Développement de méthodes analytiques et de banques de données pour le contrôle de l'authenticité de métabolites secondaires actifs issus de plantes aromatiques et médicinales

Aurélien Cuchet

▶ **To cite this version:**

Aurélien Cuchet. Développement de méthodes analytiques et de banques de données pour le contrôle de l'authenticité de métabolites secondaires actifs issus de plantes aromatiques et médicinales. Chimie analytique. Université de Lyon, 2021. Français. NNT : 2021LYSE1102 . tel-03552349

HAL Id: tel-03552349

https://theses.hal.science/tel-03552349v1

Submitted on 2 Feb 2022

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 NNT : 2021LYSE1102

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° 206
Ecole Doctorale de Chimie (Chimie, Procédés, Environnement)

Spécialité de doctorat : Chimie Analytique
Discipline : Chimie

Soutenue publiquement le 14/06/2021, par :
Aurélien CUCHET

Développement de méthodes analytiques et de banques de données pour le contrôle de l'authenticité de métabolites secondaires actifs issus de plantes aromatiques et médicinales

---

Devant le jury composé de :

Dupuy, Nathalie	Professeure	Université d'Aix-Marseille	Rapporteur
Fernandez, Xavier	Professeur	Université Côte d'Azur	Rapporteur
Morell, Christophe	Professeur	Université de Lyon	Examinateur
Brunner, Gerhard	Ingénieur de recherche	Givaudan Suisse SA	Examinateur
Casabianca, Hervé	Ingénieur de recherche	CNRS	Directeur de thèse
Carénini, Elise	Responsable de laboratoire	Albert Vieille SAS	Co-encadrante
Jame, Patrick	Ingénieur de recherche	CNRS	Invité

Université Claude Bernard – LYON 1

Président de l'Université	M. Frédéric FLEURY
Président du Conseil Académique	M. Hamda BEN HADID
Vice-Président du Conseil d'Administration	M. Didier REVEL
Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. Philippe CHEVALLIER
Vice-Président de la Commission de Recherche	M. Jean-François MORNEX
Directeur Général des Services	M. Pierre ROLLAND

COMPOSANTES SANTE

Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directrice : Mme Anne-Marie SCHOTT
Faculté d'Odontologie	Doyenne : Mme Dominique SEUX
Faculté de Médecine et Maïeutique Lyon Sud - Charles Mérieux	Doyenne : Mme Carole BURILLON
Faculté de Médecine Lyon-Est	Doyen : M. Gilles RODE
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation (ISTR)	Directeur : M. Xavier PERROT
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques (ISBP)	Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA

COMPOSANTES & DEPARTEMENTS DE SCIENCES & TECHNOLOGIE

Département Génie Electrique et des Procédés (GEP)	Directrice : Mme Rosaria FERRIGNO
Département Informatique	Directeur : M. Behzad SHARIAT
Département Mécanique	Directeur M. Marc BUFFAT
Ecole Supérieure de Chimie, Physique, Electronique (CPE Lyon)	Directeur : Gérard PIGNAULT
Institut de Science Financière et d'Assurances (ISFA)	Directeur : M. Nicolas LEBOISNE
Institut National du Professorat et de l'Education	Administrateur Provisoire : M. Pierre CHAREYRON
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. Christophe VITON
Observatoire de Lyon	Directrice : Mme Isabelle DANIEL
Polytechnique Lyon	Directeur : Emmanuel PERRIN
UFR Biosciences	Administratrice provisoire : Mme Kathrin GIESELER
UFR des Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS)	Directeur : M. Yannick VANPOULLE
UFR Faculté des Sciences	Directeur : M. Bruno ANDRIOLETTI

REMERCIEMENTS

Ce document représente l'aboutissement de trois années passionnantes. J'ai eu le plaisir de rencontrer et de travailler avec de nombreuses personnes et je souhaite les remercier pour leur aide et leur soutien.

Je remercie avant tout les membres du jury pour avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse. Merci à Nathalie Dupuy et à Xavier Fernandez pour avoir rapporté mon manuscrit. Merci également à Gerhard Brunner et à Christophe Morell pour avoir participé à ma soutenance de thèse.

Je voudrais remercier Hervé Casabianca pour m'avoir accordé sa confiance durant ses trois années, pour m'avoir partagé sa passion et ses connaissances des produits naturels. Ensemble, nous avons découvert les fraudes les plus invraisemblables possibles et cela n'a pas toujours été simple !

Un grand merci également à Patrick Jame pour m'avoir co-encadré et pour m'avoir donné l'opportunité de travailler dans un parc analytique aussi varié. J'ai beaucoup apprécié de travailler dans une équipe aussi dynamique avec une très bonne ambiance.

J'exprime également ma gratitude envers la société Albert Vieille qui a financé ces travaux doctoraux (Bourse CIFRE) et qui est à l'origine de cette étude. Je remercie tout particulièrement Elise Carénini pour m'avoir permis de travailler sur ce projet aussi passionnant. Je remercie également Marine Guillemain pour son accompagnement durant ces trois ans. Merci aussi à Eli Wilson et à Morgane Delaporte pour les échanges hebdomadaires que nous avons pu avoir lors des réunions R&D. Un grand merci également à Sèverine Dupuy et à Gaëlle Guedes Mendes de l'équipe CQ pour leurs sollicitations régulières qui ont alimenté ma thèse à travers de nombreux projets variés et pour les envois de centaines d'échantillons qui ont permis d'aboutir à des résultats aussi intéressants.

Cette thèse n'aurait pu aboutir sans l'aide précieuse d'Anthony Anchisi, qui m'a apporté son expertise au laboratoire au quotidien. Merci aussi pour tous les moments partagés après le boulot. J'espère que nous pourrons continuer ces bonnes habitudes !

Merci également à mon collègue de bureau, Frederic Schiets, pour m'avoir accompagné dans mes projets durant ces trois années. Son implication et ses conseils m'ont beaucoup apporté tout au long de mon travail.

Je remercie également toutes les autres membres des équipes Isotopie & Organique et Produits Naturels & Biosourcés pour leur bonne humeur quotidienne : Xavier Saupin, Erik Bonjour et Patrice Saint Martin. Ce fut un plaisir de travailler dans une ambiance aussi agréable ! Un grand merci

également à tous les stagiaires qui ont contribué sur ce projet : Noémi Martel, Kelvin Terry Tse On Fat et Jessica Nguyen.

Ces travaux ne seraient rien sans les collaborations que nous avons pu avoir au sein de l'ISA et avec d'autres laboratoires. Un grand merci à Christine Oberlin et à Jean-Claude Lefèvre pour leur aide précieuse sur les analyses du radiocarbone ; Philippe Telouk pour m'avoir permis de travailler sur un couplage aussi innovant que le GC-MC/ICP-MS ; François Fourel avec qui j'ai eu le plaisir de travailler sur des matières qui n'étaient pas toujours agréables olfactivement ; Yohann Clément et Pierre Lantéri pour leur accompagnement sur les analyses chimiométriques ; Anne Bonhommé et Marie Martin pour leur aide sur les analyses spectroscopiques ; ainsi que Guy Raffin pour m'avoir permis de travailler en analyse thermogravimétrique.

Je remercie également toutes les autres personnes que j'ai pu rencontrer durant ces trois années à l'ISA ou à Albert Vieille. Merci à Alexandre, Julien, Martin, Marie H, Gaëlle, Maï, Dimitri, David, Himaiji et Vincent pour les moments partagés lors d'un café au 1er étage, autour d'un verre après le boulot, ou pendant les sessions quiz du Kelly's avec les Loutres !

Merci à Maman, Papa, Elise et Léa pour m'avoir supporté et soutenu durant toutes ses années, et particulièrement pendant la période de rédaction. Merci à ma famille et à mes amis. Enfin merci à Mina pour son soutien moral au quotidien depuis un an.

Pour terminer, j'ai une pensée pour mes grands parents, et tout particulièrement pour Mamie Irène à qui je dédie ce manuscrit.

RÉSUMÉ

Développement de méthodes analytiques et de banques de données pour le contrôle de l'authenticité de métabolites secondaires actifs issus de plantes aromatiques et médicinales

Les matières naturelles aromatiques, telles que les huiles essentielles, que l'on retrouve sur le marché, ne sont pas toujours authentiques, bien que ces produits soient vendus comme étant 100% purs et naturels. Certains fournisseurs fraudent leurs produits afin de réduire les coûts de production, d'améliorer la qualité des huiles essentielles ou encore pour augmenter artificiellement les volumes de production. Les huiles essentielles sont adultérées en ajoutant des produits à moindre coût, incluant des matières naturelles moins chères et des molécules d'origine pétrochimique. Des méthodes d'authentification appropriées sont nécessaires pour contrôler la naturalité et la pureté des huiles essentielles. La détermination des ratios isotopiques stables et l'analyse énantiosélective de composés spécifiques, associées à la recherche de traces de précurseurs de synthèses, permettent d'authentifier de nombreuses huiles essentielles (gaulthérie, alliacées, néroli, menthe crépue, cannelle et cypriol). Le contrôle de ces produits naturels requiert l'établissement de banques de données, constituées d'échantillons parfaitement tracés pour l'authenticité de leurs origines. La méthodologie mise en place a permis de développer de nouveaux outils pertinents pour l'authentification, comprenant le développement de l'analyse isotopique de composés ciblés pour la mesure du $\delta^{18}O$ et du $\delta^{34}S$, et d'identifier de nouvelles fraudes, comprenant les ajouts de composés enrichis en ^{14}C et les molécules issues d'hémisynthèses.

Mots clés : Huile essentielle, authentification, naturalité, spectrométrie de masse des rapports isotopiques, analyses énantiomériques

Development of analytical methods and data banks to control the authenticity of actives secondary metabolites from aromatic and medicinal plants.

Natural raw materials are sometimes susceptible to be adulterated: essential oils sold to consumers do not always possess their original compositions, despite of being labeled 100% pure and natural. Suppliers resort to adulterate their products by adding low-cost products to their natural materials to improve the product quality, to increase the raw material volume, or for economic reasons. Thus, it is necessary to develop methods of authentication to identify such practices in order to empower consumers to be sure of the natural quality of their purchases and to enable suppliers to prove the authenticity of their products. Enantiomeric analyses, isotopic studies, and impurities researches are the three main axes of this thesis project and are applied to authenticate essential oils of wintergreen, allium species, neroli, spearmint, cinnamon, and cypriol. To ensure the authenticity of these natural products, it is critical to provide reference values useful to characterize adulteration. Therefore, in addition to analytical development, establishment of data banks based on authentic samples from various origins is also required. Accurate methods are needed to validate essential oil authenticity in commercial market rampant with fraudulent products. Companies must strictly regulate their supply chain to ensure authenticity, brand trust, and perceived value for the price. Novel methodologies were carried out, including compound specific isotope ratios $\delta^{18}O$ and $\delta^{34}S$ determination. Complex adulterations were highlighted, comprising ^{14}C-labeled molecules and hemisynthesis origin products additions.

Keywords : Essential oil, authentication, naturalness, isotope ratio mass spectrometry, enantiomeric analyses

LISTE DES PRINCIPALES ABREVIATIONS

$\delta^{2}H$	Ratio isotopique $^{2}H/^{1}H$ exprimé en ‰ par rapport au standard international V-SMOW
$\delta^{13}C$	Ratio isotopique $^{13}C/^{12}C$ exprimé en ‰ par rapport au standard international V-PDB
$\delta^{18}O$	Ratio isotopique $^{18}O/^{16}O$ exprimé en ‰ par rapport au standard international V-SMOW
$\delta^{34}S$	Ratio isotopique $^{34}S/^{32}S$ exprimé en ‰ par rapport au standard international V-CDT
BSIA	Analyse isotopique stable globale
C3	Voie métabolique de fixation du carbone dans le cycle de Calvin
C4	Voie métabolique de fixation du carbone dans le cycle de Hatch and Slack
CAM	Métabolisme acide crassulacéen
CSIA	Analyse isotopique stable de composés spécifiques
DAD	Détecteur UV à barette de diodes
EA-C/P-IRMS	Analyseur élémentaire couplé en combustion / pyrolyse avec un IRMS
Enantio-GC	Chromatographie en phase gazeuse utilisée pour la séparation énantiomérique
ESI	Ionisation par electrospray
FAME	Ester méthylé d'acide gras
FID	Détecteur à ionisation de flamme
FTIR	Spectroscopie Infra Rouge à transformée de Fourier
GC	Chromatographie en phase gazeuse
GC-C/P-IRMS	Chromatographie en phase gazeuse couplée en combustion / pyrolyse avec un IRMS
GC-MS	Chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse
HE	Huile essentielle
HPLC	Chromatographie liquide à haute pression
HV	Huile végétale
IAEA	Agence Internationale de l'Energie Atomique
IAEACH7	Feuille de polyéthylène - référence internationale de calibration V-PDB et V-SMOW
IAEA601	Acide benzoïque - référence internationale de calibration par rapport au V-SMOW
IRMS	Spectrométrie de masse des rapports isotopiques
LDA	Analyse linéaire discriminante
LSC	Comptage à scintillation liquide
MC-ICP-MS	Spectromètre de masse à multi-collection à plasma couplé à induction
MDGC	Chromatographie en phase gazeuse multi-dimensionnelle
MS	Spectrométrie de masse
m/z	Rapport masse sur charge

NIR	Spectroscopie du proche infrarouge
PCA	Analyse en composantes principales
PLS	Régression linéaire des moindres carrées
PLS-DA	Régression linéaire des moindres carrées – analyse discriminante
OPLS-DA	Régression orthogonale des moindres carrées
SD	Ecart type
SIM	Selecting Ion Monitoring
SNIF-NMR	Fractionnement isotopique naturel spécifique par résonance magnétique nucléaire
TCD	Détecteur à conductivité thermique
TGA	Analyse thermogravimétrique
TGA-FTIR	Analyse thermogravimétrique FTIR
TIC	Total Ion Current
USGS40	Acide-L-glutamique utilisé comme référence internationale de calibration du V-PDB
UV	Ultra-violet
V-CDT	Vienna-Canyon Diablo Troilite - Référence internationale de normalisation pour l'échelle $\delta^{34}S$
V-PDB	Vienna-Pee Dee Belemnite – Carbonate fossile utilisé comme référence internationale de normalisation pour l'échelle $\delta^{13}C$
V-SMOW	Vienna-Standard Mean Ocean Water – Référence internationale de normalisation pour l'échelle $\delta^{2}H$ et $\delta^{18}O$

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION GENERALE 21

CHAPITRE 1 – ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE 25

GENERALITES SUR LES HUILES ESSENTIELLES 26

1. Définitions 26

2. Procédés d'obtention 27

2.1. Procédés par distillation 27

2.1.1. Entraînement à la vapeur d'eau 27

2.1.2. Hydrodistillation 28

2.2. Expression à froid 29

2.3. Extraction par solvant 30

2.3.1. Description 30

2.3.2. Extraction par fluide supercritique CO_2 31

3. Notions de chimie végétale 32

3.1. Phénylpropanoïdes et aromatiques 32

3.2. Terpènes et terpénoïdes 34

4. Contrôle d'une huile essentielle 37

4.1. Etat de l'art des référentiels existants 37

4.2. Méthodes analytiques de références 39

4.2.1. Analyses sensorielles 39

4.2.2. Analyses physico-chimiques 40

4.2.3. Analyse par chromatographie en phase gazeuse 40

L'ADULTERATION DES MATIERES PREMIERES AROMATIQUES 44

1. Définition de la pureté et de la naturalité 44

2. Les différentes adultérations 44

3. Mise en évidence de l'adultération 46

3.1. Marqueurs d'ajouts 46

3.2. Analyse de chiralité 47

3.2.1. Principe de la chiralité 47

3.2.2. L'analyse de la chiralité par chromatographie gazeuse 49

3.2.3. Analyses énantiomériques par GC Multidimensionnelle - Principe du Heart Cutting 51

3.2.4. Applications des analyses énantiomériques pour l'authentification 53

3.3. Analyses des isotopes 60
3.3.1. Etude des isotopes stables 60
3.3.2. Analyse du radiocarbone ^{14}C 87
3.4. Traitement des données par chimiométrie 89

CHAPITRE 2 - MISE EN ÉVIDENCE D'AJOUT DE SYNTHÈSE DANS DES EXTRAITS AROMATIQUES PAR ANALYSE ISOTOPIQUE GLOBALE 91
INTRODUCTION 92
ETUDE DE L'HUILE ESSENTIELLE DE GAULTHERIE 93
Authentication of the naturalness of wintergreen (Gaultheria genus) essential oils by gas chromatography, isotope ratio mass spectrometry and radiocarbon assessment 94
ETUDE DE L'ABSOLUE DE FÈVE TONKA 113
1. Introduction 113
2. Matériels et méthodes 114
2.1. Echantillons 114
2.2. Préparation des échantillons 115
2.3. Coumarines de synthèse 115
2.4. Analyse des échantillons 116
2.4.1. Analyse des extraits par HPLC-DAD et HPLC-MS 116
2.4.2. Analyse isotopique des coumarines par EA-C/P-IRMS 116
3. Résultats et discussion 117
3.1. Etude de la composition des extraits par HPLC-DAD 117
3.1.1. Caractérisation 117
3.1.2. Quantification 118
3.2. Analyses des isotopes stables 119
3.2.1. Etude de l'influence du solvant d'extraction de l'absolue 119
3.2.2. Tableau de données 120
3.2.3. Adultération d'échantillons 122
3.2.4. Coumarines issues d'autres origines botaniques 124
CONCLUSION 125

CHAPITRE 3 - ETUDES DES HUILES ESSENTIELLES CONSTITUEES DE COMPOSES ORGANOSULFURES PAR APPROCHE MULTI-ISOTOPES GLOBALE ET MULTI-COMPOSES 127

INTRODUCTION 128

1. Contexte 128

2. L'analyse ciblée du $\delta^{34}S$ par GC/MC-ICP-MS 129

3. Le genre Allium 131

ETUDE DES HUILES ESSENTIELLES RICHES EN ORGANOSULFURES DE TYPE ALKYLE 133

Multi-element (13C, 2H and 34S) bulk and compound-specific stable isotope analysis for authentication of Allium species essential oils 137

CONCLUSION 157

CHAPITRE 4 - EMPREINTES ISOTOPIQUES ET ENANTIOMERIQUES DES HUILES ESSENTIELLES : APPLICATION A L'HUILE ESSENTIELLE DE NEROLI 159

INTRODUCTION 160

ETUDE DE L'HUILE ESSENTIELLE DE NEROLI 161

Multi-element (13C, 2H and 34S) bulk and compound-specific stable isotope analysis for authentication of Allium species essential oils 164

CONCLUSION 182

CHAPITRE 5 - DEVELOPPEMENT DE METHODOLOGIES COMPLEMENTAIRES δ18O EN GC-P-IRMS POUR LA MISE EN EVIDENCE D'ADULTERATIONS COMPLEXES 183

INTRODUCTION 184

DÉVELOPPEMENT DU COUPLAGE GC-P-IRMS POUR LA MESURE DU δ18O 186

1. Etat de l'art – Etude générale de la technique 186

2. Présentation de l'instrumentation GC-P-IRMS pour l'analyse du $\delta^{18}O$ 187

APPLICATIONS 189

1. Etude de l'huile essentielle de menthe crépue 189

1.1. Contexte 189

1.2. Matériels et méthodes 190

1.2.1. Echantillons 190

1.2.2. Synthèse de la carvone à partir de limonène 190

1.2.3. Stratégie analytique 191

1.2.1. Extraction de la carvone de l'huile essentielle de menthe et analyses EA-P-IRMS 192

1.3. Résultats et discussion 193

1.3.1. Comparaisons des valeurs obtenues par EA-P-IRMS et GC-P-IRMS 193

1.3.2. Analyse des résultats 194
2. Etude de l'huile essentielle de cannelle et d'amande amère 197
2.1. Contexte 197
2.2. Matériels et méthodes 198
2.2.1. Echantillons 198
2.2.2. Synthèse de cinnamaldéhyde et de benzaldéhyde 199
2.2.3. Stratégie analytique 199
2.3. Résultats et discussion 201
2.3.1. Etude de la composition des huiles essentielles de cannelle 201
2.3.2. Analyses isotopiques GC-C/P-IRMS 204
CONCLUSION ET PERSPECTIVES 210

CHAPITRE 6 - ETUDE DE LA DETECTION D'AJOUT D'HUILES VEGETALES DANS LES HUILES ESSENTIELLES 211
INTRODUCTION 212
1. L'adultération par ajout d'huile végétale 212
2. Stratégie analytique 212
2.1. Analyse des triglycérides par chromatographie en phase gazeuse 212
2.2. Analyse thermogravimétrique 213
2.3. Analyses spectroscopiques par Infra Rouge 214
3. L'huile essentielle de cypriol 215
MATERIELS ET METHODES 216
1. Echantillons 216
2. Méthodes analytiques 216
2.1. Détermination du profil thermogravimétrique 216
2.2. Analyse des résidus par GC-MS 217
2.2.1. Analyse thermogravimétrique 217
2.2.2. Protocole de dérivatisation et analyse GC-MS 217
2.3. Analyse par couplage TGA-FTIR 218
2.4. Analyse EA-C-IRMS : comparaisons $\delta^{13}C$ entre plantes C3 et C4 219
2.5. Analyses GC-FID – tests d'une colonne chromatographique à stabilité thermique élevée 219
APPLICATIONS 220
1. Investigations 220
1.1. Détermination du profil thermogravimétrique 220

1.2. Analyse des résidus par GC-MS 223
1.3. Analyse TGA-FTIR 226
2. Résultats et discussions 228
3. Analyses GC-FID des triglycérides à haute température 230
CONCLUSION 233

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES 235

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 237

ANNEXES 263

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Stratégie analytique 22
Figure 2: Procédé d'entraînement à la vapeur d'eau. 28
Figure 3: Procédé d'hydrodistillation.....29
Figure 4 : Procédé d'extraction par solvant de la matière végétale en concrète ou résinoïde 30
Figure 5: Lavage de la concrète ou résinoïde pour récupérer l'absolue.....31
Figure 6: Voies métaboliques du shikimate et des phenylpropanoïdes (Vogt, 2010) 33
Figure 7: Voie métabolique de l'acide mélanovique et élongation de la chaîne isoprénique (Mc Garvey and Croteau, 1995) 36
Figure 8: Les huiles essentielles sont la cible de nombreuses adultérations.....45
Figure 9: Les deux énantiomères de la carvone ne sont pas perçus olfactivement de la même manière. La carvone (R) est caractéristique de la menthe crépue, tandis que la carvone (S) est caractéristique de l'aneth 48
Figure 10: Structure des cyclodextrines alpha, beta et gamma, adapté de (Myrick et al., 2014).....50
Figure 11: Principe du Heart-cutting avec un système Dean Switch, d'après (Jones, 2011) 52
Figure 12 Variation isotopique du $\delta^{13}C$, adapté de (Guyon et al., 2020).....63
Figure 13: Cycle de Calvin ou Cycle C3, adapté de (Reece et al., 2013).....64
Figure 14: Cycle C4 ou Hatch et Slack, adapté de (Reece et al., 2013) 65
Figure 15: Comparaison entre le cycle CAM et les cycles C3 et C4, adapté de (Yamori et al., 2014)....66
Figure 16 : Les compositions isotopiques de l'hydrogène, de l'oxygène, et du soufre, sont liés au cycle atmosphérique de l'eau, d'après (Hoefs, 2018; Nehlich, 2015).....68
Figure 17 : Variations isotopiques de l'oxygène dans les eaux de mer (LeGrande and Schmidt, 2006)69
Figure 18 : Variations isotopiques de l'oxygène sur les continents (Bowen and Wilkinson, 2002) 70
Figure 19: Schéma d'un spectromètre de masse des ratios isotopiques, adapté de (Kelly et al., 2018) 72
Figure 20: Schéma des collecteurs fixes universels utilisés pour la mesure du CO_2, du N_2, du CO, et du SO_2 (Elementar, 2021).....74
Figure 21: Système Dual Inlet, d'après le logiciel Isodat Thermo.....76
Figure 22: Schéma d'un coulage Analyseur Elémentaire -Combustion-IRMS (EA-C-IRMS), adapté de Thermo.....78
Figure 23: Couplage EA-C-IRMS Type Purge and Trap (Fourel et al., 2014).....79
Figure 24: Spectre de masse montrant les analyses simultanées des éléments N, C et S en une seule analyse par EA-C-IRMS (Logiciel Elementar) 79
Figure 25: Schéma d'un couplage Analyseur Elémentaire -Pyrolyse-IRMS (EA-P-IRMS), adapté de Thermo.....80
Figure 26 : Spectre de masse EA-P-IRMS montrant l'analyse simultanée des éléments H et O (Logiciel Thermo Isodat) 81
Figure 27: Schéma d'un couplage GC-C/P-IRMS, adapté de (Thermo).....82
Figure 28: Variation de l'activité du radiocarbone biosourcé en fonction de l'année (Centre de datation par le Radiocarbone and Lefèvre, 2015) 88
Figure 29: Les différentes catégories de méthodes analytiques multivariées. D'après (Esteki et al., 2018) 89
Figure 30 : Molécules identifiées dans les extraits de fèves tonka 117

Figure 31 : Valeurs isotopiques $\delta^{18}O$ en fonction de $\delta^{2}H$, de coumarines de différentes origines : coumarines préparées en laboratoire (en bleu), coumarines de synthèse commerciales (en jaune), coumarines naturelles extraites d'absolues de tonka (en vert), et coumarines naturelles adultérées avec de la coumarine de synthèse (en rouge).....123
Figure 32 : Couplage GC/MC-ICP-MS, adapté de (Amrani et al., 2009).....129
Figure 33 : MC-ICP-MS Neptune Plus (Thermo Scientific). Schéma adapté de (Bazzano, 2016) 130
Figure 34 : Les principaux organosulfures présents dans les huiles essentielles des alliacées.....131
Figure 35: Biosynthèse des métabolites secondaires actifs aromatiques sulfurés des alliacées (Ramirez et al., 2017).....132
Figure 36 : Système GC-MS-P-IRMS pour la détermination de la valeur isotopique $\delta^{18}O$.....188
Figure 37 : Synthèse en 3 étapes de la carvone à partir de limonène.....189
Figure 38 : Comparaisons des valeurs $\delta^{18}O$ obtenues par EA-C/P-IRMS et GC-C/P-IRMS 193
Figure 39 : Représentation tridimensionnelle des analyses isotopiques GC-C/P-IRMS $\delta^{13}C$, $\delta^{2}H$ et $\delta^{18}O$ de carvones issues d'huiles essentielles de menthe crépues authentiques (en vert) et commerciales (en orange), ainsi que de carvone de synthèse (en rouge) et d'hémisynthèses à partir de limonène (en bleu).....195
Figure 40 : Schéma réactionnel d'aldolisation du benzaldéhyde (2) et de rétroaldolisation du cinnamaldéhyde (1). 198
Figure 41 : Formule chimique des différents métabolites composant les huiles essentielles de cannelle Cinnamomum verum et Cinnamomum cassia. 202
Figure 42 : Scores et loadings de l'analyse en composante principale réalisées sur les 54 échantillons de cannelle cassia (en rouge), verum (en vert), et Burmanii (en bleu), à partir des concentrations relatives des principaux métabolites.....203
Figure 43 : Représentation tridimensionnelle des analyses isotopiques GC-C/P-IRMS $\delta^{13}C$, $\delta^{2}H$ et $\delta^{18}O$ de cinnamaldéhydes issus d'huiles essentielles de cannelle sans impuretés (en vert) et avec impuretés (en orange), ainsi que des cinnamaldéhyde obtenus par hémisynthèses à partir de benzaldéhyde (en bleu). Les échantillons constitués de cinnamaldéhyde d'origine pétrochimique ont été exclus de cette représentation (valeur $\delta^{2}H$ supérieure à -42‰) 205
Figure 44 : Représentation tridimensionnelle des analyses isotopiques GC-C/P-IRMS $\delta^{13}C$, $\delta^{2}H$ et $\delta^{18}O$ de benzaldéhydes issus d'huiles essentielles d'amande amère authentiques (en vert) et obtenus par hémisynthèses à partir de benzaldéhyde ex-cassia (en orange). Les échantillons constitués de benzaldéhyde d'origine pétrochimique ont été exclus de cette représentation (valeur δ2H supérieure à 389‰) 207
Figure 45 : Exemple d'analyse de dérivatisation : la ricinoléine est dérivée en ester méthylé d'acide ricinoléique.....213
Figure 46 : Profil thermogravimétrique d'une huile essentielle de patchouli authentique et adultérée avec 5 et 10% d'huile végétale de colza.....221
Figure 47 : Profil thermogravimétrique de trois échantillons d'huiles essentielles de cypriol. 222
Figure 48 : Profils GC-MS, après application d'un protocole de dérivatisation, d'une huile végétale de colza, des résidus TGA d'une huile végétale de colza, et des résidus TGA d'une huile essentielle de patchouli adultérée avec 10% d'huile végétale de colza. Composés identifiés : Ester méthylique de l'acide palmitique (1), de l'acide linoléique (2), de l'acide oléique (3), de l'acide élaïdique (4), de l'acide stéarique (5), et de l'acide11- écosénoïque (6).....224
Figure 49 : Profils GC-MS, après application d'un protocole de dérivatisation, d'une huile végétale de ricin, et des résidus TGA d'une huile essentielle de cypriol (Echantillon n°18). Composés identifiés :

Ester méthylique de l'acide palmitique (1), de l'acide linoléique (2), de l'acide oléique (3), de l'acide élaïdique (4), de l'acide stéarique (5), et de l'acide ricinoléique (7) 225
Figure 50 : Comparaison des spectres infrarouge des trois huiles essentielles de cypriol à 280°C 227
Figure 51 : Profils GC-MS d'une huile végétale de colza, de l'huile essentielle authentique de cypriol n°2, et de ce même échantillon adultéré avec 10% d'huile végétale de colza. Les analyses ont été réalisées à l'aide d'une colonne capillaire stable à haute température (370°C).....231
Figure 52 : Profils GC-MS des huiles essentielles suspectes de cypriol n°26 et n°27. Les analyses ont été réalisées à l'aide d'une colonne capillaire stable à haute température (370°C).....232

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Principales études énantiomériques réalisées sur des huiles essentielles, recensées dans la littérature.....55
Tableau 2 : Abondance naturelle des isotopes organiques 60
Tableau 3 : Isotopomères mesurés par les collecteurs de l'IRMS 73
Tableau 4 : Principales études isotopiques réalisées sur des huiles essentielles, recensées dans la littérature 84
Tableau 5 : Pourcentage de matière obtenue pour résinoïde et absolue 118
Tableau 6 : Composition en pourcentage des résinoïdes et absolues.....118
Tableau 7 : Influence du solvant d'extraction sur la composition isotopique 120
Tableau 8 : Données isotopiques $\delta^{13}C$, $\delta^{2}H$, et $\delta^{18}O$ (‰) des absolues de fèves tonka.....121
Tableau 9 : Etude d'ajouts de coumarine de synthèse 122
Tableau 10 : Etude de coumarines d'origines végétales variées.....124
Tableau 11 : Composition des huiles essentielles de poireau, d'oignon, d'échalotte, de ciboulette, et d'ail 134
Tableau 12 : Composition des huiles essentielles de néroli et de petitgrain de différentes origines .162
Tableau 13 : Valeurs énantiomériques (%R carvone) et isotopiques $\delta^{13}C$, $\delta^{2}H$ et $\delta^{18}O$ de carvones issues d'huiles essentielles de menthe crépues, de carvones de synthèse, et de carvones obtenues à partir de limonène, déterminées par GC-C/P-IRMS. 196
Tableau 14 : Composition des huiles essentielles de cannelle.....202
Tableau 15 : Valeurs isotopiques $\delta^{13}C$, $\delta^{2}H$ et $\delta^{18}O$ de cinnamaldéhyde naturel issu d'huiles essentielles de cannelle, de cinnamaldéhyde de synthèse, et de cinnamaldéhyde obtenus par aldolisation de benzaldéhyde, déterminées par GC-C/P-IRMS. 209
Tableau 16 : Valeurs isotopiques $\delta^{13}C$, $\delta^{2}H$ et $\delta^{18}O$ de benzaldéhyde naturel issu d'huiles essentielles d'amande amère, de benzaldéhyde de synthèse, et de benzaldéhydes obtenus par rétro-aldolisation de cinnamaldéhyde, déterminées par GC-C/P-IRMS. 209
Tableau 17 : Analyses par TGA-FTIR, EA-C-IRMS, et GC-FID, de 30 huiles essentielles de cypriol. 229

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Les matières premières aromatiques (huiles essentielles, concrètes, absolues, eaux florales, …), obtenues par extraction de plantes aromatiques et médicinales, sont utilisées dans l'industrie agroalimentaire, cosmétique et pharmaceutique, et récemment dans la chimie verte, au travers de matières premières biosourcées, pour leurs propriétés médicinales et olfactives. Ces matières naturelles aromatiques sont parfois concernées par des fraudes. Les fournisseurs peu scrupuleux recourent à l'adultération de leurs produits, le plus souvent pour des raisons économiques, en ajoutant des produits à moindre coût dans leurs matières naturelles. La fraude réside sur une déclaration trompeuse d'un produit 100% pur et naturel alors que ce n'est plus le cas. C'est pourquoi il est nécessaire de mettre au point des méthodes d'authentification afin de repérer de quelconques anomalies.

Ce projet de recherche, qui est une collaboration (Bourse doctorale CIFRE) entre la société Albert Vieille et l'Institut des Sciences Analytiques (ISA) de Lyon (UMR 5280), porte sur le développement de méthodes analytiques et la construction de bases de données, visant à authentifier ces produits naturels. L'objectif de ces travaux est donc de développer des méthodes analytiques, afin de déterminer si ces produits aromatiques sont bien 100% purs et naturels. L'analyse énantiosélective, l'analyse isotopique et la recherche de traces d'impuretés sont les principaux axes de recherche étudiés durant ce projet de thèse. La mise en œuvre de ce dernier nécessite en outre d'établir des banques de données, à partir d'échantillons parfaitement tracés pour garantir l'authenticité de leurs origines, en parallèle du développement analytique.

Les huiles essentielles d'intérêts sont, dans un premier temps, caractérisées, à la fois en GC-FID (Chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme) et en GC-MS (Chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse), afin d'identifier les métabolites qui composent leur matrice, et de déterminer la quantité relative des constituants. Puis des investigations technologiquement avancées sont réalisées, selon la nature des composés identifiés présents dans la matière étudiée. Il peut s'agir de la recherche d'impuretés révélatrices de procédés de synthèse ou d'adultération par une autre origine végétale, et de l'analyse de la chiralité des composés possédant au moins un carbone asymétrique, par GC bidimensionnelle, qui permet de mettre en évidence des ajouts de synthèse et des coupes avec d'autres produits naturels en cas de ratios énantiomériques anormaux. Une autre investigation durant le projet porte sur l'analyse des isotopes stables organiques par IRMS (Spectrométrie de masse des rapports isotopiques). En effet, l'empreinte isotopique du végétal est liée au métabolisme de la plante, ce qui permet d'obtenir des

informations sur l'origine botanique, sur le terroir, ou encore sur le procédé d'extraction mis en œuvre. Une base de données est réalisée pour chaque type de matrice étudiée compilant les résultats obtenus grâce aux différentes investigations. Des traitements statistiques et analyses chimiométriques permettent ensuite de mettre en place des critères de conformité afin de conclure sur la pureté et la naturalité des échantillons analysés. La **Figure 1** résume la stratégie analytique employée.

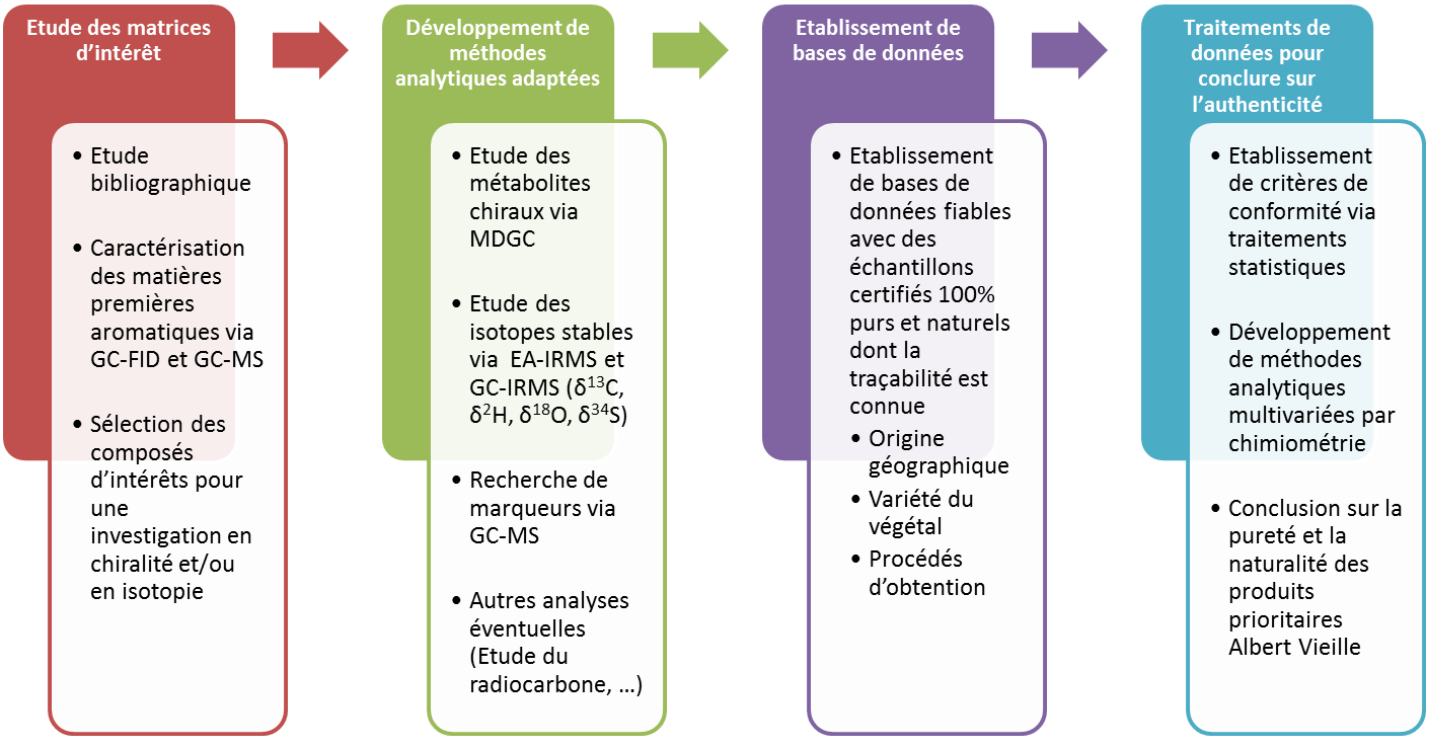

Figure 1: Stratégie analytique

Ce mémoire est organisé en six chapitres.

Le **chapitre 1** présente dans une première partie les matières premières qui sont étudiées dans la suite des travaux présentés. Une revue bibliographique des différentes techniques actuellement utilisées pour l'authentification des matières premières aromatiques sera ensuite présentée dans une seconde partie.

Les chapitres suivants détaillent les différentes études qui ont été réalisées sur différentes matrices. Les travaux réalisés ont pour objectif commun d'améliorer le contrôle de l'authenticité (naturalité et pureté) des matières premières aromatiques de la société Albert Vieille.

Un premier projet, présenté dans le **chapitre 2**, porte sur la détermination de la naturalité du salicylate de méthyle dans des huiles essentielles de wintergreen qui sont composées à 99% de cette molécule.

Une mise en évidence de marqueurs de synthèses par GC-MS, la détermination de l'activité du radiocarbone, et une étude isotopique par EA-C/P-IRMS (Analyseur élémentaire couplé en combustion / pyrolyse avec un IRMS) sur les isotopes ^{13}C, ^{2}H et ^{18}O, ont été réalisées afin d'établir des méthodes d'authentification simples et rapides. Ce projet a fait l'objet d'une publication.

Une seconde étude se focalise sur les huiles essentielles extraites d'alliacées (Poireau, oignon, …). Nous cherchons à mettre en évidence des fraudes par ajout de molécules synthétiques, notamment le disulfure de dipropyle qui est l'un des constituants principaux de ce type de matrice. L'établissement de banques de données isotopiques par GC-C/P-IRMS (Chromatographie en phase gazeuse couplée en combustion / pyrolyse avec un IRMS) et GC/MC-ICP-MS (Spectromètre de masse à multi-collection à plasma couplé à induction) des valeurs $\delta^{13}C$, $\delta^{2}H$, et $\delta^{34}S$, et une analyse chimiométrique permettant de détecter des ajouts de synthèse, ainsi que des différences entre les espèces végétales. Cette étude, décrite dans le **chapitre 3**, a été publiée.

Une troisième étude porte sur l'authentification de l'huile essentielle de néroli. L'objectif principal de ces travaux consiste à établir une base de données pour analyser différentes origines géographiques et différentes parties végétales distillées de l'orange amère (feuilles et fleurs). L'étude des signatures énantiomériques, portant sur 14 composés chiraux différents, et des signatures isotopiques $\delta^{13}C$ et $\delta^{2}H$, a permis de mettre en évidence des distinctions entre les huiles essentielles de néroli (fleurs) et de petitgrain (feuilles), mais également entre différentes origines géographiques. Ces travaux, présentés dans le **chapitre 4**, ont été soumis pour publication et sont actuellement en révision.

Les travaux issus du **chapitre 5** sont consacrés au développement analytique d'un système GC-P-IRMS pour mesurer la valeur isotopique $\delta^{18}O$ de composés spécifiques. Les isotopes de l'oxygène sont encore peu utilisés en authentification des matières premières aromatiques, principalement à cause de la complexité de l'instrumentation. Les applications, présentées dans ce chapitre, réalisées sur des huiles essentielles de menthe, de cannelle et d'amande amère permettent de mettre en exergue des ajouts de molécules issues d'hémisynthèses, ce qui est une réelle avancée discriminante. L'étude des molécules oxygénées présentes dans les huiles essentielles permet d'améliorer l'authentification sur de nombreuses fraudes complexes.

Enfin, le **chapitre 6** décrit une dernière étude se consacrant à la mise en évidence d'ajouts d'huiles végétales dans les huiles essentielles, et notamment dans le cypriol. La stratégie analytique réalisée comprend des approches alternatives aux techniques chromatographiques qui ne sont pas adaptées pour la détection de composés lourds, tels que les triglycérides dans les huiles végétales. Cette méthode comprend les analyses d'isotopes stables IRMS $\delta^{13}C$, ainsi que des analyses thermogravimétriques, et l'étude par GC-MS d'impuretés résiduelles issues de l'ajout d'huile végétale.

CHAPITRE 1

ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

GÉNÉRALITÉS SUR LES MATIÈRES PREMIÈRES AROMATIQUES NATURELLES

1. Définitions

Les matières premières aromatiques naturelles sont des produits naturels, obtenues par extraction d'espèces végétales, selon divers procédés physico-chimiques. Le produit aromatique obtenu est dépendant du procédé d'extraction utilisé, d'après la norme ISO 9253 :2013 (Matières premières aromatiques naturelles – Vocabulaire)[1] :

- Les **huiles essentielles** sont préparées par entraînement à la vapeur d'eau ; par hydrodistillation ; par expression à froid des épicarpes dans le cas des agrumes (procédé mécanique) ou par distillation sèche. Ces procédés sont généralement suivis d'une décantation qui permet de séparer l'huile essentielle, insoluble dans l'eau, avec la phase aqueuse. Ce distillat aqueux, appelé **hydrolat** ou **eau florale**, pourra être récupéré.
- Les **concrètes** sont des matières premières aromatiques, obtenues par extraction de matières fraiches, à l'aide de solvants adéquats. Ce procédé est utilisé pour les matières les plus fragiles, notamment pour l'extraction des composés odorants de matières végétales ne permettant pas l'obtention d'une huile essentielle par distillation, telle que le jasmin ou la tubéreuse. Dans le cas où la matière à extraire est sèche, le produit extrait obtenu est appelé **résinoïde** (exemple : fève tonka).
- Les concrètes et résinoïdes peuvent être, par la suite, traitées par extraction à l'éthanol, pour éliminer les cires par glaçage et filtration. Le produit obtenu est alors appelé **absolue**.

