives et isotopiques. Nous avons aussi étudié les profils moléculaires de la fraction volatile ainsi que des PMF pour les citrus. Les données fiables ont ensuite été sélectionnées afin de mettre en place une méthodologie robuste et efficace permettant la mise en évidence d'échantillons frauduleux. Nous nous sommes attachés par le biais d'analyses statistiques du profil moléculaire à réduire au maximum le nombre d'analyses requis pour le contrôle de l'authenticité.

Ainsi pour les citrus d'origine Italie et lavande d'origine France, l'étude statistique du profil moléculaire associé à l'analyse chirale du sabinène et parfois de l'α-pinène, suffisent à la détection de nombreux échantillons frauduleux. Les analyses énantio-sélectives du linalol et de l'acétate de linalyle, ainsi que les analyses isotopiques du citral et de l'acétate de géranyle, du N-méthyle anthranilate de méthyle complètent l'analyse statistique et permettent la détection de certaines fraudes plus « fines ». De plus ces analyses permettent une connaissance plus précise des procédés d'adultération et la détection de la fraude d'échantillons d'origines autres qu'Italie.

Nous avons donc réalisé des modèles statistiques pour les huiles essentielles de Bergamote,

Citron, Mandarine d'origine Italie et de Lavande d'origine France. L'utilisation en routine de ces modèles permettra de rapidement identifier les échantillons propres à une utilisation dans la parfumerie ou cosmétique. Ils pourront être étoffés en incluant des échantillons authentiques et adultérés afin d'en augmenter la fiabilité et la performance.

Le même type de modèle pourra être élaboré pour d'autres origines si besoin. Nous ne disposions pas de ces échantillons en quantité suffisante pour le réaliser lors de cette étude. En l'absence de ces modèles, la discrimination de la fraude est plus fastidieuse mais possible.

La mise en place de cartes statistiques à partir de profils moléculaires pourrait être un outil intéressant pour le contrôle qualité des eaux florales, matrices aussi très utilisées en cosmétique. Dans le futur, il serait intéressant d'étudier la faisabilité de ce type de méthodologie sur des produits cosmétiques finis.

Aussi les techniques isotopiques et chirales pourront permettre la distinction entre molécules naturelles ou issues des biotechnologies.

L'intérêt de la spectrométrie proche infrarouge a été investigué. Nous pensons que cette technique n'est pas à négliger dans l'avenir du contrôle de l'authenticité de routine. Elle nécessite cependant un grand nombre d'analyses et une base d'échantillons complète et très fiable, afin de pouvoir mettre en place des modèles statistiques.

L'émergence et le développement permanent de la chromatographie telles que, le développement de nouvelles phases stationnaires, la fast GC, la GCxGC (comprehensive, heart cutting), permettront une identification des molécules toujours plus rapide et exhaustive, en particulier pour les molécules présentent à de faibles teneurs ou coéluées[58]. De la même manière les spectromètres de masses ont des limites de détection et des résolutions sans cesse améliorées, permettant la détection et l'identification de composés à l'état de trâces, mais pouvant être déterminant dans l'étude de la naturalité.

La chromatographie sur couche mince haute performance pourra également trouver sa place dans un environnement industriel, car permet l'analyse rapide de matières premières avec un appareillage relativement simple en comparaison aux techniques précédemment citées. Elle permet notemment la mise en évidence de l'ajout de corps gras.

Enfin, les analyses olfactives effectuées par des nez humains ou électroniques ne sont également pas à négliger.

L'analyse isotopique de l'oxygène 18 pourra également être envisagée. En effet, l'oxygène présent dans les molécules produites par les plantes est assimilé à partir de deux sources dif-

férentes : Le CO_2 atmosphérique et l'eau. Les rapports isotopiques de ces deux sources sont très différents, ceci pouvant créer des variations naturelles vraissemblablement intéressantes à mettre en évidence et à exploiter.

L'étude du Fractionnement Isotopique Naturel Site-spécifique par Résonnance Magnétique Nucléaire (SNIF-RMN) du deutérium de chaque composé étudié afin de caractériser les valeurs isotopiques de chaque site d'une molécule. Ceci permet par analyse de chaque site, la différenciation d'origine botanique et géographique. Cependant ceci n'est applicable qu'aux molécules isolables facilement, car le composé doit être pur et concentré pour cette analyse (de 0.5 à 1g de produit sont nécessaires à l'analyse), et ceci, sans discrimination isotopique lors de la purification (ce qui complique la méthode).

Bibliographie

- [1] Franchomme, "Aromatherapie exactement", livre quatrième. Ed. Roger Jollois (1995)
- [2] CO_2 Le supercritique une technologie d'extraction de fracet tionnement en fort développement, société hitex. septembre 2007 ://www.gazettelabo.fr/archives/pratic/2007/124hitex.htm. Consultation août 2012.
- [3] S.Lavoine, Charabot SA, Journée CO₂ supercritique Toulouse, Novembre 2008.
- [4] J. Bruneton, "Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes Médicinales", 3e édition, éditions TEC&DOC (1999).
- [5] S.V. Bhat, B.A. Nagasampagi, M.Sivakumar, "Chemistry Of Natural Product", 1ère édition, Ed. Springer-Narosa (2005).
- [6] P. Stremple. "GC/MS Analysis of Polymethoxyflavones in Citrus Oils" J. High. Resol. Chromatogr. 21 (1998): 587
- [7] E.M. Gaydou, J.P Bianchini, and R.P randriamiharisoa. "Orange and Mandarin Peel Oils Differentiation Using Polymethoxylated Flavone Composition", J. Agric. Food. Chem. 35 (1987): 525-529.
- [8] P.P. Mouly, E.M. Gaydou, C.Arzouyan. "Separation and Quantitation of Orange Juices using Liquid Chromatography of PMF", Analusis 27 (1999): 287
- [9] W.C. Ooghe, S.J. Ooghe, C.M. Detavernier, A.Huyghebaert. "Characterisation of Orange Juice (citrus sinensis) by PMF", J. Agric. Food Chem. 42 (1994): 2191
- [10] G. Gattuso, D. Barreca, C. Garguilli, U. Leuzzi, C. Caristi. "Flavonoid Composition of Citrus Juice (review)." Molecules 12 (2007): 1647.
- [11] W.C. Ooghe, C.M. Detavernier. "Detection of the Addition of Citrus Reticulata and Hybirds to Citrus Sinensis by Flavonoid", J. Agric. Food Chem. 45 (1997): 1633
- [12] S.V. Ting, R.L Rouseff, M.H. Dougherty, J.A. Attaway, "Determination of some PMF in Citrus Juice by HPLC" J. Food sci. 44 (1979): 69.

[13] E. M. Gaydou, T. Berahia, J-C. Wallet and J-P. Bianchini. "Short Communication Gas Chromatography of some Polymethoxylated Flavones and their Determination in Orange Peel Oils", J. Chromatogr. 549 (1991): 440-445.

- [14] "Rapid LC-TOFMS Analysis and Qualitive Comparison of Oxygen Heterocyclic Compounds in Citrus Essential Oils", Leco Separation Science Application note.
- [15] P. Dugo, L. Mondello, L. Dugo, R. Stancanelli, G. Dugo, "LC-MS for the Identification of Oxygen Heterocyclic Compounds in Citrus Essential Oils", J. Pharm. Biomed. Anal. 24 (2000): 147-154.
- [16] P. Dugo, C. Ragonese, M. Russo, D. Sciarrone, L. Santi, A. Cotroneo, L. Mondello, "Sicilian Lemon Oil: Composition of Volatile and Oxygen Heterocyclic Fractions and Enantiomeric Distribution of Volatile Components", J. Sep. Sci. 33 (2010): 3374-3385.
- [17] G. Dugo, K.D. Bartle, I. Bonaccorsi, M. Catalfamo, A. Cotroneo, P. Dugo, G. Lamonica, H. McNair, L. Mondello, P. Previti, I. Stagno d'Alcontres, A. Trozzi, A. Verzera, "Avanced Analytical Techniques for the Analysis of Citrus Essential Oils, part 3 : Oxygen heterocyclic compounds", Essenze Derivati Agrumari, 69 (1999) : 251-283.
- [18] P. Dugo, L. Mondello, E. Cogliandro, I. Stagno d'Alcontres and A. Cotroneo. "On the Genuineness of Citrus Essential Oils. Part XLVI Polymethoxylated Flavones of the Non-volatile Residue of Italian Sweet Orange and Mandarine Essential Oils", Flavour Fragr. J. 9 (1994): 105-111.
- [19] G.P. Rizzi and S.S. Boeing, "Mass Spectral Analysis of Some Naturally Ocurring Polymethoxyflavones", J. Agric. Food Chem. 32 (1984): 551-555.
- [20] P. Dugo, L. Mondello, E. Sebastiani, R. Ottanà, G. Errante, G. Dugo, "Identification of Minor Oxygen Heterocyclic Compounds of Citrus Essential Oils by Liquid Chromatographie-Atmospherique Pressure Chemical Ionisation Mass spectrometry", J. Liq. Chromatogr. R. T. 22(19) (1999): 2991-3005
- [21] P. Dugo, L. Mondello, I. Stagno d'Alcontres, A. Cavazza and G. Dugo, "Oxygen Heterocyclic Compounds of Citrus Essential Oils", Perfumer & Flavorist, 22 (1997): 25-30.
- [22] D. McHale and J.B. Sheridan. "Detection of Adulteration of Cold Pressed Lemon Oil", Flavour Fragr. J. 3 (1988).
- [23] G. Dugo et K.D. Bartle, I. bonaccorsi , M. Catalfamo, A. Cotroneo , P. Dugo, G. Lamonica , H.M. McNair , L. Mondello, P. Previti , I. Stagno D'alcontres , A. Trozzi, "Advanced Analytical Techniques for the Analysis of Citrus. Part 3. Oxygen Heterocyclic Compounds: HPLC, HPLC/MS, OPLC, SFC, Fast HPLC analysis.", Essenze Derivati Agrumari 69 (1999): 251-283.

[24] C.O. Green, A.O. Wheatley, A.U. Osagie, E.Y. St A Morrison, H.N. Asem Russoota "Determination of Polymethoxylated Flavones in Peels of Selected Jamaican and Mexican Citrus (*Citrus spp.*) Cultivars by High-Performance Liquid Chromatography", Biomed. Chromatogr. 21(1) (2007): 48-54.

- [25] P. Dugo, I. Bonaccorsi, C. Ragonese, M. Russo, P. Donato, L. Santi and L. Mondello, "Analytical Characterization of Mandarin (*Citrus deliciosa Ten.*) Essential Oil", Flavour Fragr. J., 26 (2011): 34-46.
- [26] R.S. Cahn, C.K. Ingold et V. Prelog 1956 The Specification of Asymmetric Configuration in Organic Chemistry Experimentia, 12 (1956): 81-94.
- [27] G. Remaud, S. Akoka, G. Champion. "L'isotope traceur d'origine : distribution isotopique dans les composés naturel" http://culturesciences.chimie.ens.fr (2004). Consulté en juin 2012.
- [28] M.H. O'Leary. "Carbon Isotopes in Photosynthesis", Bioscience 38 (5) (1988): 328-335.
- [29] M.H. O'Leary, S. Madhavan and P. Paneth, "Physical and Chemical Basis of Carbon Isotope Fractionation in Plants", Plant. Cell. Environ. 15 (1992): 1099-1104.
- [30] G.J. Martin and M.L. Martin, "Climatic Significance of Isotope Ratios" Phytochemistry Reviews 2 (2003): 179-190.
- [31] E. Deléens, A. Ferhi, O.Queiroz. "Carbon Isotope Fractionation by Plants Using the C4 Pathway." Physiol. Veg. 21.5 (1983): 897-905.
- [32] M. Calvin, "The Photosynthetic Cycle", Bull. Soc. Chim. Biol. 38 (11) (1956): 1233–1244.
- [33] M. D. Hatch and C. R. Slack, "Photosynthesis by Sugar-Cane Leaves", Biochem. J. 101 (1966): 103–111.
- [34] C.B. Osmond "Crassulacean Acid Metabolism: a Curiosity in Context", Annu. Rev. Plant Phys. 29 (1978): 379–414.
- [35] C. Keeling. "The Concentration and Isotopic Abundances of Carbon Dioxide in Rural and Marine Air." Geochim. coschim. Acta 24 (1961): 277-298.
- [36] H. Craig "Carbon-13 in Plants and the Relationships between Carbon-13 and Cabon-14 Variations in Nature," J. Geol. 62 (1954): 115-159.
- $[37]\,$ M.H. O'Leary " Carbon Isotope Fractionation in Plants", Phytochemistry 20 (1981) : 553-567.
- [38] S.D. Kelly, K.D. Heaton, P. Brereton "Deuterium/Hydrogen Isotope Ratio measurment of Water and Organic Samples" Rapid Communications in Mass Spectrometry 15 (2001): 1283-1286.