Les propriétés olfactives de ces extraits sont utilisées dans l'industrie agroalimentaire, la cosmétique, et la parfumerie. Les propriétés médicinales sont recherchées en aromathérapie et dans l'industrie pharmaceutique.

Les matières premières naturelles extraites peuvent subir des traitements ultérieurs. Les huiles essentielles peuvent être rectifiées, par un procédé de distillation fractionnée, pour augmenter la concentration de certains composés. Par exemple, l'huile essentielle d'eucalyptus globulus 80% 1,8-cinéole est de l'eucalyptus globulus, qui a été soumis à une distillation fractionnée, afin d'obtenir une composition de 80% d'1,8-cinéole. La rectification permet également d'éliminer certains composés olfactifs sans intérêt, ou aux effets non souhaités. Par exemple, le bergaptène est parfois éliminé de

[1] Une nouvelle révision de la norme ISO 9253 :2013 paraîtra en 2021.

l'huile essentielle de bergamote, car il s'agit d'un composant photosensibilisant qui peut entraîner des effets indésirables chez l'Homme. Certaines huiles essentielles peuvent aussi être déterpénées, par élimination de la fraction contenant les hydrocarbures monoterpéniques.

2. Procédés d'obtention

Les matières premières aromatiques peuvent être obtenues par différents procédés d'extractions (Stratakos and Koidis, 2016). Le choix du procédé de mise en œuvre est important. En effet, la composition du produit final est liée à ce paramètre (Cassel et al., 2009; Conde-Hernández et al., 2017). Il convient donc de choisir la méthode d'extraction la plus appropriée à la matière végétale à extraire et au produit aromatique final souhaité.

On distingue principalement trois types de méthodes d'extractions : les procédés de distillation, les procédés par expression à froid, et les extractions par solvant.

2.1. Distillation par l'eau

Ce sont les méthodes d'extraction les plus courantes pour l'obtention des huiles essentielles.

2.1.1. Entraînement à la vapeur d'eau

Ce type de procédé, décrit en **Figure 2**, est utilisé, pour extraire et isoler les huiles essentielles de la matière végétale. La partie végétale d'intérêt est exposée à un flux de vapeur d'eau, qui va servir à extraire et entrainer les molécules aromatiques volatiles. La vapeur d'eau et les vapeurs d'huiles essentielles sont ensuite condensées, avant d'être séparées, par différence d'affinité, en deux phases non miscibles, l'huile essentielle étant non soluble dans la phase aqueuse. L'huile essentielle est plus légère que l'eau dans une majorité de cas, comme cela est présenté en **Figure 2**, mais cela peut aussi être l'inverse (Exemples : huile essentielle de cannelle ou de girofle).

Cette technique d'extraction est simple d'utilisation et convient à l'extraction de nombreuses espèces végétales. Cependant, afin d'avoir un meilleur rendement, il est généralement nécessaire de la réaliser pendant plusieurs heures, pour des matières telles que le vétiver car l'eau met un certain temps à pénétrer dans les tissus plus denses et plus compacts (bois et écorces notamment) pour en extraire les molécules.

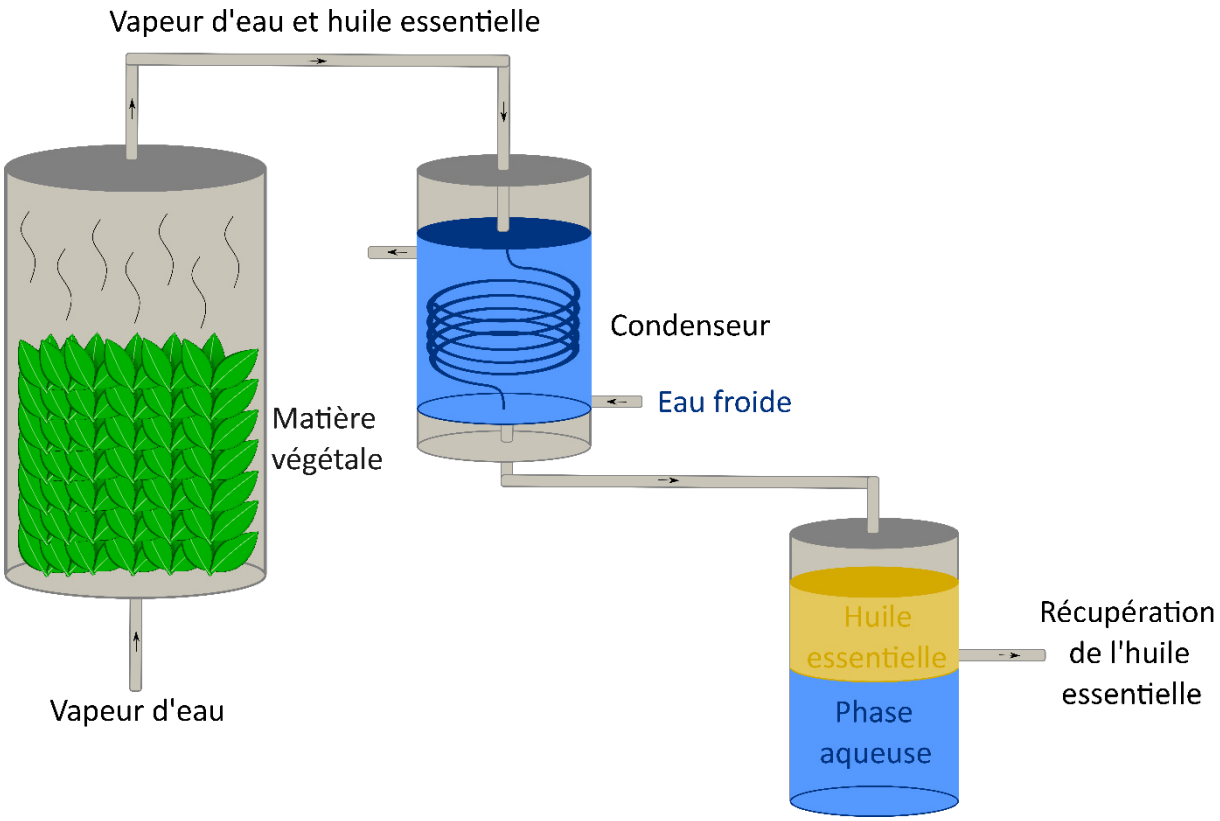

Figure 2: Procédé d'entraînement à la vapeur d'eau.

2.1.2. Hydrodistillation

Dans ce procédé, la partie végétale à traiter est, cette fois-ci, plongée dans de l'eau, portée à ébullition. La vapeur formée va entraîner les molécules volatiles. De la même manière que pour l'entraînement à la vapeur, le gaz est ensuite condensé. La phase organique obtenue constitue l'huile essentielle, tandis que la phase aqueuse peut également présenter un intérêt, si elle est collectée, c'est ce que l'on appelle le distillat ou eau florale. La **Figure 3** illustre les étapes de ce procédé.

Cette méthode d'extraction est particulièrement adaptée aux exsudats tels que les gommes d'encens, mais elle peut être utilisée pour différents types de végétaux. Toutefois, la température d'exposition relativement élevée (100°C) et l'acidité de l'eau, ne peuvent empêcher la dégradation de certains métabolites, et mener à des différences de compositions.

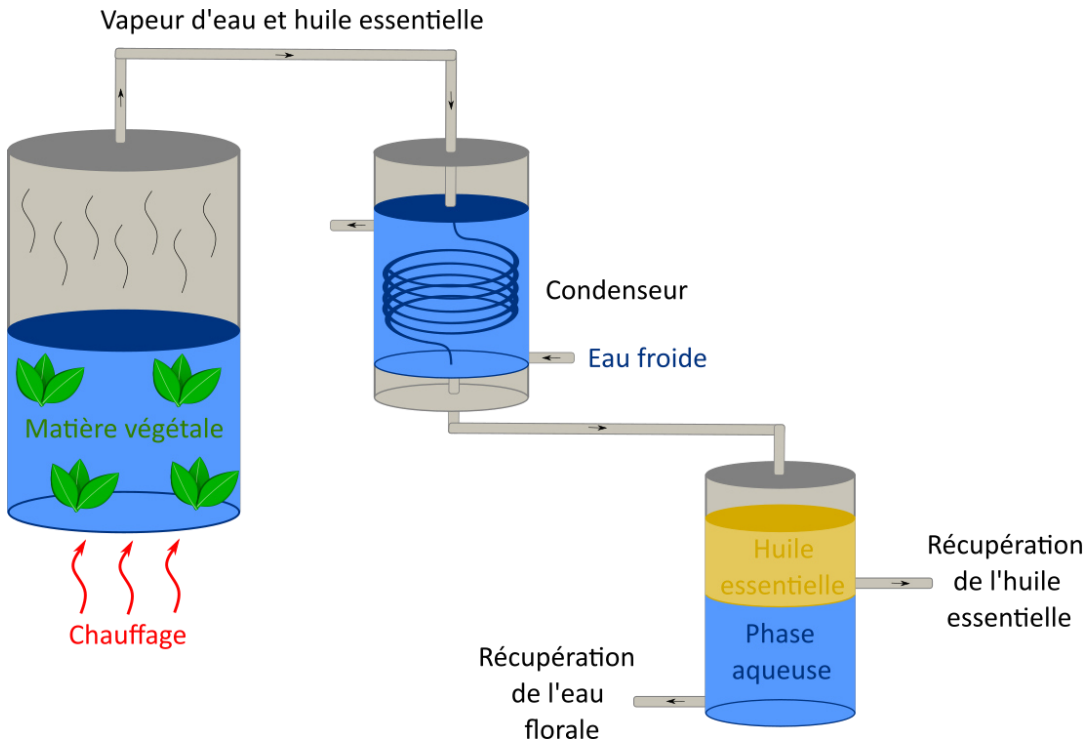

Figure 3: Procédé d'hydrodistillation

2.2. Expression à froid

L'expression à froid est un procédé mécanique d'extraction, utilisé pour la production d'huiles essentielles du genre *Citrus*. Cette méthode consiste à récolter l'huile essentielle, contenue dans les glandes oléifères du péricarpe (écorce du fruit), par dilacération (Dugo and Mondello, 2011).

L'extraction de l'essence est réalisée industriellement, à l'aide de machines pélatrices, ou sfumatrices. L'extraction par machine pélatrice consiste au râpage de la paroi du fruit, avant pressage, pour extraire l'huile essentielle (Mazollier, 2013). Les machines sfumatrices permettent, quant à elles, de séparer la pulpe et la peau des *Citrus,* en coupant le fruit en deux, avant d'extraire l'huile essentielle par pression, et par rinçage avec un jet d'eau (Hüsnü Can Baser and Buchbauer, 2016). Par la suite, l'huile essentielle est généralement traitée par essorage, pour éliminer les impuretés solides résiduelles, telles que des restes de pelures. Une dernière étape de centrifugation permet de séparer l'huile essentielle du jus obtenu.

L'huile essentielle, contenue dans l'épicarpe des agrumes, contient de nombreux aldéhydes thermiquement instables, d'où la nécessité de privilégier des procédés mécaniques à froid sur ce type de matière, et cela afin de conserver toutes les propriétés organoleptiques et olfactives. Ces huiles essentielles seront également composées de molécules plus lourdes, telles que les furocoumarines.

2.3. Extraction par solvant

L'extraction par solvant est une technique privilégiée sur des matières fragiles, aux rendements relativement faibles, telles que les fleurs de rose ou de jasmin. Outre l'extraction par solvant classique, plusieurs méthodes sont dérivées de ce procédé, notamment l'extraction au CO_2 supercritique.

2.3.1. Description

La matière végétale macère dans un solvant, ou un mélange de solvants, qui est évaporé dans un second temps (**Figure 4**). Le temps, la température et le nombre de bains peut varier en fonction de la matière végétale à extraire. Le produit obtenu est appelé concrète ou résinoïde, et peut être traité à l'éthanol, pour obtenir une absolue (**Figure 5**). Le choix du solvant est important, puisqu'il affectera le rendement et la composition de la matière première obtenue.

Le principal avantage de cette technique est que l'extraction est réalisée à température moins élevée que la distillation, permettant de travailler sur des matières végétales thermolabiles, sans risque de dégradation chimique. Cependant, ce procédé extrait des composés non volatils, tels que des cires et des pigments, ce qui différencie le produit final obtenu de l'huile essentielle, comprenant des constituants plus légers.

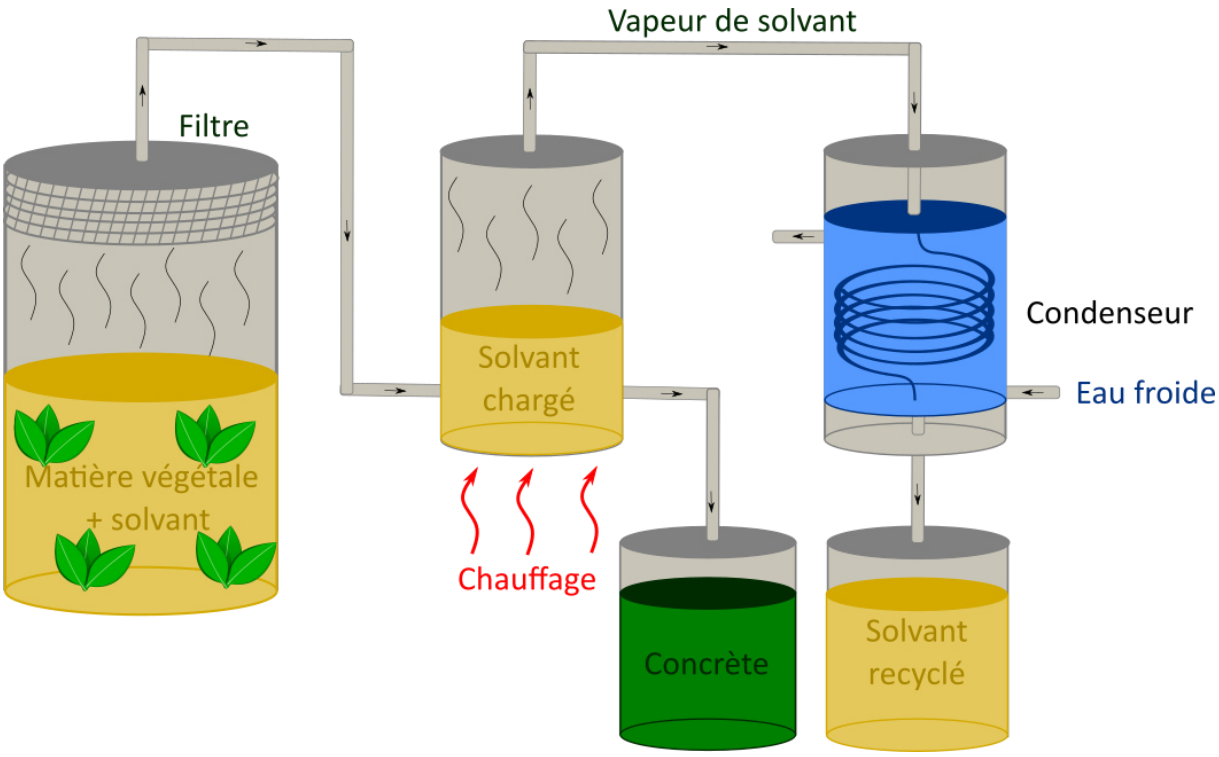

Figure 4 : Procédé d'extraction par solvant de la matière végétale en concrète ou résinoïde

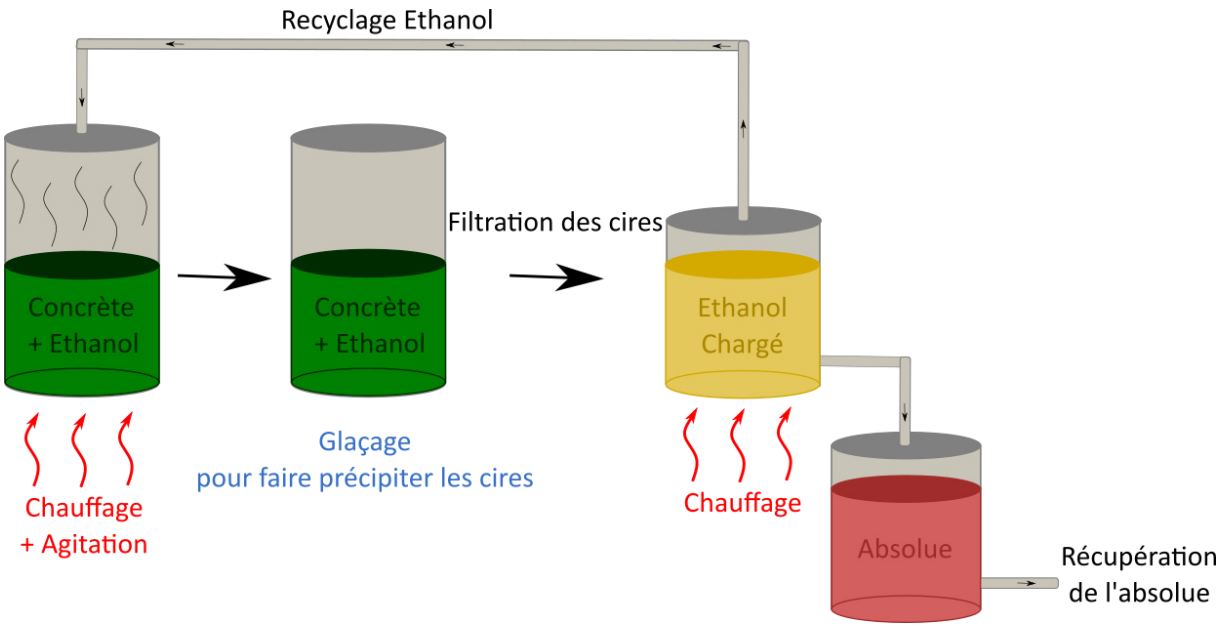

Figure 5: Lavage de la concrète ou résinoïde pour récupérer l'absolue

2.3.2. Extraction par fluide supercritique CO_2

L'extraction par fluide supercritique, procédé dérivé de l'extraction classique par solvant, présente une alternative efficace. Le CO_2 a l'avantage d'être peu cher, non toxique, sans odeur ni goût, et relativement facile à éliminer, sans traces résiduelles. Le point critique du dioxyde de carbone supercritique est facilement accessible à atteindre (température critique de 304,25°K et pression critique de 73,8 bars). Ce fluide supercritique présente des propriétés de solvabilité et de diffusion intéressantes, permettant d'obtenir des transferts de masses et des extractions plus rapides que par l'utilisation de solvants liquides. En modifiant les conditions opératoires durant l'extraction, la viscosité du CO_2 supercritique va varier, et permettre d'extraire sélectivement un composé d'intérêt de la matière végétale. Ce procédé est écologique, car il ne génère aucuns polluants, ni gaz à effet de serre. De plus le CO_2 est réutilisable.

3. Notions de chimie végétale

Une huile essentielle est un mélange complexe, comprenant des composés volatils organiques, dont la fraction représente environ 95 à 99% (Mazollier, 2013). Ces différents constituants sont des métabolites secondaires actifs des plantes et sont issus des différentes voies de biosynthèse du végétal. Ces molécules phytochimiques, à l'inverse des métabolites primaires, n'ont pas de rôles dans la croissance et le développement d'une plante.

Les composés de la fraction volatile se distinguent en deux catégories principales : les **phénylpropanoïdes et aromatiques** [2] **,** et les **terpènes et terpénoïdes** (monoterpenoides, sesquiterpenoides, normonoterpenoides et norsesquiterpenoides).

3.1. Phénylpropanoïdes et aromatiques

Les phénylpropanoïdes et aromatiques sont des métabolites dérivés de la phénylalanine. Cet acide aminé aromatique est biosynthétisé par la plante, grâce à la voie métabolique du shikimate (Knaggs, 2003). La phénylalanine est, par la suite, transformée en acide trans-cinnamique par catalyse de l'enzyme phénylalanine ammonia-lyase (PAL).

Les aromatiques, tels que le salicylate de méthyle, sont des dérivés de l'acide benzoïque, issu de l'acide cinnamique. La métabolisation des phénylpropanoïdes se réalise, quant à elle, par l'intermédiaire du composé 4-coumaryol-CoA, précurseur central de cette voie de biosynthèse (Vogt, 2010). Cet intermédiaire subi, par la suite, différentes conversions, pour obtenir différentes familles de composés; notamment les phénylpropènes (eugénol, estragol, trans-anéthol, (E)-cinnamaldéhyde), certaines coumarines volatiles et les aldéhydes phénoliques (vanilline, salicylaldéhyde), qui sont couramment retrouvés dans la composition des huiles essentielles. D'autres constituants minoritaires non volatils peuvent également être présents dans les matières premières aromatiques. Ce sont principalement des coumarines et des flavonoïdes. Ces métabolites sont présents en quantités beaucoup plus conséquentes dans des produits d'extraction par solvant, comme les absolues.

Les voies métaboliques du shikimate et des phénylpropanoïdes sont représentées en **Figure 6**.

[2] A noter que le terme aromatique désigne dans ce paragraphe la structure chimique, et non la propriété qui donne de l'odeur et du goût.

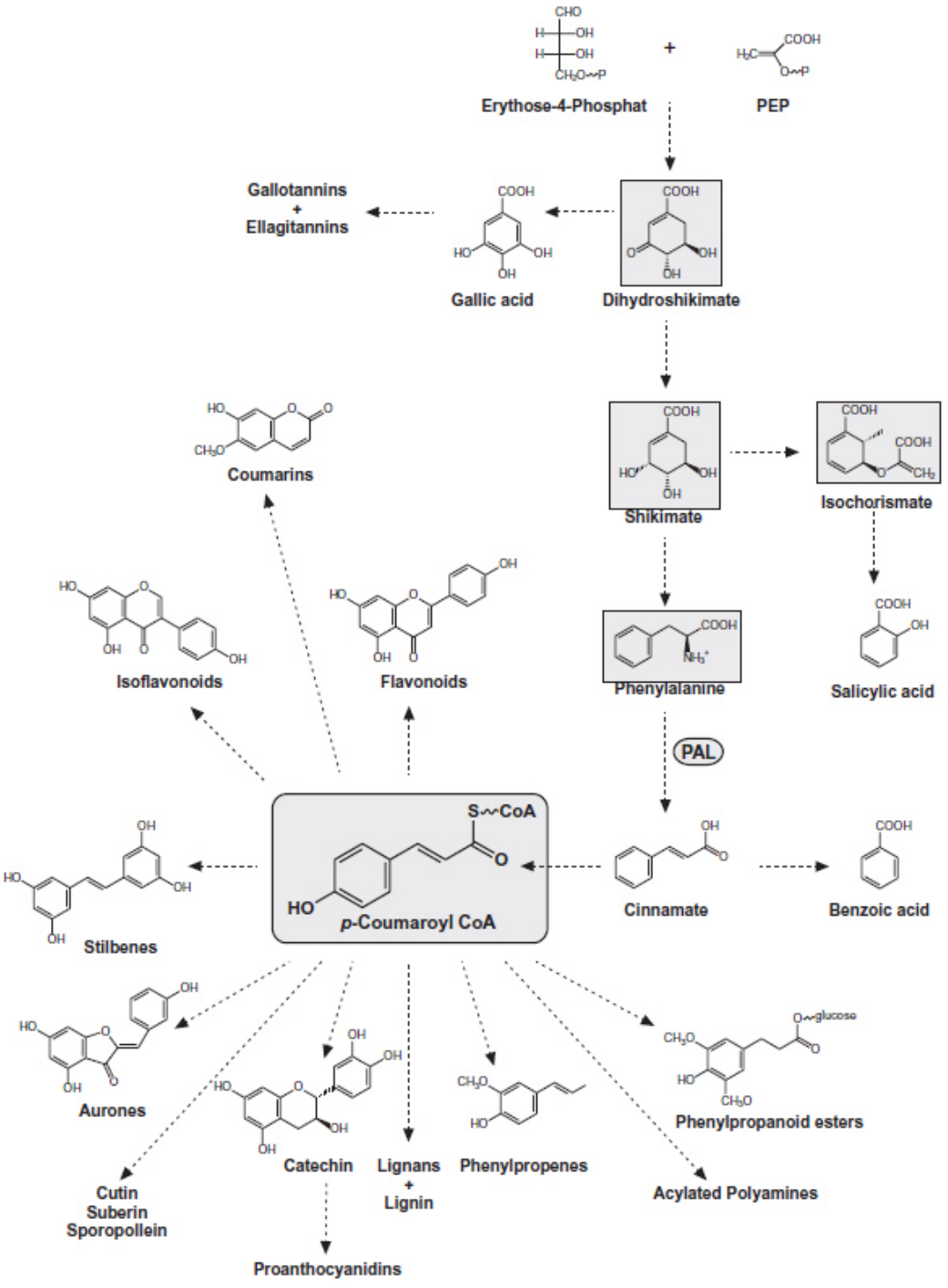

Figure 6: Voies métaboliques du shikimate et des phenylpropanoïdes (Vogt, 2010)

3.2. Terpènes et terpénoïdes

Les terpènes sont des hydrocarbures, dont la structure est constituée d'unités isopréniques, reliées entre elles de manière linéaire, cyclique ou bicyclique, selon la règle de l'isoprène (Lamarti et al., 1994a). La formule de base des terpènes est un multiple de celle de l'isoprène, autrement dit $(C_5H_8)_n$. Les monoterpènes, de formule chimique $C_{10}H_{16}$, sont constitués de 2 unités isopréniques, telles que α-pinène ou le limonène. Ce sont les composés terpéniques les plus répandus dans le milieu des huiles essentielles, avec les sesquiterpènes, d'unités terpéniques n=3 ($C_{15}H_{24}$). Les diterpènes (n=4), les sesterterpènes (n=5), les triterpènes (n=6), les tétraterpènes (n=8), et les polyterpènes (n>8), sont des composés rarement présents dans les huiles essentielles, car leur poids moléculaire est trop important pour être entrainable à la vapeur d'eau. Les terpénoïdes sont des dérivés terpéniques contenant des groupes fonctionnels supplémentaires. De la même manière que pour les terpènes, la nomenclature est dépendante des unités isopréniques. Un hémiterpénoïde C_5 est constitué d'une unique unité isoprénique, les monoterpénoïdes C_{10} sont constitués de 2 unités isopréniques et les sesquiterpénoïdes sont constitués de 3 unités isopréniques C_{15}.

Quelques exemples :

- Le linalol est un alcool terpénique
- L'acétate de linalyle est un ester terpénique
- Le citronellal est un aldéhyde monoterpénique
- La carvone est une cétone monoterpénique

Les terpènes et terpénoïdes sont des métabolites dérivés du diphosphate d'isopenténylе (IPP), un précurseur de biosynthèse, obtenu à partir de deux voies métaboliques différentes (Dewick, 2002) :

- Par la voie de l'acide mélavonique, à partir de l'acétyl CoA, molécule présente dans les compartiments cellulaires de la plante.
- Par la voie métabolique du deoxyxylulose phosphate DOXP, indépendante du mélavonate.

Après cette première étape, l'IPP est par la suite isomérisé en diméthylallyl-pyrophosphate (DMAPP), par catalyse d'une enzyme, l'isopenténylе diphosphate isomérase, second précurseur des terpénoïdes. À la suite de cette isomérisation, plusieurs condensations successives vont permettre une élongation de la chaîne isoprénique, et aboutir aux multiples composés terpéniques existants (**Figure 7**).

- Les **monoterpènes** C10 sont formés à partir de la condensation de l'IPP et du DMAPP, par action d'une phényltransférase, la géranyle diphosphate synthétase, qui permet de former le précurseur des monoterpènes, le GPP (diphosphate de géranyle).
- Les **sesquiterpènes** C15 sont formés à partir de la condensation de l'IPP et du GPP, par action d'une autre phényltransférase, la farnésyl diphosphate synthétase, qui permet de former le précurseur des monoterpènes, le FPP (diphosphate de farnésyle).
- Les **diterpénoïdes** C20 sont formés à partir de la condensation de l'IPP et du FPP, par action du géranylgéranyl diphosphate synthétase, qui permet de former le précurseur des monoterpènes, le GGPP (diphosphate de géranylgéranyle).

La biosynthèse des monoterpènes, acycliques et cycliques, est réalisée à partir du GPP et de ses isomères (Lamarti et al., 1994b), et se décompose en une série de réactions fondamentales passant par des états de transitions (carbocations) : éliminations monomoléculaire E1, additions électrophiles, réarrangements allyliques, déshydrogénation, … Par exemple, le GPP peut se décomposer en cation linalyle, qui conduit à différents terpénoïdes, tels que le linalol, le β-myrcène, ou encore le trans-β-ocimene. Le cation linalyle peut également se réarranger en cation α-terpényle. Ce carbocation peut conduire à une multitude de monoterpénoïdes, comme par exemple α-terpinéol, le limonène ou encore le tricyclène.

Cette succession de réactions chimiques permet d'expliquer la diversité des monoterpénoïdes, présents dans les huiles essentielles de différentes origines botaniques. De plus, ces réactions sont stéréosélectives, et riches en fractionnements isotopiques. La connaissance des voies métaboliques est importante, car elle lie la signature isotopique des composés formés. L'adultération, par d'autres origines végétales, peut modifier cette signature.

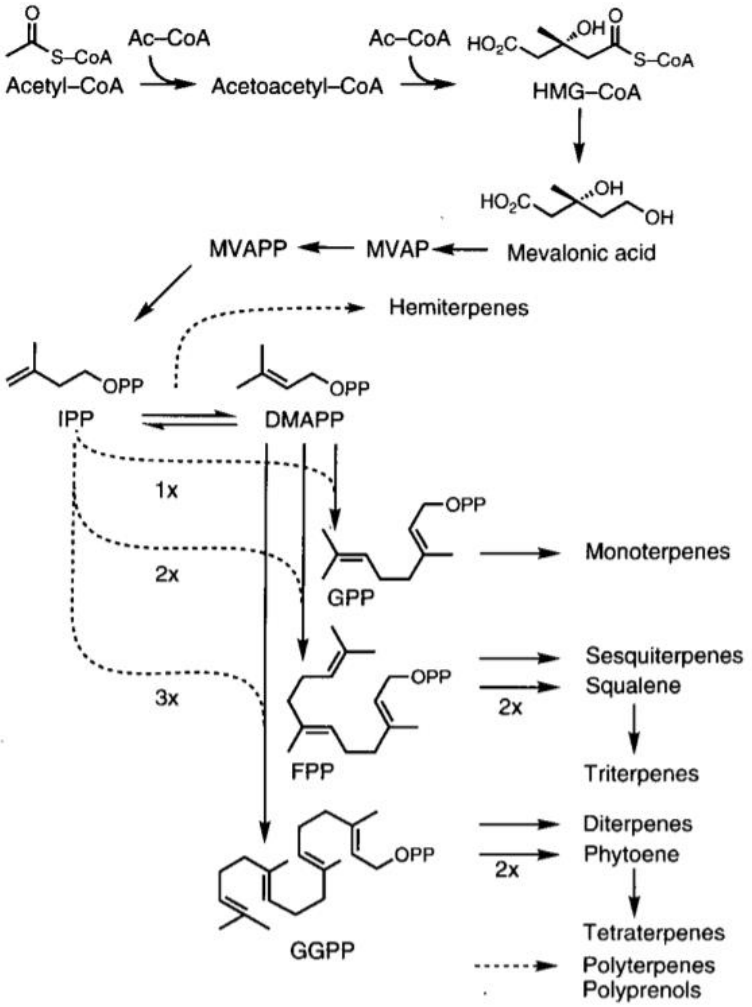

Figure 7: Voie métabolique de l'acide mélanovique et élongation de la chaîne isoprénique (Mc Garvey and Croteau, 1995)

4. Contrôle d'une huile essentielle

4.1. Etat de l'art des référentiels existants

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes, utilisées dans de nombreuses applications, dues à des propriétés diversifiées. La composition de ces huiles essentielles est donc importante, car elle a des conséquences sur l'efficacité de ces produits. Par ailleurs, certains composés peuvent avoir un impact sur la santé (allergies, toxicité). Afin de contrôler la qualité d'une huile essentielle, il est nécessaire de se baser sur des normes de références.

A l'échelle internationale, l'ISO (International Standards Organization) publie des spécifications, qualitatives et quantitatives, pour les différents acteurs du marché. La commission ISO/TC 54 vise à normaliser les méthodes d'analyses utilisées pour le contrôle des huiles essentielles, ainsi que les spécifications associées à la qualité d'environ une centaine d'entre elles. Trois normes encadrent celles-ci : l'ISO 3218 :2014 (Principes de la nomenclature) ; l'ISO 4720 :2018 (Nomenclature) et la norme ISO 9253 :2013 (Matières premières aromatiques naturelles – Vocabulaire). Au niveau européen, il existe le Comité Européen de Normalisation (CEN) et au niveau national, l'AFNOR (Association Française de Normalisation), avec la comission T75A qui regroupe un panel d'expert de la profession et travaille sur la révision et l'établissement de nouvelles normes sur les huiles essentielles. Ces normes sont des référentiels officiels d'application volontaire qui résultent d'un choix du producteur ou des exigences clients.

La Pharmacopée française (actuellement 11ème édition), préparée et publiée par l'ANSM (Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé), édite des monographies spécifiques. Au niveau européen, la Pharmacopée Européenne (Ph. Eur. 10ème édition en cours) est un ouvrage de référence en matière de contrôle qualité des médicaments et les huiles essentielles sont considérées comme des MPUP (Matières Premières à Usage Pharmaceutique) dans ce domaine. Ces normes sont juridiquement contraignantes dans les législations pharmaceutiques nationales et de l'Union Européenne (UE).

Les matières premières aromatiques naturelles sont soumises à différentes réglementations en fonction de leurs utilisations. Nous pouvons citer le règlement (CE) n°1223/2009 relatif aux produits cosmétiques, faisant état des substances proscrites dans la composition des produits cosmétiques ou encore le règlement (CE) n°1334/2008 relatif aux arômes. Considérées comme des Substances Naturelles Complexes (NCS), leur commerce doit être en conformité avec le règlement (CE) n°1907/2006 REACH (Registration, Evaluation, Authorization and restriction of CHemicals) concernat l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des substances chimiques, ainsi que les restrictions

applicables à ces substances et répondre aux règles d'étiquetage selon le règlement (CE) n°1272/2008 CLP (Classification, Labelling, Packaging).

De nombreuses organisations et associations professionnelles publient des lignes directrices et des bonnes pratiques qui font foi dans la profession, par exemple l'IFRA (International Fragrance Association) qui rédige des standards pour l'utilisation dans différents types de produits finis en parfumerie et cosmétique (49ème amendement en vigueur), l'EFEO (European Federation of Essential Oils) qui représente les différents acteurs de la chaîne d'approvisionnement ou encore l'IOFI (International Organisation of the Flovor Industry) qui représente au niveau mondial les industries dans le domaine des arômes.

En définitive, il existe une multitude d'organismes qui éditent différentes spécifications, concernant les matières premières aromatiques. Cela peut être expliqué par la complexité de la matrice, ainsi que ses nombreuses propriétés. Ces critères de qualités peuvent être distincts, selon l'usage de l'huile essentielle. En effet, les normes seront différentes, si le composé est utilisé dans la parfumerie, l'industrie agroalimentaire, ou en aromathérapie.

Cependant, ces référentiels sont, à l'heure actuelle, d'un usage limité dans le cadre de l'authentification. En effet, d'une part, toutes les huiles essentielles ne sont pas recensées. D'autre part, les techniques et spécifications actuellement référencées sont insuffisantes pour garantir que l'huile essentielle est bien 100% pure et naturelle. De plus, la littérature de standardisation, qui permet à de nombreux industriels d'établir leurs propres critères de qualités, est restreinte. Peu de données bibliographiques, sur une minorité de produits, sont trouvées dans les publications scientifiques. Il est nécessaire d'établir des banques de données, plus complètes, pour affiner les spécifications. De nouvelles méthodes doivent être développées pour permettre d'améliorer l'authentification.

4.2. Méthodes analytiques de références

Il existe une multitude d'outils analytiques, qui permettent d'identifier, et de quantifier, les nombreux métabolites qui caractérisent les huiles essentielles (Do et al., 2015). Les évaluations sensorielles, et les analyses physico-chimiques, permettent le contrôle rapide de la qualité des huiles essentielles. Les techniques séparatives sont utilisées pour obtenir plus d'informations sur les échantillons analysés. La chromatographie en phase gazeuse (GC) est la technique d'analyse de prédilection pour ces produits, riches en molécules volatiles. Elle est aujourd'hui incontournable pour déterminer, par séparation, les différents constituants. La partie non volatile, présente principalement dans les extraits de type absolue, est généralement analysée par chromatographie liquide à haute pression (HPLC). Ces techniques sont complémentaires, et chacune apportent leurs lots d'informations.

4.2.1. Analyses sensorielles

L'analyse sensorielle est l'un des tests recommandés dans les normes. Il permet d'examiner les propriétés organoleptiques d'un produit grâce aux organes sensoriels.

Le contrôle olfactif est un test effectué par un panel d'experts olfactifs, qui vont évaluer la qualité odorante d'une matière, grâce à leur nez. Les matières premières aromatiques sont généralement contrôlées par un test triangulaire. Ce test discriminatif permet de comparer deux produits entre eux.

Le contrôle se déroule généralement en comparant olfactivement un témoin, représentant la qualité attendue, à l'échantillon. Pour que l'évaluation soit validée, les experts sont également soumis à l'olfaction d'une troisième touche de parfumeur, sur laquelle a été déposée le témoin ou l'échantillon. Cette information n'est cependant pas connue des évaluateurs pendant le contrôle olfactif. Si le panel est dans l'incapacité de différencier les différentes mouillettes, cela signifie que la matière contrôlée est conforme par rapport au témoin.

Afin de comparer olfactivement les échantillons, les évaluateurs utilisent un vocabulaire spécifique, permettant de décrire les différentes notes olfactives perçues. Les descriptions olfactives sont comparées aux référentiels AFNOR/ISO et Pharmacopée, ainsi qu'aux données disponibles dans la bibliographie. Chaque matière est classée par familles olfactives, qui regroupent les matières premières aromatiques, selon leurs propriétés olfactives principales. Il existe de nombreuses familles et sous familles olfactives, parmi lesquelles on peut retrouver les floraux (huile essentielle de néroli, …), les herbacées (huiles essentielles de wintergreen, d'anis, …), les boisées (huiles essentielles de cypriol, de santal, …), les gourmandes (absolue de fève tonka, …), ou encore les soufrées (huile essentielle de poireau, …).

Un autre type d'analyse sensorielle est opéré sur les huiles essentielles : il s'agit du contrôle visuel. Il permet de juger de la couleur et de l'aspect des différentes matières à contrôler. Il est important de bien caractériser l'aspect visuel, puisqu'il va permettre de juger de l'évolution d'une matière et de sa dégradation, au même titre que les autres analyses pratiquées en contrôle qualité. L'opérateur va évaluer la couleur à l'aide d'un nuancier et/ou à l'aide d'un échantillon témoin. La couleur peut être estimée par analyse spectrophotométrique ou à l'aide d'un colorimètre, lorsque le laboratoire en est équipé.

4.2.2. Analyses physico-chimiques

Différentes analyses physico-chimiques sont également réalisées, pour contrôler la qualité d'une huile essentielle. Ces analyses incluent la mesure de la densité à l'aide d'un densimètre, de l'indice de réfraction grâce à un refractomètre, de son pouvoir rotatoire en utilisant un polarimètre, ou encore le contrôle d'indices de peroxydes et d'acides. Des tests de solubilités peuvent aussi être mis en place. Ces différentes analyses font l'objet de normes.

4.2.3. Analyse par chromatographie en phase gazeuse

La chromatographie en phase gazeuse, couplée à un détecteur, permet de caractériser, de manière simple et efficace, la composition de la partie volatile des huiles essentielles. Cette technique est aujourd'hui la plus utilisée dans les laboratoires de contrôle qualité.

4.2.3.1. Principe

La GC est une technique de séparation des composés d'un mélange, basée sur le partage des solutés, entre une phase stationnaire liquide ou solide adsorbante, et une phase mobile gazeuse. Le gaz vecteur (N_2, He, H_2, Ar) est inerte. Cette méthodologie est très efficace, du fait de son grand nombre de plateaux théoriques. Cependant, étant donné que l'échantillon à analyser est volatilisé dans la chambre d'injection chauffée, cette analyse n'est pas adaptée aux composés non volatils et/ou thermiquement instables. Pour pouvoir prendre en charge les constituants trop polaires, une dérivatisation est nécessaire dans ce dernier cas.

La séparation des différents constituants du mélange se réalise par interaction avec la phase stationnaire, ce qui va engendrer de la rétention chromatographique. Le gaz vecteur sert uniquement à transporter l'échantillon de l'injecteur au détecteur. En effet, aucune interaction n'est réalisée entre la phase mobile et l'échantillon. En revanche, le débit et la nature du gaz vecteur influencent l'efficacité de l'analyse (Courbe de Van Deemter (van Deemter et al., 1956)).

L'appareil de chromatographie est principalement composé de trois parties (Soria et al., 2014) : un injecteur permettant l'introduction de l'échantillon dans le système chromatographique, un four programmable en température, dans lequel se trouve une colonne chromatographique permettant la séparation des solutés, et un détecteur.

4.2.3.2. Injecteur

L'échantillon est tout d'abord prélevé, à l'aide d'une micro-seringue, et introduit dans l'instrument par l'injecteur. L'échantillon est alors vaporisé, de manière homogène, sans se décomposer, à température élevée, entre 250°C et 300°C, afin de pouvoir être introduit rapidement en entrée de colonne, mélangé au gaz vecteur. L'objectif étant de récupérer l'échantillon de manière représentative, afin d'assurer la répétabilité et la justesse.

Deux systèmes principaux d'injections sont utilisés, associés à des colonnes capillaires : les modes split et splitless.

L'injection avec division split est privilégiée pour l'étude des huiles essentielles, car elle permet d'injecter de petites quantités d'échantillons, pour ne pas saturer la colonne, tout en s'affranchissant de faire une dilution, ce qui permet de caractériser au mieux la composition de l'huile essentielle. Le gaz vecteur, introduit à débit ou pression constante, est partagé en deux flux. Le premier flux est dirigé dans la colonne, afin d'envoyer rapidement une faible partie d'échantillon, le second flux est lui dirigé vers un système de fuite, pour évacuer le reste de l'échantillon. Le rapport de fuite, qui est le débit de la fuite par rapport au débit dans la colonne, nécessite d'être réglé, afin de ne pas avoir de perte de composés légers ou lourds.

L'injection sans division splitless est similaire, mais l'échantillon vaporisé n'est cette fois-ci pas divisé. Après un temps relativement court au sein du liner, qui permet de concentrer l'échantillon, la totalité de celui-ci est envoyée en tête de colonne.

4.2.3.3. Colonne chromatographique

Il existe trois types principaux de colonnes : les colonnes remplies, macrobores et capillaires. Ces dernières sont idéales pour l'analyse des huiles essentielles, car elles ont une efficacité importante du fait de leur faible diamètre interne, variant de 0,1 à 0,32 mm, et un nombre de plateaux élevés. Ainsi, les pics chromatographiques sont plus fins, permettant une meilleure séparation des solutés d'un mélange complexe.

Les colonnes capillaires sont des tubes vides en silice fondue ou en verre, entourés de polyimide, de longueur pouvant aller de 10 m à 100 m. La phase stationnaire des colonnes capillaires est déposée

sur la paroi interne du tube. Il existe de nombreuses phases stationnaires, différant par leur polarité. Les phases stationnaires polaires sont généralement constituées de polyéthylène glycol, telle que la phase HP-Innowax, et permettent de mieux retenir les composés polaires. A l'inverse, les molécules apolaires seront mieux retenues sur des phases apolaires, constituées d'hydrocarbures aliphatiques saturés, comme par exemple la phase HP-1 constituée de dimethylpolysiloxane, ou bien la phase HP-5 constituée de (5%-Phenyl)-methylpolysiloxane.

4.2.3.4. Détecteur

4.2.3.4.1. FID

Le détecteur généralement employé pour l'analyse des huiles essentielles est un détecteur à ionisation de flamme (FID). Les composés organiques sont pyrolysés dans une flamme, obtenue à partir d'un mélange gaz air / H_2. Les ions formés sont enregistrés entre deux électrodes, et convertis par un électromètre en signal électrique, dont la tension est proportionnelle aux ions formés. Le FID est proportionnel au nombre d'atome de carbone, ce qui permet de réaliser de la quantification. Dans le cas des huiles essentielles, la quantification relative est privilégiée, en calculant la proportion de chaque composé de l'échantillon en fonction de l'aire totale des composés détectés, par normalisation interne. En effet, on estime que l'on voit 100% des composés sur le profil GC.

4.2.3.4.2. GC-MS

La GC peut également être couplée avec un spectromètre de masse (MS). Ce détecteur est complémentaire au FID, car il est préférentiellement utilisé pour l'identification des constituants volatils des huiles essentielles. La MS donne des informations structurelles d'identification directe des constituants volatils des huiles essentielles, par rapport au FID. Un spectromètre de masse est constitué d'une source d'ionisation, d'un analyseur de masse, et d'un détecteur.

La source d'ionisation permet de produire des ions, à partir des molécules introduites dans le MS. Deux sources d'ionisation sont principalement utilisées en GC-MS : l'ionisation électronique (EI) et l'ionisation chimique (CI). Ces deux modes d'ionisation nécessitent un fonctionnement sous vide. Le principe de l'impact électronique, qui est le plus utilisé, est le suivant : les molécules gazeuses, introduites dans la source, vont être ionisées par collision avec un faisceau d'électron, généré par un filament. Cette ionisation est réalisable si les électrons ont une énergie appliquée suffisante (généralement 70 eV) pour générer une charge sur les molécules introduites. Les molécules ionisées, en fonction de leur stabilité, vont ensuite subir des fragmentations, suivis de possibles réarrangements, tel que le réarrangement de McLafferty (McLafferty, 1959).

Les ions fragmentés obtenus sont ensuite envoyés dans un analyseur de masse qui permet la séparation et la mesure du rapport masse/charge (m/z) des ions. L'analyseur le plus couramment utilisé pour l'identification des huiles essentielles est l'analyseur simple quadripôle. Des analyses haute résolution ou des analyses en tandem peuvent également être employées (Q-TOF ou triple quadripôle), pour détecter des métabolites à l'état de traces notamment. Le quadripôle est formé de quatre électrodes parallèles deux à deux cylindriques. Ces électrodes sont soumises à des potentiels similaires, mais opposés.

4.2.3.5. Indices de rétention

L'identification des composés est généralement réalisée à partir des informations structurelles obtenues en GC-MS. Toutefois, il est aussi possible de travailler avec les indices de rétention (RI). En effet, pour une même phase stationnaire de colonne chromatographique utilisée, chaque constituant d'une huile essentielle est défini par son indice de rétention (Kováts, 1958). Cette constante, indépendante du système chromatographique, est une normalisation du temps de rétention (t_r) d'un composé, par rapport au temps de rétention de n-alcanes adjacents, selon la formule suivante :

$$RI = 100 * \left[\frac{t_{r(inconnu)} - t_{r(n)}}{t_{r(N)} - t_{r(n)}}\right]$$

La formule, exposée ci-dessus, permet de convertir les temps de rétention en indices de rétention, et ainsi s'affranchir des variations du temps de rétention, selon la longueur de la colonne par exemple. Les indices de rétention des différents alcanes, utilisés pour calibrer le système, suivent le modèle suivant : un alcane à n carbone aura un indice de rétention de n*100. Ainsi, l'indice de l'alcane C8 sera 800, le C12 sera 1200, et ainsi de suite. Par exemple, si le linalol présente un indice de rétention de 1084 pour une méthode donnée, cela signifie que son temps de rétention est compris entre les alcanes C10 et C11.

L'ADULTÉRATION DES MATIÈRES PREMIÈRES AROMATIQUES NATURELLES

1. Définition de la pureté et de la naturalité

L'objectif de ce projet d'étude est de mettre au point des méthodes analytiques, permettant d'authentifier les huiles essentielles, c'est-à-dire de vérifier que les échantillons sont bien 100% purs et naturels.

Une huile essentielle est dite « naturelle » si ce produit est bien constitué de carbone biosourcé. Par opposition, un produit de synthèse est constitué de carbone d'origine fossile. Une huile essentielle 100% naturelle n'a donc pas été adultérée avec un produit d'origine de synthèse.

Une huile essentielle est définie par son origine botanique, géographique, ainsi que de son procédé d'obtention. Une huile essentielle est dite pure, si elle n'a pas subi d'ajout de produits, même d'origine naturelle, qui diffère de la définition de l'huile essentielle d'origine.

2. Les différentes adultérations

Les matières premières aromatiques naturelles sont des produits qui peuvent parfois être très chers. Les rendements d'extraction étant très souvent relativement faibles, il est nécessaire de travailler sur de grandes quantités du produit brut.

Ces produits peuvent être fraudés pour différentes raisons, principalement économiques. Les huiles essentielles doivent correspondre à des normes de qualités pour répondre aux besoins des clients. La qualité d'un produit est variable selon les années, les matières végétales récoltées étant dépendantes notamment des conditions météorologiques et des températures. Les producteurs sont alors parfois enclins à falsifier leurs produits, pour répondre aux critères de qualités et pouvoir écouler leur stock.

Les fraudes associées aux produits naturels sont généralement des adultérations. Les producteurs vont ajouter des composés extérieurs à la matière naturelle. De nombreuses adultérations existent, et affectent la naturalité et la pureté des produits. Il est possible de les regrouper en trois catégories (**Figure 8**) :

- Ajout de molécules isolées
    - synthétisées à partir de produits issus de la pétrochimie
    - obtenues par hémisynthèse
    - d'origine naturelle
    - ajout de composés odorants pour retrouver une conformité olfactive
- Coupe avec une huile essentielle différente
    - d'origine botanique différente (espèces, variétés, …)
    - d'origine géographique différente
    - de partie végétale différente
- Dilution de l'huile essentielle, pour augmenter les rendements
    - par une huile végétale ou minérale
    - dans un solvant

Les techniques classiques d'identification et de caractérisation ne permettent pas toujours de différencier une molécule naturelle identique, issue de deux origines différentes, ou encore d'une molécule naturelle de son équivalent de synthèse.

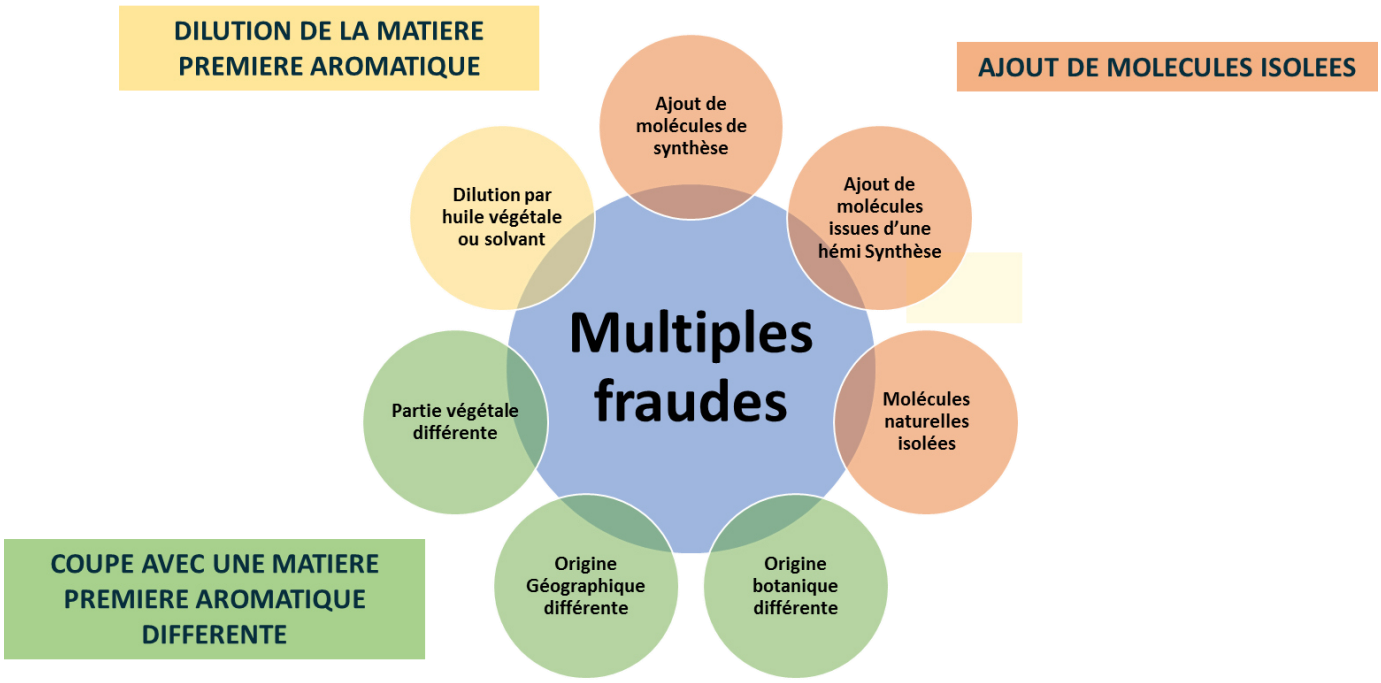

Figure 8: Les huiles essentielles sont la cible de nombreuses adultérations

3. Mise en évidence de l'adultération

3.1. Marqueurs d'ajouts

La détection d'impureté(s) résiduelle(s) s'effectue par caractérisation en GC-MS de la matière première aromatique. La détection d'un métabolite, qui ne fait pas partie de la constitution de l'échantillon analysé, ou la présence d'une molécule, en quantité anormale, peut permettre de mettre en évidence une adultération.

Ces anomalies peuvent mettre en lumière plusieurs fraudes :

- Ajout de molécules de synthèse, si la présence d'un précurseur de synthèse (une impureté résiduelle obtenue pendant la synthèse de la molécule d'adultération) est confirmée. Dans ce cas, l'huile essentielle n'est pas naturelle.
    - Exemple avec la présence de dihydrolinalol, qui indiquera que l'huile essentielle est constituée en partie ou en totalité de linalol de synthèse (Burfield, 2003; König and Hochmuth, 2004).

- Coupe avec une autre huile essentielle, dans le cas où il y a présence, ou concentration anormale, d'une molécule indicatrice d'une autre matière première aromatique, qui a servi d'adultérant. Un composé caractéristique peut être propre à la matière, s'il ne se retrouve pas dans d'autres matières ; représentatif de la matière en fonction de sa concentration ; distinctif de parties végétales différentes, ou bien d'autres origines botaniques, ou géographiques.
    - Exemple avec la présence de δ-3-carène en quantité importante dans l'huile essentielle de mandarine, qui indique une coupe avec l'orange douce (Burfield, 2003; Schipilliti et al., 2010).
    - Exemple avec la présence de foeniculine en quantité importante dans l'huile essentielle d'anis, qui indique une coupe avec l'huile essentielle de badiane (Burfield, 2003).

La mise en évidence de ce type d'adultération peut être réalisée par GC-FID ou par GC-MS, qui sont les techniques de référence pour l'analyse et l'identification des molécules volatiles. Les analyses en laboratoire se font généralement par utilisation d'un simple quadripôle. Travailler à plus haute résolution, à l'aide d'un temps de vol ou d'un triple quadripôle par exemple, permet cependant de mieux visualiser les impuretés à l'état de trace.

Toutefois, ces méthodes, relativement simples à mettre en place en contrôle qualité, sont loin d'être infaillibles pour conclure sur la pureté et la naturalité d'un échantillon. En effet, il est possible de

purifier les molécules de synthèse, afin d'éliminer les précurseurs de synthèse. La variabilité naturelle est également à prendre en compte. Une bonne connaissance de la matrice d'analyse est nécessaire, pour savoir si une molécule anormale identifiée est un marqueur d'ajout potentiel ou s'il s'agit d'une présence naturelle de cette molécule dans l'huile essentielle analysée. Enfin, il faut prendre en compte que certains composés sont des traceurs de vieillissement ou d'oxydation et n'apparaissent que lorsque la matière se dégrade.

D'autres techniques d'authentification complémentaires sont donc nécessaires, afin d'améliorer le diagnostic d'évaluation.

3.2. Analyse de chiralité

3.2.1. Principe de la chiralité

3.2.1.1. Définitions

Deux composés différents, qui possèdent la même formule moléculaire, sont dits isomères l'un par rapport à l'autre. Ces deux isomères sont dits stéréoisomères entre eux, s'ils présentent une isomérie de disposition dans l'espace, c'est-à-dire si ces deux molécules sont de constitution identique, mais l'organisation spatiale des atomes est différente. Il existe deux types d'isomères différents : les énantiomères et les diastéréoisomères. Deux stéréoisomères sont diastéréoisomères, s'ils ne sont pas images dans un miroir plan.

La chiralité est une propriété de symétrie, entre une molécule et son image dans un miroir plan, non superposables. Ces deux formes sont appelées énantiomères. La plupart des énantiomères sont dus à la présence d'une structure tétraédrale sp3 de l'atome de carbone. Ce dernier est asymétrique car il possède quatre substituants différents. C'est ce que l'on appelle un centre stéréogène. Il est à noter que ce centre de chiralité n'est pas toujours un carbone, même si cela reste le plus courant dans les molécules organiques.

3.2.1.2. Propriétés

Dans le monde vivant (animal et végétal), les énantiomères possèdent des propriétés physicochimiques différentes, car l'environnement est anisotropique (les propriétés physicochimiques dépendent d'une direction). Ce paramètre est important car cela peut changer considérablement la nature du produit fabriqué. En effet, la chiralité peut affecter l'odeur perçue par les récepteurs olfactifs humains, qui sont sensibles à la chiralité d'une molécule. Dans le domaine des arômes et parfums, quelques molécules volatiles présentent cette différence d'odeur. On peut citer l'exemple de la carvone (**Figure 9**) : la carvone (R), présente dans la menthe verte et la carvone (S), présente dans

l'aneth, n'ont pas la même odeur. C'est également le cas du limonène (R), présent dans le citron et le limonène (S), présent dans l'orange.

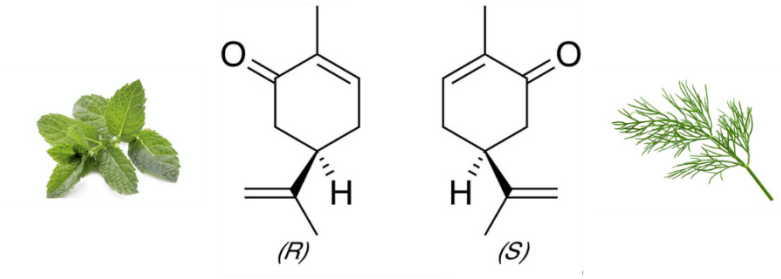

Figure 9: Les deux énantiomères de la carvone ne sont pas perçus olfactivement de la même manière. La carvone (R) est caractéristique de la menthe crépue, tandis que la carvone (S) est caractéristique de l'aneth

3.2.1.3. Nomenclature

Différentes nomenclatures existent, afin de désigner les différents énantiomères d'une molécule. La première est basée sur les propriétés optiques que présentent les molécules chirales (découvertes par Biot) : c'est ce que l'on appelle le pouvoir rotatoire. Si une lumière polarisée dans le plan est déviée à droite, l'isomère est appelé dextrogyre (d, +) et son énantiomère, appelé lévogyre (l, -) déviera la lumière à gauche. Une seconde nomenclature est la règle de Cahn, Ingold et Prelog (Cahn et al., 1956). Cette nomenclature est indépendante du pouvoir rotatoire. Elle prend en compte le poids (c'est-à-dire le numéro atomique Z) des 4 différents substituants liés au carbone asymétrique. Le plus léger des quatre substituants n'est pas retenu, les trois autres substituants sont classés par ordre décroissant du numéro atomique Z. Si l'ordre de succession est dans le sens des aiguilles d'une montre, la stéréochimie est dite R (Rectus) tandis que si le sens est inverse au sens des aiguilles d'une montre, la stéréochimie est dite S (Sinister). Cette nomenclature permet de décrire la conformation absolue d'un composé chiral, selon cette règle séquentielle.

3.2.1.4. La chiralité pour l'authentification

A l'état naturel, la catalyse enzymatique induit généralement une stéréosélectivité de la biosynthèse, dans le cas où les métabolites secondaires actifs possèdent au moins un carbone asymétrique. Ainsi, dans une majorité de cas, les molécules chirales auront préférentiellement un énantiomère majoritaire par rapport à l'autre. Cependant, certaines molécules peuvent se racémiser naturellement, dans

certaines conditions de pH ou de température. C'est notamment le cas des alcools tertiaires (linalol, α-terpinéol ou terpinène-4-ol par exemple) (Casabianca et al., 1998).

A l'inverse, l'obtention par voie synthétique aboutit très souvent à un mélange racémique, composé d'un mélange égal des deux énantiomères (50% du R et 50% du S). Il est à noter que ce mélange n'est pas optiquement actif. Il est difficile de synthétiser en laboratoire des énantiomères purs. Cela nécessite généralement d'utiliser des catalyseurs énantiosélectifs ou de réaliser des séparations énantiosélectives. Cependant, l'hémisynthèse, réalisée à partir de réactifs issus de produits naturels, permet d'obtenir des énantiomères si la molécule initiale présente elle-même une stéréosélectivité. Par exemple, la carvone (-), peut être synthétisée à partir de limonène (+) extrait des terpènes d'orange (Gozzi et al., 2009).

L'analyse du ratio énantiomérique permet donc la mise en évidence d'une fraude de synthèse si l'on observe une racémisation des composés. De plus, il est possible de mettre en évidence des coupes entre produits naturels, si la matrice naturelle ajoutée possède des chiralités inversées par rapport à la matrice d'intérêt.

La teneur d'énantiomère est décrite en déterminant la pureté chromatographique. Il s'agit du pourcentage d'un énantiomère par rapport au total des deux énantiomères, décrit par les formules ci-dessous :

$$\%(R) = {Aire\ (R)}\Big/{Aire\ (R+S)} * 100 \quad \text{ou} \quad \%(S) = {Aire\ (S)}\Big/{Aire\ (R+S)} * 100$$

A noter que l'excès énantiomérique et la pureté optique sont aussi utilisés pour décrire la teneur d'énantiomère.

3.2.2. L'analyse de la chiralité par chromatographie gazeuse

L'analyse du rapport énantiomérique peut se faire par séparations chirales à l'aide d'une analyse GC. Il est également possible de réaliser des séparations chirales par HPLC (des colonnes de phases stationnaires chirales sont utilisées), par HPTLC (Chromatographie sur couche mince haute performance) et par électrophorèse capillaire (un additif chiral est ajouté dans la phase mobile). Dans le cas des molécules volatiles, la séparation chirale par GC est plus pertinente.

La séparation des molécules chirales ne peut être réalisée en chromatographie en phase gazeuse sur des colonnes traditionnelles, sans dérivation avec un composé optiquement pur en amont. Il est nécessaire d'utiliser des colonnes de phases stationnaires chirales, constituées de cyclodextrines, le

plus souvent dérivatisées, pour une meilleure efficacité de la séparation (Beck et al., 2000). Les cyclodextrines sont des molécules cages, obtenues à partir de la dégradation enzymatique de l'amidon. Ce sont des oligomères cycliques, composés de résidus de glucose (**Figure 10**). Le nombre d'unité de glucose qui compose le cycle des cyclodextrines défini sa taille (Connors, 1997; Loftsson and Duchene, 2007). Les cyclodextrines sont utilisées depuis 1978 dans le domaine de la chimie analytique, pour la séparation analytique chirale directe (Harada et al., 1978). Ces cyclodextrines sont utilisées comme greffe sur la phase stationnaire des colonnes. Ces propriétés de sélecteur chiral, produites par des mécanismes d'inclusions et d'interactions extra cavités (Berthod et al., 1992), permettent la séparation des énantiomères.

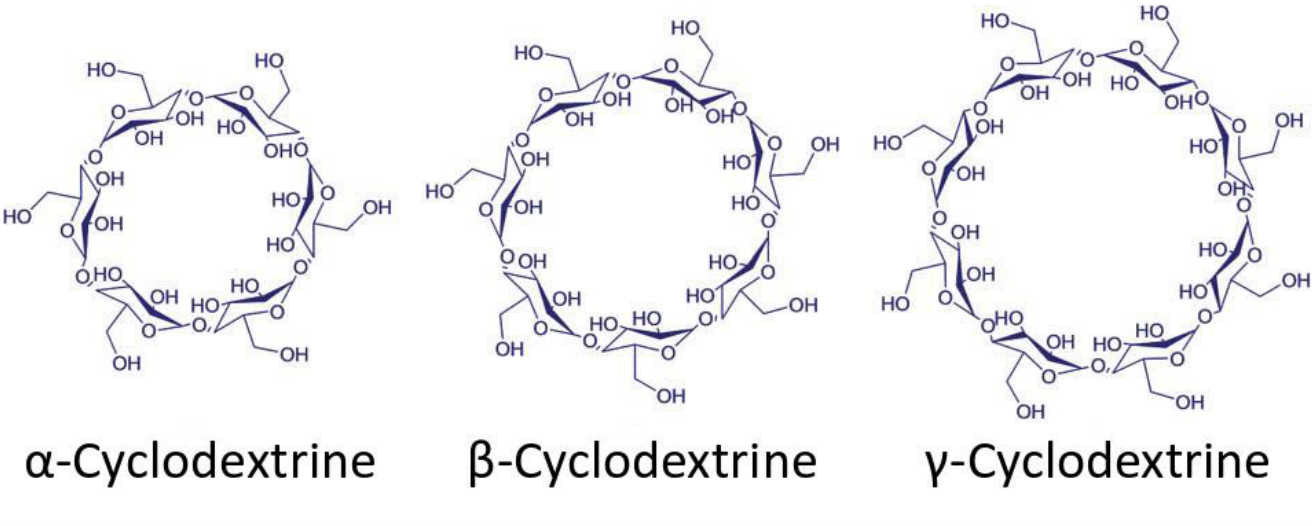

Figure 10: Structure des cyclodextrines alpha, beta et gamma, adapté de Myrick et al.(2014)

L'établissement de bases de données de chiralité, pour connaître la stéréosélectivité de plusieurs énantiomères d'une même matrice, est nécessaire afin de pouvoir authentifier, avec certitude, un produit naturel. Il est donc important de développer des méthodes permettant d'obtenir un profil énantiomérique complet.

Il existe de nombreuses phases stationnaires de chiralité différentes, permettant la résolution de couples d'énantiomères de molécules spécifiques, mais aucune colonne n'est actuellement universelle pour la séparation des énantiomères. L'utilisation de méthodes multidimensionnelles par GC présente alors un intérêt. Cette technique permet de séparer un grand nombre d'énantiomères en une seule analyse.

3.2.3. Analyses énantiomériques par GC Multidimensionnelle MDGC – Principe du Heart Cutting

L'efficacité des systèmes GC traditionnels est insuffisante pour séparer complètement les matrices complexes, telles que les huiles essentielles. La solution est d'utiliser des techniques multi dimensionnelles. La GC multidimensionnelle (MDGC) est un système qui utilise des colonnes avec des caractéristiques de séparations différentes, pour améliorer la séparation des composés dans des matrices complexes (Sharif et al., 2016). Dans le cas de l'analyse énantiomérique, l'objectif est d'associer une première colonne capillaire, de séparation « classique », constituée d'une phase polaire ou apolaire, avec une seconde colonne composée d'une phase chirale, pour séparer les énantiomères. Le système repose sur le principe du heart-cutting, réalisé à l'aide d'un Deans Switch (**Figure 11**).

Après injection, les composés sont préalablement séparés dans la première colonne. Ensuite, en position « no cut », la valve est fermée, un débit d'hélium (indiqué sur le schéma par une flèche verte) vient directement emmener les composés au premier détecteur. Dès qu'un composé d'intérêt (en l'occurrence un composé chiral) est séparé sur la première colonne, la valve bascule en mode heart cut, et le débit d'hélium (symbolisé par une flèche rouge) vient cette fois diriger les composés vers la deuxième colonne, permettant de séparer les énantiomères, avant d'arriver au deuxième détecteur.

L'énantio-MDGC présente de nombreux intérêts. Les méthodes développées permettent de séparer un grand nombre d'énantiomères. Par comparaison avec l'énantio-GC simple, plus de composés sont séparés en MDGC, avec une meilleure résolution, ce qui permet de s'affranchir d'éventuelles coélutions.

Le principal désavantage de la technique est la limitation par la température maximale de la colonne chirale, de l'ordre de 200 à 220°C maximum environ, ce qui complique les développements de méthodes. Il existe cependant depuis plusieurs années des GC pourvues de deux fours indépendants, permettant de s'affranchir des problèmes de températures maximales liés à la colonne chirale.

Le second désavantage est la longueur de la première colonne, qui ne doit pas être trop importante. Si le gradient appliqué est rapide, la température sera trop élevée pour séparer les énantiomères dans la deuxième colonne. Si le gradient appliqué est trop lent, le temps de méthode nécessaire à la séparation des énantiomères sera très important.

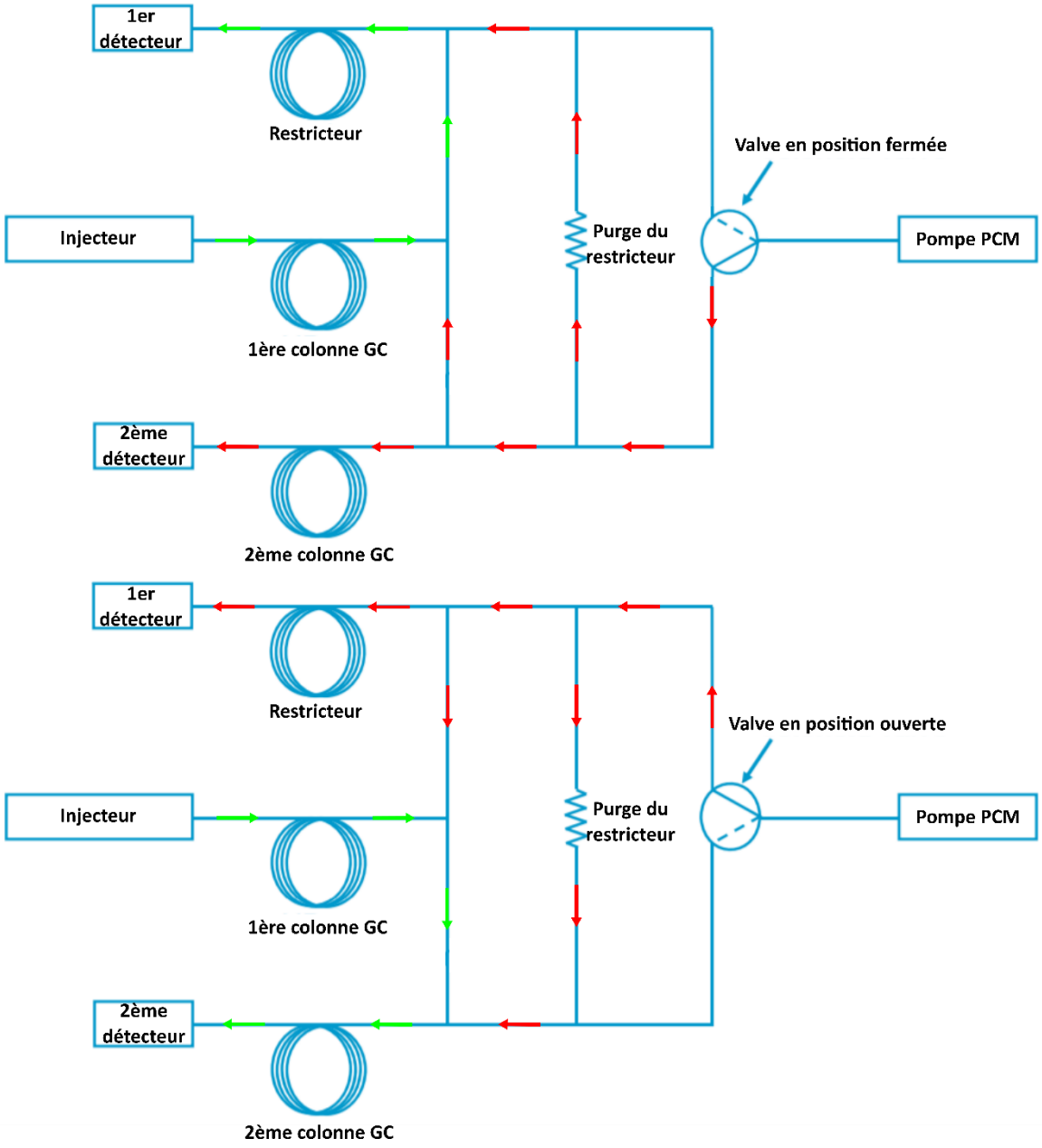

Figure 11: Principe du Heart-cutting avec un système Dean Switch, adapté de Jones (2011)

3.2.4. Applications des analyses énantiomériques pour l'authentification

L'analyse énantiomérique est utilisée depuis plusieurs décennies, pour authentifier les produits naturels. L'approche par analyse GC multi dimensionnelle, développée dès les années 80 (Schomburg et al., 1984), a permis d'améliorer la séparation des composés chiraux dans les matrices complexes. Cette technique est, la plupart du temps, privilégiée dans les huiles essentielles. Elle permet d'obtenir le ratio énantiomérique d'un plus grand nombre de composés, en une seule analyse. Cela conduit à des profils énantiomériques décrivant la quasi-totalité des métabolites chiraux des huiles essentielles (Mondello et al., 2006). En outre, l'amélioration des phases stationnaires des colonnes chirales (Bayer and Mosandl, 2004) a permis le développement de colonnes chirales permettant d'analyser un plus grand nombre d'énantiomères.

Les premières banques de données de chiralité des huiles essentielles apparaissent au début des années 1990, avec principalement les travaux de Mosandl et König. Ces dernières années, les travaux ont essentiellement portés sur les huiles essentielles de citrus (Mondello) et de tea tree (Mariott).

Le **Tableau 1** ci-après recense les principales études énantiomériques, réalisées sur les huiles essentielles, disponibles dans la littérature. Ces données sont nécessaires afin d'authentifier les matières aromatiques. Toutefois, peu de banques de données de chiralité ont été publiées. Les banques de données décrivent principalement la chiralité des monoterpènes et monoterpénoïdes. Quelques rares études ont été conduites sur l'analyse énantiomériques des sesquiterpènes (König et al., 1994) et des diterpenes hydrocarbonés (Pietsch and König, 1997). Certaines huiles essentielles ont été très étudiées (lavande et lavandin, agrumes, tea tree), tandis que très peu, voir aucunes données énantiomériques ne sont disponibles pour certaines huiles essentielles (cypriol ou ciste par exemple). Les autres matières premières aromatiques, telles que les absolues, n'ont également pas été beaucoup étudiées par énantiomérie.

La plupart des études se sont concentrées sur les métabolites les plus abondants de ces matrices. Cependant, l'étude la plus complète possible du profil énantiomérique est nécessaire pour mettre en évidence des fraudes, notamment des coupes entre huiles essentielles. En effet, il existe des corrélations énantiomériques entre terpénoïdes (König, 1998), liées aux mécanismes de biosynthèse précédemment décrits.

Le développement de nouvelles analyses Enantio-MDGC, permettant l'analyse d'un plus grand nombre de métabolites chiraux et l'étude d'un plus grand nombre d'espèces d'huiles essentielles, apportera une amélioration du contrôle de la qualité des matières premières aromatiques. Ces analyses

permettront de remonter au métabolisme de ces molécules par des systèmes enzymatiques spécifiques aux plantes et aux terroirs.

L'analyse énantiomérique présente le désavantage de ne pouvoir être utilisée que sur des molécules chirales D'autre part, les études de chiralité ne permettent pas toujours de mettre en évidence des adultérations, ou de conclure. Par exemple, le linalol présent dans l'huile essentielle de bois de rose est naturellement racémique (Casabianca et al., 1998). Il existe également le cas d'un ajout d'huile essentielle de shiu dans de l'huile essentielle de lavande, qui est indétectable, car l'énantiomère majoritaire du linalol est le même. L'analyse de marqueurs n'est pas toujours réalisable car ces impuretés peuvent être éliminées. L'analyse des isotopes peut être une approche complémentaire pour mettre en évidence des différences.

Tableau 1 : Principales études énantiomériques réalisées sur des huiles essentielles, recensées dans la littérature

Huiles essentielles analysées	**Molécules investiguées**	**Observations**	**Sources**
Lavande, Lavandin, Bergamote, Sauge sclarée, Myrthe, Néroli, Thym, Petitgrain, Cardamome, Ylang, Magnolia, Verbena, Eucalyptus, Laurier, Origan, Sarriette, Basilic, Estragon, Poivre noir, Jasmin, Orange, Romarin, Cannelle, Bois de rose, Pamplemousse, Citron, Rose	Linalol, Acétate de linalyle	Données d'échantillons naturels	(Casabianca et al., 1998)
Coriandre	Limonène, Linalol	Différences entre échantillons naturels et synthèse. Analyses GC-C/P-IRMS complémentaires	(Frank et al., 1995)
Aneth	Limonène, carvone, α-phellandrène, β-phellandrène	Différences entre échantillons naturels et synthèse. Analyses GC-C/P-IRMS complémentaires	(Faber et al., 1997; Reichert et al., 2000)
Mandarine	α-pinène, β-pinène, limonène	Différences entre échantillons naturels et synthèse. Analyses GC-C/P-IRMS complémentaires	(Faulhaber et al., 1997a, 1997b)
Mandarine	α-thuyène, α-pinène, camphène, β-pinène, sabinène, α-phellandrène, β-phellandrène, limonène, citronellal, linalol, terpinène-4-ol, α-terpinéol	Données d'échantillons naturels. Analyses GC-C/P-IRMS complémentaires	(Schipilliti et al., 2010; Sciarrone et al., 2010)
Mélisse, Citron, citronnelle, Litsea Cubeba, Lemongrass	Citronellal	Différences entre échantillons naturels et synthèse, et entre origines botaniques. Analyses GC-C/P-IRMS complémentaires	(Nhu-Trang et al., 2006a)

Lavandula	Oxyde de trans et cis linalol, acétate de linalyle, lavandulol, terpinène-4-ol, linalol	Données d'échantillons naturels	(Kreis and Mosandl, 1992)
Bergamote, bigaraden pamplemousse, citron, lime, orange, neroli, kumquat, petitgrain, shaddock, mandarine, citronelle, lemongrass	α-pinène, β-pinène, limonène	Données d'échantillons naturels	(Mosandl et al., 1990)
Basilic, carotte semences, celery, cannelle cassia et ceylan, coriandre, eucalyptus, fenouil, sapin aiguilles, geranium, genévrier, terebenthine, myrrhe, olibanum, pin aiguilles, romarin, thym, valériane, vetiver, ylang ylang	α-pinène, β-pinène, limonène	Données d'échantillons naturels	(Hener et al., 1990)
Angélique, poivre noir, calamus, camphre, carvi, coriandre, aneth, gingembre, marjolaine, noix de muscade, origan, persil, rue, sassafras, vermouth	α-pinène, β-pinène, limonène	Données d'échantillons naturels	(Hener et al., 1991)
Lavande, lavandin, noix de muscade, basilic, coriandre, cannelle, bergamote	Linalol, acétate de linalyle	Données d'échantillons naturels	(Schubert and Mosandl, 1991)
Eucalyptus, tea tree, thym	α-pinène, sabinène, β-pinène, α-phellandrène, limonène, linalol, terpinène-4-ol, bornéol, α-terpinéol	Différences entre échantillons naturels et synthèse. Analyses MDGC-MS complémentaires	(Kreck et al., 2002)
Neroli, petitgrain	α-pinène, β-pinène, limonène, terpinène-4-ol, nérolidol	Données d'échantillons naturels	(Juchelka et al., 1996)
Lavande	Linalol, acétate de linalyle	Données d'échantillons naturels. Analyses GC-C/P-IRMS complémentaires	(Jung et al., 2005)
Origan, sarriette, thym, fenouil	α-pinène, limonène, terpinène-4-ol, β-pinène, linalol, bornéol, fenchone, camphre	Différences entre échantillons naturels et synthèse. Analyses GC-C/P-IRMS complémentaires	(Greule et al., 2008)

Poivre noir, noix de muscade, romarin	α-thuyène, α-pinène, camphène, β-pinène, sabinène, α-phellandrène, δ-3-carène, β-phellandrène, limonène	Données d'échantillons naturels	(König et al., 1992)
Baume de copahu, cubebe, poivre noir, orange, cèdre, curcuma	α-copaene, δ-cadinène, β-elemène, δ-elemène, α-bisabolène, β-bisabolène ; α-curcumène, bicylcogermacrene, cis et trans calamenene	Données d'échantillons naturels	(König et al., 1994)
Melisse, bergamote, rose, géranium, menthe poivrée, romarin	Citronellal, linalol, acétate de linalyle, oxyde de linalol, citronellol, isomenthone, menthone, menthol, isomenthol	Données d'échantillons naturels	(König et al., 1997)
Bergamote, rose, menthe arvensis, menthe poivrée, camomile, marjolaine, hysope, cèdre, iris	Linalol, acétate de linalyle, citronellol, menthone, menthol, neomenthol, menthofurane, menthone, isopulegol, isomenthone, hydrate de trans-sabinène, α-bisabolol, epi α-bisabolol, cis α-irone, cis γ-irone	Données d'échantillons naturels	(König and Hochmuth, 2004)
Tea tree	α-thuyène, β-pinène, sabinène, α-phellandrène, limonène, hydrate de trans et cis sabinène, linalol, terpinène-4-ol, α-terpinéol	Données d'échantillons naturels	(Shellie et al., 2001)
Tea Tree	Terpinène-4-ol, α-terpinéol, limonène	Données d'échantillons naturels	(Davies et al., 2016; Southwell et al., 2017; West et al., 2015; Wong et al., 2015a, 2015b)
Citronnelle	Linalol, citronellal, citronellol, limonène	Données d'échantillons naturels	(Lorenzo et al., 2000)
Romarin	Camphène, β-pinène, sabinene, limonène, camphre, isobornéol, bornéol, terpinène-4-ol, α-terpinéol	Données d'échantillons naturels	(Mondello et al., 2006)
Citron, bergamote, mandarine, lime, orange	α-thuyène, α-pinène, camphène, β-pinène, sabinène, α-phellandrène, β-phellandrène, limonène, camphre,	Données d'échantillons naturels	(Bonaccorsi et al., 2011a)

	linalol, citronella, acétate de linalyle, terpinène-4-ol, α-terpinéol		
Petitgrain	Linalol, Acétate de linalyle	Données d'échantillons naturels	(Schipilliti et al., 2012a, 2018)
Néroli	α-thuyène, α-pinène, camphène, β-pinène, sabinène, α-phellandrène, β-phellandrène, limonène, citronellal, acétate de linalyle, linalol, terpinène-4-ol, α-terpinéol	Données d'échantillons naturels	(Bonaccorsi et al., 2011b)
Osmanthus absolue, violette absolue	Trans α-ionone, trans α-damascone	Données d'échantillons naturels	(Werkhoff et al., 1991)
Aneth, carvi, menthe	Carvone	Données d'échantillons naturels	(Ravid et al., 1992b)
Fenouil	Fenchone	Données d'échantillons naturels	(Ravid et al., 1992a)
Sauge sclarée, menthe citronnée, myrthe, petitgrain	Acétate de linalyle	Données d'échantillons naturels	(Ravid et al., 1994a)
Menthe	Piperitone	Données d'échantillons naturels	(Ravid et al., 1994b)
Fenouil, badiane, rose, myrcia, lemongrass, orange	Limonène, linalol	Données d'échantillons naturels	(Wang et al., 1995)
Pin sylvestre, picea abies	α-pinène, δ-3-carene, sabinene, α-phellandrène, limonène	Données d'échantillons naturels	(Sjödin et al., 2000, 1996, 1992)
Origan capitatus	α-pinène, camphene, β-pinène, limonène, 1-octen-3-ol, linalol, terpinène-4-ol, α-terpinéol	Données d'échantillons naturels	(Tateo et al., 1998)
Cèdre atlantica	Limonène, cis-pinane	Données d'échantillons naturels	(Yassaa et al., 2000)
Santal album, spicatum et austrocaledonicum, insulare	B-bisabolol, epi β-bisabolol	Données d'échantillons naturels	(Braun et al., 2007, 2005, 2003)
Laurier	α-terpenyl acétate	Données d'échantillons naturels. Analyses GC-C/P-IRMS complémentaires	(Hammerschmidt et al., 2006)
Origan vulgare	α-pinène, limonène, linalol, terpinène-4-ol, α-terpinéol, acetate de bornyle, bornéol	Données d'échantillons naturels	(Bisht et al., 2009)
Origan vulgare, menthe citrata, orange, coriandre, rose damascene, Cymbopogon flexuosus	Linalol	Données d'échantillons naturels	(Chanotiya and Yadav, 2009)

Romarin	α-pinène, camphène, β-pinène, limonène, linalol, camphor, bornéol, α-terpinéol	Données d'échantillons naturels	(Zawirska-Wojtasiak and Wąsowicz, 2009)
Santal, menthe arvensis et spearmint	β-santalol, carvone, menthol, isopulegol	Données d'échantillons naturels	(Leffingwell, 2011)
Encens	α-pinène	Différences énantiomériques entre *Boswellia carterii* et *sacra*	(Woolley et al., 2012)
Pin sylvestre	α-pinène, δ-3-carène	Données d'échantillons naturels	(Kannaste et al., 2013)
Menthe spicata	Limonène, carvone, piperitone, menthol, menthone, isomenthone, sabinene, β-pinène, α-terpinéol	Données d'échantillons naturels	(Pragadheesh et al., 2015)
Tea tree	α-pinène, limonène, terpinène-4-ol, α-terpinéol	Données d'échantillons naturels	(Wang et al., 2015)
Romarin	α-pinène, verbénone, bornéol, camphre, limonène	Données d'échantillons naturels	(Satyal et al., 2017b)
Lavande	Limonène, camphre, linalol, bornéol, acétate de linalyle, terpinène-4-ol, α-terpinéol, lavandulol, acétate de lavandulyle, β-caryophyllène	Données d'échantillons naturels	(Lafhal et al., 2019)
Poivre noir	β-pinène, sabinène, limonène, terpinène-4-ol	Données d'échantillons naturels	(Wang et al., 2019)

3.3. Analyses des isotopes

Les isotopes sont les atomes d'un même élément présentant, au sein de leur noyau, le même nombre de protons, mais un nombre de neutrons différent. On distingue deux types d'isotopes : les isotopes stables et les isotopes radioactifs (radioisotopes). Les isotopes stables sont constitués de noyaux de structure stable. Au contraire, les isotopes radioactifs se désintègrent spontanément au cours du temps à cause de la structure instable de leur noyau, en émettant de l'énergie et des particules de matière, pour se transformer en d'autres atomes aux noyaux plus stables.

3.3.1. Etude des isotopes stables

3.3.1.1. Principe

L'abondance naturelle des isotopes des principaux éléments des produits naturels et biosourcés est indiquée dans le **Tableau 2**. L'isotope le plus abondant est généralement le plus léger.