[39] A. Mariotti, "Atmospheric Nitrogen is a Reliable Standard for Naturel ¹⁵N Abundance Measurements", Nature 303 (1983): 685-687.

- [40] C.C. Delwhiche; P.L. Teyne "Nitrogen Isotope Fractionation in Soil and Microbial Reactions" Environ. Sci. Technol. 4 (1970): 929-935.
- [41] G.B. Shearer, D.H. Kohl, B. Commoner, "The Precision of Determination of the Natural Abundance of Nitrogen 15 in Soils", Fertilizers and Shelf Chem. Soils Sci. 118 (1974): 308-316.
- [42] T. Yoneyama, T. Omata, S. Nakakta, J. Yakazi, "Fractionation of Nitrogen Isotopes during the Uptake and Assimilation of Ammonia by Plants", Plant Cell. Physiol. 32 (1991):1211-1217.
- [43] S. Faulhaber, U. Hener, A. Mosandl, "GC/IRMS analysis of Mandarin essential oil.1 Delta¹³C_{pdb} and Delta¹⁵N_{air} values of N-methyl anthranilate de methyl", J. Agric. Food Chem. 45 (1997): 2579-2583.
- [44] R. Huet, "Les Huiles Essentielles d'Agrumes" Fruit, 46 (5) (1991): 551-574.
- [45] M.E. Lucchesi, "Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes Conception et Application à l'extraction des huiles essentielles", thèse de doctorat en chimie de l'université de la Réunion, 2005.
- [46] M.E Lucchesi, F. Chemat, J.Smadja, "Solvent-Free Extraction of Essential Oil From Aromatics Herbs: Comparison With Conventional Hydro-distillation", J. Chromatogr. A 1043 (2004): 323-327.
- [47] M.E. Lucchesi, F.Chemat and J. Smadja, "An Original Solvent Free Microwave Extraction of Essential Oils From Spices", Flavour Fragr. J. 19 (2004): 134-138.
- [48] shttp://www.exchem.fr/introduction a extraction.htm. Consulté en juillet 2012.
- [49] C.SCHWARTZ, http://culturesciences.chimie.ens.fr/printpdf/886. Consulté en juillet 2012.
- [50] M.Ziegler and Günter Ziegler, "A Different Aging Model for Orange Deterioration Products", J. Essent. Oil. Res. (1991).
- [51] C. Grenier. "Méthodes Analytiques Fines Appliquées au Contrôle Qualité des Matières Premières Aromatiques." Thèse de doctorat, Ecole doctorale de chimie de l'université Claude Bernard Lyon 1, 2000.
- [52] M.J Garnero, "Problèmes rencontrés au cours de l'études de la composition chimique des huiles essentielles" Parfums, cosmétiques, arômes, 14 (1977), 31.
- [53] Dieckman, "Autooxydation of Myrcene" J. Agric. Food Chem. 22 (3) (1974).

[54] G. Dugo, "The Composition of The Volatile Citrus Essential oils", Perfumer & Flavorist 19 (1994)

- [55] J.F. Morton. "Fruits of Warm Climates." published by J. Morton 1987.
- [56] T. Burfield. "the Adulteration of Essential Oils and the Consequences to Aromatherapy & Natural Perfumery Practice", Institute for complementary Medicine Journal (2003).
- [57] G. Dugo, G. Lamonica, A.Cotroneo, I.Stagno D'alcontres, A. Verzera, M.G. Donato et P.Dugo. "High Resolution Gas Chormatography for Detection of Adulterations of Citrus Cold-Pressed Essential Oils Dugo", Perfumer & Flavorist 14 (1992): 57-65.
- [58] P.Q. Tranchida, I. Bonaccorsi, P. Dugo, L. Mondello, G. Dugo, "Analysis Of Citrus Essential Oils: State Of The Art And Future Perspectives. A Review, Flavour Fragr. J. 27 (2012): 98-123.
- [59] G. Dugo, P. Quinto Tranchida, A. Cotroneo, "Advanced and Innovative Chromatographic Techniques for the Study of Citrus Essential Oils", Flavour Fragr. J. 20 (2005): 249-264.
- [60] M.H. Boelens, "Critical Review on the Chemical Composition of Citrus Oil", Perfumer & Flavorist 26 (1991).
- [61] A. Verzera, G. La Rosa, M. Zappalà and A. Cotroneo, "Essential oil Composition of Different Cultivars of Bergamot Grown in Sicily", Ital. J. Food Sci. 12 (4) (2000): 493-501.
- [62] M. Ahmed, M.L. Arpaia, R.W. Scora, "Seasonal Variation in Lemon (Citrus limon L.Burm.f) Leaf and Rind Oil Composition." J. Essent. Oil Res. 13 (2001): 149-153.
- [63] W.L. Stanley, R.C. Linwall and S.H. Vannier, "Specific Quantitative Colorimetric Method of Analysis for Citral in Lemon oil" J. Agric. Food Chem. 11 (6) (1958): 858-860.
- [64] L. Schipilliti, P. Dugo, I. Bonaccorsi, "Authenticity Control on Lemon Essential Oils Employing Gas Chromatography-Combustion-Isotope Ratio Mass Spectrometry (GC-C-IRMS)", Food Chem. 131, (2012): 1523-1530.
- [65] B.M. Lawrence, "Progress in Essential Oils" Perfumer & Flavorist, 30 (2005).
- [66] S.B. Mitiku, M.Sawaruma, S.M. Njirige et H. Koaze. "Analytical Discrimination of the Cold-Pressed Oils of Mandarins and their Hybrids", J. Essent. Oil Res. 14 (2002): 196-202.
- [67] B.M. Lawrence et R.J. Reynolds tobacco company. "Progress in Essential Oils: Mandarin Oil." Perfumer & Flavorist 21 (1996): 25-28.
- [68] A-L. Fanciullino, F. Tomi, F.Luro, J-M Desjobert and J.Casanova "Chemical Variability of Peel and Leaf Oils of Mandarins", Flavour Fragr. J. 21 (2006): 359-367.

[69] D. Sciarrone, L. Schipilliti, C. Ragonese, P.Q. Tranchida, P. Dugo, G. Dugo, L.T. Mondello, "Thorough Evaluation of the Validity of Conventional Enantio-Gas Chromatography in the Analysis of Volatile Chiral Compounds in Mandarin Essential Oil: A Comparative Investigation with Multidimensional Gas Chromatography", J. Chromatogr. A. 1217(7) (2010): 1101-5.