Tableau 2 : Abondance naturelle des isotopes organiques

Elements	**Isotope**	**Abondance (%)**	**Masse**	**Référence internationale**
Hydrogène	^{1}H	99,985	1,0078250	V-SMOW
	^{2}H	0,015	2,0141020	
Carbone	^{12}C	98,900	12,000000	V-PDB
	^{13}C	1,100	13,003355	
Azote	^{14}N	99,630	14,003074	N_2 Air
	^{15}N	0,370	15,000109	
Oxygène	^{16}O	99,762	15,994915	V-SMOW
	^{17}O	0,038	16,999130	
	^{18}O	0,20	17,999159	
Soufre	^{32}S	95,020	31,972072	V-CDT
	^{34}S	4,120	33,967868	

L'objectif de l'étude des isotopes stables est d'utiliser ces derniers comme éléments traceurs, pour comprendre un certain nombre de phénomènes, en étudiant l'abondance relative de chaque isotope d'un élément. La composition isotopique relative est variable en fonction de l'origine du produit analysé. Cependant, cette différence d'abondance relative est très faible, elle porte généralement sur la sixième décimale seulement du ratio isotopique de l'isotope le plus lourd sur l'isotope le plus léger. Pour représenter ces faibles variations des rapports isotopiques en abondance naturelle, les physiciens ont choisi d'utiliser le delta, donné par la formule ci-dessous (Brand et al., 2014):

$$\delta^{i}\mathrm{E} = \frac{(\,^{i}\mathrm{R}_{\,Sample} - \,^{i}\mathrm{R}_{\,Reference})}{^{i}\mathrm{R}_{\,Reference}}$$

i correspond au nombre de masse de l'isotope le plus lourd de l'élément E, R_{Sample} correspond au ratio isotopique de l'échantillon analysé, et $R_{Reference}$ correspond au ratio isotopique de la norme internationale de référence. La valeur delta est par la suite multipliée par 1000 et exprimée en pour mille (‰).

Cette unité est exprimée dans une majorité de publication en pour mille, mais elle peut également être exprimé en milli Urey (mUr) (Brand et al., 2014), seule unité rattachée officiellement au système international (SI). Le delta est exprimé par rapport à une référence de calibration internationale. En effet, les valeurs mesurées par les appareils, peuvent varier avec le temps, en fonction de l'environnement de l'instrument. C'est pourquoi il est nécessaire de normaliser les résultats sur une échelle internationale afin de pouvoir réaliser des comparaisons inter laboratoires. La référence internationale des analyses $\delta^{2}H$ et $\delta^{18}O$ est le V-SMOW (Vienna Standard Mean Ocean Water), pour l'analyse $\delta^{13}C$, il s'agit du V-PDB (Vienna-Pee Dee Belemnita), pour celle du $\delta^{34}S$, le V-CDT (Vienna-Canyon Diablo Troilite) et pour le $\delta^{15}N$, il s'agit de la valeur isotopique du N_2 atmosphérique.

Ces variations d'abondances isotopiques naturelles étant très faibles, il est nécessaire de travailler avec une instrumentation perfectionnée, telle que la spectrométrie de masse des rapports isotopiques (IRMS).

3.3.1.2. Facteurs de variation de l'abondance des isotopes stables

Comme expliqué précédemment, les isotopes d'un élément ne sont pas constamment présents dans les mêmes proportions. Cela est dû au phénomène de fractionnement isotopique (Akoka and Remaud, 2020; Galimov, 1985; Sessions and Hayes, 2005). Cette modification isotopique entraine des enrichissements et des appauvrissements de l'abondance naturelle des isotopes d'un même élément. Cette variation de la distribution isotopique est causée par différents effets physicochimiques, expliqués par la différence de masse des isotopes stables d'un élément. Les principales sources de fractionnement isotopiques durant une réaction chimique sont les effets isotopiques cinétiques et thermodynamiques.

L'effet cinétique est provoqué par la différence de mobilité entre un isotope léger et un isotope lourd, ainsi que par leur force de liaisons chimiques. Un isotope lourd sera moins mobile et aura une force de liaison chimique plus importante qu'un isotope plus léger, conduisant à une énergie d'activation plus importante. Ces différences d'énergie d'activation entre isotopes lourds et légers induisent des différences de vitesse de réaction.

L'effet thermodynamique est lié aux différences d'énergie libre et aux constantes d'équilibres entre différents isotopomères (molécules qui diffèrent par leur composition isotopique). Un isotopomère plus lourd aura une énergie libre plus basse qu'un isotopomère plus léger, donc une constante d'équilibre plus faible car le système est plus stable. Cet effet induit des différences d'inerties de réaction. Par exemple, un isotopomère plus lourd aura une plus grande disposition à se concentrer dans les phases condensées lors d'un changement d'état matière.

Le métabolisme d'une plante est en harmonie avec son environnement. Ainsi, les différents éléments qui composent une plante sont soumis à de nombreux fractionnements isotopiques, conférant à la matière naturelle une empreinte isotopique qui lui est propre, et qui est dépendante principalement de son origine botanique et géographique.

3.3.1.2.1. Fractionnement isotopique du carbone dans les plantes

L'élément carbone possède deux isotopes stables, les carbones 12 et 13. La variation isotopique du carbone est déterminée par la valeur $\delta^{13}C$. La variation isotopique du carbone dans les principales matières naturelles est montrée en **Figure 12**. La variation du $\delta^{13}C$ est dépendante du cycle biogéochimique du carbone.

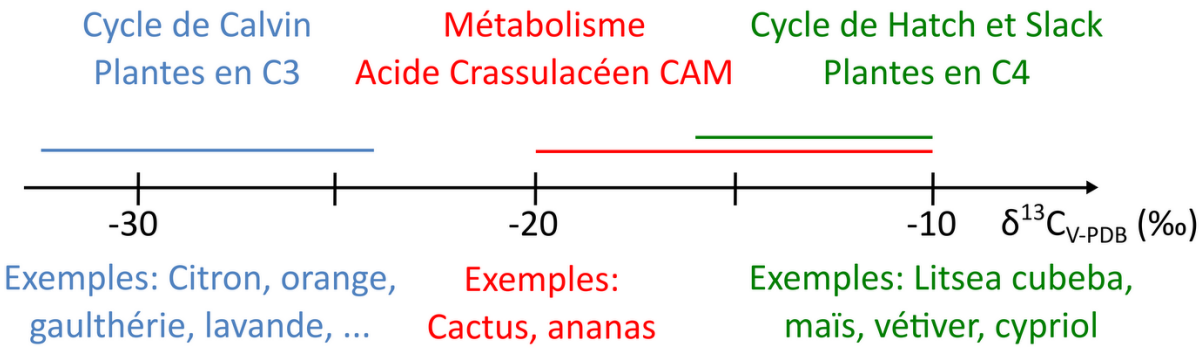

Figure 12 Variation isotopique du $\delta^{13}C$, adapté de Guyon et al. (2020)

La principale source de carbone pour une plante est liée aux échanges atmosphériques. La teneur isotopique du CO_2 atmosphérique est relativement constante sur Terre, sa valeur étant comprise entre -8 et -11 pour mille. Le fractionnement isotopique du carbone dans les plantes provient principalement du mécanisme de fixation du CO_2 lors du processus de photosynthèse. Selon la voie photosynthétique employée par le végétal, les réactions lors du cycle de métabolisation de la plante seront différentes, conduisant à des ratios isotopiques $\delta^{13}C$ différents. Ces différentes voies de photosynthèses sont au nombre de trois : le cycle de Calvin (Cycle C3), le cycle de Hatch et Slack (Cycle C4) et le cycle du Métabolisme Acide Crassulacéen (Cycle CAM).

Le cycle de Calvin ou cycle C3 (Calvin and Bassham, 1962), représenté en **Figure 13**, est la voie photosynthétique la plus répandue, elle concerne environ 95% des végétaux. Les végétaux concernés par ce cycle représentent la plupart des plantes ayant pour origine les régions tempérées et comprennent la majorité des végétaux cultivés. Cette voie d'assimilation est appelée C3 car cette réaction de fixation du CO_2 implique un composé intermédiaire tri carboné, le 3-phosphoglycérate (également appelé acide phosphoglycérique ou APG). Le CO_2 atmosphérique se diffuse à travers des stomates, des orifices présents à la surface des feuilles pour permettre les échanges entre l'organisme végétal et l'air atmosphérique. Ce CO_2 est ensuite dissous dans le cytoplasme avant de se combiner avec le ribulose 1,5-disphosphate (RuBP) pour produire le composé ATG. Cette réaction de

carboxylation est catalysée par une enzyme, le ribulose bis phosphate carboxylase (RuBPc). L'étape de fixation du carbone induit un fractionnement isotopique du carbone très important (-20 pour mille d'après Deleens 1974). Le cycle de Calvin se poursuit avec l'enchainement de différentes réactions de réductions et de régénération du RuBP. La photosynthèse de type C3 aboutit à des ratios isotopiques $\delta^{13}C$ (‰) variant de -20 à -33 (Krueger and Reesman, 1982).

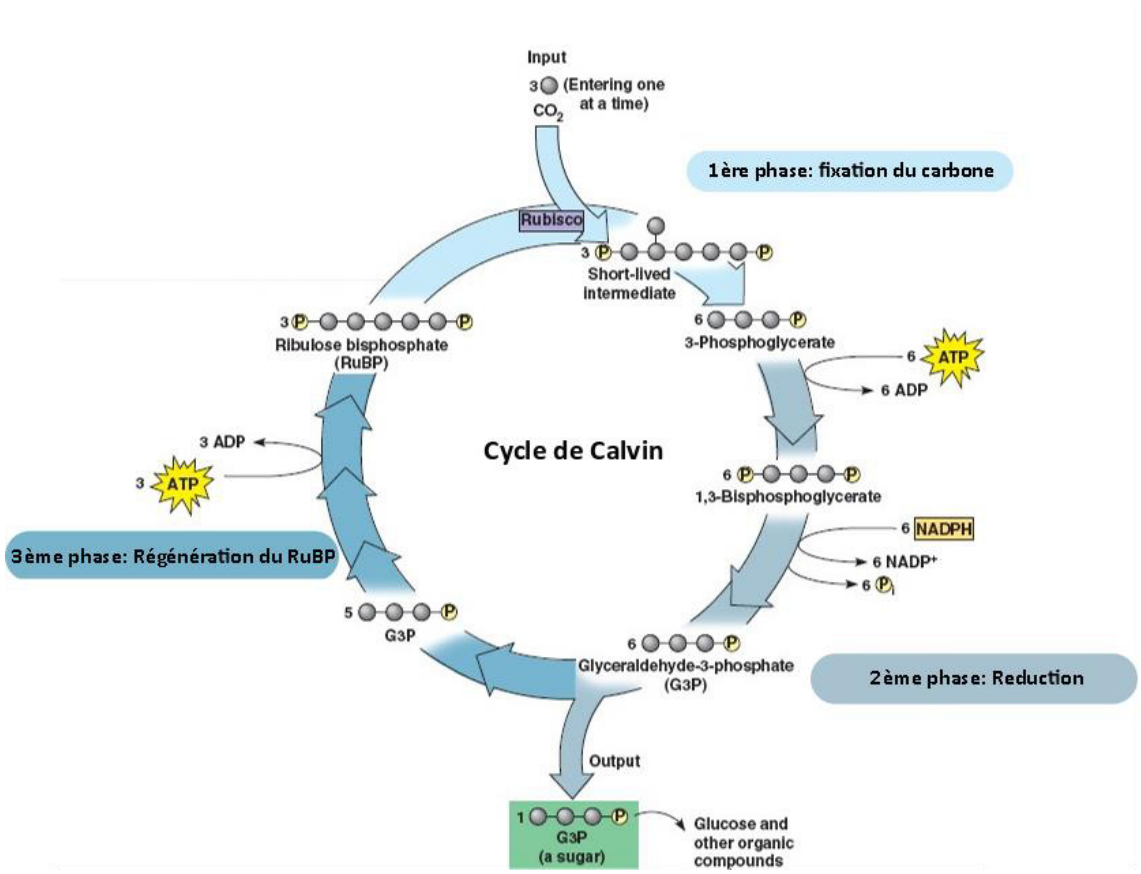

Figure 13: Cycle de Calvin ou Cycle C3, adapté de Reece et al. (2013)

Le mécanisme de photosynthèse C4 ou cycle de Hatch and Slack (Hatch and Slack, 1970), concerne principalement les plantes des régions sèches. Ce cycle (**Figure 14**), qui ne concerne que 1% des végétaux, permet aux plantes de s'adapter à un environnement tropical en permettant d'enrichir le CO_2 pour limiter la photorespiration. Le maïs, la canne à sucre, et le lemongrass, font notamment partie des plantes de type C4. Lors de ce processus de photosynthèse, le CO_2, après diffusion dans le mésophylle, est fixé sur le phosphoénol pyruvate (PEP), pour former l'oxaloacétate (OOA), par catalyse du phosphoénol pyruvate carboxylase (PEPc). Ce produit intermédiaire est composé de 4 carbones, donnant son nom au cycle de type C4. Cette réaction de carboxylation produit un fractionnement isotopique du carbone plus faible que le cycle de Calvin (O'Leary, 1981), pour aboutir à des ratios isotopiques compris entre -7 et -2 pour mille. Le composé OOA est ensuite réduit en malate puis oxydé en pyruvate. Cette dernière étape d'oxydation produit du CO_2 qui est ensuite converti en glucose par un cycle de Calvin tandis que le pyruvate est utilisé pour régénérer le PEP. La photosynthèse en C4 aboutit à des ratios isotopiques $\delta^{13}C$ (‰) variant de -9 à -16 (van Leeuwen et al., 2014; Winkler, 1984).

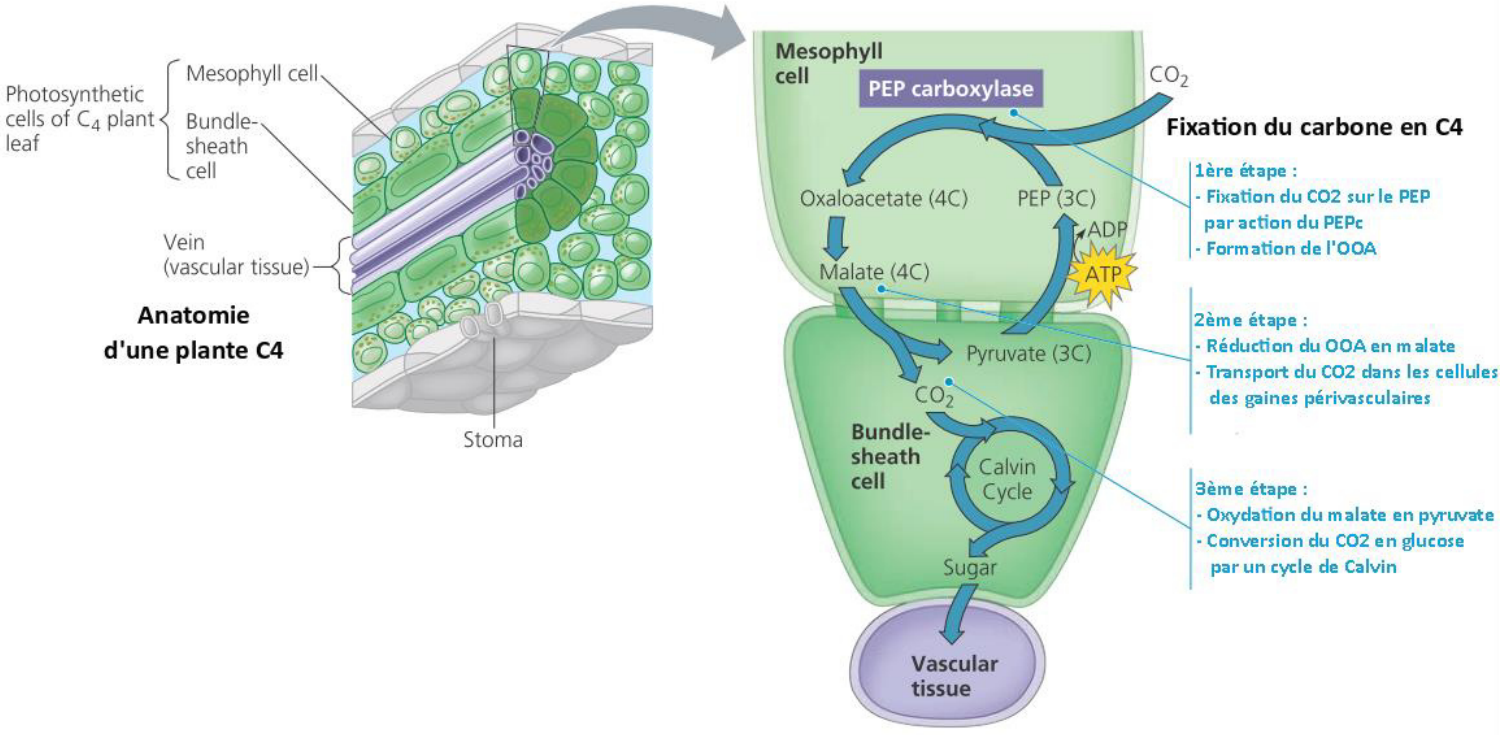

Figure 14: Cycle C4 ou Hatch et Slack, adapté de Reece et al. (2013)

Enfin, il existe le cycle des plantes en CAM (Osmond, 1978) qui concerne principalement les végétaux vivant dans des zones arides (Whelan et al., 1973), tels que les cactées et la vanille. Pour s'adapter aux conditions désertiques, les stomates des plantes restent fermés en journée pour éviter la perte d'eau (Krueger and Reesman, 1982). Le CO_2 est capté durant la nuit et est fixé en oxaloacétate puis en malate grâce à un processus similaire au cycle de Hatch et Slack. De jour, le malate est converti en pyruvate pour régénérer le PEP intermédiaire, et le CO_2 est intégré dans un cycle proche de Calvin (**Figure 15**). Il en résulte des valeurs isotopiques intermédiaires des plantes C3 et C4 $\delta^{13}C$ (‰) : -10 à -24

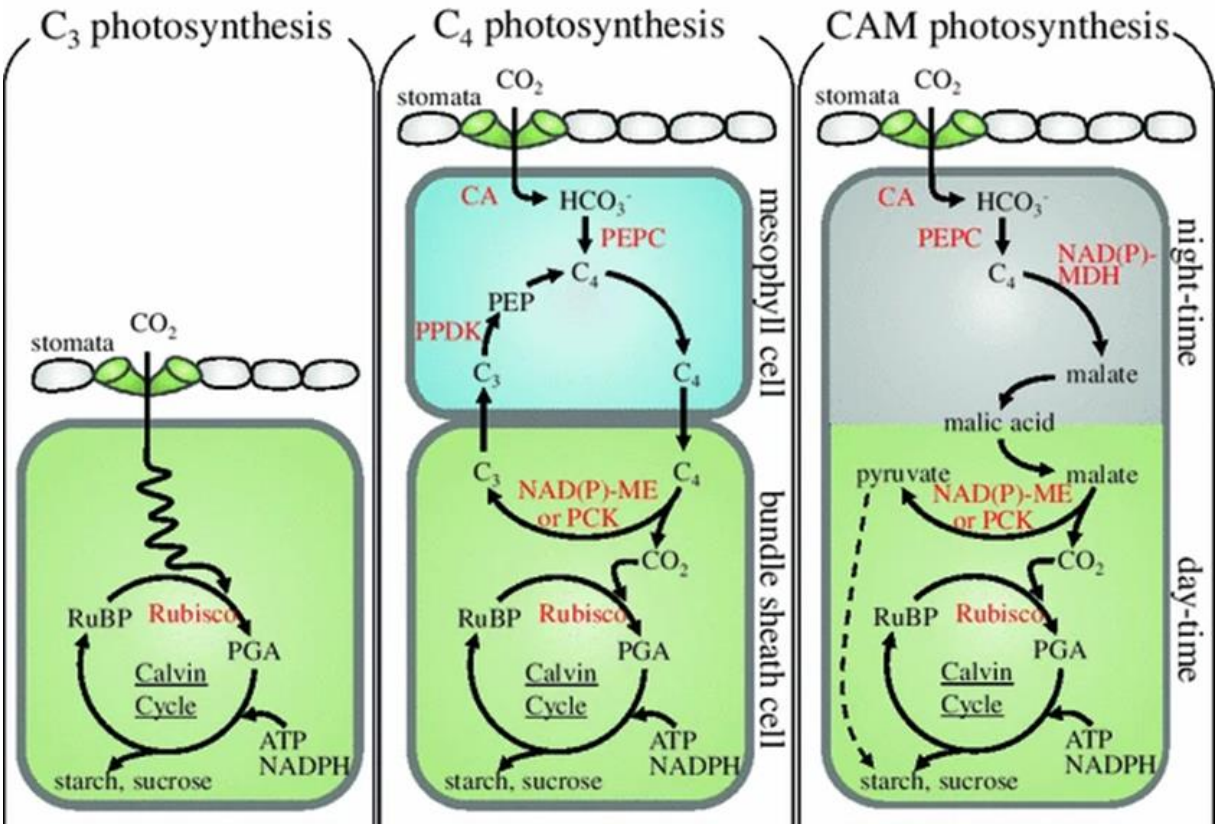

Figure 15: Comparaison entre le cycle CAM et les cycles C3 et C4, adapté de Yamori et al. (2014)

Si le fractionnement isotopique du carbone est principalement lié aux mécanismes de fixation du CO_2 atmosphérique, il est également lié à d'autres facteurs qui vont venir contribuer à la variabilité naturelle des rapports isotopiques du carbone. Il est possible de citer les processus de biosynthèse des métabolites secondaires actifs (Schmidt et al., 2006), les conditions climatiques ou encore la photorespiration qui peuvent venir affecter de manière non significative les ratios isotopiques. En définitive, la signature isotopique du carbone est principalement liée à l'origine botanique de la plante. Ainsi, l'authenticité d'une matière première aromatique peut être déterminée à l'aide du $\delta^{13}C$. Un produit de synthèse ou une autre origine botanique pourront avoir des ratios isotopiques en carbone différents à cause de fractionnements isotopiques distincts.

3.3.1.2.2. Fractionnement isotopique de l'hydrogène dans les plantes

L'élément hydrogène possède deux isotopes stables, l'hydrogène ^1H et le deutérium ^2H. La variation isotopique de l'hydrogène est déterminée par la valeur δ^2H.

La principale source d'hydrogène d'une plante provient de l'eau de pluie. Celle-ci est assimilée par le végétal via le tissu xylémique qui va transporter l'eau depuis le sol jusque dans les feuilles.

La variation de la composition isotopique de l'hydrogène est principalement liée au cycle atmosphérique de l'eau (**Figure 16**), qui se décompose en trois étapes : l'évaporation, la condensation et les précipitations. L'eau des mers et des océans est tout d'abord transformée en vapeur d'eau grâce à l'énergie solaire et s'évapore dans l'atmosphère. Ce gaz va ensuite se condenser en refroidissant au contact de l'atmosphère pour former les nuages. Les nuages vont transporter l'eau par circulation atmosphérique vers l'intérieur des continents, et sous l'effet d'un changement climatique, vont perdre une fraction d'eau sous forme liquide ou solide selon la température.

Les changements successifs de l'état physique de l'eau par les différents phénomènes d'évaporation et de condensation sont à l'origine du fractionnement isotopique de l'hydrogène. En effet, le deutérium étant plus lourd, il s'évapore plus difficilement. Les nuages sont donc constitués de vapeur d'eau appauvries en isotope lourd par rapport à l'eau océanique dont le rapport isotopique est compris entre -1 et 0,7 pour mille (Calderone, 2005). Les précipitations successives que subissent les nuages appauvrissent davantage l'eau contenue dans les nuages car le deutérium étant plus lourd, il se condense plus facilement. De plus, le fractionnement isotopique de l'hydrogène est lié à la température : plus la température diminue, plus le fractionnement isotopique est important. Ainsi, du fait que l'eau soit transportée par effet continental, de l'équateur vers les pôles, l'eau de pluie est beaucoup plus enrichie en deutérium dans les régions chaudes, proches de l'équateur, et appauvrie en deutérium dans les régions froides, proche des pôles.

Le fort effet de fractionnement isotopique subit par l'hydrogène, induit par le cycle atmosphérique de l'eau, permet aux végétaux d'acquérir une empreinte isotopique δ^2H liée à l'origine géographique (latitude, longitude, et altitude). D'autre part, l'origine botanique peut affecter la composition isotopique en deutérium. En effet, la plante va perdre une partie de l'eau assimilée par évapotranspiration. Ce processus est dépendant des cycles de métabolisation de la plante précédemment expliqués C3, C4 et CAM (Feakins and Sessions, 2010).

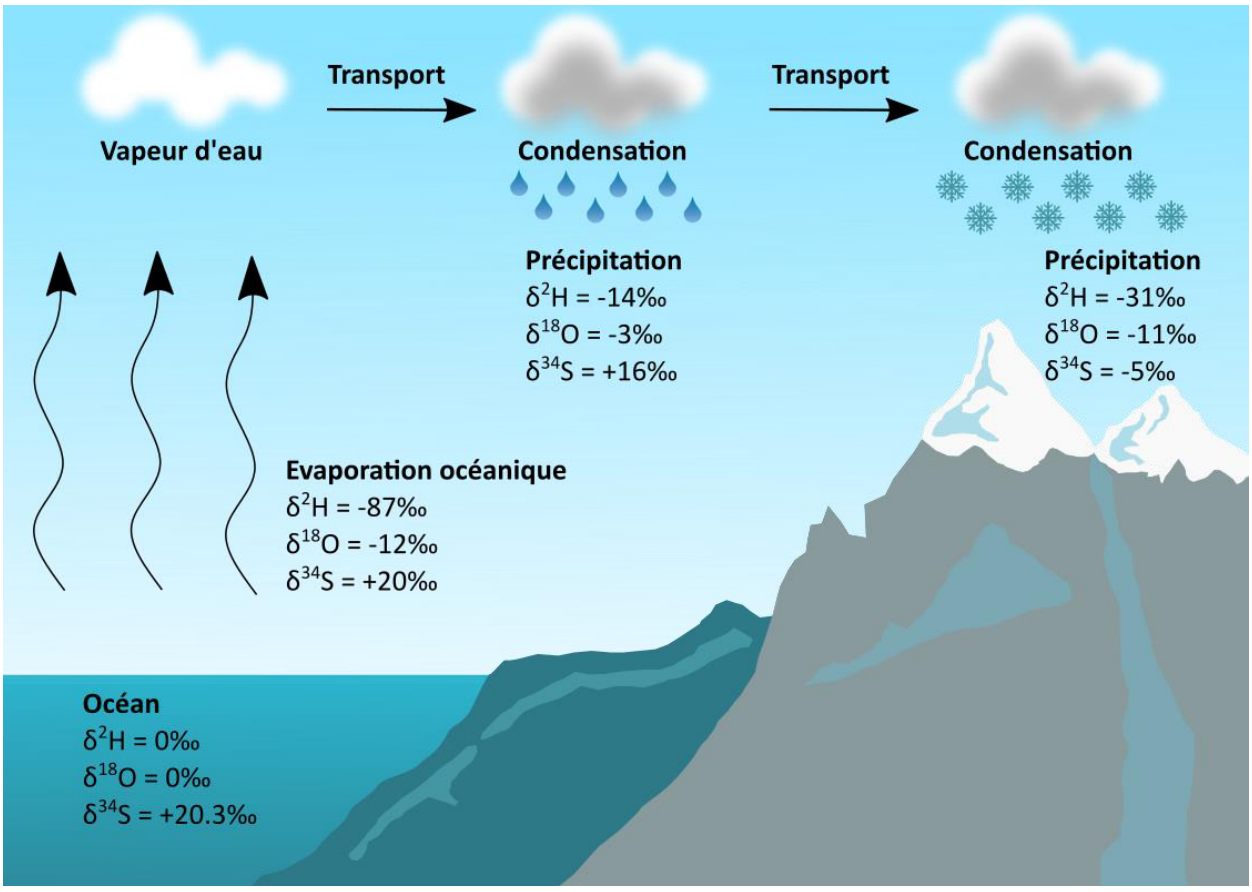

Figure 16 : Les compositions isotopiques de l'hydrogène, de l'oxygène, et du soufre, sont liés au cycle atmosphérique de l'eau, d'après les données de Hoefs (2018) et Nehlich (2015)

3.3.1.2.3. Fractionnement isotopique de l'oxygène dans les plantes

L'élément oxygène possède trois isotopes stables, les oxygènes 16, 17 et 18, ce dernier étant généralement l'isotope stable minoritaire utilisé pour décrire la variation isotopique de l'oxygène dans les plantes ; il est déterminé par la valeur $\delta^{18}O$.

De la même manière que pour l'hydrogène précédemment présenté, la principale source d'oxygène, pour une plante, est l'eau de pluie. La variation isotopique de l'oxygène est liée, en partie, par le cycle atmosphérique de l'eau (Lachniet, 2009). En effet, à cause d'une plus grande vitesse de diffusion des isotopes légers, on observe les mêmes phénomènes de fractionnements isotopiques de l'oxygène que pour l'hydrogène lors des étapes d'évaporation et de condensation (**Figure 16**) : la vapeur d'eau des nuages est appauvrie en oxygène 18 par rapport aux eaux des mers, et l'eau sera davantage enrichie en oxygène 18 à l'équateur, par rapport aux pôles (**Figure 17**). Cela est dû aux déviations telles que les facteurs de latitude, les précipitations successives qui appauvrissent en isotopes lourds l'eau transportée par les nuages, et la température qui influencent les changements d'état physique.

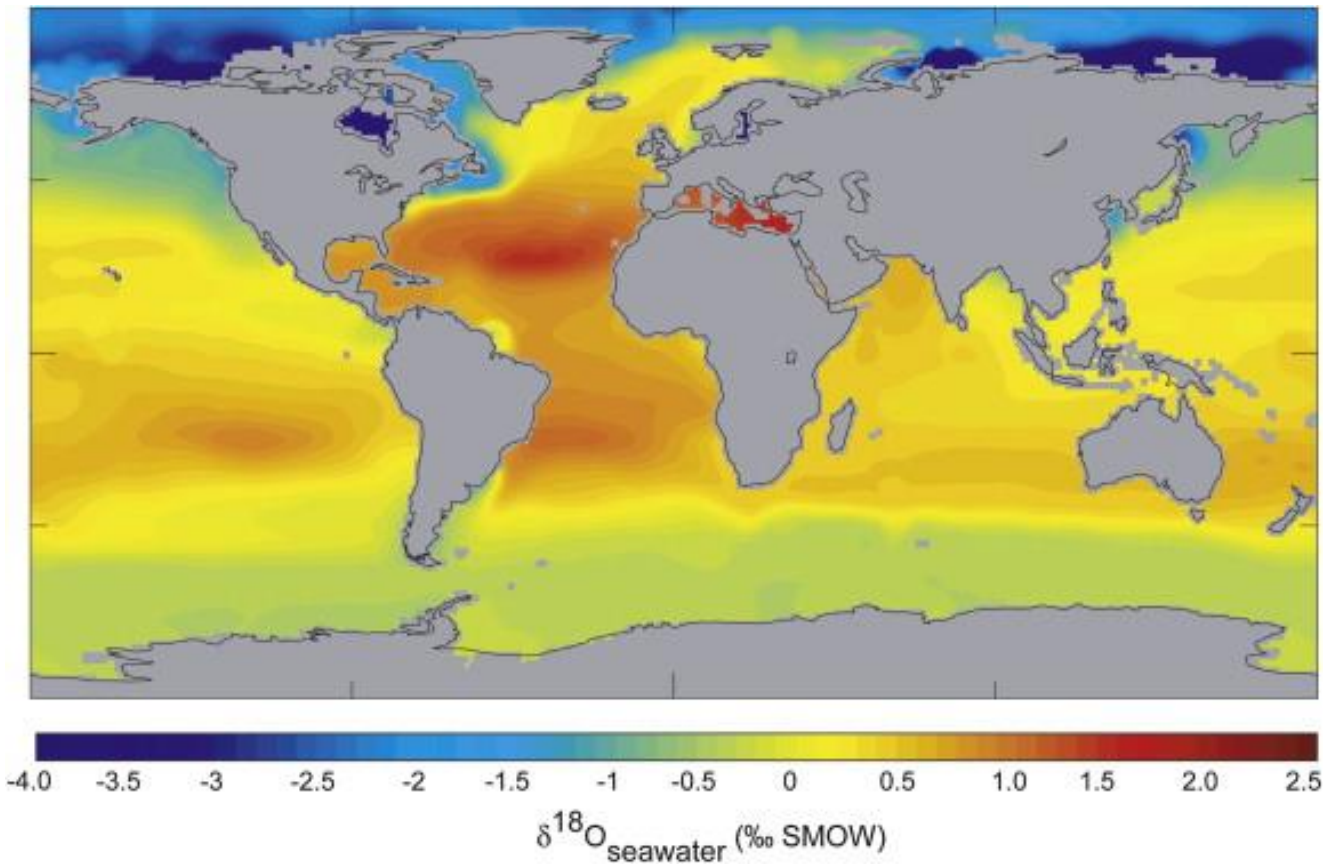

Figure 17 : Variations isotopiques de l'oxygène dans les eaux de mer (LeGrande and Schmidt, 2006)

La géolocalisation est possible, grâce à la variation $\delta^{18}O$ et $\delta^{2}H$ de l'eau en fonction de la latitude (**Figure 18**). L'altitude joue également son rôle dans le fractionnement isotopique de l'oxygène. Plus l'altitude est élevée, plus l'eau est appauvrie en isotope lourd. Ainsi, les ratios isotopiques en $\delta^{18}O$ sont plus élevés à haute altitude. La géolocalisation est donc réalisable, grâce à la variation $\delta^{18}O$ de l'eau, en fonction de la latitude et de l'altitude. Ainsi, la signature isotopique $\delta^{18}O$ est liée à l'origine géographique de la plante.

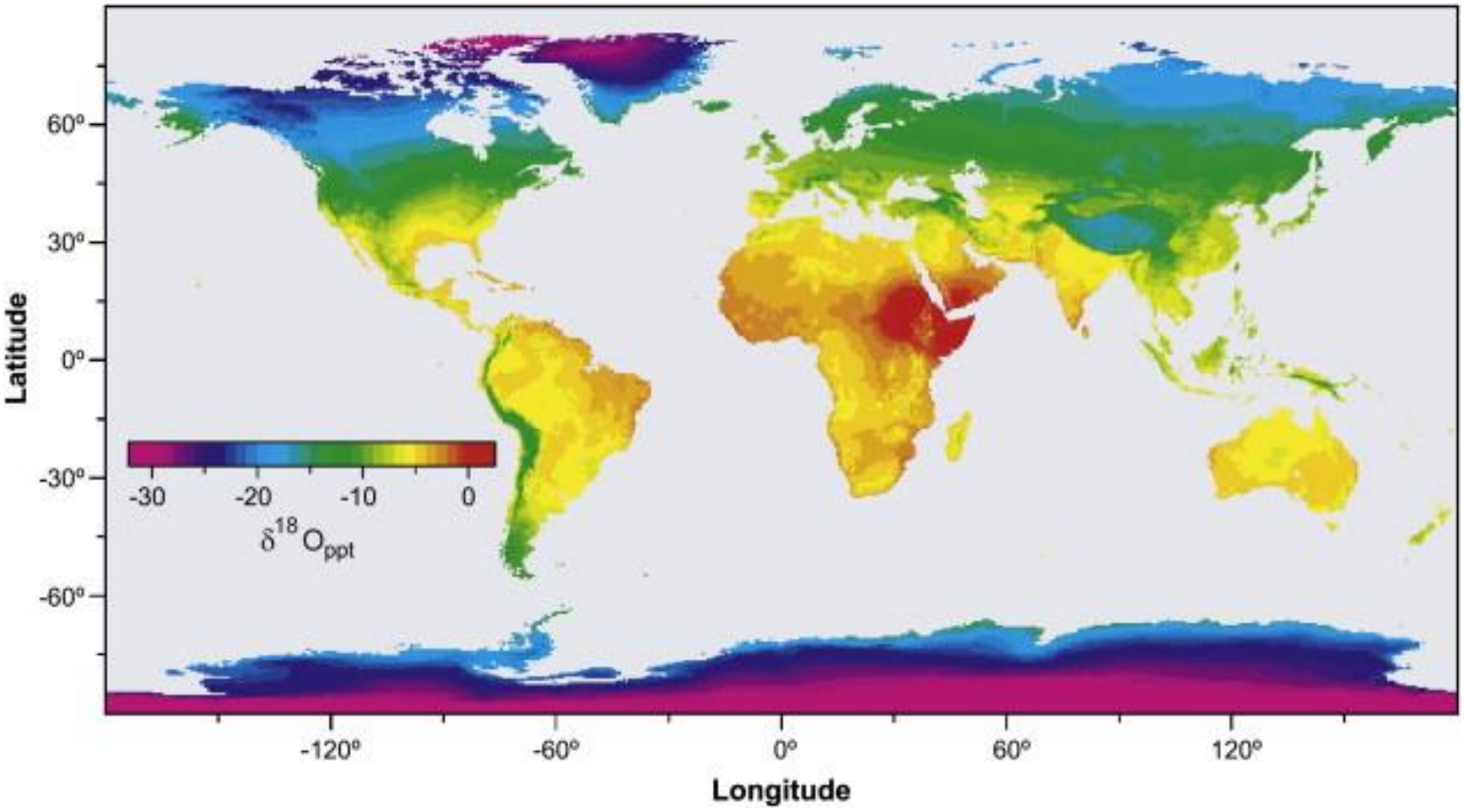

Figure 18 : Variations isotopiques de l'oxygène sur les continents (Bowen and Wilkinson, 2002)

De plus, comme pour le carbone, l'autre source d'oxygène pour les plantes provient de ses échanges atmosphériques, l'air étant composé de CO_2 et d'O_2. Les valeurs isotopiques $\delta^{18}O$ du CO_2 et de l'O_2 sont relativement constantes. Le fractionnement isotopique de l'oxygène dans les plantes est induit par la biosynthèse des métabolites secondaires actifs que composent la plante (Schmidt et al., 2001). Le rapport isotopique final d'un métabolite est fonction de ses fonctions chimiques et de son précurseur de biosynthèse d'origine. Il est ainsi possible d'établir des modèles de prédictions du rapport isotopiques $\delta^{18}O$. Par conséquent, l'empreinte isotopique $\delta^{18}O$ est également reliée à la métabolisation et donc indicatrice de l'origine botanique d'une plante.

3.3.1.2.4. Fractionnement isotopique du soufre dans les plantes

L'élément soufre possède quatre isotopes stables, les soufres 32, 33, 34 et 36. La variation isotopique du soufre dans les plantes est décrite par la valeur $\delta^{34}S$, déterminée à partir de l'isotope du soufre 34. Le soufre est l'élément constitutif des composés organiques le moins représenté dans les huiles essentielles. Les composés volatils soufrés sont principalement présents dans les alliacées. La signature isotopique $\delta^{34}S$ de ces organosulfures est principalement dépendante de deux sources principales de sulfates, présents dans la composition du sol et dans l'eau océanique.

La composition isotopique du soufre, liée à la composition du sol, diffère selon les régions, en fonction des caractéristiques géologiques (Choi et al., 2020) ; des effets anthropologiques, tel que les procédés de fertilisation (Mizota and Sasaki, 1996) ; et de l'activité microbiologique des sols (Pianezze et al., 2019). Les valeurs isotopiques du soufre des végétaux sont également liées au cycle atmosphérique de l'eau océanique (Nehlich, 2015), comme décrit en **Figure 16**. Les conditions climatiques, la proximité géographique des végétaux par rapport au littoral et les aérosols présents dans l'air, tel que les embruns marins (Norman et al., 2006), participent à la diversification de la signature isotopique du soufre dans les huiles essentielles.

Ainsi, l'empreinte isotopique du soufre des végétaux est caractéristique de l'origine géographique. Elle est aussi dépendante des produits fertilisants utilisés, et permet de réaliser de la traçabilité de filière.

3.3.1.3. Analyse des isotopes stables par IRMS

La spectrométrie de masse de rapports isotopiques (IRMS) permet de mesurer le rapport des isotopes des éléments C, N, O, S, H sous leurs formes gazeuses (ex : CO_2, N_2, N_2O, CO, SO_2, H_2) à l'aide d'un spectromètre de masse de rapports isotopiques. Les instruments IRMS mesurent les abondances relatives de ces isotopes ($^{13}C/^{12}C$, $^{15}N/^{14}N$, $^{18}O/^{16}O$, $^{34}S/^{32}S$, $^{2}H/^{1}H$) par rapport à un gaz de référence calibré par rapport à des standards internationaux.

3.3.1.3.1. Fonctionnement

L'IRMS est composé de 3 parties : la **source**, **l'analyseur** et le **détecteur** (**Figure 19**).

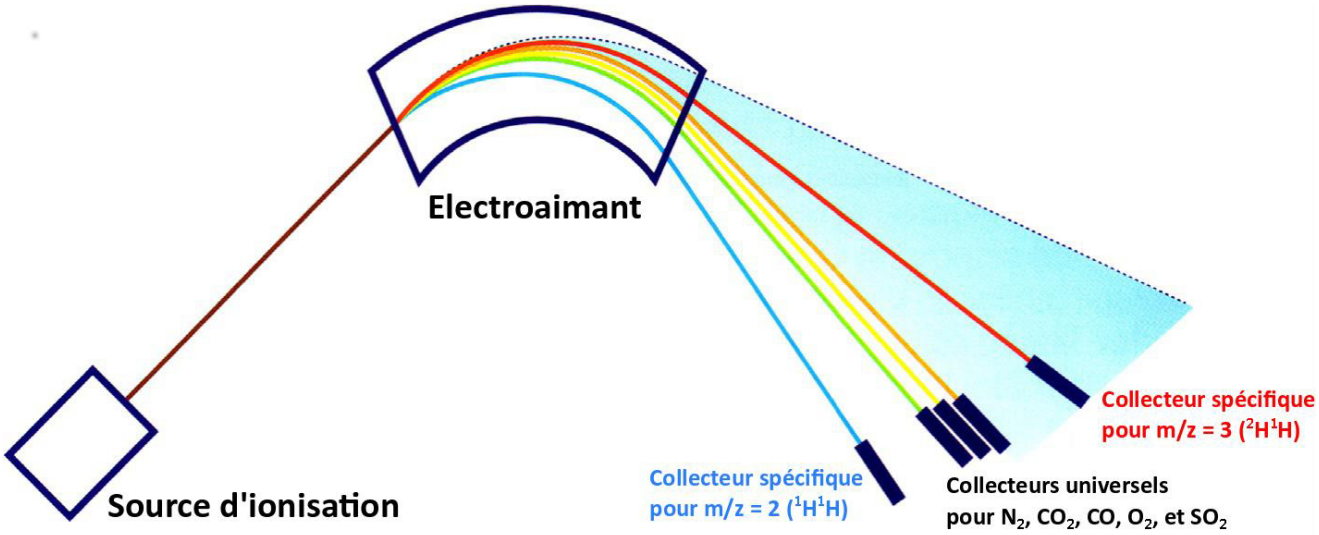

Figure 19: Schéma d'un spectromètre de masse des ratios isotopiques, adapté de Kelly et al. (2018)

La **source**, de type impact électronique, est composée d'une chambre d'ionisation sous vide dans laquelle des électrons sont produits via un filament chauffé et accélérés sous l'application d'un potentiel. Ces électrons peuvent alors interagir avec l'échantillon, préalablement introduit sous forme de gaz, afin de créer des ions chargés positivement. Les lentilles, disposées en sortie de source, permettent ensuite de focaliser le faisceau pour augmenter la sensibilité finale du signal. La focalisation est nécessaire pour récupérer la totalité du signal, et éviter d'introduire un biais dans les mesures.

Tableau 3 : Isotopomères mesurés par les collecteurs de l'IRMS

Elément	**Gaz**	**Masses**	**Isotopomères**	**Rapports des signaux des masses**	**Rapports isotopiques**
H	H_2	2	$^{1}H^{1}H$	3/2	$^{2}H/^{1}H$
		3	$^{2}H^{1}H$		
N	N_2	28	$^{14}N^{14}N$	29 + 30/28	$^{15}N/^{14}N$
		29	$^{15}N^{14}N$		
		30	$^{15}N^{15}N$		
C	CO_2	44	$^{12}C^{16}O^{16}O$	45/44	$^{13}C/^{12}C$
		45	$^{13}C^{16}O^{16}O + {}^{12}C^{16}O^{17}O$		
		46	$^{12}C^{16}O^{18}O + {}^{13}C^{17}O^{16}O + {}^{12}C^{17}O^{17}O$		
O	CO	28	$^{12}C^{16}O$	30/28	$^{18}O/^{16}O$
		30	$^{12}C^{18}O$		
S	SO_2	64	$^{32}S^{16}O_2$	66/64	$^{34}S/^{32}S$
		66	$^{34}S^{16}O_2$		

L'analyseur est constitué d'une partie conique, dans laquelle est placé un électroaimant. Ce dernier va séparer les différentes molécules vers des collecteurs qui sont des détecteurs de type cages de Faraday, utilisés afin de mesurer l'intensité de chaque masse. Pour l'analyse du carbone, on mesure les masses des isotopomères du CO_2 : 44, 45 et 46 (**Tableau 3**). Les signaux recueillis sur les masses 44 et 45 nous donnent les teneurs en ^{13}C sur ^{12}C mais un autre isotopomère du CO_2 possède la même masse 45 ($^{12}C^{16}O^{17}O$). Le signal collecté sur la masse 46 permet donc d'obtenir une valeur corrective, par application de la correction de Craig (Craig, 1957). Pour l'analyse du $\delta^{2}H$, ce sont les molécules de masses 2 et 3 qui sont mesurées, qui correspondent aux masses de $^{1}H^{1}H$ et $^{2}H^{1}H$. Pour la mesure du $\delta^{18}O$, les masses prises en compte sont les molécules de masses 28 et 30, correspondant aux isotopomères $^{12}C^{16}O$ et $^{12}C^{18}O$. Ces masses étant communes avec celles des isotopomères du N_2, il est nécessaire de s'assurer que le système soit étanche à l'air pour ne pas obtenir une valeur biaisée. Enfin, pour le soufre 34, ce sont les molécules de masses 64 et 66 qui sont retenues ($^{32}S^{16}O_2$ et $^{34}S^{16}O_2$).

Les collecteurs (**détecteur**), au nombre de trois, sont fixes et universels, car ils permettent l'analyse des différents gaz (**Figure 20**). Deux collecteurs supplémentaires sont utilisés pour l'analyse de l'hydrogène (**Figure 19**). Différentes amplifications sont appliquées à chaque collecteur (Kelly et al., 2018):

- $1*10^9$ Ω et $1*10^{12}$ Ω pour les collecteurs spécifiques à m/z =2 et m/z =3 pour la mesure du H_2.
- $3*10^8$ Ω, $3*10^{10}$ Ω et $1*10^{11}$ Ω pour les collecteurs universels 1, 2, et 3 (**Figure 20**).

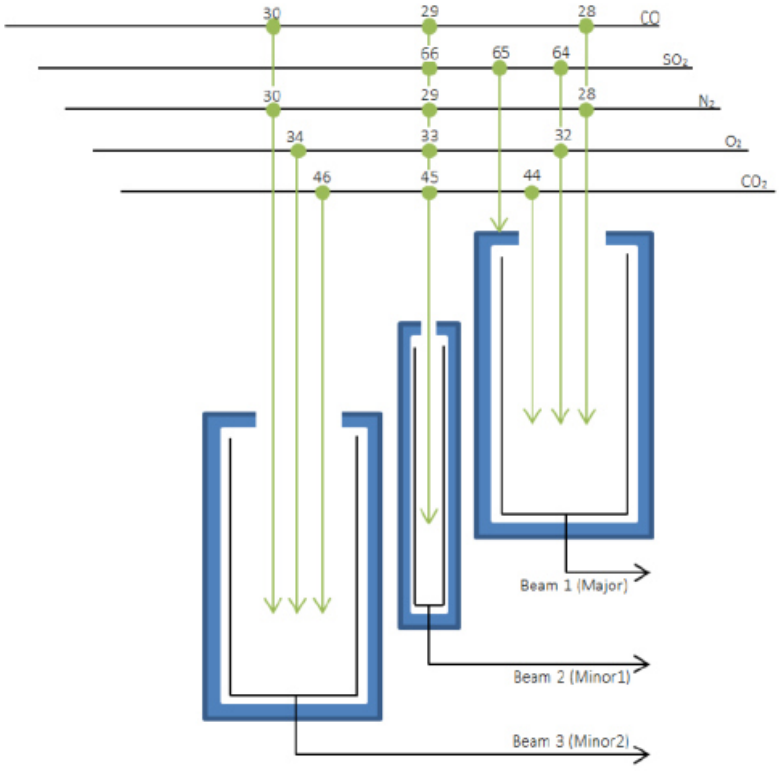

Figure 20: Schéma des collecteurs fixes universels utilisés pour la mesure du CO_2, du N_2, du CO, et du SO_2 (Elementar, 2021)

3.3.1.3.2. Gaz de référence et mesures isotopiques

L'analyse par IRMS est réalisée sur des échantillons sous forme de gaz. La mesure isotopique consiste à mesurer un échantillon par rapport à un gaz de référence dont la valeur isotopique est connue. Par exemple, pour l'analyse isotopique du carbone, la conversion en échelle V-PDB est donnée par la formule ci-dessous (Craig, 1957) :

$$\delta^{13}C_{\frac{Echantillon}{V-PDB}} = \delta^{13}C_{\frac{Echantillon}{Référence}} + \delta^{13}C_{\frac{Référence}{V-PDB}} + \frac{\delta^{13}C_{\frac{Echantillon}{Référence}} \times \delta^{13}C_{\frac{Référence}{V-PDB}}}{1000}$$

Avec $\delta^{13}C_{Echantillon/V\text{-}PDB}$ qui correspond à la déviation isotopique de l'échantillon par rapport au standard V-PDB, $\delta^{13}C_{Echantillon/Référence}$ qui correspond à la déviation isotopique de l'échantillon par rapport au gaz de référence, $\delta^{13}C_{Référence/V\text{-}PDB}$ qui correspond à la déviation isotopique du gaz de référence par rapport au standard V-PDB.

Des injections de gaz de référence, appelées pulses, sont effectuées au début de chaque analyse pour réaliser la quantification isotopique de l'échantillon par rapport à ce gaz. Ce dernier est introduit au cours de l'analyse, dans le cas des couplages EA-C/P-IRMS (Analyseur élémentaire couplé en combustion / pyrolyse avec un IRMS) et GC-C/P-IRMS (Chromatographie en phase gazeuse couplée en combustion / pyrolyse avec un IRMS), par l'intermédiaire d'une interface open split (**Figure 22, Figure 25, et Figure 27**) directement reliée aux bouteilles de gaz (CO_2, H_2). Dans le cas du monoxyde de carbone, utilisé pour l'analyse du $\delta^{18}O$, la bouteille de gaz standard n'est pas stockée dans le laboratoire pour des raisons de sécurité. La manipulation d'une petite quantité de gaz va être privilégiée, pour limiter le danger, en réalisant une introduction directe par le système Dual Inlet à l'aide d'un récipient étanche (Ex : ampoule).

3.3.1.3.3. Evaluation des performances de l'IRMS et calibration

Il est important de s'assurer que la valeur isotopique mesurée soit juste. C'est pourquoi un certain nombre de tests sont réalisés quotidiennement pour apporter un maximum de garantie sur la validité des résultats. Le protocole réalisé inclut un test d'autotune permettant de déterminer les paramètres de réglages de sources optimaux pour obtenir l'intensité de signal la plus importante possible, ainsi que des tests de stabilité et de linéarité qui permettent de vérifier la réponse et les performances de la source du spectromètre.

Avant chaque série d'analyses, il est nécessaire de vérifier la répétabilité des résultats en fonction des différentes quantités de signal mesurés (tests de linéarité) et avec des signaux d'intensités constantes (tests de stabilité). Ces tests sont réalisés quotidiennement pour tous les gaz de référence d'intérêt. Le coefficient de régression linéaire du test de linéarité et l'écart-type du test de stabilité permettent de vérifier que l'appareil est en état de fonctionnement et que les analyses de la journée seront bien répétables. Dans le cas de l'analyse du H_2, il est également nécessaire de déterminer un facteur de correction H_3^+. En effet, lorsque le gaz H_2 est ionisé, des ions H_3^+ sont générés. Leur nombre de masse étant similaire aux ions $^1H^2H^+$, la mesure de la masse 3 sera perturbée et le rapport isotopique final δ^2H sera erroné (Sessions et al., 2001).

Tous ces tests de performances sont primordiaux pour pouvoir obtenir des résultats justes et répétables qui pourront être utilisés pour des projets de contrôle et d'authentification.

3.3.1.3.4. Système Dual Inlet – Mesure d'échantillons gazeux

Le système Dual inlet (**Figure 21**) est un système double-entrée permettant d'introduire une quantité de gaz contrôlée dans l'IRMS. L'appareil est équipé d'un mécanisme à volumes variables, appelés soufflets, qui permet d'adapter la quantité de gaz à injecter, et affiner l'intensité du signal mesuré par l'IRMS.

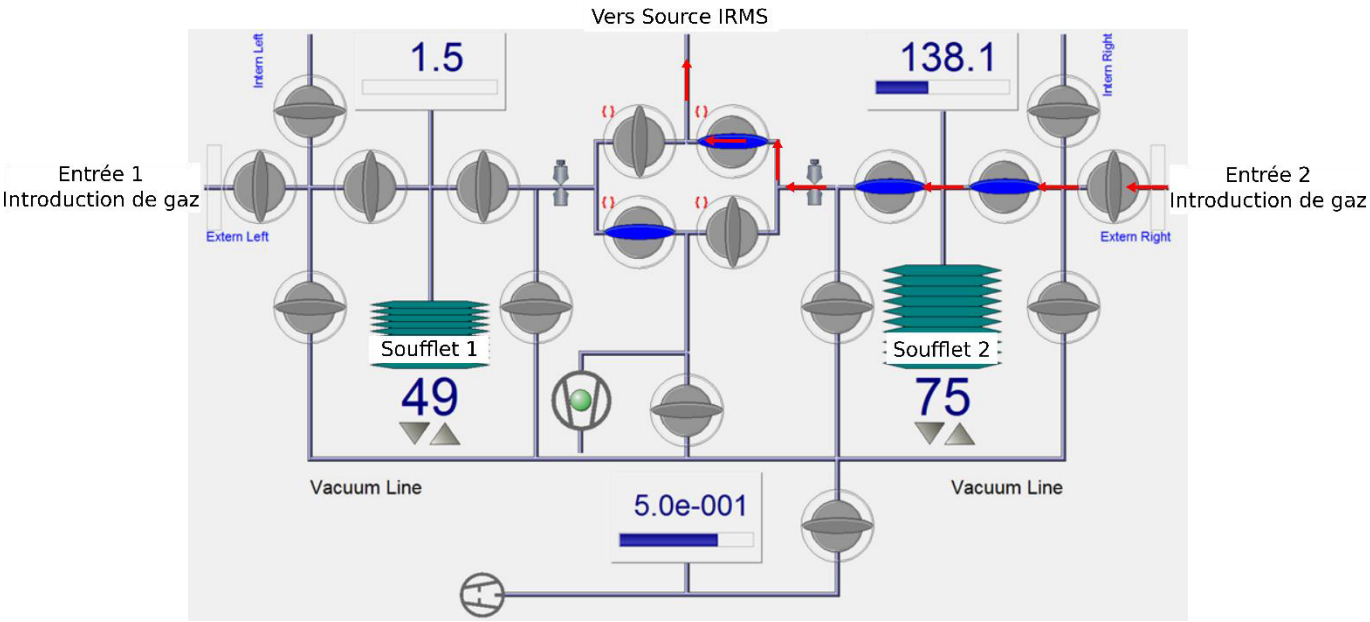

Figure 21: Système Dual Inlet, d'après le logiciel Isodat Thermo

Dans le cas des produits naturels, les échantillons sont à l'état liquide, voir solide selon le type d'extrait étudié. Il est donc nécessaire de les mettre à l'état gazeux pour pouvoir réaliser des analyses par IRMS, en travaillant avec différents couplages permettant la minéralisation, à l'état gazeux, des échantillons analysés.

Deux systèmes de couplages existent : les couplages permettant l'analyse isotopique globale d'un échantillon, par analyse élémentaire - IRMS, et ceux permettant de réaliser des analyses spécifiques, par chromatographie en phase gazeuse – IRMS.

3.3.1.3.5. Le couplage Analyse Elémentaire – Spectrométrie de masse des rapports isotopiques EA-C/P-IRMS

Le système de couplage EA-C/P-IRMS a été développé en 1985 pour l'analyse $\delta^{13}C$ (Preston and Owens, 1985). Ce système est équipé d'une interface open split. Cette interface permet de coupler, en ligne, des systèmes de minéralisation automatisés, sous flux d'hélium, avec un spectromètre de masse des rapports isotopiques sous vide. Ce système permet également de réaliser des analyses isotopiques sur d'autres éléments : $\delta^{15}N$ (Marshall and Whiteway, 1985), $\delta^{18}O$ et $\delta^{2}H$ (Hilkert et al., 1999; Morrison et al., 2001), ou encore $\delta^{34}S$ (Fourel et al., 2014).

L'analyseur élémentaire permet, dans le cadre de l'analyse isotopique, de transformer les éléments des échantillons analysés, sous leur forme gazeuse afin de pouvoir être analysés par IRMS. Deux réactions de décomposition chimique sont utilisées : la combustion et la pyrolyse.

3.3.1.3.5.1. La combustion pour l'analyse $\delta^{13}C$, $\delta^{34}S$ et $\delta^{15}N$ (EA-C-IRMS)

La combustion est utilisée pour l'analyse du $\delta^{13}C$, du $\delta^{34}S$ et du $\delta^{15}N$. Il s'agit d'une réaction d'oxydoréduction, à haute température, qui va permettre, dans le cadre de l'analyse élémentaire, de transformer les carbones en CO_2, les soufres en SO_2 et les azotes en N_2., selon la réaction de combustion suivante :

$$C_\alpha H_{2\beta} N_\gamma S_\varepsilon + \lambda O_2 \rightarrow \alpha CO_2 + \beta H_2O + \gamma NO_x + \varepsilon SO_2$$

Cette réaction fait intervenir l'oxygène comme comburant. Il n'est pas possible d'utiliser cette méthode pour l'analyse du $\delta^{18}O$, car de l'oxygène extérieur est introduit dans l'instrument, ce qui affectera le ratio isotopique $^{18}O/^{16}O$. Pour l'hydrogène, la combustion transforme les H en H_2O, qui n'est pas analysable par IRMS.

Deux systèmes sont principalement utilisés aujourd'hui : le système Thermo Flash (**Figure 22**) et le système Elementar Purge and Trap (**Figure 23**). Ces deux systèmes permettent de mesurer simultanément les $\delta^{13}C$, $\delta^{15}N$ et $\delta^{34}S$ (**Figure 24**).

- Système Flash (Kracht, 2011): Un échantillon, préalablement pesé dans une nacelle en étain, est inséré dans un tube à combustion, composé d'oxyde de cuivre et de laine d'argent. Un flux d'hélium traverse l'analyseur élémentaire pour faire circuler les différents gaz, tandis qu'un flux d'O_2 est présent afin de réaliser la combustion : les atomes de carbone présents dans l'échantillon sont transformés en CO_2, les atomes de soufre deviennent SO_2, et les atomes d'azote prennent la forme NO_X. Un second tube, composé de cuivre réduit, permet ensuite la réduction de NO_X pour obtenir N_2. L'eau formée, par combustion des atomes d'hydrogène, est éliminée en aval de l'IRMS par piégeage. Une colonne chromatographique permet ensuite de séparer les différents gaz N_2, CO_2, et SO_2. Ces gaz sont ensuite envoyés dans l'analyseur IRMS par l'intermédiaire de l'interface open split. Ce système permet d'analyser en simultané $\delta^{13}C$, $\delta^{15}N$ et $\delta^{34}S$. Le système peut être équipé d'un détecteur à conductivité thermique (TCD). Ce détecteur, composé d'un pont de Wheatstone, fonctionne sur le principe de la différence de conductivité thermique entre l'hélium et l'échantillon. Il réalise une mesure différentielle entre une résistance de référence, balayée par le gaz vecteur (l'hélium), et une résistance de mesure, balayée par les composés, entrainés par le gaz vecteur. Le TCD, détecteur universel et non destructif, permet de déterminer la concentration de l'échantillon. L'instrument peut alors automatiquement appliquer une dilution de l'échantillon avec de l'hélium, en fonction l'intensité obtenue, afin de ne pas saturer le signal de l'appareil.

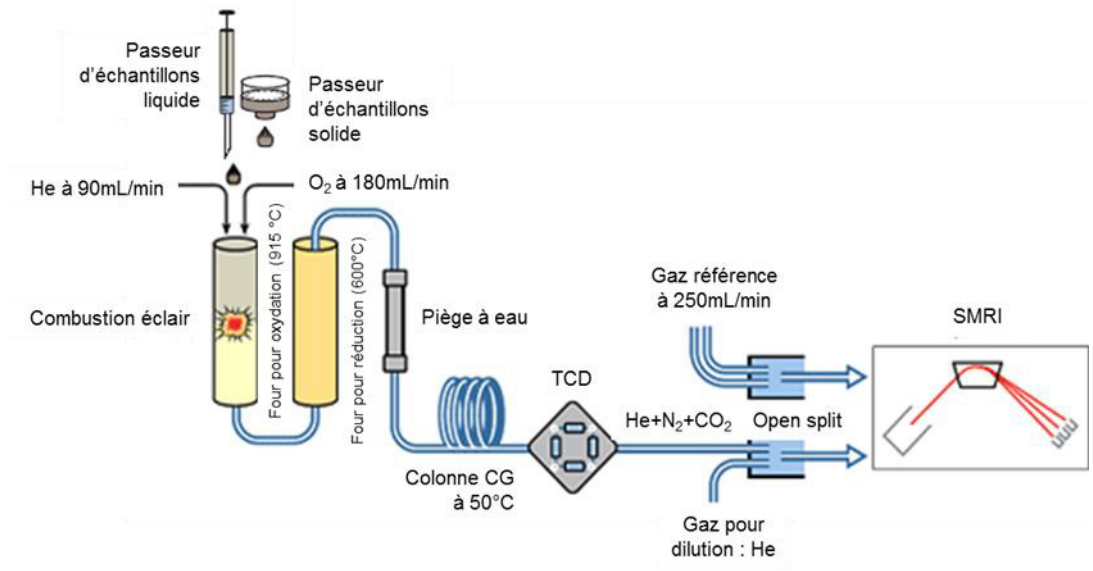

Figure 22: Schéma d'un coulage Analyseur Elémentaire -Combustion-IRMS (EA-C-IRMS), adapté de Thermo

- Système Purge and Trap (Fourel et al., 2015, 2014): Après combustions et réductions similaires au système précédent, les gaz SO_2 et CO_2 sont piégés chimiquement. Le N_2 est directement analysé, puis le CO_2 est désorbé pour pouvoir être analysé, suivi du SO_2. L'avantage de ce système est qu'il ne fait pas intervenir de colonnes chromatographiques, les gaz étant séparés par piégeage chimique.

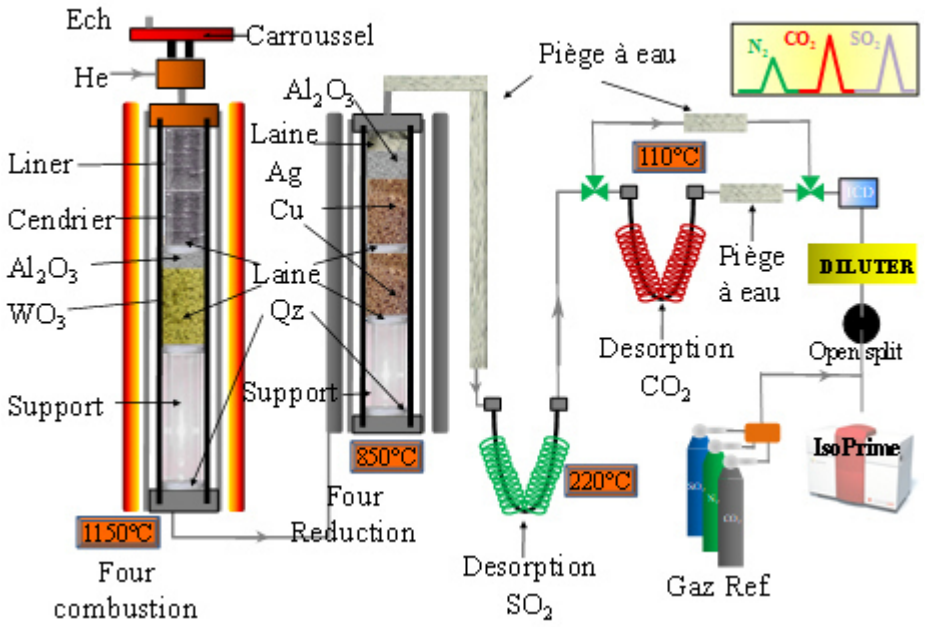

Figure 23: Couplage EA-C-IRMS Type Purge and Trap (Fourel et al., 2014)

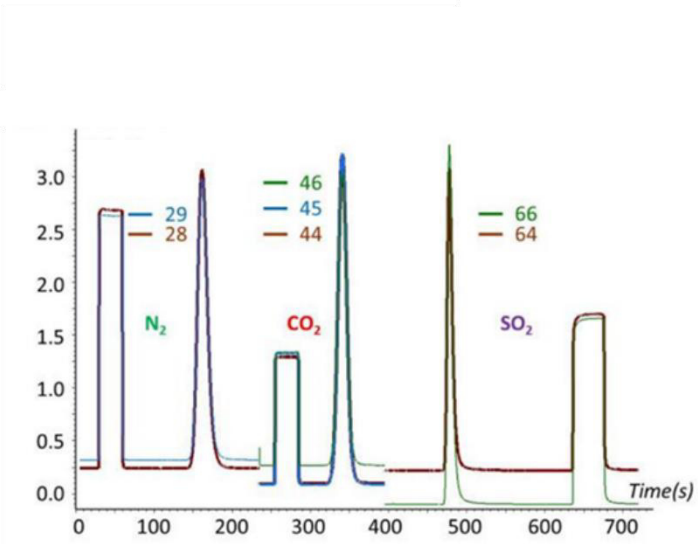

Figure 24: Spectre de masse montrant les analyses simultanées des éléments N, C et S en une seule analyse par EA-C-IRMS (Logiciel Elementar)

3.3.1.3.5.2. La pyrolyse pour l'analyse δ^2H et $\delta^{18}O$ (EA-P-IRMS)

La pyrolyse est utilisée pour l'analyse du $\delta^{18}O$ et du δ^2H. Cette réaction de décomposition chimique ne fait pas intervenir d'oxygène, à la différence de la combustion, et va permettre, dans le cadre de l'analyse élémentaire, de transformer les hydrogènes en H_2, et les oxygènes en CO. La pyrolyse est réalisée à température plus élevée que la combustion (1400°C) (Leuenberger and Filot, 2007). Les échantillons liquides et solides ne sont pas pesés dans des nacelles en étain, qui contiennent de l'oxygène qui peut interférer dans l'analyse du $\delta^{18}O$, mais dans une nacelle en argent.

L'échantillon est introduit dans un tube de pyrolyse, composé de carbone vitrifié sur les parois internes du tube en alumine (Sharp et al., 2001; Stuart-Williams et al., 2008). Les atomes d'hydrogène vont se combiner entre eux pour former du H_2, tandis que les oxygènes libres vont réagir avec le carbone déposé sur les parois pour former du CO, selon la réaction de pyrolyse décrite ci-après :

$$C_xH_{2y}O_z + nC \rightarrow zCO + yH_2 + (n + x - z)*C$$

Les gaz formés H_2 et CO sont par la suite séparés sur colonne chromatographique avant d'être envoyés dans l'IRMS pour analyse (**Figure 25 et Figure 26**).

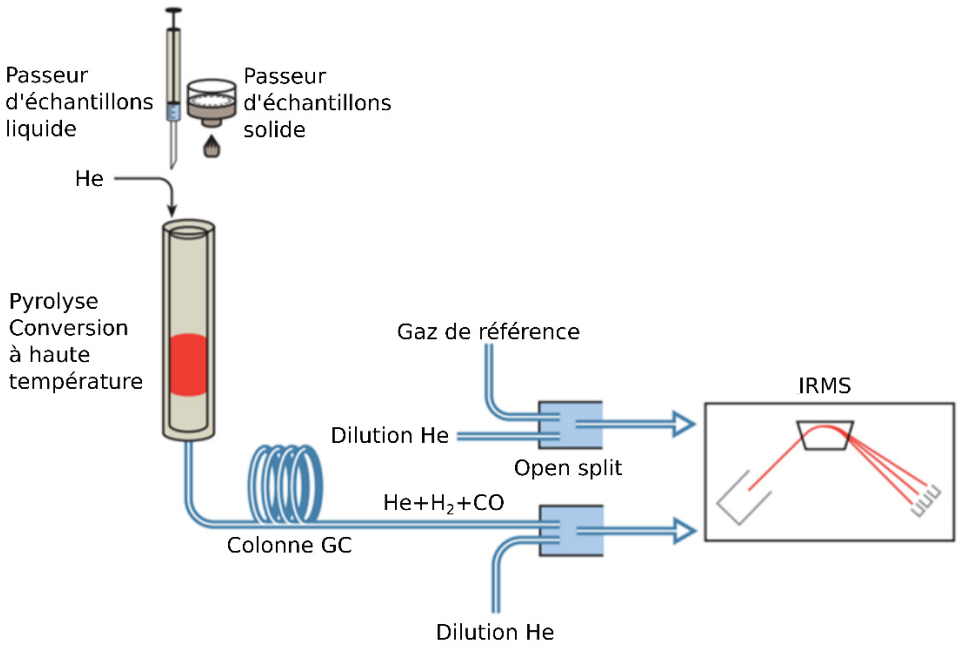

Figure 25: Schéma d'un couplage Analyseur Elémentaire -Pyrolyse-IRMS (EA-P-IRMS), adapté de Thermo

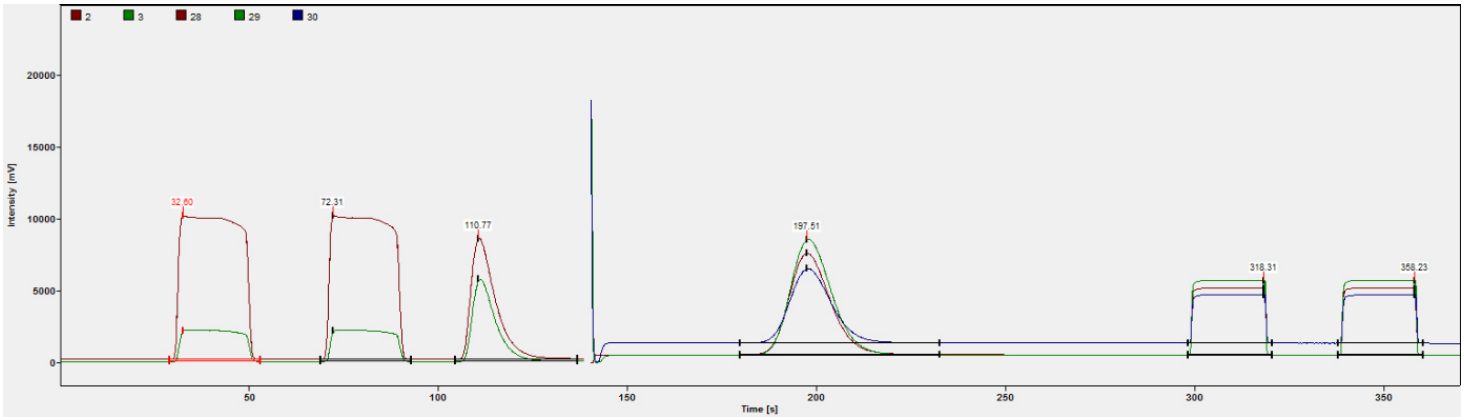

Figure 26 : Spectre de masse EA-P-IRMS montrant l'analyse simultanée des éléments H et O (Logiciel Thermo Isodat)

L'analyse élémentaire permet de réaliser une analyse globale de l'échantillon. Cette méthode présente de nombreux avantages : les méthodes développées sont rapides, universelles, et faciles à développer. En outre, il est possible de réaliser simultanément l'analyse isotopique de différents éléments. Pour certaines matrices peu complexes, constituées d'une molécule presque pure, cette méthode est idéale. Cependant, pour des matrices qui présentent de nombreux métabolites, une séparation en amont des composés sera nécessaire, si l'objectif est de réaliser l'analyse spécifique d'un métabolite d'intérêt. Cette séparation peut être réalisée par une préparation d'échantillon, par exemple une extraction du composé par flash chromatographie sur silice ou par couplage GC-C/P-IRMS.

3.3.1.3.6. Le couplage chromatographie gazeuse – spectrométrie de masse des rapports isotopiques (GC-C/P-IRMS)

Le couplage GC-C/P-IRMS est réalisable pour l'analyse du $\delta^{13}C$ (Barrie et al., 1984), du $\delta^{15}N$ (Desage et al., 1991) ou du $\delta^{2}H$. L'analyse $\delta^{18}O$ est également possible, mais ce type d'analyse est encore peu développé à l'heure actuelle (**Voir Chapitre 4**). Pour l'analyse du $\delta^{34}S$, aucun système GC-C/P-IRMS n'a été développé à ce jour, mais quelques études par GC/MC-ICP-MS ont été réalisées pour accéder à la mesure isotopique de cet élément (**Voir Chapitre 5**).

Selon les constructeurs, le système de couplage par GC-C/P-IRMS peut différer, mais le principe reste globalement le même (**Figure 27**). Après séparation par GC, les analytes d'intérêts de l'échantillon, transportés par flux d'hélium, sont envoyés sous forme de gaz dans un tube de combustion pour analyse $\delta^{13}C$ ou dans un tube à pyrolyse pour analyse ^{2}H.

Le tube de combustion est composé d'oxyde de cuivre afin de transformer les atomes de carbone C en CO_2, et de laine d'argent pour retenir les composés halogénés et le soufre. La composition d'un tube de pyrolyse est différente selon les constructeurs. Le catalyseur, employé pour réaliser la pyrolyse, peut-être à base de chrome (à 1050°C), ou de molécules carbonées (à 1400°C), qui sont préalablement fixés sur la paroi par injection d'alcane. La pyrolyse transforme automatiquement les atomes d'hydrogène H en H_2, les autres composés étant retenus par les atomes de carbone fixés sur la paroi.

L'eau, formée en combustion, est piégée en sortie de tube à l'aide d'un tube à membrane Nafion. L'eau traverse la membrane par osmose, et est éliminée par un flux d'hélium, tandis que le CO_2 est maintenu dans le tube.

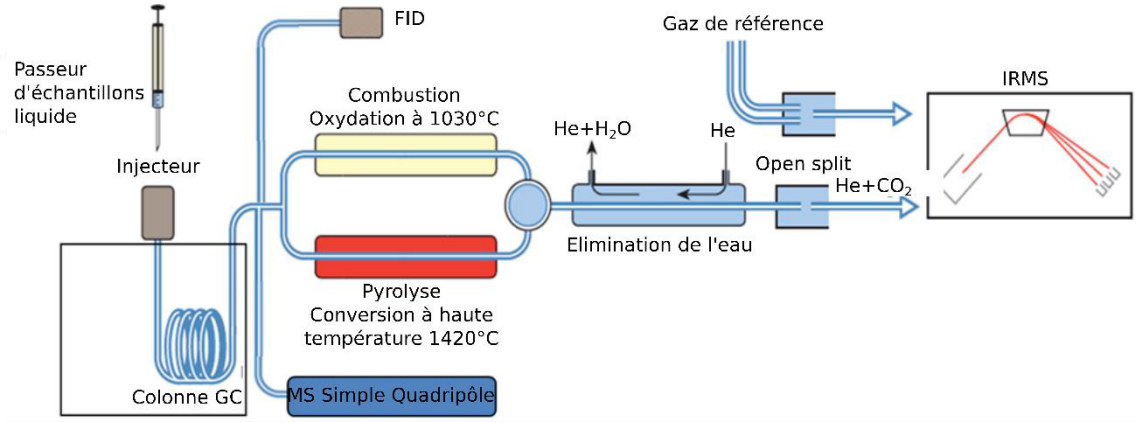

Figure 27: Schéma d'un couplage GC-C/P-IRMS, adapté de Thermo

3.3.1.3.7. Calibration par rapport à des standards internationaux

La valeur isotopique des échantillons mesurée en EA-C/P-IRMS est corrigée par rapport à des standards internationaux certifiés par l'Agence Internationale de l'Energie Atomique (IAEA). Cette correction est nécessaire pour normaliser les échantillons mesurés par rapport aux références internationales (V-PDB, V-MSOW, et V-CDT) et pour s'affranchir des biais causés par l'appareil, permettant ainsi la comparaison avec les données obtenues avec d'autres laboratoires travaillant avec des équipements différents. Il existe de nombreux standards internationaux, tel que IAEA CH7 (Feuille de polyéthylène, $\delta^{13}C_{V\text{-}PDB}$ = -32,15‰, $\delta^{2}H_{V\text{-}SMOW}$ = -100‰), USGS40 (acide L-glutamique, $\delta^{13}C_{V\text{-}PDB}$ = -26,39‰), IAEA601 (acide benzoïque, $\delta^{18}O$ = +23,3‰), NBS127 (sulfate de barium $BaSO_4$, $\delta^{34}S_{V\text{-}CDT}$ = +20,3‰), et IAEAS1 (sulfide d'argent Ag_2S, $\delta^{34}S_{V\text{-}CDT}$ = -0,3‰) (IAEA, 2021).

En GC-C/P-IRMS, afin d'avoir une correction plus précise, plusieurs standards sont utilisés pour chaque molécule d'intérêts analysée. Ces standards sont eux même calibrés en amont par EA-C/P-IRMS avec les références internationales fournies par l'IAEA.

3.3.1.4. Etat de l'art des applications de l'analyse des isotopes stables pour l'authentification d'huiles essentielles

Le **Tableau 4** ci-après présente les principales applications d'authentification de matières premières aromatiques naturelles par analyse IRMS.

Cette technique est principalement utilisée pour détecter des ajouts de synthèse. Certaines molécules présentent en effet une signature isotopique sur un ou plusieurs isotopes différents en fonction de son origine naturelle ou synthétique. Il est même parfois possible de mettre en évidence l'origine de la synthèse réalisée (biosynthèse, hémisynthèse, réactifs d'origine…).

Certaines études, réalisées en GC-C/P-IRMS, ont permis de mettre en évidence des corrélations entre molécules de mêmes origines, par exemple dans le cas de l'étude de la mandarine (Faulhaber et al., 1997a, 1997b). Une étude multi isotopes permet aussi de mettre en évidence des relations de linéarité entre ratios isotopiques. Par exemple la corrélation $\delta^{13}C$ et $\delta^{2}H$ du trans-anéthol dans les huiles essentielles d'anisés permet de montrer des ajouts de synthèse (Balabane et al., 1984).

L'analyse des isotopes stables a également été employée pour authentifier l'origine botanique et géographique des huiles essentielles, en bénéficiant du pouvoir de traçabilité des ratios isotopiques (Kumar et al., 2016; Pellati et al., 2013).

Dans certains cas, l'analyse des isotopes stables peut être complémentaire à d'autres analyses (analyse du radiocarbone ; analyses de caractérisation GC-FID, GC-MS ; analyses énantiomériques). En effet, les méthodes multi techniques permettent d'améliorer l'authentification d'une matière en croisant les diagnostics (Mosandl, 1995).

Tableau 4 : Principales études isotopiques réalisées sur des huiles essentielles, recensées dans la littérature

Huile essentielle analysée	**Molécule investiguée**	**Observations**	**Isotope**	**Technique IRMS**	**Sources**
Fenouil, Anis, Badiane	Trans-anéthol	Relation linéaire observée entre $\delta^{13}C$ et $\delta^{2}H$ du trans anéthol naturel. Pas observé sur les synthétiques	$\delta^{13}C$ $\delta^{2}H$	EA-C/P-IRMS	(Balabane et al., 1984)
Anis, Cannelle écorce, Bouleau, Wintergreen, Amande amère, Vanille	Trans-anéthol, benzaldéhyde, vanilline, salicylate de méthyle	Différences isotopiques entre molécules naturelles et synthétiques. Analyse complémentaire de l'activité du radiocarbone	$\delta^{13}C$ $\delta^{2}H$	EA-C/P-IRMS	(Culp and Noakes, 1992a)
Lavande, Lavandin, Bois de rose, Petitgrain, Bergamote, Coriandre, Géranium, Camphre, Sauge sclarée	Linalol, acétate de linalyle.	Différences isotopiques entre molécules naturelles et synthétiques	$\delta^{13}C$ $\delta^{2}H$	EA-C/P-IRMS	(Hanneguelle et al., 1992)
Coriandre	Limonène, γ-terpinène, para-cymene, linalol, géraniol, myrcène	Différences isotopiques entre molécules naturelles et synthétiques. Analyses énantiomériques complémentaires	$\delta^{13}C$	GC-C-IRMS	(Frank et al., 1995)
Aneth	α-phellandrène, limonène, dill ether, xarvone.	Mise en évidence d'une origine biosynthèse. Analyses énantiomériques complémentaires	$\delta^{13}C$	GC-C-IRMS	(Faber et al., 1997; Reichert et al., 2000)
Mandarine	Anthranilate de méthyle, α-sinensal, limonène, γ-terpinène, α-thuyène, β-pinène, sabinène,	Comparaisons entre échantillons naturels et commerciaux. Mise en évidence de reconstitutions de synthèse	$\delta^{13}C$ $\delta^{15}N$	GC-C-IRMS	(Faulhaber et al., 1997b, 1997a)

	myrcène, terpinolène, linalol, octanal				
Lavande, Lavandin, Bergamote, Petitgrain, Néroli	Linalol, Acétate de linalyle	Différences isotopiques entre molécules naturelles et synthétiques	δ^2H	GC-P-IRMS	(Hör et al., 2001)
Basilic, Estragon, Piment, Laurier	Estragol, Méthyl eugénol	Différences isotopiques entre origines naturelles, hémisynthèse, synthèse, et échantillons commerciaux	$\delta^{13}C$ δ^2H $\delta^{18}O$	GC-C/P-IRMS	(Ruff et al., 2002)
Lavande	Linalol Acétate de linalyle	Différence isotopique entre molécules naturelles et synthétiques	$\delta^{13}C$ δ^2H $\delta^{18}O$	GC-C/P-IRMS	(Jung et al., 2005)
Citron, Lemongrass, Citronnelle, Litsea Cubeba	Citronellal, citral	Différences isotopiques entre molécules d'origine naturelle, hémisynthèse, et synthèse. Analyses énantiomériques complémentaires	$\delta^{13}C$ δ^2H	GC-C/P-IRMS	(Nhu-Trang et al., 2006a)
Thym, Origan, Sarriette	Thymol, carvacrol, γ-terpinène, para cymène	Différences isotopiques entre molécules d'origine naturelle, hémisynthèse, et synthèse	δ^2H	GC-P-IRMS	(Nhu-Trang et al., 2006b)
Origan, Thym, Fenouil, Sarriette	Carvacrol, thymol, trans-anéthol	Différences isotopiques entre molécules naturelles et synthétiques. Analyses énantiomériques complémentaires	$\delta^{13}C$ δ^2H $\delta^{18}O$	GC-C/P-IRMS	(Greule et al., 2008)
Mandarine	α-thuyène, α-pinène, β-pinène, myrcène, Limonène, γ-terpinène,	Comparaisons isotopiques entre échantillons naturels et commerciaux.	$\delta^{13}C$	GC-C-IRMS	(Schipilliti et al., 2010)

	terpinolène, terpinène-4-ol, α-terpinéol, décanal, thymol, antranylate de méthyle, α-farnesène, α-sinensal	Analyses énantiomériques complémentaires.			
Néroli	Myrcène, limonène, linalol, terpinène-4-ol, α-terpinéol, β-caryophyllène, (E)-nérolidol, (E,E)-farnésol	Données d'échantillons naturels. Analyses complémentaires : GC-FID et Enantio-GC.	$\delta^{13}C$	GC-C-IRMS	(Bonaccorsi et al., 2011b)
Rose Damascena	Citronellol, nérol, géraniol, nonadécane, héneicosane, farnésol	Zone géographiques différentes (Bulgarie, Turquie…). Analyses complémentaires par GC-FID et GC-MS	$\delta^{13}C$	GC-C-IRMS	(Pellati et al., 2013)
Lemongrass, Palmarosa	Géraniol, citral	Différences isotopiques entre lemongrass et palmarosa. Mise en évidence d'ajouts de synthèse	$\delta^{13}C$	EA-C-IRMS	(Kumar et al., 2015)
Cypriol	Analyse globale	Données d'échantillons naturels	$\delta^{13}C$	EA-C-IRMS	(Kumar et al., 2016)
Petitgrain	Linalol, acétate de linalyle	Données d'échantillons naturels	$\delta^{13}C$	GC-C-IRMS	(Schipilliti et al., 2012a, 2018)
Origan, Ylang ylang,, Santal, Laurier	Carvacrol, Para crésyl méthyl éther, acétate de benzyle, Cis α-santalol, acétate d'α-terpenyle	Différences isotopiques entre orgines géographiques différentes et entre échantillons naturels et synthétiques. Analyses complémentaires : Enantio-GC et GC-MS	$\delta^{13}C$ $\delta^{2}H$ $\delta^{18}O$	GC-C/P-IRMS	(Hammerschmidt et al., 2006)

3.3.2. Analyse du radiocarbone ^{14}C

Outre l'étude des isotopes stables, il est aussi possible de travailler avec les isotopes radioactifs dans le domaine de l'authentification, et plus particulièrement le radiocarbone ^{14}C (Ho et al., 2010). Cette méthode analytique permet la détermination de l'activité du ^{14}C, donnée en dpm/g (désintégration par min et par g de carbone). L'activité en radiocarbone d'un échantillon est liée à sa composition en carbone biosourcé. Un échantillon naturel, constitué de 100% de carbone biosourcé, présentera une activité ^{14}C similaire à celle présente actuellement dans l'atmosphère. Cette valeur est différente selon les années, comme indiqué sur le diagramme **Figure 28**. En 2017, l'activité naturelle est autour de 13,70 dpm/g, tandis qu'en 2018, elle est d'environ 13,48 dpm/g. Un échantillon d'origine synthétique est constitué uniquement de carbones fossiles, son activité est donc nulle. En effet, le ^{14}C, dont la demi vie est d'environ 5700 ans, est formé dans la haute atmosphère, par interaction entre les neutrons, issus des rayonnements cosmiques et l'azote atmosphérique (Evin and Oberlin, 2005; Oberlin and Valladas, 2015). Un échantillon naturel adultéré avec des produits pétrochimiques présentera alors un pourcentage en carbone biosourcé intermédiaire entre 0 et 100%.

Cette technique analytique est intéressante, car elle permet de déterminer avec efficacité la naturalité d'un échantillon. Cependant, si la molécule adultérante est issue d'une hémisynthèse, il est alors impossible de l'observer par cette technique. De plus, l'analyse du radiocarbone ne permet pas d'attester de la pureté d'un échantillon, comme, par exemple, dans le cas d'une coupe avec un autre produit naturel. Enfin, l'activité naturelle variant au cours du temps, la connaissance de l'année de production de l'huile essentielle est primordiale pour diagnostiquer avec précision l'authenticité naturelle d'un échantillon.