- [70] G. Dugo, M. Rouzet, A. Verzera, A. Cotroneo, I.R.Merenda "Composition de l'Huile Essentielle Italienne de Mandarine. La Pureté des Essences d'Agrumes NotaXXIV", Parfum. Cosmet. Arômes 93 (1990): 77-84.
- [71] C.D Frizzo, D.Lorenzo et E.Dellacassa. "Composition and Seasonal Variation of the Essential Oils from two Mandarin Cultivars of Southern Brazil" J. Agric. Food Chem. 52 (2004): 3036-3041.
- [72] S.I Kirbaslar, I.Boz, F.G. Kirbaslar "Composition of Lemon and Grapefruit Peel Oils" J. essent. Oil Res. 18(5) (2006): 525-543.
- [73] S.M. Njoroge, H. Koaze, P.N. Karanja, M. Sawamura, "Volatile Consituents of Redblush Grapefruit (citrus paradisi) and Pummelo (citrus grandis) peel essential oils from Kenya", J. Agric. Food Chem. 53 (2005).
- [74] A. Ortuno, and D. Garcia-Puig, M.D. Fuster, M.L. Pérez, F. Sabarater, I. Porras, A. Garcia-Lidon and J.A. Del Rio. "Flavonone and Nootkatone Levels in Different varieties of Grapefruit and Pummelo." J. Agric. Food Chem. 43 (1995).
- [75] M. Sawamura, S. Kuwahara, K-I Shichiri and T. Aoki, "Volatile Consitutents of Several Variaties of Pummelos and a Comparison of the Nootkatone Levels in Pummelos and Other Citrus Fruits" Flavour Fragr. J. 17 (3) (2002): 169-174
- [76] J.E. Simon, A.F. Chadwick and L.R. Cracker. "Herbs: An Indexed Bibliography" (1984).
- [77] R. Näf, A.F Morris, "Lavande et Lavandin: Une Analyse Comparative", Firmenich.
- [78] C.T. Hamdem. "The Scientific Literature on Selected Herbs, and Aromatic and Medicinal Plants of the Temperate Zone." Ed. Archon Books (1980).
- [79] P.J Mariott, R. Shellie, C. Corwell. "Gas Chromatography Technilogies for the Analysis of Essential Oils." J. chromatogr. A, 936 (2001): 1–22.
- [80] D. Lorient, J.C. Lhuguenot, A. Voilley. "Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries Agro-alimentaire: principe et technique des analyses", 2e édition, chp chromatographie, collection sciences et techniques agro-alimentaire, Ed. Lavoisier-TEC & DOC et apria (1991).
- [81] http://www.chem.agilent.com. Consulté en juillet 2012.

[82]Agilent Cross Lab works with BRUKER, PERKINELMER, SHIMADZU, AND THERMO SCIENTIFIC, MORE UI Crosslab liner brochure, http://www.chem.agilent.com/Library/brochures/Crosslab%20UI%20liner%20brochure.pdf.Consulté en 2012.

- [83] A. Harada, M. Furue, S-I. Nozakura, "Optical Resolution of Mandelic Acid Derivatives by Column Chromatography on Crosslinked Cyclodextrin Gels", J. of Polymer Sci 16(1) (1978): 189-196.
- [84] T. Beck, J-M Liepe, J Nandzik, S.Rohn, A. Mosandl. "Comparison of Different Di-tert-butyldimethyl-silylated Cyclodextrins as Chiral Stationary Phases in Capillary Gas Chromatography." J. High. Resol. Chromatogr. 23 (2000): 569-575.
- [85] A. Mosandl, "Enantioselective Capillary Gas Chromatography and Stable Isotope Ratio Mass Spectrometry in the Authenticity Control of Flavors and Essential Oils". Food Reviews Int. 11 (1995): 597-664.
- [86] W.A. König, D.Icheln, T. Runge, I. Pforr and A. Krebs. "Cyclodextrins as Chiral Stationary Phases in Capilllary Gas Ghromatography." J. High. Resol. Chromatogr. (1990).
- [87] B.S Middleditch. "Practical Mass Spectrometry: A Contemporary Introduction." 1ère édition, chp 1, éditon Plenum.
- [88] A.O. Nier, E.A. Gulbransen, "Variations in the Relative Abundance of the Carbon Isotopes", J. Am. Chem. Soc. 61 (1939): 697–698.
- [89] GV instrument. "Documentation appareillage."
- [90] H. Craig. "Isotopic Standards for Carbon and Oxygen and Correction Factors for Mass-Spectrometric Analysis of Carbon Dioxide." Geochimica et coschimica Acta 12 (1957): 133-149.
- [91] T.J. Brenna, T.N.Corso, H.J Tobias, R.J. Caimi, "High Precision Continuous-Flow Isotope Ratio Mass Spectrometry", Mass spectrometry Reviews 16 (1997): 227-258.
- [92] H.W Krueger, R.H Reesman. "Carbon Isotope Analyses in Food Technology" Mass Spectrometry Reviews 1 (1982): 205-236.
- [93] G. Blond, D. Simatos. "Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaire : principe et technique des analyses" 2e édition, chp analyse thermique, collection sciences et techniques agro-alimentaire, Ed. Lavoisier-TEC & DOC et apria (1991).
- [94] TA instrument. "Documentation appareillage."
- [95] D. Bertrand, P. Robert. "Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaire : principe et technique des analyses, chp Sectroscopie de reflexion dans le

- proche infra-rouge." 2e édition, chp Sectroscopie de reflexion dans le proche infra-rouge, collection sciences et techniques agro-alimentaire, Ed. Lavoisier-TEC & DOC et apria (1991).
- [96] P.Q. Tranchida, I. Bonnaccorsi, P. Dugo, L. Mondello, G. Dugo "Analysis of *Citrus* essential oils: state of the art and future perspectives. A review" Flavour Fragr. J, (2012), 27, 98-123
- [97] L.Paillat, "Application de la chromatographie plainaire haute performance (HPTLC) à l'analyse des substances naturelles complexes à destination des arômes, parfums et de la cosmétiques" thèse de doctorat de chimie moléculaire de l'Université de Nice-Sophia Antipolis, 2012.
- [98] S. Morgenthaler, "Introduction à la Statistique", 3e édition, Collection Enseignement des Mathématiques, Presses Polytechnique et Universitaire Romandes (2007).
- [99] Michel Tenenhaus, "La régression PLS: Théorie et pratique" 1e édition, ed. TECHNIP (1998)
- [100] M. Volle "Analyse de données" 3e éditions, Ed. Economica (1985)
- [101] A. Starrantino, G. Terranova, P.Dugo, I bonaccorsi and L. Mondello. " Chemical Characterization of the Essential Oil of New hybrids of Lemon Obtained in Sicily." Flavour Fragr. J. 12 (1997): 153-161.
- [102] G. Dugo, L. Mondello, A. Cotroneo, I. Bonaccorsi, G.Lamonica. "Enantiomeric Distribution of Volatile Components of Citrus Oils by MDGC", Perfumer & Flavorist 26 (2001): 20-35.
- [103] H. Casabianca et C. Chau. "Analyse Chirale des Principaux Constituants d'Huile de Bergamote" Actes des 16e journée internationales de huiles essentielles sous l'égide de la "Revista Italiana Eppos" (1997) : 45
- [104] A. Cotroneo, I. Stagno d'Alcontres and A.Trozzi, "On the Guenuineness of Citrus Essential Oils. Part XXXIV. Detection of Added Reconstituted Bergamot Oil in Genuine Bergamot Essential Oil By High Resolution Gas Chromatography with Chiral Capillary Columns" Flavour Frangr. J. 7 (1992): 15-17.
- [105] B. Nallet. "Développement de méthodes analytiques pour vérifier l'authenticité des huiles essentielles d'agrumes." Diplôme d'Etudes Supérieures Spécialisées (DESS), Université Lyon I, SCA-CNRS (2001).
- [106] H. Casabianca et J.B. Graff. "Le point sur l'analyse chirale du linalol et de l'acétate de linalyle dans diverses plantes." 14e journée internat. huile essentielle (1995) : 227.

[107] H. Schulz. "Application of Vibrational Spectroscopy Methods in Essential Oil Analysis." Perfumer & Flavorist 30 (2005).

- [108] S. Kuriakose, X. Thankappan, H. Joe and V. Venkataram. "Detection and Quantification of Adulteration in Sandalwood Oil though Near Infrared Spectroscopy", Analyst 135 (2010): 2676-2681.
- [109] U. Hener, R. Braunsdorf, O. Kreis, A. Dietrich, B. Maas, E.Euler, B. Schlag et A. Mosandl, "Chiral Compounds of Essential Oils. X: The Role of Linalol in the Origin Evaluation of essential Oil", Chem. Mikrobiol. Techol. Lebesm., 14 (1992): 129-133.
- [110] R. Agnel and P.Teisseire, "Essential Oil of French Lavender its Composition and its Adulteration", Perfumer & Flavorist, 9 (1984): 53.
- [111] L. Mondello, A. Verzera, P. Previti, F. Crispo, and G. Dugo, "Multidimensional capillary GC-GC for the Analysis of Complex Samples. 5. Enantiomeric Distribustion of Monoterpene Hydrocarbons, Monoterpene Alcohols and Linanlyl Acetate of Bergamot oils" J. Agric. Food Chem. 46 (10), 1998: 4275–4282.
- [112] D. Juchelka and A. Mosandl, "Authencity Profiles of Bergamot Oils", Pharmazie 51 (1996).
- [113] C. Mangiola, E. Postorino, F. Gionfriddo, M. Catalfamo, R. Mangarano, G. Calabro. "Evaluation of the Genuineness of Cold-pressed Bergamot Oil." Perfumer & Flavorist 34 (2009).
- [114] R. Costa, P. Dugo, M. Navarra, V. Raymo, G. Dugo, L. Mondello "Study on the Chemical Composition Variability of some Processed Bergamot Essential Oil", Flavour Fragr. J. 25 (2010).
- [115] H. Casabianca, J.B. Graff, V. Faugier, F. Fleig, C. Grenier, "Enantiomeric Distribution Studies of Linalol and Linalyl acetate", J. High. Resol. Chromatogr. 21 (1998).
- [116] H. Casabianca and J.B. Graff, "Separation of Linalyl Acetate Enantiomers: Application to the Authentication of Bergamot Food Products" J. High Resol. Chromatogr. 17 (1994): 184-186.
- [117] W.A. König, C. Fricke, Y. Saritas, B. Momeni, and G. Hohenfeld, "Adulteration or Natural Variability? Enantioselective Gas Chromatography in Purity Control of Essential Oils" J. High Resol. Chromatogr. 20 (1997): 55-61.
- [118] L. Mondello, M. Catalfamo, A. Cotroneo, G. Dugo, "Multidimensional Capillary GC-GC for the Analysis of Real Complex Samples" J. High Resol. Chromatogr. 22 (1999): 350-356.

[119] P. Dugo, C. Ragonese, M. Russo, D. Sciarrone, L. Santi, A. Cotroneo, L. Mondello. "Sicilian Lemon oil: Composition of Volatile and Oxygen Heterocyclic Fractions and Enantiomeric Distribution of Volatile Components", J. Sep. Sci., 33 (2010): 3374-3385.