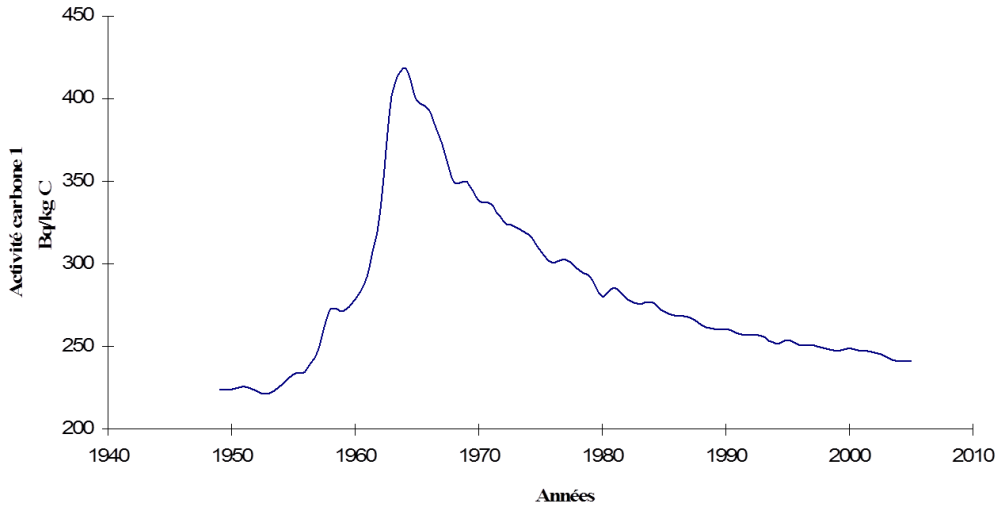

Figure 28: Variation de l'activité du radiocarbone biosourcé en fonction de l'année (Centre de datation par le Radiocarbone, 2015)

Il existe deux méthodes de détermination de l'activité du radiocarbone :

- Le comptage par scintillation liquide (LSC) (Culp and Noakes, 1992a; Sakamoto et al., 2002; Vagner et al., 2017). L'échantillon est préalablement minéralisé en CO_2, puis transformé en C_6H_6. Une poudre scintillante (Butyl-PBD ou Bis-MSB) est ensuite ajoutée, puis un comptage est réalisé grâce à des photomultiplicateurs. Cette méthode très précise (pourcentage d'erreur de 0,2%) présente un temps d'analyse long car la technique nécessite de nombreux comptages pour être reproductible (4 à 5 comptages de 1000 minutes). Le LSC est également très consommateur d'échantillon (1 g de carbone minimum), ce qui peut être problématique lorsque l'on travaille avec des extraits naturels comme les huiles essentielles qui sont très onéreuses.
- Le spectromètre de masse par accélérateur (AMS) (Gershon et al., 2019). Un dépôt sur fer de 1 mg d'échantillon carbone est réalisé. Un bombardement par une source radioactive et un potentiel de 4 millions de volts sont appliqués, permettant une accélération suffisante des ions pour séparer et quantifier ^{12}C, ^{13}C et ^{14}C. Cette méthode présente les avantages d'être rapide et peu consommatrice d'échantillon. Cependant, l'instrumentation adéquate est très onéreuse.

Malgré l'intérêt indéniable de cette technique en authentification, les équipements nécessaires rendent l'application pour du contrôle industriel difficile.

3.4. Traitement des données par chimiométrie

La complexité moléculaire des huiles essentielles implique généralement l'utilisation de méthodes multianalytiques parmi le panel des différentes techniques analytiques présentées, selon ce que l'utilisateur cherche à authentifier. Un grand nombre de données implique très souvent le traitement de ces dernières par l'utilisation d'outils statistiques multivariés afin d'en obtenir une meilleure interprétation, notamment dans le cas d'un grand nombre de variables. L'utilisation des techniques de chimiométrie va permettre de réduire la complexité du problème, une meilleure compréhension, de mettre en évidence des corrélations entre variables, d'extraire des informations sous-jacentes, voire de mettre au point des modèles prédictifs (Rutledge, 2021). Cela est d'autant plus intéressant dans le domaine de l'authentification des matières naturelles. L'analyse des nombreux métabolites constituant les extraist aromatiques peut générer de nombreuses variables. L'utilisation d'outils chimiométriques est alors indispensable pour comprendre les résultats.

On distingue principalement, dans le domaine de l'authentification, deux types de méthodes analytiques multivariées (**Figure 29**) : les analyses qualitatives (Analyses par composantes principales PCA, analyses par discrimination linéaire LDA) et les analyses quantitatives (Analyse de régression moindres carrés PLS) (Esteki et al., 2018).

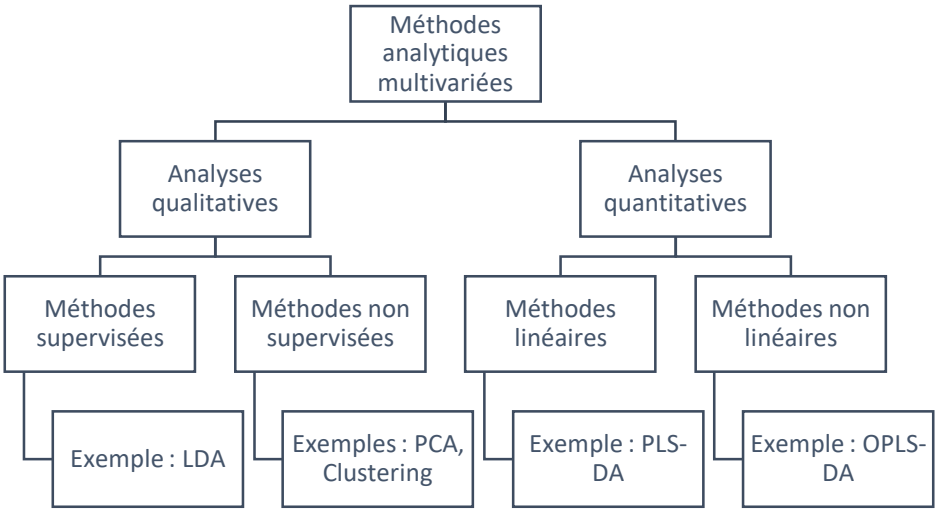

Figure 29: Les différentes catégories de méthodes analytiques multivariées, adapté de Esteki (2018)

Les analyses qualitatives permettent la classification des données. Les méthodes d'analyses qualitatives peuvent être non supervisées. Dans ce cas, les données sont séparées en groupes sans avoir préalablement définies de catégories spécifiques aux échantillons. L'analyse des composantes principales PCA est la technique d'analyse qualitative non supervisée la plus répandue. Elle permet, à partir de nombreuses variables décrivant des données, de produire un plus faible nombre de nouvelles

variables non corrélées permettant de représenter les échantillons d'analyse (Jolliffe, 2002). L'analyse par PCA peut être complétée par une analyse par cluster CA, qui permet de mettre en évidence différents groupements au sein des échantillons.

Il est également envisageable de réaliser des méthodes d'analyses qualitatives supervisées qui permettent de construire un modèle de classification des échantillons, basé au préalable sur le regroupement par catégorie de ces échantillons. L'analyse de discrimination linéaire LDA est l'une des techniques supervisées les plus utilisées, notamment pour l'authentification de l'origine géographique (Haghighat et al., 2016).

Les analyses multivariées quantitatives sont privilégiées dans le cas où les variables explicatives et les variables à expliquer sont séparés, ce qui n'est pas le cas des méthodes descriptives (PCA, LDA). Ces méthodes quantitatives vont permettent de construire un modèle de régression permettant de quantifier l'adultération. Les méthodes de régression peuvent être linéaires (régression partielle des moindre carrées en analyse discriminante PLS-DA) ou non linéaires (régression partielle des moindres carrées orthogonale en analyse discriminante OPLS-DA) (Tenenhaus, 1998). Ces modélisations permettent notamment d'identifier les variables discriminantes pour une classe donnée.

Les exemples d'applications des analyses chimiométriques dans le domaine de l'authentification sont nombreux dans la littérature récente. La stratégie analytique consiste généralement à mettre en évidence d'éventuelles corrélations par détermination des coefficients de Pearson, puis de réaliser une PCA pour analyser la qualité et l'homogénéité des échantillons. En fonction des applications, différentes analyses peuvent être réalisées, permettant de mettre en évidence des clusters (CA, LDA, PLS-DA, …). Différentes applications ont été réalisés sur les huiles essentielles, principalement pour des approches métabolomiques, telles que la mise en évidence d'adultération dans des extraits de rose (Saint-Lary et al., 2016), la discrimination botanique d'huiles essentielles d'espèces *Salvia* (Lim Ah Tock et al., 2020), *Lamiaceae* (Hassanein et al., 2020) ou *Ocimum* (Freitas et al., 2018), ou encore l'analyse d'huiles essentielles de romarin (Jalali-Heravi et al., 2011) et de géranium (Jalali-Heravi et al., 2006)

CHAPITRE 2

MISE EN ÉVIDENCE D'AJOUT DE SYNTHÈSE DANS DES EXTRAITS AROMATIQUES PAR ANALYSE ISOTOPIQUE GLOBALE

Ce chapitre a fait l'objet d'une publication :

Article 1

Cuchet, A., Jame, P., Anchisi, A., Schiets, F., Oberlin, C., Lefèvre, J.-C., Carénini, E., Casabianca, H., 2019. Authentication of the naturalness of wintergreen (*Gaultheria* genus) essential oils by gas chromatography, isotope ratio mass spectrometry and radiocarbon assessment. Ind. Crops Prod. 142, 10. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111873

INTRODUCTION

L'étude bibliographique, détaillée dans le chapitre précédent, faisait état de plusieurs catégories d'adultération. La fraude la plus répandue est l'ajout de molécules issues de la synthèse, ce qui a pour conséquence la non-naturalité de la matière première frelatée par ce type de fraude.

Parmi l'ensemble des techniques analytiques utilisées pour authentifier les huiles essentielles, les analyses énantiomériques sont particulièrement efficaces, car elles permettent de détecter rapidement un ajout de produits de synthèse en observant une racémisation des molécules chirales. Cependant, de nombreuses huiles essentielles ne sont pas majoritairement constituées de molécules présentant un centre de stéréosélectivité. C'est notamment le cas des huiles essentielles composées de phenylpropanoïdes et de dérivés aromatiques, telles que les huiles essentielles de cannelle, d'amande amère, ou encore de gaulthérie. Dans ce cas, la détermination de l'activité en radiocarbone est la technique de référence. Cette technique est cependant couteuse, et d'autres techniques analytiques par IRMS et par GC-MS (impureté de synthèse résiduelle) peuvent potentiellement arriver aux mêmes conclusions, rapidement et sans préparation d'échantillon préalable.

Les analyses par IRMS permettent de différencier, la plupart du temps, l'origine naturelle de l'origine synthèse. En effet, la signature isotopique des métabolites secondaires actifs de l'huile essentielle est liée aux procédés de biosynthèses que subit la plante, ainsi qu'à ses interactions avec son environnement. Les fractionnements isotopiques subis par les molécules obtenues par photosynthèse sont donc différents des molécules obtenues par synthèse pétrochimique. C'est notamment le cas des phenylpropanoides, pour lesquels la signature isotopique est particulièrement différente (Schmidt et al., 2006, 2003, 2001).

Ce chapitre est consacré à la mise en évidence d'ajouts de molécules de synthèse qui ne présentent pas d'énantiomères, dans des matières premières riches en phenylpropanoïdes : l'huile essentielle de gaulthérie, et l'absolue de fèves tonka. La première partie de ce chapitre présente le développement d'une méthodologie permettant de contrôler la naturalité du métabolite principale de l'huile essentielle de wintergreen, le salicylate de méthyle, grâce à l'utilisation combinée de trois techniques analytiques : la détection d'impuretés résiduelles, la détermination de l'activité en radiocarbone, et l'analyse multiéléments EA-C/P-IRMS. Cette partie a fait l'objet d'une publication dans *Industrial Crops and Products*. La seconde partie de ce chapitre se consacre au développement d'une approche d'authentification de la coumarine issue de l'absolue de fève tonka. Une préparation d'échantillon est requise pour extraire la coumarine avant analyse des ratios isotopiques stables.

ÉTUDE DE L'HUILE ESSENTIELLE DE GAULTHÉRIE

L'huile essentielle de gaulthérie (également appelée wintergreen) est obtenue par un procédé de distillation à la vapeur d'eau des feuilles issues de gaulthérie, principalement les espèces gaulthérie odorante, et gaulthérie couchée. Cette huile essentielle, utilisée notamment en aromathérapie, pour ses propriétés anti inflammatoires, est particulièrement riche en salicylate de méthyle, qui représente environ 99% de sa composition. Cependant, du fait de cette particularité, certains producteurs sont parfois enclins, pour des raisons économiques, à adultérer le wintergreen avec du salicylate de méthyle, issu de la synthèse. En effet, le salicylate de méthyle est relativement simple à obtenir, par des voies de synthèse peu coûteuses, impliquant l'acide salicylique, le salicylaldéhyde, ou encore l'acide acétylsalicylique. L'objectif de l'étude présentée était donc de mettre au point une méthodologie, permettant de contrôler la naturalité de l'huile essentielle de wintergreen.

Lors de cette étude, des marqueurs de synthèse ont été mis en évidence. La détection de 4-hydroxybenzoate de méthyle, de 2-hydroxyisophtalate de méthyle, et/ou de 4-hydroxyisophtalate de diméthyle, indiquent que le salicylate de méthyle est d'origine synthétique, car ces composés n'existent pas à l'état naturel, et sont des impuretés résiduelles de la synthèse du salicylate de méthyle. Cependant, certaines voies de synthèse ne permettent pas d'obtenir ces impuretés, et il est également possible, avec une distillation, ou un protocole de purification, d'éliminer les traces d'impuretés du salicylate de méthyle synthétisé. C'est pourquoi un simple contrôle de la composition de l'huile essentielle de wintergreen n'est pas toujours suffisant, et des techniques complémentaires sont nécessaires, afin de s'assurer de la naturalité.

L'étude a permis de développer une méthode d'authentification de l'huile essentielle de wintergreen par EA-C/P-IRMS, de montrer la complémentarité de l'analyse des isotopes stables et du radiocarbone pour authentifier l'huile essentielle de wintergreen et de mettre en évidence une nouvelle forme de fraude par ajout de molécules marquées au carbone ^{14}C.

Authentication of the naturalness of wintergreen (*Gaultheria* genus) essential oils by gas chromatography, isotope ratio mass spectrometry and radiocarbon assessment

Aurélien Cuchet[a,b,*], Patrick Jame[b], Anthony Anchisi[b], Frédéric Schiets[b], Christine Oberlin[c], Jean-Claude Lefèvre[c], Elise Carénini[a], Hervé Casabianca[b]

[a]*Albert Vieille SAS, 629 Route de Grasse, 06227 Vallauris Cedex, France*

[b]*Université de Lyon, CNRS, Université Claude Bernard Lyon 1, Institut des Sciences Analytiques, UMR 5280, 5 rue de la Doua, F-69100 Villeurbanne, France*

[c]*Université de Lyon, CNRS, Université Claude Bernard Lyon 1, Université Lumière Lyon 2, ARAR UMR 5138 – Centre de Datation par le Radiocarbone, 69622 Villeurbanne Cedex, France*

Abstract:

The essential oil of wintergreen, which is extracted by steam distillation from *Gaultheria* genus leaves, is mainly used in aromatherapy. However, due to its adulteration easiness with synthetic material, it is necessary to control samples naturalness with accuracy. The purpose of this work was to develop a methodology to authenticate the essential oil of wintergreen. Wintergreen essential oil is composed of more than 99% methyl salicylate. This aromatic ester can be easily synthesized and used to adulterate wintergreen essential oil. Authentic wintergreen essential oil can be distinguished from adulterated oils by examining their compositions. The detection of methyl salicylate synthetic marker compounds (methyl 4-hydroxybenzoate, dimethyl 4-hydroxyisophthalate or dimethyl 2-hydroxyisophthalate) or the absence of several naturally occurring minor secondary metabolites (ethyl salicylate and vitispirane) contribute to the authentication. Isotopic values of bulk wintergreen essential oil have also been determined using an isotope ratio mass spectrometer (IRMS): the $\delta^{13}C$ values of authentic samples range from -36.78 to -33.36‰, the $\delta^{2}H$ values range from -173 to -115‰ and the $\delta^{18}O$ values range from -1.3 to 5.7‰. However, these analytical methods cannot account for the natural variability in the essential oils. To determine the boundaries of the natural isotopic values, ^{14}C radioactive isotope activity assessment was undertaken, which allows for the determination of the genuineness of samples that are not assessed using multistable isotope approaches. Additional studies evaluating ^{14}C activity of a noncompliant sample using IRMS identified a ^{14}C-labeled synthetic methyl salicylate adulteration.

Keywords: Wintergreen essential oil, Methyl salicylate, Chemical composition, Isotope ratio mass spectrometry, Authentication, Radiocarbon activity

1. Introduction

Natural raw materials such as essential oils are obtained from the extraction of vegetal products and are currently widely used in food products, cosmetics (including fragrances), pharmaceuticals, and aromatherapy products due to their medicinal and olfactory properties. These products are sometimes susceptible to fraud: essential oils sold to consumers do not always possess their original compositions, despite being labeled 100% pure and natural. Suppliers resort to adulterating their products by adding low-cost products to their natural materials to improve the product quality, to increase the raw material volume, or for economic reasons. One of the main adulterations of essential oils is the addition of less expensive synthetic compounds. Thus, it is necessary to develop methods of authentication to identify such practices in order to empower consumers to be sure of the natural quality of their purchases and to enable suppliers to prove the authenticity of their products.

The essential oil of wintergreen can be obtained by the steam distillation of leaves from different species of the genus *Gaultheria*. These essential oils are produced mainly in high altitude locations in North America (Canada), China, and Nepal, and the harvest period usually lasts from May until September. The botanical sources of *Gaultheria* that are most commonly used to produce wintergreen essential oils are *procumbens* and *fragrantissima*, because these species yield a high concentration of methyl salicylate. However, wintergreen essential oils obtained from other species of *Gaultheria* such as *yunnanensis* and *hispidula* are commercialized as well. The steam distillation yield of leaves is less than 2% (Bantawa et al., 2011). The quantity of essential oils produced in China is estimated to be between 20 and 70 Mg. Farmers are interested in growing the essential oil plants only where prices are high enough to make the crop economically viable and falling prices will quickly lead to a change to the cultivation of other more valuable crops.

Due to its very high concentration in the aromatic ester methyl salicylate, wintergreen is notable of the field of essential oils. Methyl salicylate represents more than 99% of the composition of most wintergreen species after a bidistillation process (Cong et al., 2015; Nikolić et al., 2013; Singh and Ali, 2017). The aromatic and herbaceous wintergreen fragrance can be used in perfumery and in the cosmetic and food industries, but the main uses are in aromatherapy, oral care, and natural preservatives for cosmetics. Many medical ointments used in aromatherapy are composed of wintergreen essential oil (Mukhopadhyay et al., 2016) because of its analgesic and anti-inflammatory properties (Delplancq, 2015; Liu et al., 2013; Michel et al., 2014; Park et al., 2011), which efficiently relieve pain caused by muscle fever (Ribnicky et al., 2003). Antispasmodic, vasodilators, and liver stimulant properties of the essential oil have also been reported (Franchomme et al., 2012). Wintergreen possesses other properties that are useful for various applications. For example,

wintergreen essential oil is used as a biopesticide (Dayan et al., 2009) in food crops and food packaging because of its antifeedant properties (Jeyasankar, 2012; Prakash, 2015), and it is used as a natural preservative in cosmetic products because of its antioxidant and antibacterial activities (Pandey et al., 2017).

Suppliers desiring to increase their profits illegally might be inclined to adulterate their natural product by adding synthetic materials that are less expensive. For the 2018 harvest, the price of essential oil from China was between 50 and 65 euros per kilogram. The most common method of wintergreen essential oil adulteration is the addition or substitution of synthetic methyl salicylate. This synthetic molecule can be prepared through several different chemical pathways (Fig. 1.). The most common pathway starts with salicylic acid that has been obtained by conducting a Kolbe Schmitt reaction (Luo et al., 2016) using phenol, which can be synthesized from petroleum products using the Hock process (also known as cumene process). The methylation of salicylic acid leads to synthetic methyl salicylate (D'Souza and Nagaraju, 2007; Iijima and Yamaguchi, 2008; Su et al., 2009). Another previously reported method to obtain salicylic acid employs the Lowig oxidation process with salicylaldehyde as the starting material. Salicylaldehyde can be obtained in several ways, such as via the Reimer Tiemann reaction, but salicylaldehyde also occurs naturally in meadowsweet flowers (Olennikov et al., 2016). This process is more expensive than the classical salicylic acid approach, and an additional step is required. The most economical current method to synthesize methyl salicylate is the hydrolysis of aspirin (acetylsalicylic acid), which is industrially produced from salicylic acid (Hartel and Hanna, 2009; Montes et al., 2006).

Chiral analysis cannot be performed on methyl salicylate to guarantee the natural authenticity of the product because the methyl salicylate molecule does not possess an asymmetrical carbon. Previous studies used isotope ratio mass spectrometry (IRMS) to obtain pertinent isotopic data for methyl salicylate. Synthetically produced methyl salicylate possesses $\delta^{13}C$ values ranging from -28.32 to -30.84‰ and $\delta^{2}H$ values from -51 to -97‰, whereas natural essential oil values obtained from birch range from -33.11 to -33.66‰ for $\delta^{13}C$ and from -56 to -163‰ for $\delta^{2}H$ (Culp and Noakes, 1992a). An authentication method for methyl salicylate in black tea using $\delta^{13}C$ GC-C-IRMS was published in 1999 (Weinert et al., 1999). The most recently developed naturalness authentication method used ERETIC analysis via SNIF-NMR (Le Grand et al., 2005).

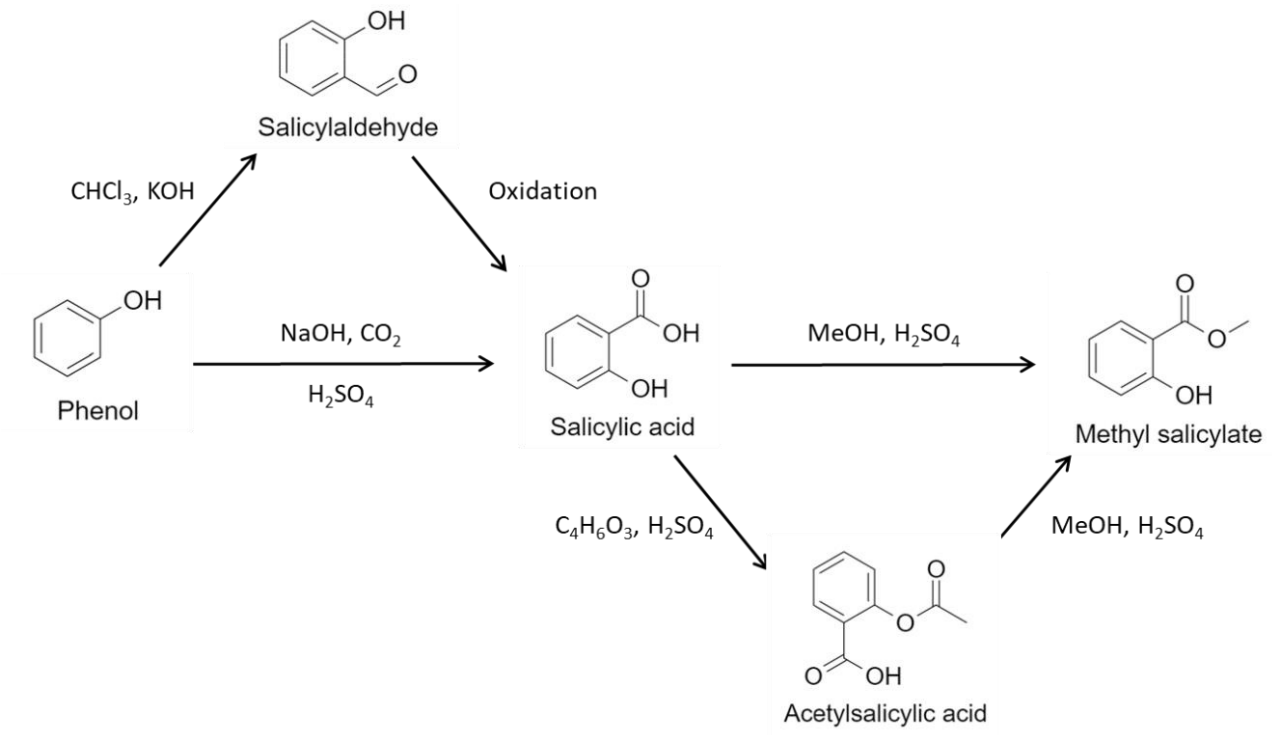

Figure 1. *Principal synthetic paths to synthesize methyl salicylate*

The objective of this study was to develop an accurate methodology to ensure the naturalness authentication of the wintergreen essential oil. Samples from various providers were studied and compared with commercially produced and laboratory-synthesized methyl salicylate. Different studies were carried out including a characterization of the essential oils, a determination of the synthetic precursors and impurities, the analysis of stable isotope ratios of methyl salicylate, and an assessment of the radiocarbon activity.

2. Material and Methods

2.1. Samples information

Twenty-One *Gaultheria procumbens* L. essential oils samples were provided by Albert Vieille (Vallauris, France), originating from China and Nepal. Thirty samples of *Gaultheria procumbens* L., *Gaultheria fragrantissima* Wall., and *Gaultheria leucocarpa var. yunnanensis* (Franch.) T.Z. Hsu & R.C. Fang. essential oils were obtained from different suppliers and originated from China and Canada. Eleven commercial samples were purchased from a pharmacy. Two authentic samples of Gaultheria *fragrantissima* Wall. and Gaultheria *leucocarpa* var. *yunnanensis* (Franch.) T.Z. Hsu & R.C. Fang. essential oils, originating in China (Yunnan province) and Nepal, were supplied by Young Living (Lehi, UT, USA). Five synthetic methyl salicylate commercial samples were purchased from several suppliers

(Sigma Aldrich (Saint Louis, MO, USA), Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA), and TCI (Tokyo, Japan)). Several methyl salicylates were made in our laboratory via different synthetic pathways. One sample was obtained from aspirin (Sigma Aldrich), three were synthesized with salicylic acid (TCI and Cooper, Melun, France) as a starter material, and one sample was made from salicylaldehyde (Sigma Aldrich).

2.2. Gas chromatography (GC-FID) analysis

GC analyses were carried out using a gas chromatograph 6890N (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) equipped with a flame ionization detector (FID), with the detector temperature set at 250°C. Separation of the volatile compounds was performed on a HP-1 capillary column (50 m*0.320 mm*0.52 µm, Agilent Technologies) and a HP-Innowax capillary column (60 m*0.320 mm*0.50 µm). The GC conditions for the HP-1 column were programmed as follows: 1 µL of pure sample was injected into the GC in the split mode (120:1) with the injector temperature set at 250°C. The carrier gas was helium at a constant flow rate of 1.5 mL/min. The initial oven temperature was held at 80°C for 2 min, ramped to 220°C at a rate of 2°C/min, and then to 295°C at a rate of 10°C/min and held for 30 min. The GC conditions for the Innowax column were programmed as follows: 1 µL of pure sample was injected into the GC in the split mode (100:1) with the injector temperature set at 250°C. The carrier gas was helium at a constant flow rate of 1.3 mL/min. The initial oven temperature was held at 60°C for 2 min, ramped to 245°C at a rate of 2°C/min and held for 35 min. Identification of the volatile compounds was achieved using the Kovats Index determined with relative retention indices from C5 to C30 alkanes.

2.3. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis

GC-MS analyses were performed on a gas chromatograph 6890N GC System (Agilent Technologies) interfaced with a 5975 inert XL MSD mass spectrometer with electron impact ionization (70 eV). Each 1 µL pure sample was injected into the GC in the split mode (120:1), with the injector temperature set at 250°C. Helium was used as the carrier gas with a constant flow rate of 1.2 mL/min. Separation of the volatile compounds was achieved using a HP-1 capillary column (50 m*0.200 mm*0.50 µm, Agilent Technologies). The initial oven temperature was held at 60°C for 2 min and then ramped at a rate of 3°C/min to reach a final temperature of 320°C and then held for 10 min. The mass scanning range was from 35 to 350 m/z in TIC. The SIM parameters were as follows: the targeted mass ions (m/z) were 91 (tropylium ion), 121 (M - CH_3O) and 152 (molecular ion) from 36 to 44 min to detect methyl 4-Hydroxybenzoate and 120 (ortho rearrangement), 147 (double loss of CH_3OH (methanol) and CH_3O), 178 (loss of CH_3OH), and 210 (molecular ion) from 44 to 50 min to detect dimethyl 4-hydroxyisophthalate and dimethyl 2-hydroxyisophthalate. NIST library and lab-made library, combined

with retention time, retention indices, literature references, and standards injections were used to identify the molecules.

2.4. Elemental Analysis –Isotope Ratio Mass Spectrometry (EA-C/P-IRMS)

High purity carbon dioxide (CO_2) 99.998% (4.8 Messer), hydrogen (H_2) 99.999% (5.0 Messer), and carbon monoxide (CO) 99.997% (4.7 Messer) were used as the working reference gases. Helium flow at 99.999% was used as the carrier gas.

International standards IAEA CH7 (polyethylene foil: $\delta^{13}C$ (‰) -31.82, $\delta^{2}H$ (‰) -100.3), USGS40 (L-glutamic acid: $\delta^{13}C$ (‰) -26.39), and IAEA-601 (Benzoic acid: $\delta^{18}O$ (‰) +23.3) supplied by the IAEA (International Agency of Atomic Energy, Vienna, Austria) were used for the calibration of all the studied samples. All sample values were obtained in duplicate and were verified by bracketing the analytical sequence with the international standards every sixth analysis.

The carbon isotopic analyses ($\delta^{13}C$ value) of the synthetic standards were carried out using a Flash HT elemental analyzer connected to a Delta V Plus via a Conflo V interface (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany). The samples were weighted in tin capsules (5 X 8, Säntis Analytical AG, Teufen, Switzerland) and dropped into the combustion unit, which was maintained at 915°C in a stream of helium with a flow rate of 90 $mL.min^{-1}$ and pulsed with oxygen. The flash combustion (approximately 1800°C) caused the complete oxidation of carbon to CO_2. The gases flowed through the reduction furnace, which was held at 600°C and included a copper wire where the excess oxygen was trapped. The reduction furnace was followed by a water trap containing anhydrous magnesium perchlorate. The Flash HT elemental analyzer was connected to the isotope ratio mass spectrometer Thermo Delta V Plus via an online interface (Conflo IV). This intermediary device provided for automatic adjustment of the sample dilution and generation of the reference gas pulses, which facilitated the isotopic determination.

The $\delta^{2}H$ and $\delta^{18}O$ measurements of the synthetic standards were carried out using a TC-EA elemental analyzer linked to a Delta V Plus via a Conflo V interface (all Thermo Fisher Scientific). Samples weighed in silver capsules (3.3 X 5 mm, Säntis Analytical AG, Teufen, Switzerland) were dropped into the pyrolysis unit, which was held at 1400°C. This high-temperature reactor consisted of an inner glassy carbon tube half-filled with glassy carbon granules integrated into an external ceramic tube. Hydrogen and oxygen were converted to H_2 and CO and separated on a gas chromatography column prior to introduction into the IRMS via the same interface (Conflo IV). The interface, as previously described, provided steady and regular reference gas pulses.

The $\delta^{13}C$ values (‰) were calibrated relative to Vienna Pee Dee Belemnite (V-PDB) using two multipulse injections of the CO_2 reference gas. H_2 and CO reference gases were used in the same way for the determination of the $\delta^{2}H$ and $\delta^{18}O$ values (‰), and the results were calibrated to Standard Mean Ocean Water (SMOW).

Isotopic results are expressed in delta unit (δ) according to the following formula:

$$\delta(^{13}C/^{12}C) = \left[\frac{R\ (^{13}C/^{12}C)\ sample}{R\ (^{13}C/^{12}C)\ standard} - 1\right]$$

where the $\delta^{13}C$ values are given within a maximum standard deviation (SD) of ± 0.21‰, $\delta^{2}H$ within SD=± 5‰, and $\delta^{18}O$ within SD=± 0.6‰.

2.5. Radiocarbon analysis via Liquid Scintillation Counting (LSC)

All liquid samples were burned in a pyrocombustion mineralization device (Mineralyseur ERALY) to obtain CO_2. This device consists of a quartz combustion tube and two furnaces in series. An automatic syringe pump type device makes the injection of liquid samples possible. The first furnace, mounted at 400°C, is swept by a flow of nitrogen and triggers the vaporization of the liquid produced. The second furnace, maintained at 750°C, is crossed by an oxygen flow and ensures the oxidation of the gas resulting from the vaporization. The carbon dioxide formed is collected and chemically transformed into benzene (C_6H_6). It is in this liquid form that its carbon-14 content will be measured by counting in liquid scintillation. The samples are measured in liquid scintillation counters with very low background with TRI-CARB 1500, 2000CA/LL, 2260XL, 2560TR/XL, 3170TR/SL, and 2900TR Packard and Perkin Elmer counters. A sample is counted four or five times during 1000 min in different counters each time. The counting rate of the background noise of the counter is subtracted (net count rate) from the counting rate of the sample. The ^{14}C activity is obtained by normalizing the net count rate from the count rate of the reference standard (NBS Oxalic Acid). All the values of modern carbon are in percent modern and are corrected from isotopic fractionation, using the data of stable isotopes (ratio $^{13}C/^{12}C$) measured on CO_2 obtained from the combustion of the sample. Values are given within a maximum SD of ± 0.6%.

3. Results and discussion

3.1. Essential oil composition via GC-FID and GC-MS

The compositions of wintergreen essential oils and commercial and laboratory-made synthetic methyl salicylates are listed in Table 1 with relative Kovats indices. The major compounds are also represented in Fig. 2.

The synthetic methyl salicylates exhibited a high purity, nearly 99%, but several impurity peaks can be seen in their compositions, which can be attributed to precursors and secondary products of the methyl salicylate synthesis. Seven compounds were identified. Phenol (**16**) was the initial synthesis precursor of the Kolbe Schmitt reaction. Ethyl salicylate (**2**), methyl o-cresotinate (**18**), methyl 2-methoxybenzoate (**17**), and methyl 4-hydroxybenzoate (**13**) were all produced during the methylation of salicylic acid. Dimethyl 4-hydroxyisophthalate (**15**) and dimethyl 2-hydroxyisophthalate (**14**) were secondary products of a Kolbe Schmitt reaction impurity. The other minor compounds were primarily from residual solvents. The ex-salicylaldehyde sample was the only synthetic methyl salicylate without the presence of dimethyl 4-hydroxyisophtalate, which was the second major component in the other six samples. The absence of this compound was expected, since it did not come from the carboxylation of phenol, which was identified in trace amounts in the ex-salicylaldehyde sample.

In the set of wintergreen essential oils, a total of 62 compounds were identified, covering more than 99% of the total peak area of the 64 samples analyzed. The methyl salicylate represented, among the natural essential oils, the majority of the volatile compounds and represented 97.36 to 99.71% of the total amount. Most of the other components were found in trace amounts and were not systematically present in the wintergreen oils. Natural variability, due to botanical varieties and geographical origins, induces important differences among natural wintergreen compositions. The minority compounds that were the most prevalent were limonene (**1**) (Mean value ± SD= 0.04 ± 0.06%), ethyl salicylate (**2**) (0.09 ± 0.07%), linalool (**3**) (0.05 ± 0.02%), alpha-pinene (**4**) (0.01 ± 0.02%), geraniol (**5**) (0.02 ± 0.02%), benzyl alcohol (**6**) (0.02 ± 0.01%), vitispirane (**7**) (0.02 ± 0.01%), eugenol (**8**) (0.02 ± 0.02%), beta pinene (**9**) (0.01 ± 0.01%), safrole (**10**) (0.01 ± 0.04%), para cymene (**11**) (0.01 ± 0.01%), trans-beta caryophyllene (**12**) (0.01 ± 0.01%), and phenol (**16**) (0.01 ± 0.00%).

Table 1. *Chemical compositions of presumed authentic wintergreen essential oils, adulterated ones, synthetic and lab-made methyl salicylates*

No	Compounds	CAS	KI HP1[a]	KI Innowax[b]	% Total peak area		
					Authentic wintergreen essential oils (n=41)	Synthetic methyl salicylate (n=10)	Adulterated wintergreen essential oils (n=23)
					Min-Max	Min-Max	Min-Max
	Ethanol	64-17-5	480	937	0.00-1.37	0.00-0.03	0.00-2.74
	Acetone	67-64-1	489	827	0.00-0.03	0.00-0.02	0.00-0.02
	Hexanal	66-25-1	772	1097	0.00-0.01	nd	0.00-tr
	(E)-2-Hexenal	6728-26-3	822	1241	0.00-0.01	nd	0.00-tr
	(Z)-3-Hexenol-1	928-96-1	831	1397	0,00-0.09	0.00-tr	0.00-0.04
	(E)-2-Hexenol	928-95-0	840	1415	0.00-0.01	nd	0.00-0.01
	1-Hexanol	11-27-1	843	1360	0.00-0.04	0.00-tr	0.00-0.01
	Heptanal	11-71-7	875	1206	0.00-0.01	nd	0.00-tr
	2-Heptanol	543-49-7	879	1320	0.00-0.04	nd	0.00-0.02
	Benzaldehyde	100-52-7	929	1546	0.00-0.01	0.00-tr	0.00-tr
(4)	α-Pinene	80-56-8	932	1037	0.00-0.05	0.00-tr	0.00-0.59
	Camphene	79-92-5	945	1088	0.00-0.01	nd	0.00-0.01
	1-Heptanol	111-70-6	948	1463	0.00-tr	nd	0.00-0.02
(16)	Phenol	108-95-2	950	1981	0.00-0.02	0.00-0.12	0.00-0.06
	Sabinene	3387-41-5	966	1138	0.00-0.01	nd	0.00-0.03
(9)	β-Pinene	127-91-3	972	1129	0.00-0.02	nd	0.00-0.15
	Myrcene	123-35-3	981	1177	0.00-0.01	nd	0.00-0.01
	(Z)-3-Hexenyl Acetate	3681-71-8	984	1334	0.00-0.01	nd	0.00-tr
	α-Phellandrene	99-83-2	999	1185	0.00-0.01	nd	0.00-tr
(6)	Benzyl Alcohol	100-51-6	1004	1881	tr-0.04	nd	0.00-0.02
	α-Terpinene	99-86-5	1011	1202	0.00-0.01	nd	0.00-0.01
(11)	p-Cymene	99-87-6	1013	1295	0.00-0.05	nd	0.00-0.05
(1)	Limonene	138-86-3	1023	1219	0.00-0.33	0.00-tr	0.00-0.80
	1,8-Cineole + β-Phellandrene	470-82-6 555-10-2	1023	1229	0.00-0.01	nd	Nd
	γ-Terpinene	99-85-4	1050	1269	0.00-0.03	nd	0.00-0.01
	1-Octanol	111-87-5	1051	1565	0.00-0.06	nd	0.00-0.01
	Terpinolene	586-62-9	1080	1308	0.00-0.01	nd	0.00-0.01
(3)	Linalool	78-70-6	1083	1561	tr-0.11	nd	0.00-0.46
	Camphor	76-22-2	1121	1556	0.00-0.01	nd	0.00-0.02
	(E)-Pinocarveol	1674-08-4	1124	1683	0.00-0.01	nd	0.00-0.01
	Isopulegol	7786-67-6	1131	1598	0.00-0.01	nd	0.00-0.02
	Ethyl Benzoate	93-89-0	1144	1688	0.00-0.01	nd	0.00-0.18
	Terpinen-4-ol	562-74-3	1162	1622	0.00-0.02	nd	0.00-tr
	Methyl Salicylate	119-36-8	1169	1809	97,36-99.71	96,36-99.93	94.94-99.76
	β-Cyclocitral	432-25-7	1199	1640	0.00-0.01	nd	0.00-0.01
	Nerol	106-25-2	1210	1810	0.00-0.05	nd	0.00-0.01
	Neral	106-26-3	1215	1708	0.00-0.08	nd	0.00-0.03
(5)	Geraniol	106-24-1	1233	1866	0.00-0.06	nd	0.00-0.01
	Geranial	141-27-5	1242	1760	0.00-0.06	nd	0.00-tr
(2)	Ethyl Salicylate	118-61-6	1245	1821	0,05-0.50	0.00-0.04	0.00-0.05
(10)	Safrole	94-59-7	1263	1908	0.00-0.16	nd	0.00-0.01
(18)	Methyl o-Cresotinate	23287-26-5	1267	-	0.00-tr	0.00-tr	0.00-0.01
	Bornyl acetate	200-694-4	1270	1612	0.00-0.08	nd	Nd
(7)	Vitispirane	65416-59-3	1271	1504	0.02-0.03	nd	0.00-0.01
	Isobornyl acetate	125-12-2	1274	1618	0.00-0.02	nd	0.00-0.01
	Nagina Ktone (Dehydro Elshotzia Ketone)	6138-88-1	1276	1884	0.00-0.01	nd	Nd
(17)	Methyl 2-Methoxybenzoate	606-45-1	1295	2070	0.00-0.01	0.00-0.08	0.00-0.01
(8)	Eugenol	97-53-0	1327	2196	0.00-0.12	nd	0.00-0.04
	α-Terpenyl Acetate	80-26-2	1333	1724	0.00-0.03	nd	0.00-tr
	Methyl 2,4-Dihydroxybenzoate	2150-47-2	1346	-	0.00-0.01	0.00-0.02	0.00-tr
	α-Copaene	223-364-4	1377	1517	0.00-0.01	nd	0.00-tr
(13)	Methyl 4-Hydroxybenzoate	202-785-7	1410	-	Nd	0.00-0.06	0.00-0.04
(12)	(E)-β-Caryophyllene	87-44-5	1419	1628	0.00-0.04	nd	0.00-0.10
	Aromadendrene	25246-27-9	1439	1634	0.00-0.05	nd	0.00-tr
	α-Humulene	6753-98-6	1452	1704	0.00-0.01	nd	0.00-0.01
	Eugenyl Acetate	93-28-7	1493	2287	0.00-0.03	nd	0.00-0.01

	Δ-Cadinene	478-76-1	1515	1785	0.00-0.03	nd	0.00-0.02
	(Z)-3-Hexenyl Benzoate	3681-71-8	1542	2160	0.00-0.01	nd	0.00-tr
(15)	Dimethyl 4-Hydroxyisophthalate	5985-24-0	1573	2468	Nd	0.00-0.19	0.00-0.68
(14)	Dimethyl 2-Hydroxyisophthalate	36669-06-04	1611	2583	Nd	0.00-tr	0.00-0.03
	Benzyl Salicylate	118-58-1	1834	2757	0.00-0.05	nd	0.00-0.04
	Total identified				99.89±0.20	99.06±1.33	99.85±0.39

Compositions of essential oils have been determined with GC-FID and GC-MS analysis. Compounds are listed in order of their elution from HP1 column. Total identification data are reported as mean ± standard deviation.

[a] KI: Kovats Index on HP1 column

[b] KI: Kovats Index on HP-Innowax column

n: Number of samples, nd: Non-detected, tr: Traces (Compounds detected below 0.01%)

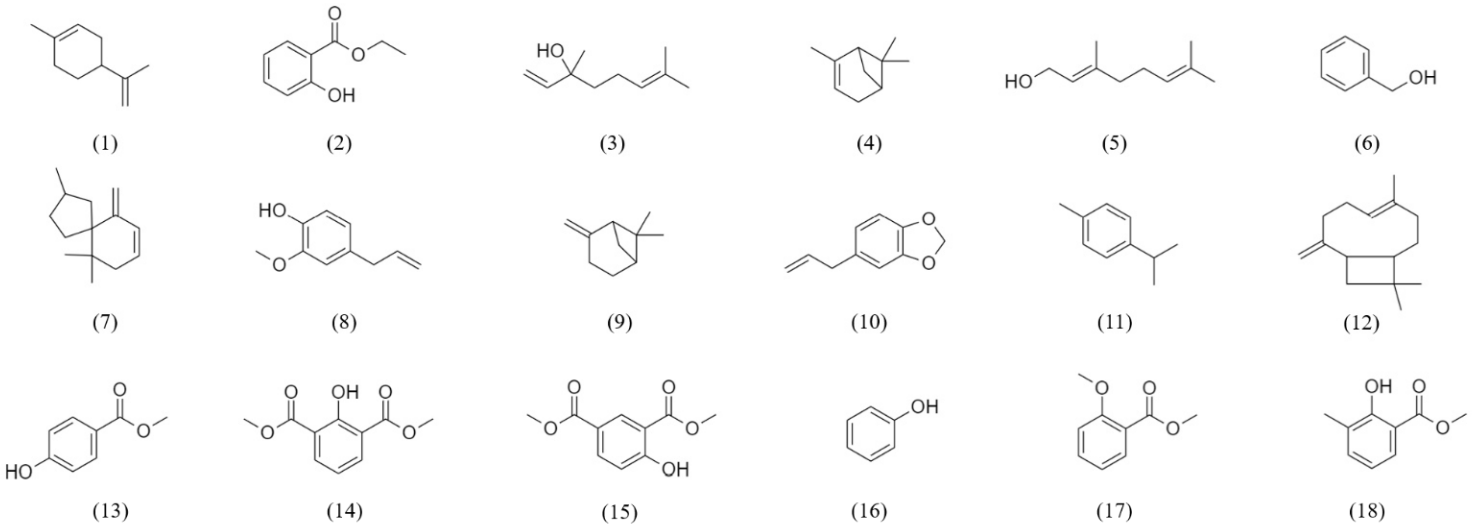

Figure 2. *Structure of major compounds of the essential oil of wintergreen and of resultant impurities from methyl salicylate synthesis. (1) Limonene; (2) ethyl salicylate; (3) linalool; (4) α-pinene; (5) geraniol; (6) benzyl alcohol; (7) vitispirane; (8) eugenol; (9) β-pinene; (10) safrole; (11) p-cymene; (12) (E)-β-caryophyllene; (13) methyl 4-hydroxybenzoate; (14) dimethyl 2-hydroxyisophthalate; (15) dimethyl 4-hydroxyisophthalate; (16) phenol; (17) methyl 2-methoxybenzoate; (18) methyl o-cresotinate*

Methyl 4-hydroxybenzoate, dimethyl 4-hydroxyisophthalate, and dimethyl 2-hydroxyisophthalate have only been identified in several adulterated essentials oils, in which many secondary metabolites found in authentic wintergreens are in low abundance, such as ethyl salicylate (0.02 ± 0.02%) and vitispirane (0.00 ± 0.01%), whereas these samples have similar methyl salicylate concentrations compared with those of natural oils. These three molecules can potentially be used as synthesis marker compounds, but they have not always been detected, probably because of an addition of impurity-free methyl salicylate or another remedy. A single-ion monitoring (SIM) method was developed for GC-

MS in order to monitor trace amounts of these adulteration marker components in all the essential oils in this study.

3.2. Stable-Isotopes analysis

The determination of minor peaks establishing that the process of production is synthesis is not so easy to show, when natural wintergreen is partly diluted. in this scheme, IRMS will be relevant to conclude. The isotopic measurement is performed in 5 min allowing fast and cheap analyses when the assessment of raw materials need to be done.

The $\delta^{13}C$, $\delta^{2}H$, and $\delta^{18}O$ isotopic values of the 64 wintergreen essential oils samples are summarized in Table 2 and shown in a 3D-plot representation (Fig. 3.). Because methyl salicylate constitutes more than 99% of the wintergreen essential oil, isotopic measurements have been conducted using an elemental analyzer connected to an isotope ratio mass spectrometer (EA-C/P-IRMS) for bulk stable isotope analysis (BSIA).

The natural methyl salicylates exhibited significantly different values of the three isotope ratios investigated, $\delta^{13}C$, $\delta^{2}H$, and $\delta^{18}O$, compared with those of the synthetic samples. The 3D plot of the isotopic values clearly shows two distinct areas: one for the authentic wintergreen samples and the other one for the synthetic methyl salicylates and adulterated wintergreens. The samples with at least one identified synthetic marker compound demonstrated values close to those of the synthetic methyl salicylates. Conversely, the essential oils without markers possessed isotopic deltas in the same range as those of the natural essential oils. Only two samples were found in the synthetic range that did not have any synthetic markers, but they were located far away from the natural essential oils: an adulteration was clearly demonstrated. All three isotopes were highly correlated, as shown in Fig. 4.

According to Culp et al. (1992), natural methyl salicylates have δ-values, measured in five samples, ranging between -33.11 and -33.66‰ for $\delta^{13}C$ and from -56 to -163‰ for ^{2}H. The results obtained in this study of 41 authentic wintergreen oils indicated that the authentic range is tighter for $\delta^{2}H$, with an average value of -135‰ and a maximal value of -115‰, and different $\delta^{13}C$ natural values, with an upper mean value of -34.98‰. The synthetic normal range of $\delta^{2}H$ is wider than the deltas of the other isotopes, notably depending on the synthetic origin of the methyl salicylates, as the $\delta^{2}H$ isotopic fractionation is larger. Clear differentiation is distinguished between natural and synthetic δ-values: synthetic methyl salicylates show more positive δ-values, especially on the $\delta^{18}O$, which is consistent with previous work on isotopic patterns of phenylpropanoids (Schmidt et al., 2001). Isotopic ratios of adulterated essential oils have been determined to be between natural and synthetic ones.

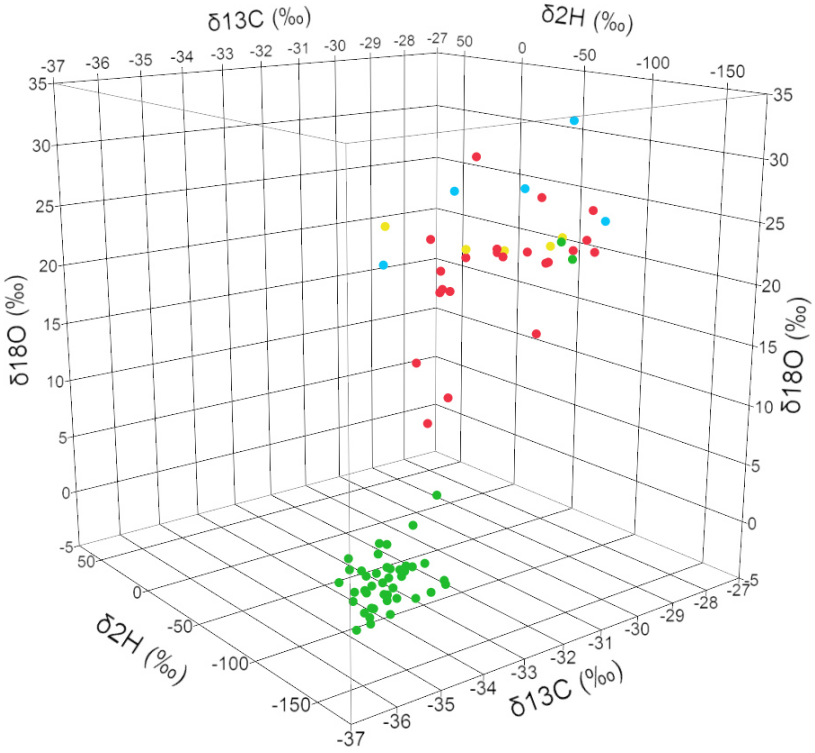

Figure 3. *EA-C/P-IRMS (Elemental Analysis – Combustion / Pyrolysis – Isotope Ratio Mass Spectrometry) multi-element isotopic analysis of methyl salicylate from different origins: lab-made methyl salicylates (in blue); commercial methyl salicylates (in yellow); wintergreen essential oils with at least one synthetic marker compound (in red); wintergreen essential oils with no synthetic impurities (in green). Each sample has been analyzed at least in duplicate: δ values are a mean result of both determined results.*

Table 2. *$\delta^{13}C$, $\delta^{2}H$, and $\delta^{18}O$ values of methyl salicylate from various origins determined by EA-C/P-IRMS*

Isotopic values	Authentic wintergreen essential oils (n=41)				Synthetic methyl salicylate (n=10)				Adulterated wintergreen essential oils (n=23)			
	Min (‰)	Max (‰)	Mean (‰)	SD (‰)	Min (‰)	Max (‰)	Mean (‰)	SD (‰)	Min (‰)	Max (‰)	Mean (‰)	SD (‰)
$\delta^{13}C$	-36,78	-33,36	-34.98	0.70	-32,09	-27,71	-29.49	1.49	-32.37	-27,45	-29.42	1.36
$\delta^{2}H$	-173	-115	-135	11	-87	63	-54	44	-99	7	-56	28
$\delta^{18}O$	-1,3	5.7	1.3	1.5	19,5	32.0	23.3	4.0	8.6	29,2	19.0	4.4

n: Number of samples

SD: Standard deviation

EA-C/P-IRMS: Elemental Analysis – Combustion / Pyrolysis – Isotope Ratio Mass Spectrometry

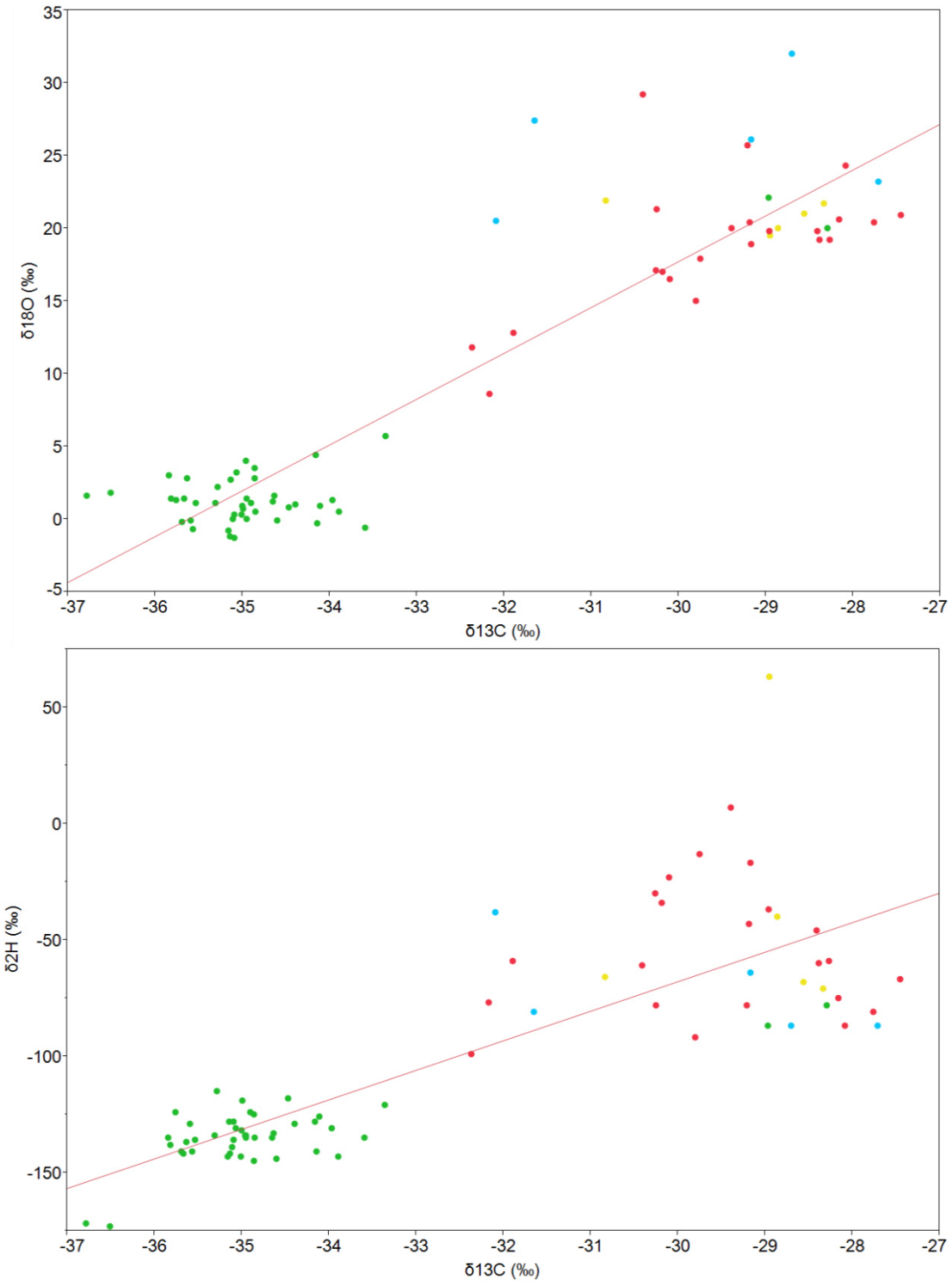

Figure 4. *Correlation between $\delta^{13}C$ and $\delta^{18}O$ values (r^2=0.85) and between $\delta^{13}C$ and $\delta^{2}H$ values (r^2=0.67) of methyl salicylates from different origins: lab-made methyl salicylates (in blue); commercial methyl salicylates (in yellow); wintergreen essential oils with at least one synthetic marker compound (in red); wintergreen essential oils with no synthetic impurities (in green).*

3.3. Radiocarbon activity assessment

3.3.1. Analysis of the wintergreen ^{14}C activity

The analysis of the ^{14}C radiocarbon activity was conducted to determine the percentages of biosourced carbon in the samples. A natural product is composed of 100% biosourced carbon, which is equivalent to an activity of 13.7 ± 0.1 dpm/gC in 2017 (Disintegrations per minute per gram of carbon), whereas a synthetic compound from petrochemistry does not have any ^{14}C activity. An adulteration with synthetic methyl salicylate will result in a mixture of natural and synthetic products, which will result in an intermediate radiocarbon activity. This analysis can be carried out with liquid scintillation counting (LSC) or with accelerator mass spectrometry (AMS) methods.

The determination of the percentage of biosourced carbon accurately establishes the percentage of adulteration in analyzed samples. Furthermore, this percentage helps confirm the naturalness of samples in order to verify the results from GC-FID, GC-MS, and EA-C/P-IRMS and to determine more precise authenticity ranges.

Twenty samples from the analytical panel were chosen to be analyzed with LSC. Biosourced carbon percentages of the 20 samples are listed in Table 3. The naturalness range of the analyzed samples was large, from the 100% synthetic-free to the 100% nonnatural. The synthetic commercial methyl salicylate (Sample 20) had no ^{14}C activity, as expected, because it is usually prepared from petroleum products. Wintergreen essential oils that have a higher activity than natural products are probably a mixture of branches and leaves of the *Gaultheria*, because woody tissues are generally older vegetal raw materials, resulting in a higher ^{14}C activity due to higher radioactivity in the past years. These values have been rounded to 100%. Surprisingly, Sample 17 showed 100% biosourced carbon, whereas stable isotopic data classified this sample in the synthetic origin category. Further investigations were carried out to explain this anomaly.

Table 3. *Percentage of biosourced carbon determined by LSC, along with $\delta^{13}C$, $\delta^{2}H$, $\delta^{18}O$ values determined by EA-C/P-IRMS, and GC-FID relative peak area percentage of ethyl salicylate, vitispirane, methyl 4-hydroxybenzoate and dimethyl 4-hydroxyisophthalate on 19 samples of wintergreen essential oils (Sample numbers 1 to 19) and one commercial methyl salicylate (Sample number 20). Pairwise correlation values between biosourced carbon % and other variables are also referenced. Percentage of biosourced carbon determined by LSC on salicylic acid samples (1S and 17S) obtained from samples 1 and 17.*

Sample number	Product	LSC	EA-C/P-IRMS			GC-FID (% relative peak area)			
		Biosourced carbon (%)	$\delta^{13}C$ (‰)	$\delta^{2}H$ (‰)	$\delta^{18}O$ (‰)	Ethyl salicylate	Vitispirane	Methyl-4-hydroxybenzoate	Dimethyl 4-hydroxyisophthalate
1	Wintergreen	92.9	-34.63	-133	1.6	0.09	0.02	0.00	0.00
1S	Salicylic Acid	92.8	-	-	-	-	-	-	-
2	Wintergreen	96.4	-34.99	-119	0.7	0.09	0.02	0.00	0.00
3	Wintergreen	36.2	-29.80	-92	15.0	0.03	0.01	0.01	0.17
4	Wintergreen	100.0	-34.95	-134	0.0	0.06	0.02	0.00	0.00
5	Wintergreen	0.0	-29.18	-43	20.4	0.01	0.00	0.03	0.23
6	Wintergreen	7,4	-29.39	7	20.0	0.02	0.00	0.02	0.14
7	Wintergreen	14,0	-29.75	-13	17.9	0.02	0.00	0.03	0.24
8	Wintergreen	49,1	-31.89	-59	12.8	0.03	0.01	0.02	0.15
9	Wintergreen	28.7	-30.10	-23	16.5	0.02	0.00	0.03	0.21
10	Wintergreen	0.0	-28.41	-46	19.8	0.01	0.01	0.02	0.11
11	Wintergreen	93.5	-34.16	-128	4.4	0.06	0.02	0.00	0.00
12	Wintergreen	100.0	-34.39	-129	1.0	0.10	0.02	0.00	0.00
13	Wintergreen	14,6	-29.17	-17	18.9	0.02	0.00	0.03	0.24
14	Wintergreen	26.8	-30.26	-30	17.1	0.02	0.00	0.02	0.11
15	Wintergreen	27.9	-30.18	-34	17.0	0.02	0.00	0.02	0.12
16	Wintergreen	100.0	-35.63	-137	2.8	0.08	0.02	0.00	0.00
17	Wintergreen	104.7	-28.29	-78	20.0	0.01	0.00	0.00	0.00
17S	Salicylic Acid	116.5	-	-	-	-	-	-	-
18	Wintergreen	100.0	-35.84	-135	3.0	0.12	0.02	0.00	0.00
19	Wintergreen	100.0	-34.65	-135	1.2	0.15	0.02	0.00	0.00
20	Methyl Salicylate	0.0	-28.33	-71	21.7	0.01	0.00	0.02	0.19
Pairwise correlation (Pearson correlation coefficient *r*)			-0.99	-0.90	-0.99	0.89	0.93	-0.92	-0.90

LSC: Liquid Scintillation Counting

EA-C/P-IRMS: Elemental Analysis – Combustion / Pyrolysis – Isotope Ratio Mass Spectrometry

1.1.1. Correlation study

A linear correlative study (pairwise correlation) was conducted to determine which variables from the 3 isotopes and the 73 secondary metabolites that constituted the wintergreen essential oils were the best correlated with the percentage of biosourced carbon. Sample 17 was excluded from this statistical test.

Results determined for the 20 samples analyzed in LSC show that $\delta^{18}O$ and $\delta^{13}C$ are the isotope values that best described the naturalness of the samples with a Pearson correlation coefficient greater than 0.95 in absolute value. Although $\delta^{2}H$ is also strongly correlated with ^{14}C activity, its higher measurement uncertainty and its more significant isotopic dispersion in the various synthetic samples resulted in a lower linear correlation coefficient. Fig. 5. shows the correlation between $\delta^{18}O$ and $\delta^{13}C$ and the biosourced carbon contents.

The metabolite study confirmed that the presence of synthetic impurities is correlated with the naturalness of the samples. Methyl 4-hydroxybenzoate and dimethyl 4-hydroxyisophthalate both had a Person correlation coefficient higher than 0.90 in absolute value. Furthermore, some alternative metabolites were directly correlated with the percentage of biosourced carbon (with $r>|0.85|$). A small amount of vistispirane (<0.20%) and ethyl salicylate (<0.06%) could potentially indicate the addition of a synthetic material. However, the concentration of these compounds can be extremely variable from one wintergreen to another, as geographical origin and variety affect the composition of essential oils.

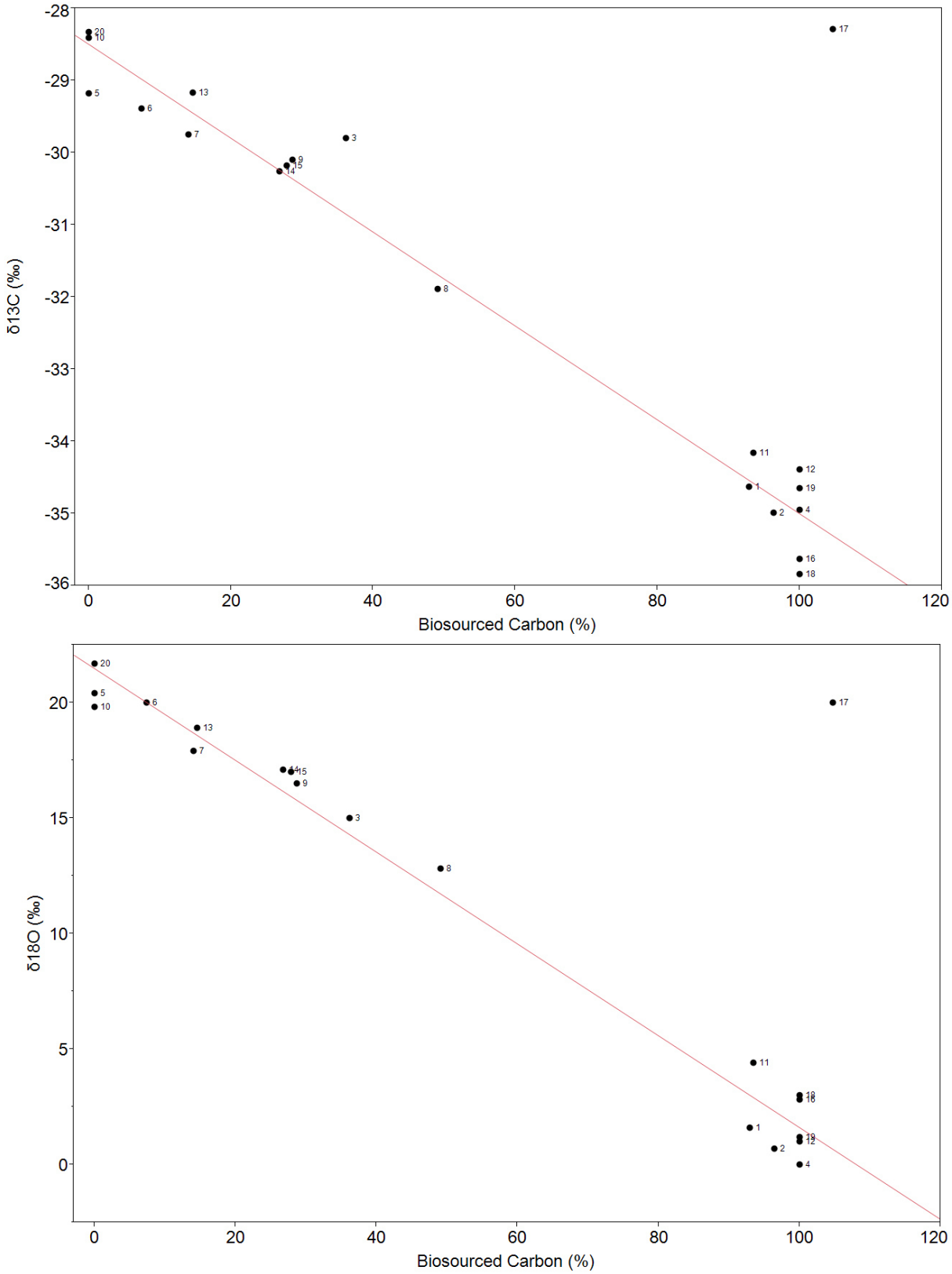

Figure 5. *Bivariate fit of $\delta^{13}C$ (‰) and $\delta^{18}O$ (‰) by % of biosourced carbon measured on 19 wintergreen essential oils and one commercial synthetic methyl salicylate (Sample 20). In red: Linear regression fit of the data (excluding sample 17). Determination coefficient: r^2=0.97 and r^2=0.98.*

3.3.2. ^{14}C-labeled-compound addition

Sample 17 demonstrated a natural radiocarbon activity, despite being clearly adulterated, as its $\delta^{13}C$, ^{2}H and ^{18}O values were in the synthetic area. One hypothesis is that this sample had been adulterated with a ^{14}C marked compound. ^{14}C labeled phenol, methanol, salicylic acid, and methyl salicylate are available on the market. The methyl salicylate molecule is composed of 8 carbons. Each of these carbons can potentially be ^{14}C labeled. To demonstrate this adulteration, a saponification was conducted to remove the methyl and produce salicylic acid. This chemical reaction was carried out on samples 1 and 17 with the addition of sodium hydroxide and methanol by heating under reflux. After methanol removal and acidification, a white powder of salicylic acid was obtained. Radiocarbon activity was assessed on both salicylic acids and compared with the parent wintergreen.

The ex-sample 1 (1S) salicylic acid ^{14}C activity was not altered by the saponification, whereas ex-sample 17 (17S) salicylic acid exhibited a biosourced carbon percentage greater than 115%. These observations indicate that the removed carbon did not have any radioactive activity and that the produced salicylic acid had a higher radioactive activity than any natural material. Therefore, this wintergreen essential oil was indeed adulterated with the addition of synthetic methyl salicylate and some ^{14}C-labeled methyl salicylate. A 1 mL solution of 250 microcurie 6C-ring labeled methyl salicylate can mimic approximately 40500 kg of 100% synthetic methyl salicylate to appear as a 100 % biosourced content, despite its synthetic origin. Use of ^{14}C-labeled salicylic acid or methanol is also a feasible approach to adulterating synthetic methyl salicylate during the Kolbe Schmitt reaction. This fraud could not be detected with radiocarbon activity measurement methods, and only the use of IRMS highlighted this adulteration possibility.

3.4. Conclusion

The multianalytical approach presented in this study demonstrated several methods to clearly authenticate the naturalness of wintergreen essential oils.

An abnormally low concentration of some secondary metabolites in wintergreen, such as ethyl salicylate or vitispirane, can indicate that adulteration has occurred. However, this marker is only an indicator, as compositions differ between each species. The detection of resultant impurities from the synthesis of methyl salicylate (methyl 4-hydroxybenzoate, dimethyl 4-hydroxyisophthalate, and dimethyl 2-hydroxyisophthalate) is another indicator of fraud. The presence of these impurities is proof of the addition of synthetic material.

Multielement isotopic analysis with IRMS can also assess the compliance of wintergreen. The advantages of this method are its rapidity and its inexpensive price. The minimal values of acceptability of the 3 isotope deltas were determined by applying an empirical law (mean + 3*SD) considering that the values of the 41 authentic essential oils followed a unimodal normal distribution. The results of these calculations showed that 99.87% of the authentic essential oils exhibited $\delta^{13}C$, $\delta^{2}H$ and $\delta^{18}O$ isotopic values lower than -32.87‰, -101‰, and 5.9‰, respectively. Wintergreen essential oils exhibiting a higher value for at least one stable isotope are likely to have been adulterated with synthetic material. However, natural isotopic variation is important, because the authenticity area of one isotope can be obscured by slightly adulterated essential oils. Consequently, multielement isotopic analysis is needed to ensure the naturalness of the product.

The ^{14}C radioactive activity is a powerful tool to precisely assess the authenticity of natural products, but this study also demonstrated the complementarity of using both stable and radioactive isotope techniques to authenticate wintergreen essential oils, as ^{14}C assessment cannot detect ^{14}C-labeled product additions, which have been only detected with IRMS.

Acknowledgments

This work is provided in partial fulfillment of the PhD requirements for Aurélien Cuchet who has received a grant from the Association Nationale de la Recherche et de la Technologie (ANRT, Paris, France). The research was supported by a contract between Albert Vieille SAS and ISA (Institut des Sciences Analytiques, Villeurbanne, France). The authors are grateful to Young Living for providing authentic samples.

ÉTUDE DE L'ABSOLUE DE FÈVES TONKA

1. Introduction

La fève tonka est le fruit issu de l'arbre *Dipteryx odorata*. Cette fève est originaire d'Amérique du Sud : le Brésil est le principal producteur de fèves tonka, avec le Vénézuela. De ces dernières est extrait, à l'aide de solvants, un résinoïde de fève tonka. Cette matrice n'est en effet pas propice à l'entraînement à la vapeur. Ce résinoïde permet ensuite de produire l'absolue de fève tonka par extraction à l'éthanol afin d'éliminer les composés insolubles. Cet extrait est principalement utilisé dans la parfumerie (Häser et al., 2006). La fève tonka est également utilisée pour son activité acaricide (Gleye et al., 2003) et ses autres propriétés (Abernethy, 1969).

L'absolue de fève tonka est principalement composée de coumarine ($C_9H_6O_2$), qui représente environ 90% de la partie volatile, déterminée par l'analyse de son profil chromatographique en phase gazeuse GC. La dihydrocoumarine est le second constituant majoritaire de cet extrait. Cependant, les absolues, à la différence des huiles essentielles qui sont obtenues généralement par entraînement à la vapeur, présentent aussi une partie non volatile qui n'est pas négligeable. La coumarine est présente à environ 60% de la teneur de l'absolue de fève tonka totale, déterminée par dosage par chromatographie en phase liquide à haute performance HPLC (Ehlers et al., 1996, 1995). Cette composition est cependant extrêmement dépendante du mélange de solvant employé pendant le procédé d'extraction (Bajer et al., 2018; Wörner and Schreier, 1991). La fraction volatile est principalement constituée de composés aromatiques, essentiellement des acides et esters phenylpropanoïques (acide mélilotique, acides ortho et para-coumarique, mélilotate de méthyle, et mélilotate d'éthyle).

La principale adultération possible sur le marché est l'ajout de coumarine de synthèse. En effet, la coumarine est une molécule relativement simple à produire en laboratoire avec des synthèses comportant peu d'étapes. On peut notamment citer la réaction de Perkin (Réaction d'un salicylaldehyde avec de l'anhydride acétique) (Aslam et al., 2010; Vilar et al., 2006), la condensation de Knoevanagel (González-González et al., 2016; Phadtare and Shankarling, 2012; Shakil et al., 2019; Vekariya and Patel, 2014) (Réaction de l'acide malonique sur l'aldéhyde salicylique, suivi d'une décarboxylation), la condensation de Pechmann (Bouasla et al., 2017; Jadhav et al., 2019; Khaligh, 2012; Manhas et al., 2006), l'acylation de Kostanecki (Narale, 2018), réactions de Wittig (Belavagi et al., 2014) ou encore des réactions impliquant des réarrangements de Claisen. Il est à noter que de nombreuses méthodologies sont disponibles dans la littérature récente et les protocoles en constante amélioration.

Plusieurs méthodologies peuvent être envisagées, pour mettre en évidence des ajouts de synthèse, dans l'absolue de fèves tonka. L'une des méthodes les plus répandues, l'analyse de l'activité du radiocarbone, n'est ici pas envisageable, car les solvants résiduels, utilisés pour préparer le résinoïde et l'absolue, peuvent être constitués de carbones fossiles, auquel cas l'analyse serait biaisée. La coumarine ne présentant aucun centre stéréochimique, l'analyse énantiomérique n'est pas réalisable non plus. La détection de précurseurs de synthèse de la coumarine est possible. Dans le cas de l'absolue de fève Tonka, l'identification de précurseurs pourrait être envisagé, par GC ou HPLC, mais cette technique ne semble pas adaptée à la composition très variable des extraits selon les procédés employés.

L'analyse isotopique par spectrométrie de masse des rapports isotopiques (IRMS) de la coumarine est une option intéressante dans le cas de l'absolue de fève tonka. Différentes valeurs isotopiques sont retrouvées dans la littérature. Les valeurs $\delta^{18}O$ des coumarines naturelles mesurées par Brenna et al. (2005) sont plus hautes (entre 20,3 et 23,6‰) que les valeurs $\delta^{18}O$ des coumarines de synthèse (12,6‰) (Brenna et al., 2005). Une valeur similaire de la coumarine de synthèse (15,8‰) est donnée dans une autre étude (Sieper et al., 2010). Enfin, la valeur $\delta^{13}C$ d'une coumarine d'origine pétrochimique a été mesurée autour de -37,6‰ (Sakamoto et al., 2002). Des valeurs de références, mesurées par SNIF-RMN, sont données en deutérium, sur la coumarine d'origine naturelle et de synthèse (Brenna et al., 2005; Schmidt et al., 2006).

L'objectif de l'étude présentée est le développement d'une méthode analytique, par IRMS, permettant d'authentifier la naturalité de la coumarine, issue de l'absolue de fève tonka. Différents procédés d'extraction ont été réalisés, pour observer les différences de composition, et mettre en évidence d'éventuels effets isotopiques, qui pourraient influer sur la valeur isotopique mesurée finale de la coumarine.

2. Matériels et méthodes

2.1. Echantillons

Huit lots de fèves tonka *Dipteryx odorata*, provenant du Brésil et du Venezuela, sont étudiés. Le fait de disposer et de traiter directement des matières premières non extraites permet d'éviter le risque d'adultération et de garantir l'authenticité des échantillons analysés. Six échantillons d'absolues de fève tonka, ainsi que 2 arômes de tonka, provenant du Brésil et du Vénézuela ont été fourni par Albert Vieille. Enfin, une préparation commerciale originaire du Brésil est également considérée dans cette étude.

Des échantillons d'absolues de foin, de mélilot *Melilotus officinalis*, de liatrix *Liatris odoratissima*, de lavandin grosso *Lavandula hybrida var. grosso*, ainsi que des huiles essentielles de cannelle *Cinnamomum cassia* L., ont additionnellement été analysés pour cette étude, car ce sont des sources potentielles de coumarine.

2.2. Préparation des échantillons

Le protocole comprend 2 étapes. Les huit lots de fèves de tonka sont, dans un premier temps, broyés finement, et traités pour extraire le résinoïde et l'absolue. Par la suite, un second procédé est réalisé pour extraire la coumarine, afin de l'analyser par EA-C/P-IRMS.

Pour chaque échantillon, 200 grammes de fève tonka sont broyés. Les extractions au Soxhlet sont réalisées sur 20 grammes, pendant 24 heures, avec différentes compositions de solvants, choisis selon la liste des solvants utilisés par l'Union Européenne 2010/59/UE (*Safe food processing: common standards for extraction solvents*, 2009) :

- 100% cyclohexane (CH)
- 80% CH et 20% d'acétate de méthyle (AM),
- 20% d'acétate d'éthyle (AE),
- 20% de butanone-2 (B2),
- 20% d'isopropanol (IPA),
- 80% CH et 20% d'éthanol (ET).

Après évaporation du solvant, on obtient le résinoïde. Il est ensuite transformé en absolue, par extraction à l'éthanol à 96°C, et glaçage des cires (réfrigérateur toute la nuit). Les cires sont soumises à une deuxième extraction : après filtration à froid, les fractions d'extraction sont rassemblées, le solvant est évaporé et on obtient l'absolue. Les résidus (résinoïde et absolue) sont analysés en HPLC-DAD. Une prise d'essai comprise entre 25 et 35 mg est dissoute dans 10 ml d'un mélange THF-eau (80/20).

La coumarine est extraite des absolues de fèves tonka par recristallisation à 0°C dans de l'hexane.

2.3. Coumarines de synthèse

Différentes coumarines d'origine de synthèse sont également étudiées, comprenant 4 coumarines commerciales (TCI, Sigma Aldrich, et Acros), et 2 coumarines obtenues par synthèse au laboratoire (via salicylaldéhyde et acide malonique).

2.4. Analyse des échantillons

2.4.1. Analyse des extraits par HPLC-DAD et HPLC-MS

Les résinoïdes et absolues de fèves Tonka ont été analysées par HPLC sur un instrument Agilent technologies series 1100 composé d'une pompe quaternaire G1311A, d'un passeur d'échantillon G1313A, d'un détecteur à barrette de diodes DAD G1315A, d'un compartiment à colonne thermostaté G1316A, et d'un spectromètre de masse Infinity Lab LC/MSD.

Un volume d'injection de 5 µL d'échantillon est employé. La séparation est réalisée à 50°C, sur une colonne YMC-Pack Pro C18 de dimensions 150 mm * 3 mm, 3 µm de taille de particules, à un débit de 0,4 mL/min. La phase mobile est constituée d'un mélange 99,9% eau et 0,1% d'acide formique (Phase A) et 100% acétonitrile (Phase B). La programmation du gradient d'élution appliqué est le suivant : des conditions isocratiques sont tout d'abord appliquées de 0 à 3 min (85% A), suivi d'un premier gradient linéaire de 85% à 50% A de 3 à 20 min, et d'un second gradient linéaire de 50% à 0% A de 20 à 25 min, puis de conditions isocratiques (0% A) de 25 à 28 min, avant un dernier gradient linéaire de 0% à 85% A de 28 à 30 min, et des conditions isocratiques à 85% A de 30 à 35 min pour équilibrer la colonne.

La détection DAD est réalisée sur une gamme de longueurs d'ondes comprises entre 190 et 500 nm, avec une mesure tous les 2 nm, pour une largeur de pic de 0.2 s. Un mélange composé de coumarine, de dihydrocoumarine (DHC), et d'acides de références (acides benzoïque, salicylique, anisique, vanillique, cinnamique, 4-hydroxybenzoïque, ferulique, protocatechuique, dihydrocaffeïque, para coumarique, ortho coumarique, phénylpropanoïque, caffeique, trans 4-méthoxycinnamique, 3-(4-méthoxypehnyl) propanoïque, 3-(4-hydroxyphényl) propanoïque), est utilisé pour confirmer la présence et quantifier par dosage les différents constituants de l'absolue de fève tonka.

La détection MS est réalisée à l'aide d'une source d'ionisation par electrospray à pression atmosphérique (API-ES), en mode négatif $(M-H)^-$ et en mode positif $(M+H)^+$. La fragmentation est fixée à 70 eV, et le scan est réalisé de 100 à 1500 m/z.

2.4.2. Analyse isotopique des coumarines par EA-C/P-IRMS

Les coumarines extraites sont analysées par EA-C/P-IRMS pour déterminer les ratios isotopiques $\delta^{13}C$, $\delta^{2}H$, et $\delta^{18}O$. La méthode analytique est la même que celle décrite précédemment pour l'analyse du salicylate de méthyle dans l'huile essentielle de wintergreen.

3. Résultats et discussion

3.1. Etude de la composition des extraits par HPLC-DAD

3.1.1. Caractérisation

Les analyses HPLC ont permis de mettre en évidence la présence de nombreuses molécules dans les extraits d'absolue de fèves tonka. La coumarine, la dihydrocoumarine, l'acide mélilotique, l'acétate de mélilotate, le mélilotate d'éthyle, et l'acide ortho-coumarique, mentionnés par Ehlers (1995, 1996) ont été détectés dans la composition des extraits analysés. Nous avons également identifié de nombreux acides qui n'étaient pas mentionnés dans la littérature (acides benzoïque, salicylique, anisique, vanillique, cinnamique, 4-hydroxybenzoïque, férulique, protocatechuique, dihydrocaffeïque, para coumarique, phénylpropanoïque, caffeique, trans 4-méthoxycinnamique, 3-(4-méthoxypehnyl) propanoïque, 3-(4-hydroxyphényl) propanoïque).

La **Figure 30** résume toutes les structures que nous avons identifiées (UV, $(M-H)^-$ et $(M+H)^+$, et temps de retention). On observe des séries propénoïque, propanoïque, et l'acide aromatique correspondant pour des séries ortho et para hydroxylé, méthoxylé, ainsi que des combinaisons méta/para dihydroxylé ou hydroxy-méthoxylé, correspondant aux mécanismes de dégradation classique des phenylpropénoiques (hydrogénation, oxydation sur le carbone branché au cycle aromatique).

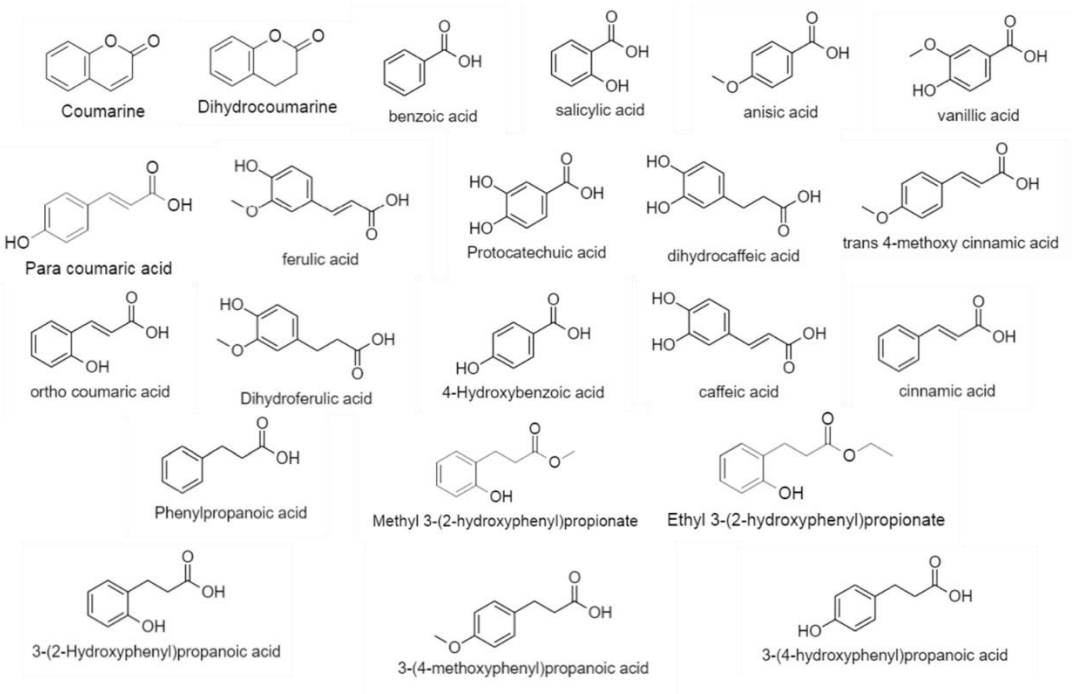

Figure 30 : Molécules identifiées dans les extraits de fèves tonka

3.1.2. Quantification

L'examen du **Tableau 5** indique un pourcentage massique de résinoïde entre 23 et 25% excepté avec l'emploi de l'éthanol ou le rendement atteint 36%. La transformation en absolu par élimination des cires à froid donne des valeurs de 4,6 à 6%, sauf pour l'éthanol qui atteint 15%.

Tableau 5 : Pourcentage de matière obtenue pour résinoïde et absolue

Composition du solvant d'extraction	Rendements obtenus	
	Résinoïde (%)	Absolue (%)
100% Cyclohexane	22,65	5,29
80% Cyclohexane - 20% Acétate d'éthyle	22,99	5,59
80% Cyclohexane - 20% IPA	24,92	6,07
80% Cyclohexane - 20% Butanone-2	24,11	5,24
80% Cyclohexane - 20% Ethanol	36,35	15,02
80% Cyclohexane - 20% Acétate de méthyle	23,25	4,60

L'examen du **Tableau 6** indique clairement que le solvant ou le mélange de solvants employés lors de l'extraction a une influence sur la composition finale de l'extrait. Pour les résinoïdes, Le cyclohexane donne la plus forte teneur en dihydrocoumarine (DHC), les autres solvants décomposent cette molécule pour donner de l'acide mélilotique, voire de l'éthyle mélilolate avec l'éthanol. La transformation en absolue diminue encore la teneur en DHC ainsi que celle de l'acide mélilotique au profil de son ester éthylique.

Tableau 6 : Composition en pourcentage des résinoïdes et absolues

Composition du solvant d'extraction	100% CH		80% CH - 20% AE		80% CH - 20% IPA		80% CH - 20% B2		80% CH - 20% AM		80% CH - ET	
	% dans résinoïde	% dans absolue	% dans résinoïde	% dans absolue	% dans résinoïde	% dans absolue	% dans résinoïde	% dans absolue	% dans résinoïde	% dans absolue	% dans résinoïde	% dans absolue
Coumarine	56,61	66,93	57,41	71,34	54,35	64,51	53,05	64,55	45,13	70,88	49,14	47,3
Dihydrocoumarine	7,64	5,75	4,15	3,52	1,34	1,12	3,03	2,84	3,85	3,8	0,58	0,35
Mélilolate d'éthyle	Non détecté	1,28	Non détecté	3,69	Non détecté	6,06	Non détecté	4,7	Non détecté	4,97	1,01	2,27
Acétate de melilolate	6,59	0,24	14,47	2,38	18,87	2,71	15,69	2,55	14,31	2,82	15,29	1,2
o-Coumarique	0,14	1,04	0,84	3,66	0,64	2,46	0,67	3,84	0,83	3,81	0,51	0,86
p-Coumarique	0,14	4,14	0,39	1,6	0,61	1,68	0,54	2,14	0,8	4,12	0,16	1,74
Somme %	71,13	76,38	77,26	86,18	75,81	78,55	72,98	80,63	64,93	90,41	66,7	53,72

De façon inattendue et inexplicable, les teneurs en acides ortho et para coumarique augmentent lors de la transformation en absolue. Le produit obtenu par extraction à 20% d'éthanol indique clairement qu'il contient d'autres substances que celles visées par cette analyse ciblée (uniquement 53.7% identifiés). Ehlers indiquait que l'obtention de l'acide mélilotique et des esters méthyliques et éthyliques était facile à partir de DHC, nous observons en effet une dégradation très rapide de la DHC en solution en acide mélilotique, même en employant des solvants « inertes » tels que l'acétonitrile ou le THF. Les données obtenues pour la DHC avec l'IPA et l'éthanol confirment cette observation. La mise en solution dans le méthanol ou l'éthanol conduit rapidement à l'ester correspondant.