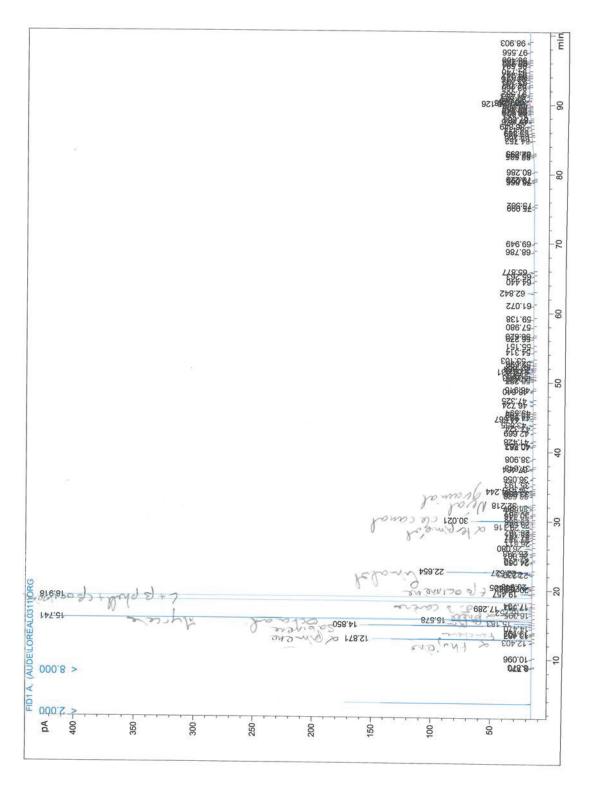
- [120] L. Schipiliti, P. Dugo, I. Bonaccorsi, L.Mondello, "Authenticity Control Lemon Essential Oils Employing Gas Chromatography Combustion-Isotope Ratio Mass Spectrometry (GC-C-IRMS)", Food Chem. 131 (2012): 153-1530.
- [121] K. Hör, C. Ruff, B. Weckerle, T. König, P. Shreier, "2H/1H Ratio Analysis of Flavor Compounds by On-line Gas Chromatography-Pyrolysis-Isotope Ratio Mass Spectrometry (HRGC-P-IRMS): Citral", Flavour Fragr. J. 16 (201): 344-348.
- [122] Thi Thran, "Analyses multi-isotopes (¹³C, ²H) par spectrométrie de masse des rapports isotopiques et analyses enantio-sélectives" Thèse de doctoral, Ecole doctorale de chimie de l'université Claude Bernard Lyon 1, 2006.
- [123] S.H. Vannier and W.L. Stanley, "Fluorometric Determination of 7-Geranoxycoumarin in Lemon Oil Analysis of Mixtures of Grapefruit Oil in Lemon Oil", J. of the A.O.A.C., 41 (2) (1958).
- [124] N.T. Minh Tu, L.X. Tanh, A. Une, H. Ukeda and M. Sawaruma, "Volatile Constituent of Vietnamese Pummelo, Orange, Tangerine and Lime Peel Oils" Flavour Fragr. J. 17 (2002): 169-174.
- [125] H. Merle, M. Moron, M. Amparo Blazquez, H. Boira "Taxonomical Contribution of Essential Oils in Mandarins Cultivars" Biochemical Systematics and Ecology 32 (2004): 491-497.
- [126] A. Verzera, L. Mondello, A. Trozzi and P. Dugo, "On the Guenuineness of Citrus Essential Oil. Part LII. Chemical Characterization of Essential Oil of three Cultivar of Citrus Clementine Hort", Flavour Fragr. J. 12 (1997): 163-172.
- [127] I. Bonaccorsi, P. Dugo, A. Trozzi, A. Cotroneo and G. Dugo, "Characterization of Mandarin (Citrus deliciosa Ten.) Essential Oil. Determination of Volatiles, Non-Volatiles, Physico-chemical Indices and Enantiomeric Ratios" Natural Product Communications 4 (11) (2009): 1595-1600.
- [128] G. Dugo, A. Verzera, A. Cotroneo, I. Stagno d'Alcontres, L. Mondello, K.D. Bartle. "Automated HPLC-HRGC: a Powerful Method for Essential Oil Analysis. part II. Determination of Enantiomeric Distribution of Linalol in Sweet Orange, Bitter Orange and Mandarin Essential Oils", Flavour Fragr. J. 9 (1994): 99-104.
- [129] S. Faulhaber, U. Hener and A. Mosandl, "GC/IRMS Analysis of Mandarin Essential Oils $2.\ \delta^{13}C_{PDB}$ Values of Characteristic Flavor Components", J. Agric. Food Chem. 45 (1997): 4719-4725.

[130] L. Schipilliti, P.Q. Tranchida, D. Sciarrone, M. Russo, P. Dugo, G. Dugo, L. Mondello "Genuiness Assessment of Mandarin Essential Oils Employing Gas Chromatography-Combustion-Isotope ratio Mass Spectrometry (GC-C-IRMS)", J. Sep. Sci. 33(4-5) (2010): 617-25.

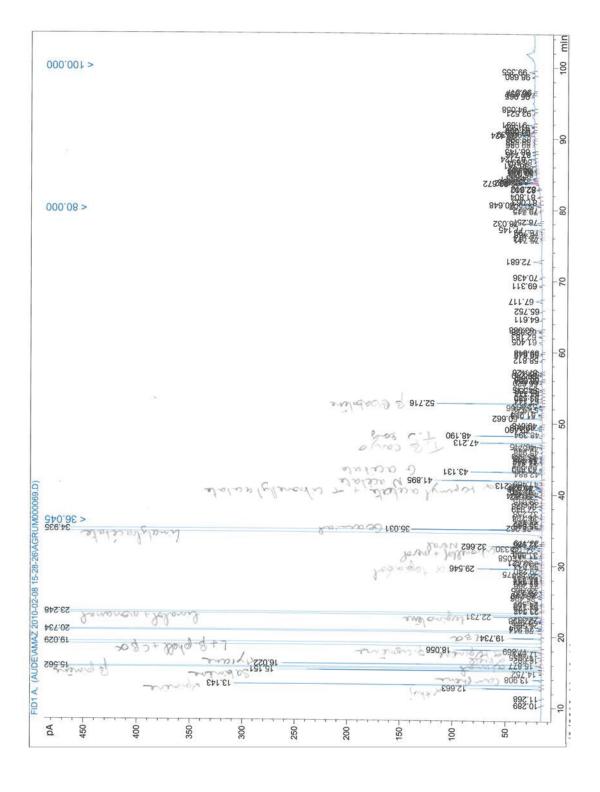
- [131] S.B. Solomon, M. Sawaruma, S.M. Njirige et H. Koaze. "Analytical Discrimination of the Cold-Pressed Oils of Mandarins and Their Hybrids" J. Essent. Oil Res. 14 (2002): 196-202.
- [132] S. Bilke, A. Mosandl, "Authenticity Assessment of Lavender Oils using GC-P-IRMS: ²H/¹H Isotope Ratios of Linalool and Linalyl Acetate", Eur. Food. Res. Technol. 214 (2002): 532-535.
- [133] P. Kreis and A. Mosandl "Chiral Compounds of Essential Oils Part XI. Simultaneous Stereoanalysis of Lavandula Oil Consituents", Flavour Fragr. J., 7 (1992), 187-193.
- [134] P. Schreier, A. Bernreuther, "Multidimensional Gas Chromatography/Mass Spectrometry: A Powerful Tool for the Direct Chiral Evaluation of Aroma Compounds in Plant Tissues. II. Linalool in Essential Oils and Fruits", Phytochem. Ana. 2 (1991), 167-170.
- [135] J. Jung, S. Sewenig, U. Hener, A. Mosandl, "Comprehensive Authenticity Assessment of Lavender Oils using Multielement/Multicomponent Isotope Ratio Mass Spectrometry Analysis and Enantioselective Multidimensional Gas Chromatography-Mass Spectrometry", Euro. Food Res. Technol. 220 (2005): 232-237.
- [136] A. Verzera, A. Trozzi, A. Cotroneo, D. Lorenzo, and E. Dellacassa, "Uruguyan Essential Oil. 12. Composition of Nova and Stasuma Mandarin Oils", J. Agric. Food Chem. 2000, 48, 2903-2909.

Annexes

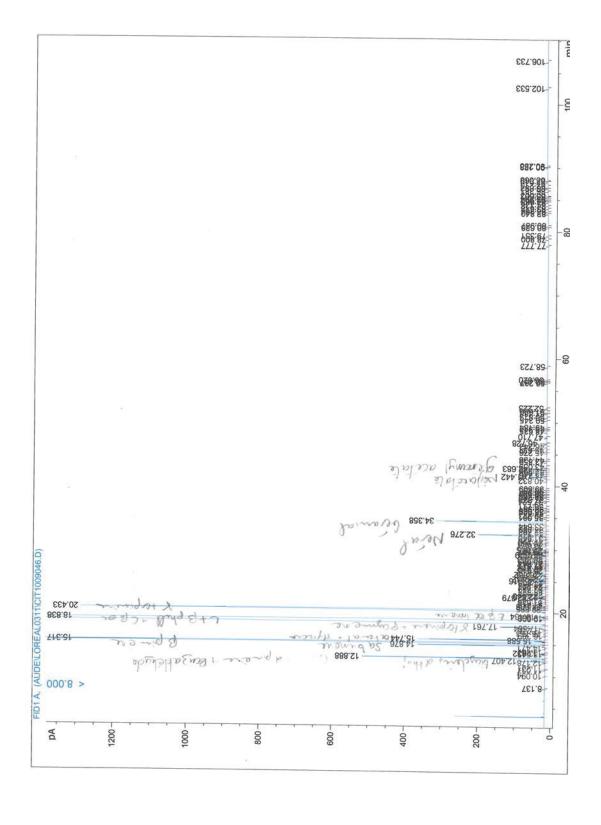
Annexe 1Profil chromatographique d'huile essentielle d'orange



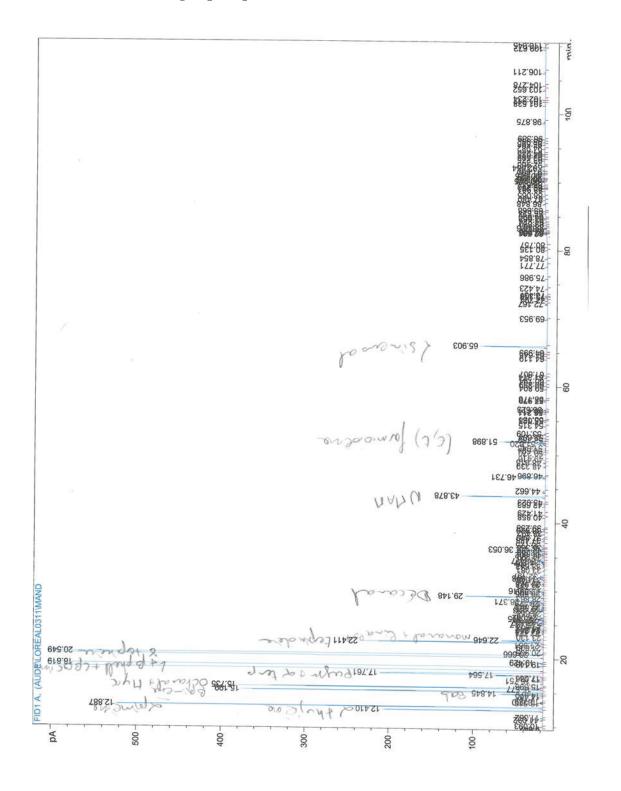
Profil chromatographique d'huile essentielle de bergamote



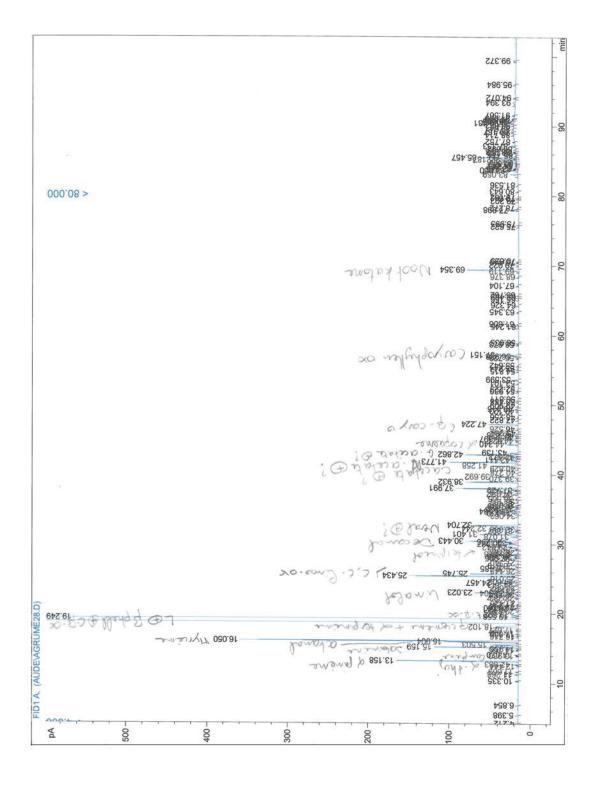
Profil chromatographique d'huile essentielle de citron



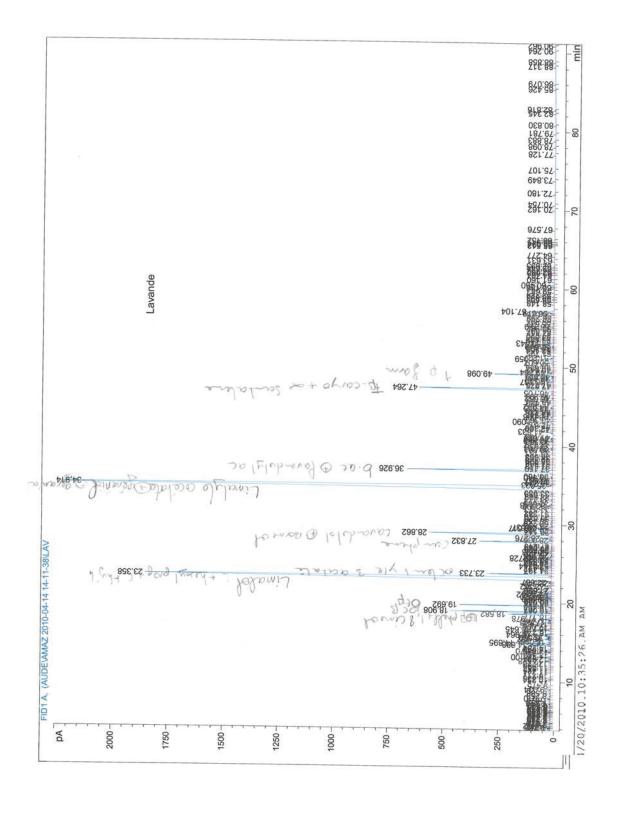
Profil chromatographique d'huile essentielle de mandarine



Profil chromatographique d'huile essentielle de pamplemousse

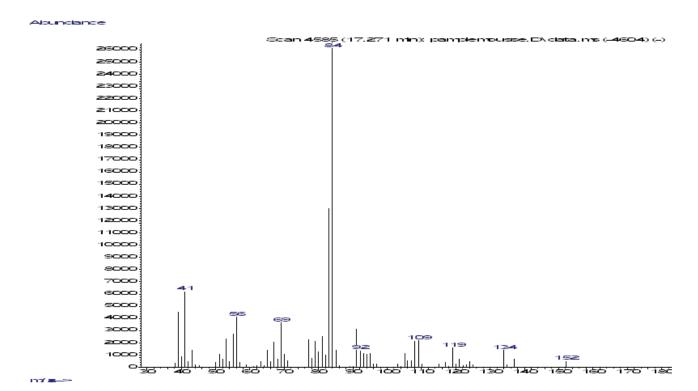


Profil chromatographique d'huile essentielle de lavande

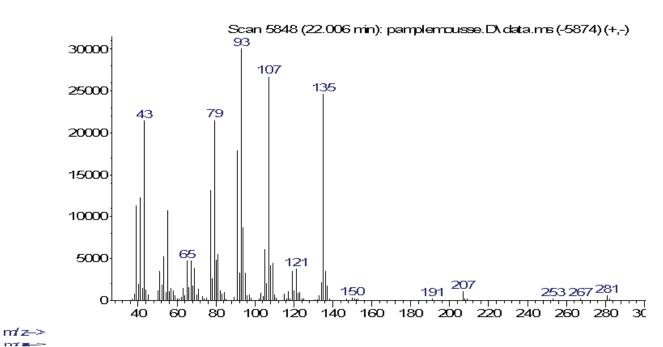


Annexe 2

Spectres de masses de molécules inconnues

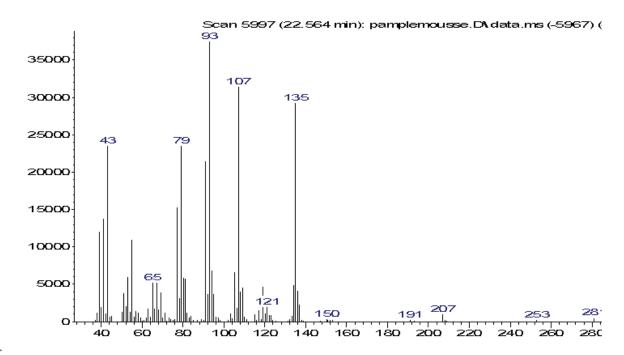


Abundance



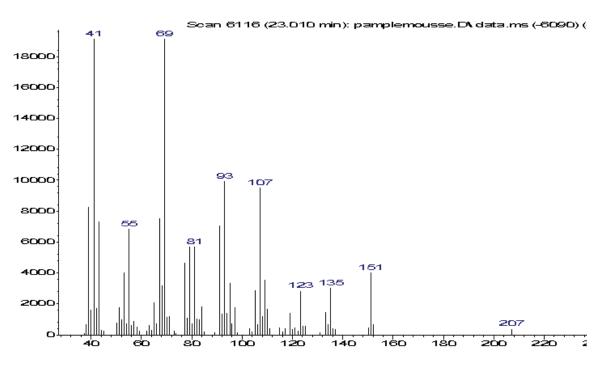
Spectres de masses de molécules inconnues (suite)

Abundance



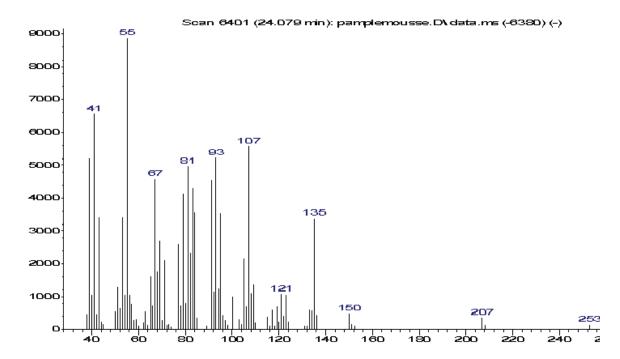
m/z–⇒

Abundance



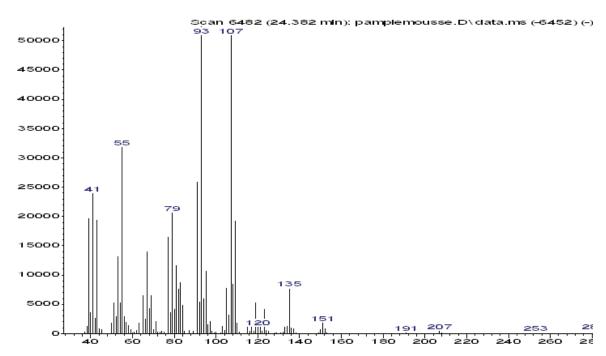
Spectres de masses de molécules inconnues (suite)

Abundance



m/z–>

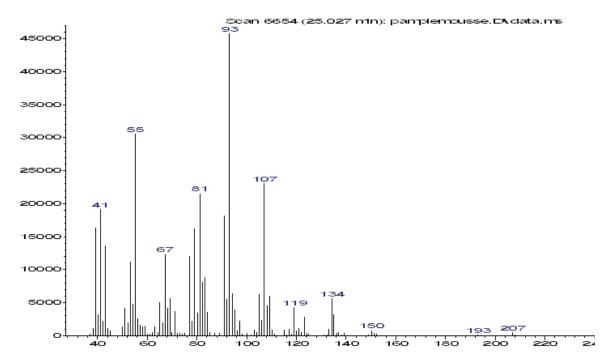
Abundance



m/ **z**-->-

Spectres de masses de molécules inconnues (suite)

Abundance



m**yz**----

Annexe 3

Principales molécules étudiées

sabinène	
ō-3-carène	
limonène	
γ-terpinène	
α-terpinéol	ОН
citronnellal	
linalol	OH OH
acétate de linalyle	

acétate de lavandulγle	
néral	
géranial	
acétate de néryle	H ₂ C H ₃ C H ₃ C
acétate de géranyle	
N-méthyle anthranilate de méthyle	H ₃ C NH