L'observation de ces variations de compositions, qu'elles soient dues au solvant d'extraction employé (procédé industriel) et aux conditions analytiques (solvant de solubilisation) permet de conclure qu'une méthodologie analytique basée sur la quantification des principaux constituants de ces extraits (résinoïdes, absolues) ne permet pas un contrôle « normalisé » d'extraits de fèves Tonka.

La coumarine est le composé majoritaire et olfactivement le plus recherché dans ces extraits. La méthodologie de contrôle de qualité et d'authenticité doit se baser sur l'étude de la naturalité de cette molécule, notamment par les techniques utilisant les rapports d'isotopes stables du carbone ($^{13}C/^{12}C$), de l'hydrogène ($^{2}H/^{1}H$) et de l'oxygène ($^{18}O/^{16}O$). L'obtention de coumarine est aisée à partir des absolues par dissolution à chaud dans de l'hexane ou cyclohexane et recristallisation par refroidissement, la filtration sur verres frittés et le séchage conduisent à une coumarine de haute pureté (>98%).

3.2. Analyses des isotopes stables

La coumarine étant facilement extractible de l'absolue, l'analyse des valeurs isotopiques $\delta^{13}C$, $\delta^{2}H$, et $\delta^{18}O$ de la coumarine est réalisable directement par couplage EA-C/P-IRMS.

3.2.1. Etude de l'influence du solvant d'extraction de l'absolue

L'utilisation de différents solvants d'extraction peut éventuellement affecter la composition isotopique de la coumarine. Afin d'étudier cette influence isotopique, différentes extractions d'un même échantillon de fève tonka sont réalisées avec différents solvants d'extraction. La coumarine est ensuite extraite de l'absolue et analysée par EA-C/P-IRMS. Les données sont présentées dans le **Tableau 7.**

Les données montrent que le solvant d'extraction n'a aucun effet sur le résultat isotopique final. En effet, la variation isotopique observée sur les ratios isotopiques de chaque élément est négligeable ($\delta^{13}C$ de -32,83 ± 0,11‰, $\delta^{2}H$ de -102 ± 2‰, et $\delta^{18}O$ de 25,3 ± 0,5‰). Ainsi, le procédé n'affectant pas

la composition isotopique de la coumarine, il est possible de comparer les valeurs de différents échantillons résultant de process différents.

Tableau 7 : Influence du solvant d'extraction sur la composition isotopique

Référence échantillon	Origine	Forme	Solvant d'extraction	EA-C/P-IRMS - Coumarine		
				$\delta^{13}C$ (‰)	$\delta^{2}H$ (‰)	$\delta^{18}O$ (‰)
Tonka Fèves 1	Brésil	Fèves	100% Cyclohexane	-32,88	-100	25,1
			Acétate Ethyle	-32,94	-104	25,1
			Acétate Méthyle	-32,92	-101	25,9
			IPA	-32,85	-106	24,4
			Butan-2-one	-32,68	-103	25,4
			Ethanol	-32,72	-100	25,7

3.2.2. Tableau de données

Les ratios isotopiques du carbone, de l'hydrogène, et de l'oxygène, de la coumarine extraite, sont déterminés par EA-C/P-IRMS sur tous les échantillons (huit échantillons d'absolue obtenus en laboratoire à partir des fèves, six absolues, deux arômes, une préparation commerciale et six coumarines de synthèse). Les données obtenues sont présentées dans le **Tableau 8**.

Chaque coumarine a été extraite deux fois, afin de valider le protocole d'extraction de la coumarine, en vérifiant qu'aucun fractionnement isotopique n'était réalisé au moment de la préparation d'échantillon. Nous n'avons pas observé de différence isotopique en fonction du protocole d'extraction utilisé. Les analyses ont été effectuées en duplicata pour l'analyse de la valeur $\delta^{13}C$, et en triplicata pour l'analyse simultanée des valeurs $\delta^{2}H$ et $\delta^{18}O$.

Les valeurs isotopiques des ex-fèves sont comprises entre -32,88‰ et -31,38‰ pour $\delta^{13}C$, -113‰ et -84‰ pour $\delta^{2}H$ et 23,5‰ et 27,8‰ pour $\delta^{18}O$. Ces analyses permettent d'avoir des valeurs naturelles de références, les coumarines étant issues d'absolues réalisées en laboratoire. Les échantillons d'absolues non extraites en laboratoire présentent des valeurs similaires, comprises entre -32,67‰ et -31,80‰ pour le carbone, -84‰ et -103‰ pour l'hydrogène, et entre 23,0‰ et 28,0‰ pour l'oxygène. Les valeurs isotopiques du carbone correspondent à une origine d'une plante C3, ce qui est conforme au tonka. Les valeurs mesurées en $\delta^{18}O$ sont plus positives que la gamme de valeurs présentées par Brenna et al. (2005).

Tableau 8 : Données isotopiques $\delta^{13}C$, $\delta^{2}H$, et $\delta^{18}O$ (‰) des absolues de fèves tonka.

Référence échantillon	Origine	Forme	EA-C/P-IRMS - Coumarine		
			$\delta^{13}C$ (‰)	$\delta^{2}H$ (‰)	$\delta^{18}O$ (‰)
Tonka Fèves 1	Brésil	Ex -Fèves	-32,88	-100	25,1
Tonka Fèves 2	Brésil	Ex-Fèves	-32,22	-113	23,5
Tonka Fèves 3	Brésil	Ex-Fèves	-32,10	-85	25,2
Tonka Fèves 4	Brésil	Ex-Fèves	-32,57	-112	25,8
Tonka Fèves 5	Brésil	Ex-Fèves	-32,69	-84	26,9
Tonka Fèves 6	Brésil	Ex-Fèves	-32,13	-108	24,7
Tonka Fèves 7	Brésil	Ex-Fèves	-32,28	-107	27,8
Tonka Fèves 8	Vénézuela	Ex-Fèves	-31,38	-94	25,2
Tonka Abs 1	Brésil	Absolue	-32,67	-98	27,0
Tonka Abs 2	Brésil	Absolue	-32,30	-84	28,0
Tonka Abs 3	Brésil	Absolue	-32,31	-100	26,2
Tonka Abs 4	Brésil	Absolue	-32,27	-103	27,3
Tonka Abs 5	Brésil	Absolue	-31,80	-94	23,0
Tonka Abs 6	Brésil	Absolue	-32,60	-91	28,0
Tonka Arôme 1	Vénézuela	Arôme Tonka (PEG)	-31,50	-83	22,4
Tonka Arôme 2	Inconnue	Arôme Tonka (PEG)	-32,32	-79	23,5
Tonka HE 1	Brésil	Préparation commerciale	-35,09	-127	20,9
Coumarine Synthèse 1	Synthèse via salicylaldehyde	Coumarine	-32,86	109	21,2
Coumarine Synthèse 2	Synthèse via acide malonique	Coumarine	-31,99	-58	23,0
Coumarine Synthèse 3	Synthèse	Coumarine	-32,17	44	17,8
Coumarine Synthèse 4	Synthèse	Coumarine	-31,00	48	17,1
Coumarine Synthèse 5	Synthèse	Coumarine	-29,18	-26	10,5
Coumarine Synthèse 6	Synthèse	Coumarine	-29,28	-4	19,8

En ce qui concerne les coumarines de synthèse, les valeurs $\delta^{13}C$ sont comprises entre -32,86‰ et -29,18‰. Ces valeurs sont beaucoup plus positives comparées à celle présentée dans la littérature (-37,6‰ (Sakamoto et al., 2002), procédé de synthèse non décrit). On peut observer que certains échantillons de coumarine de synthèse présentent des valeurs de $\delta^{13}C$ supérieures aux valeurs observées sur les coumarines naturelles. Cependant, certains échantillons de synthèse ont des valeurs similaires. La mesure du carbone ne permet pas d'indiquer une origine pétrochimique, car $\delta^{13}C$ semble différer selon les procédés de synthèse et ne permet pas toujours de conclure. Le même constat est réalisé sur les valeurs $\delta^{18}O$, comprises entre 10,5‰ et 23,0‰. Les coumarines de synthèse commerciales ont des valeurs plus basses que les échantillons naturels, qui correspondent aux

données de la littérature (15.8‰ d'après Brenna et al., 2005), mais cela n'est pas le cas des coumarines synthétisées en laboratoire.

Le ratio isotopique de l'hydrogène est beaucoup plus intéressant pour l'authentification de la naturalité de la coumarine. En effet, les valeurs δ^2H des origines pétrochimiques sont comprises entre -58 et 109‰. Même si des différences significatives sont observées entre les échantillons d'origine de synthèse, les coumarines de synthèse sont plus enrichies en deutérium que celles d'origine naturelles (entre -113‰ et -84‰). Ainsi, les analyses isotopiques permettent la mise en évidence d'adultération de synthèse de la coumarine, surtout sur les isotopes δ^2H et $\delta^{18}O$, où des différences sont observées entre synthétiques et naturels.

En définitive, les échantillons naturels permettent d'établir une gamme de naturalité comprise entre -32,88‰ et -31,38‰ pour $\delta^{13}C$, entre -113‰ et -84‰ pour δ^2H, et entre 23,0‰ et 28,0‰ pour $\delta^{18}O$.

3.2.3. Adultération d'échantillons

Afin de visualiser les fraudes, des ajouts de coumarine de synthèse (Coumarine synthèse n°3) sont réalisés dans deux absolues de fèves tonka naturelles (Tonka Fèves 6 et 7). Ces valeurs sont présentées dans le **Tableau 9**.

Tableau 9 : Etude d'ajouts de coumarine de synthèse

Référence échantillon	Origine	Ajout	EA-C/P-IRMS - Coumarine		
			$\delta^{13}C$ (‰)	δ^2H (‰)	$\delta^{18}O$ (‰)
Tonka Fèves 6	Brésil	100% Naturelle	-32,13	-108	24,7
	Brésil	20% Synthèse	-31,99	-72	22,8
	Brésil	10% Synthèse	-32,11	-97	24,5
Tonka Fèves 7	Brésil	100% Naturelle	-32,28	-107	27,8
	Brésil	55% Synthèse	-31,55	-13	22,2
	Brésil	51% Synthèse	-31,77	-28	23,2

Ces ajouts sont visualisables sur les 3 isotopes, mais c'est principalement sur le ratio isotopique δ^2H que la fraude est détectable. L'absolue adultérée à 20% présente un ratio isotopique δ^2H de -72‰, ce qui est en dehors de la gamme de naturalité précédemment déterminée grâce aux valeurs de référence (-84 et -113‰). En revanche, l'absolue adultérée à 10% est comprise dans la gamme de naturalité, et son adultération n'est pas identifiable. En ce qui concerne les deux autres isotopes, les valeurs $\delta^{13}C$ ne varient pas suffisamment pour permettre d'établir un quelconque diagnostic, mais les valeurs $\delta^{18}O$

permettent parfois de détecter un ajout. Cela dépend cependant de la composition isotopique initiale de l'échantillon adultérée. En effet, une valeur très élevée, comme c'est le cas pour l'échantillon « Tonka Fèves 7 », conduit à ne pas pouvoir identifier une fraude, même à 50% d'adultération, en travaillant uniquement sur les isotopes de l'oxygène.

La **Figure 31** permet de visualiser le cluster des échantillons naturels, et celui des coumarines de synthèse. Les adultérations sont bien identifiables, mis à part l'ajout à 10% qui se confond avec les coumarines d'origine naturelle.

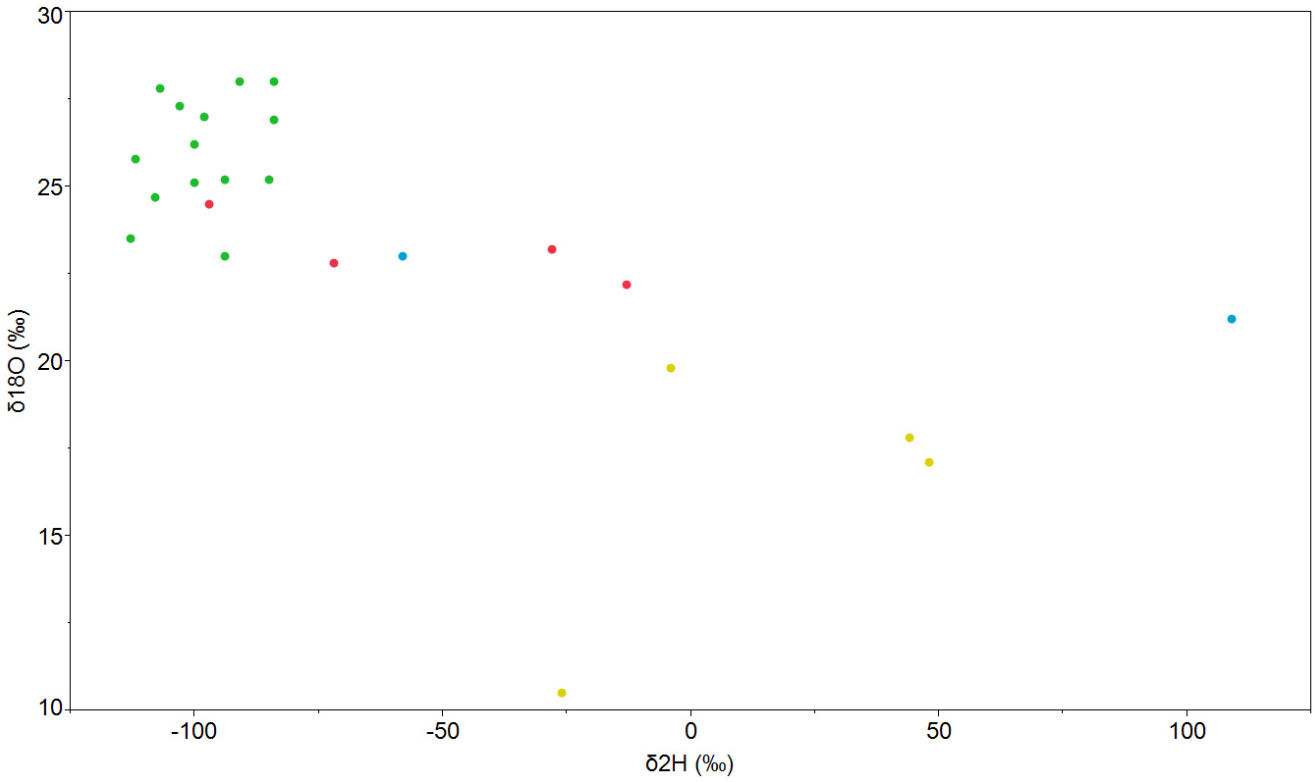

Figure 31 : Valeurs isotopiques $\delta^{18}O$ en fonction de $\delta^{2}H$, de coumarines de différentes origines : coumarines préparées en laboratoire (en bleu), coumarines de synthèse commerciales (en jaune), coumarines naturelles extraites d'absolues de tonka (en vert), et coumarines naturelles adultérées avec de la coumarine de synthèse (en rouge).

En conclusion, l'analyse isotopique est pertinente pour l'analyse de naturalité, mais c'est idéalement le ratio δ^2H qui permet la discrimination naturel / synthèse. La variation isotopique naturelle en oxygène est trop importante pour les extraits de fèves tonka, et la composition isotopique en carbone est trop similaire pour pouvoir être utilisées pour conclure sur la naturalité d'un échantillon d'absolue de tonka.

3.2.4. Coumarines issues d'autres origines botaniques

Enfin, pour approfondir l'étude, des coumarines issues d'autres origines botaniques sont étudiées en IRMS. La fève tonka est la matière végétale la plus riche en coumarine, mais le foin, le liatrix, ou encore pailles de lavande et lavandins présentent également une concentration non négligeable de coumarine dans leurs compositions, ainsi que les cannelles cassia.

Tableau 10 : Etude de coumarines d'origines végétales variées.

Référence échantillon	Origine	Plante	EA-C/P-IRMS - Coumarine		
			$\delta^{13}C$ (‰)	δ^2H (‰)	$\delta^{18}O$ (‰)
Mélilot Absolue	France	Mélilot	-30,04	-176	17,9
Cassia HE 1	Chine	Cannelle cassia	-32,59	-120	12,7
Cassia HE 2	Chine	Cannelle cassia	-32,24	-92	16,2
Cassia HE 3	Chine	Cannelle cassia	-30,88	-97	16,4
Liatrix Absolue	France	Liatrix	-33,26	-60	22,8
Lavandin Absolue	France	Lavandin	-31,12	-167	8,8
Foin Absolue	France	Foin	-33,05	-187	24,4

Le **Tableau 10** détaille les valeurs isotopiques obtenues sur les coumarines extraites. Il est intéressant de noter que tous les échantillons, à l'exception du liatrix, ont des valeurs inférieures à -92‰ sur le δ^2H. L'étude de cet isotope serait donc pertinente pour authentifier la naturalité de ces différentes matières. En revanche, les ratios $\delta^{13}C$ et $\delta^{18}O$ ne semblent pas pertinents, car leurs valeurs se confondent avec celles d'origine pétrochimique. Etant donné qu'un très faible nombre d'échantillons a été étudié sur ces matrices d'origine botanique différente, il est cependant impossible d'émettre la moindre conclusion. A noter que, mis à part le liatrix et le foin, les valeurs $\delta^{18}O$ des autres matières végétales sont significativement plus basses que les fèves tonka. Cela pourrait éventuellement être intéressant en cas de contrôle de pureté des absolues de tonka, si l'échantillon était adultéré avec une coumarine issue d'une autre origine botanique.

CONCLUSION

Les deux études présentées ont permis de mettre en évidence l'utilité de l'analyse des isotopes stables pour authentifier la naturalité de ces matières premières. Les différences de production des molécules d'origines naturelles, par les voies métaboliques ; et synthétiques, par synthèse de produits pétrochimiques, conduisent à des différences isotopiques liées aux environnements différents, ce qui induit des fractionnements isotopiques différents.

Les cas présentés dans ce chapitre étaient centrés sur des matières premières peu complexes, constituées très majoritairement d'une unique molécule (le salicylate de méthyle dans le cas de l'huile essentielle de wintergreen, et la coumarine dans le cas de l'absolue de fève tonka), ce qui permettait de travailler avec une instrumentation EA-C/P-IRMS pour analyser l'échantillon dans sa globalité. Cependant, une majorité d'huiles essentielles ont des profils moléculaires plus complexes. L'analyse ciblée est alors beaucoup plus pertinente.

CHAPITRE 3

ÉTUDE DES HUILES ESSENTIELLES CONSTITUÉES DE COMPOSÉS ORGANOSULFURÉS PAR APPROCHE MULTI ISOTOPES GLOBALE ET MULTI COMPOSÉS

Ce chapitre a fait l'objet d'une publication :

Article 2

Cuchet, A., Anchisi, A., Telouk, P., Yao, Y., Schiets, F., Fourel, F., Clément, Y., Lantéri, P., Carénini, E., Jame, P., Casabianca, H., 2021. Multi-element (^{13}C, ^{2}H and ^{34}S) bulk and compound-specific stable isotope analysis for authentication of Allium species essential oils. Food Control 126, 108086. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108086

INTRODUCTION

1. Contexte

L'authentification est plus difficile pour les huiles essentielles de matrices plus complexes, comportant un plus grand nombre de métabolites, dans des proportions relatives importantes.

C'est par exemple le cas des huiles essentielles de la famille des alliacées. Cette famille de plantes regroupe notamment le poireau *Allium porrum*, la ciboulette *Allium schoenoprasum*, l'oignon *Allium cepa*, l'échalote *Allium ascalonicum*, ainsi que l'ail *Allium sativum*. Ces huiles essentielles sont constituées principalement de composés organosulfurés (Mnayer et al., 2014). Ces produits, de très faible rendement d'extraction, peuvent être la cible d'ajouts de synthèses sur plusieurs molécules (Gershon et al., 2019). De plus, la composition extrêmement similaire de ces matrices rend difficile l'authentification de leur pureté. L'utilisation de l'EA-C/P-IRMS est limitée dans ce cas-là, car la mesure isotopique globale n'est pas suffisamment précise pour être en mesure d'être interprétée. L'utilisation de la GC-C/P-IRMS est une solution intéressante, il est en effet nécessaire de contrôler les isotopes stables de plusieurs molécules, pour s'assurer de la naturalité et de la pureté.

Ces matrices particulières étant riches en organosulfures, il est possible d'analyser les ratios isotopiques du carbone, de l'hydrogène, ainsi que du soufre. Ce dernier n'est habituellement pas utilisé pour authentifier les huiles essentielles, car les molécules terpéniques et phénylpropanoïques n'ont pas de soufres dans leurs compositions. La détermination du $\delta^{34}S$ est principalement réalisée, en authentification, dans des études de traçabilité géographiques, par exemple dans les matières végétales d'oignons (Park et al., 2019), ou d'ail (Mahne Opatić et al., 2017), car le soufre est un élément traceur intéressant, car dépendant des conditions géographiques et anthropologiques. Des approches d'authentification de la naturalité ont également été réalisées avec la mesure du $\delta^{34}S$, en complément d'autres éléments, par exemple pour identifier des ajouts de synthèse d'isothiocyanate d'allyle dans la moutarde (G. S. Remaud et al., 1997).

Cependant, à l'heure actuelle, la mesure CSIA est impossible par GC-C-IRMS pour le soufre. Le grand nombre d'oxydation du soufre rend l'interface de combustion très difficile à régler pour l'analyse d'organosulfures (Amrani et al., 2009). Néanmoins, de précédentes études ont montré que les isotopes du soufre pouvaient, dans des matrices issues de la pétrochimie, être déterminés par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse à multi-collection à plasma couplé à induction (GC/MC-ICP-MS) (Amrani et al., 2009; Hanousek et al., 2016; Said-Ahmad et al., 2017). Cela n'a cependant jamais été appliqué aux huiles essentielles.

2. L'analyse ciblée du $\delta^{34}S$ par GC/MC-ICP-MS

Plusieurs études précédentes ont été réalisées pour développer ce type de couplage permettant d'accéder aux données $\delta^{34}S$ de molécules organiques soufrées au sein de mélanges complexes (Kümmel et al., 2020; Said-Ahmad et al., 2017). Cette instrumentation se compose d'une chromatographie gazeuse reliée par une interface (ligne de transfert) à un spectromètre de masse à multi-collection à plasma couplé à induction (**Figure 32**).

La colonne capillaire chromatographique traverse la ligne de transfert, et est connectée à l'entrée de l'injecteur ICP, à la limite de la torche, afin de permettre au gaz vecteur de la colonne GC de se mélanger avec le flux d'argon dans le tube d'injection de la torche. Ce flux d'argon permet d'optimiser l'ionisation, dans la torche à plasma, des analytes présents dans l'hélium, en accélérant le débit. Ce flux d'argon est préchauffé dans la GC, et entoure le capillaire contenant l'hélium dans la ligne de transfert, pour permettre en sortie de capillaire, d'homogénéiser le mélange des gaz. La ligne de transfert est chauffée à 280°C pour éviter d'éventuelles condensations des molécules en sortie de GC.

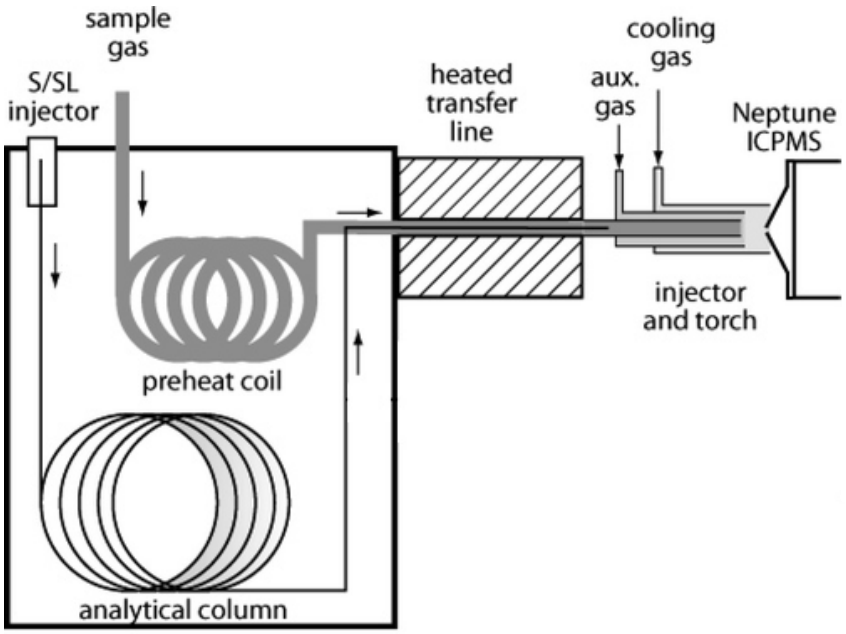

Figure 32 : Couplage GC/MC-ICP-MS, adapté de Amrani et al. (2009)

Les différents composés, précédemment mélangés avec l'argon, sont transportés dans le MC-ICP-MS. Cet instrument est composé de trois principaux éléments : une source d'ion ICP, un analyseur de masse, et un système de multi-collection (**Figure 33**).

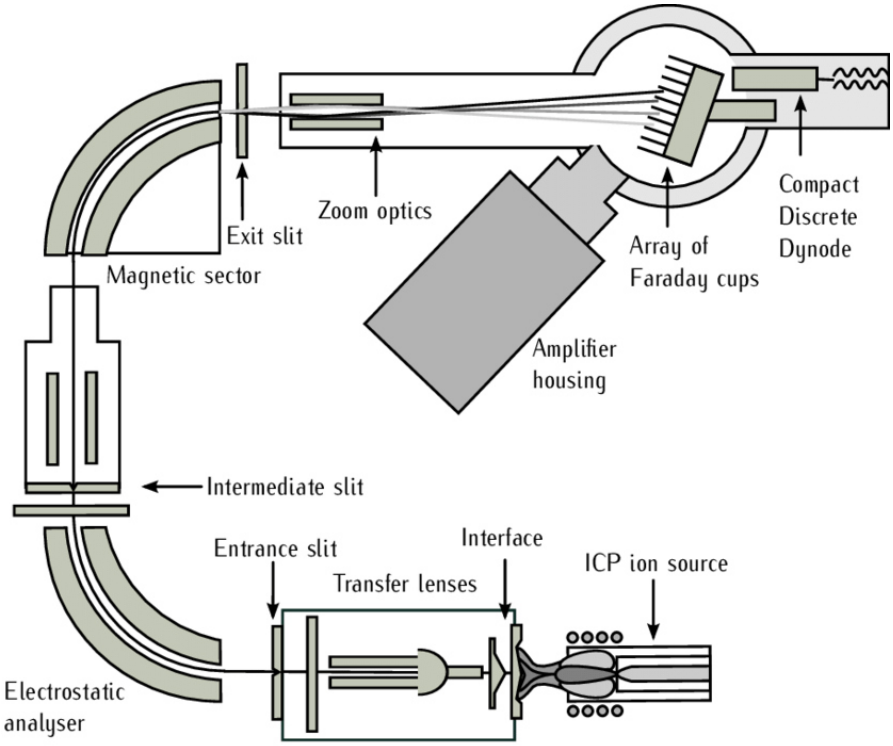

Figure 33 : MC-ICP-MS Neptune Plus (Thermo Scientific). Schéma adapté de Bazzano (2016)

Les composés sont tout d'abord introduits dans la source d'ion ICP, composée d'une torche à plasma par induction, qui permet la production d'ions. Un faisceau d'ions est ensuite constitué dans l'analyseur, en focalisant et en filtrant les ions de même énergie. Ces ions sont ensuite séparés, grâce à un champ magnétique, en fonction de leur rapport m/z, et dirigés vers différents collecteurs (cages de Faraday). Chaque collecteur va mesurer simultanément l'intensité de chacun des ions sélectionnés (^{32}S et ^{34}S pour l'analyse du soufre). Ces mesures permettent ensuite de déterminer le ratio $^{34}S/^{32}S$.

Le système MC-ICP-MS permet d'obtenir des ratios isotopiques précis de nombreux éléments, y compris le soufre. Cependant, la torche, l'interface, les lentilles, ou encore le spectromètre de masse engendrent des problèmes d'interférences spectrales, entrainant une réponse non-uniforme sur la gamme de mesure des masses analysées (Graczyk et al., 2019; Yang and Sturgeon, 2003). Ce biais en masse est ainsi observé sur les mesures isotopiques finales. Cette déviation doit être traitée en réalisant une correction avec des standards de référence externe, préalablement calibrés en EA-C/P-IRMS versus le standard international de référence V-CDT pour la mesure du soufre, et en appliquant une formule corrective, la loi de Russell (Russell et al., 1978).

3. Le genre *Allium*

Les huiles essentielles de la famille des Alliacées ont la particularité d'être principalement composées de molécules organosulfurées (**Figure 34**). Ces molécules sont produites lors de l'extraction par oxydation de molécules contenues dans la matière première des alliacées : l'allicine et l'isoallicine (Ramirez et al., 2017). L'allicine est principalement présent dans l'ail, et sa dégradation permet la formation de dérivés organosulfurés de type allyle (Bocchini et al., 2001; Borlinghaus et al., 2014; Li et al., 2017). A l'inverse, les huiles essentielles de poireau, échalote, ciboulette, et oignon sont principalement constituées d'organosulfures de type alkyle, dues à la dégradation de l'isoallicine (Collin and Britton, 1993; Randle, 1997). Ces différents précurseurs expliquent les différences importantes de composition entre l'ail et les autres matrices cités.

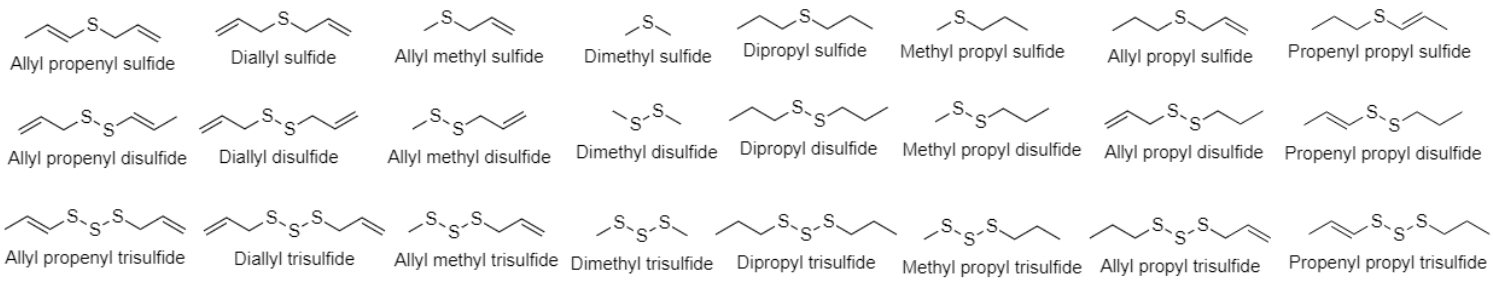

Figure 34 : Les principaux organosulfures présents dans les huiles essentielles des alliacées

Le soufre, contenu dans le sol, induit la valeur $\delta^{34}S$ des métabolites secondaires de la matière végétale, en étant absorbé sous la forme SO_4^{2-}, qui conduit, à travers une succession de plusieurs étapes de biosynthèses aux organosulfures présents dans la composition des huiles essentielles (**Figure 35**). Ces étapes de biosynthèses participent au fractionnement isotopique du soufre.

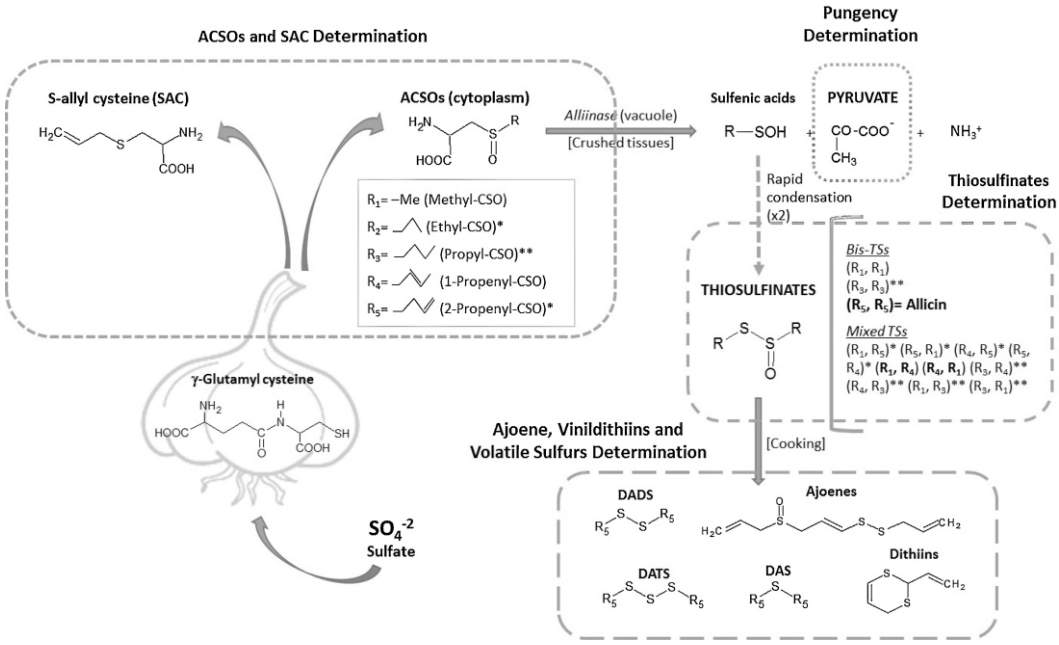

Figure 35: Biosynthèse des métabolites secondaires actifs aromatiques sulfurés des alliacées (Ramirez et al., 2017)

Ce chapitre se consacre à l'étude des alliacées de type poireau, oignon, échalote et ciboulette, riches en organosulfures alkylées, tels que le disulfure de dipropyle ou le disulfure de méthyle propyle, pour permettre d'authentifier la naturalité (détection d'ajout de molécules de synthèse) et la pureté (mélange entre différentes origines botaniques d'huiles essentielles). Cette étude a été publiée dans *Food Control*.

ÉTUDE DES HUILES ESSENTIELLES RICHES EN ORGANOSULFURES DE TYPE ALKYLE

La composition des huiles essentielles de poireau, échalote, ciboulette et oignon est décrite dans le **Tableau 11**. La caractérisation est donnée en pourcentage de l'aire totale de pics, et l'identification des composés est réalisée en utilisant les indices de rétention et les banques de données de spectrométrie de masse. Les analyses de chromatographie gazeuses de compositions relatives des échantillons de cette étude sont en accord avec les précédentes études de composition d'*Alliaciae* décrites dans la littérature (Abdel-Lateef et al., 2018; Ikram et al., 2018; Mnayer et al., 2014; Noleau et al., 1991; Schreyen et al., 1976).

En tout, 109 molécules sont identifiées dans les 5 espèces d'huiles essentielles. Ces analyses permettent de confirmer la présence de nombreux composés organosulfurés dans les matrices d'intérêts. Les huiles essentielles de poireau, échalote, oignon, et ciboulette présentent des profils similaires, avec la présence de composés identiques. Des différences intrinsèques sont cependant identifiables, la concentration relative des différents composés étant différente selon les composés. La majorité des composés organosulfurés sont des dérivés alkyles de type sulfure de propyle.

Le disulfure de dipropyle (DPDS) est le compose majoritaire des quatre espèces d'huiles essentielles d'intérêt (38,39 ± 3,55% dans le poireau, 22,46 ± 3,19% dans la ciboulette, 18,47 ± 2,31% dans l'échalote, 21,46 ± 4,26% dans l'oignon), et le trisulfure de dipropyle (DPTS) est également présent en grandes proportions (12,69 ± 1,54% dans le poireau, 12,71 ± 2,25% dans la ciboulette, 15,96 ± 3,48% dans l'échalote, 14,91 ± 2,96% dans l'oignon). Le tétrasulfure de dipropyle est aussi détecté dans des quantités significatives (1,41 ± 0,17% dans le poireau, 2,04 ± 0,17% dans la ciboulette, 2,49 ± 0,28% dans l'échalote, 2,49 ± 0,23% dans l'oignon), et le trisulfure de méthyle propyle (MPTS) présente des concentrations qui ne sont pas négligeables (4,90 ± 0,60% dans le poireau, 5,36 ± 0,38% dans la ciboulette, 8,66 ± 0,42% dans l'échalote, 6,85 ± 1,36% dans l'oignon). De même, le disulfure de propényle propyle est détecté, ainsi que son dérivé, le trisulfure de propényle propyle. Ce dernier métabolite n'a pas été identifié dans l'oignon, en accord avec l'étude de Mnayer et al. (2014), mais il a été détecté dans les huiles essentielles de poireau (2,10 ± 0,14%), de ciboulette (3,00 ± 0,27%) et d'échalote (4,63 ± 0,58%). Une autre différence significative est l'absence de trisulfure d'allyle propyle dans les huiles essentielles d'oignons, alors que ce composé est présent en faible concentration dans la ciboulette (0,52 ± 0,10%) et l'échalote (0,32 ± 0,04%), et dans des proportions plus abondantes dans le poireau. (3,31 ± 1,65%). Le tétrasulfure de propényle propyle a été détecté uniquement dans les

huiles essentielles de poireau (1,15 ± 0,19%). Les autres composés sont présents dans des concentrations inférieures à 1%.

Tableau 11 : Composition des huiles essentielles de poireau, d'oignon, d'échalotte, de ciboulette, et d'ail

Composés	KI HP1	% Aire totale des pics			
		HE Poireau (n=8)	HE Oignon (n=13)	HE Ciboulette (n=10)	HE Echalotte (n=11)
		Min-Max	Min-Max	Min-Max	Min-Max
Ethanol	480	0,00-0,17	0,03-4,81	0,03-0,08	0,02-1,69
Propanal	490	0,00-0,18	0,01-0,23	0,03-0,11	0,06-0,38
Ethane thiol	511	nd	0,00-0,03	0,00-0,02	0,00-0,06
Sulfure de dimethyle	530	nd	0,00-0,03	0,01-0,02	0,00-0,06
Sulfure de propylene	595	nd	0,00-0,29	0,00-0,05	0,00-0,46
Propane thiol	602	0,03-0,18	0,00-0,25	nd	nd
3-Methylbutanal	629	0,01-0,16	0,00-0,05	0,02-0,03	0,00-0,07
2-Methylbutanal	639	0,01-0,02	0,00-0,04	0,01-0,02	0,00-0,04
Pentanal	670	0,00-0,05	0,00-0,01	0,01-0,02	0,00-0,02
Sulfure d'allyle methyle	683	0,01-0,20	0,01-0,06	0,01-0,02	0,02-0,06
3-Methylbutan-1-ol	712	0,00-0,01	0,00-0,06	0,01-0,03	0,00-0,05
Disulfure de dimethyl	727	0,02-0,37	0,01-0,30	0,02-0,03	0,02-0,31
Pentanol	739	0,00-0,01	0,00-0,03	0,00-0,01	0,00-0,03
3-Methylthiophene	763	0,00-0,03	0,00-0,01	0,00-0,01	0,00-0,01
Hexanal	772	0,03-0,68	0,01-0,08	0,01-0,03	0,01-0,07
Octane	800	0,00-0,04	0,00-0,12	0,00-0,03	0,00-0,04
2-Methyl-2-pentenal	809	0,04-0,21	0,02-0,41	0,02-0,17	0,03-0,61
2-Methyl-2-pentenol	812	0,00-0,02	0,00-0,09	0,01-0,04	0,00-0,05
Ethyl methyl disulfide	818	0,00-0,01	0,00-0,04	0,00-0,01	0,00-0,01
(Z)-3-Hexenol-1	831	0,01-0,04	0,00-0,02	0,01-0,04	0,00-0,05
Sulfure de diallyle	840	0,08-0,23	0,09-0,39	0,12-0,25	0,00-0,40
(E)-2-Hexenol	840	0,00-0,10	nd	0,00-0,13	0,00-0,31
Hexanol	843	0,00-0,17	0,00-0,08	0,05-0,17	0,00-0,18
2,4-Dimethylthiophene	856	0,01-0,10	0,04-0,21	0,12-0,18	0,12-0,26
Sulfure de 1-Propenyle propyle	861	0,01-0,87	0,02-0,29	0,02-0,03	0,05-0,17
Heptanal	875	0,02-0,11	0,01-0,07	0,01-0,02	0,01-0,04
3,4-Dimethylthiophene	890	0,13-0,30	0,18-0,84	0,16-0,27	0,27-1,19
Disulfure d'allyle methyle	899	0,04-0,62	0,02-0,14	0,03-0,07	0,05-0,11
Sulfure de dipropyle	909	0,00-0,03	nd	nd	nd
Disulfure de methyle propyle	916	2,08-7,89	1,16-4,55	0,74-2,22	1,46-3,86
Disulfure de methyle 1-propenyle	921	0,21-0,60	0,31-1,65	0,16-0,45	0,47-1,57
Benzaldehyde	929	nd	0,01-0,02	0,01-0,02	0,01-0,02
α-Pinene	932	0,00-0,02	0,01-0,02	0,02-0,04	0,01-0,02
Trisulfure de dimethyle	947	0,01-0,48	0,31-1,94	0,32-0,43	0,64-1,45
1-Octen-3-ol	959	0,00-0,02	0,00-0,01	0,01-0,02	0,00-0,01

3-Octanone	963	0,00-0,02	0,00-0,01	0,00-0,01	0,00-0,01
Sulfure de n-Butyl n-propyle	974	0,00-0,05	nd	nd	nd
2-Amylfuran	977	0,02-0,17	0,00-0,12	0,02-0,12	0,01-0,10
Disulfure d'éthyle propyle	999	0,03-0,11	0,01-0,04	0,01-0,04	0,01-0,03
Limonene	1023	0,00-0,01	0,01-0,10	0,02-0,07	0,00-0,01
Disulfure de diallyle	1057	0,12-0,26	0,01-0,33	0,02-0,17	0,02-0,07
Disulfure d'allyle propyle	1075	0,71-5,14	0,29-0,47	0,38-0,64	0,24-0,36
Nonanal	1082	0,18-0,35	0,02-0,18	0,11-0,25	0,02-0,06
Disulfure de dipropyle	1097	34,66-46,24	14,43-28,27	16,95-26,56	14,11-20,65
Disulfure de (E)-1-Propenyle propyle	1100	1,16-4,24	2,64-5,53	3,60-4,95	3,40-5,66
Disulfure de (Z)-1-Propenyle propyle	1103	0,08-0,11	0,00-0,14	0,05-0,07	0,09-0,10
(Z)-3.5-dimethyl-1,2,4-trithiolane	1107	0,09-0,27	0,02-0,08	0,02-0,06	0,04-0,13
2-Ethyl-2-methyl-1,3-dithiolane	1109	0,05-0,13	0,01-0,04	0,02-0,06	0,02-0,08
2-Ethyl-4-methyl-1,3-dithiolane	1112	0,00-0,42	0,02-0,10	0,04-0,13	0,05-0,15
(E)-3,5-dimethyl-1,2,4-trithiolane	1114	0,00-0,47	0,08-0,23	0,09-0,25	0,02-0,20
Trisulfure de methyle allyle	1116	0,00-0,75	0,25-0,85	0,01-0,36	0,49-0,86
Trisulfure de methyle propyle	1132	4,37-5,70	5,46-10,65	5,01-6,25	7,91-9,15
Trisulfure de methyle (Z)-1-propenyle	1138	0,06-0,09	0,04-0,65	0,12-0,31	0,34-0,54
Trisulfure de methyle (E)-1-propenyle	1141	0,09-0,15	0,21-0,89	0,16-0,36	0,49-0,77
Disulfure de methyle (ethylthio)methyle	1144	0,03-0,13	0,00-0,04	0,00-0,12	0,00-0,02
Salicylate de méthyle	1169	0,00-0,10	0,02-0,20	0,04-0,29	0,00-0,40
Tetrasulfure de dimethyle	1186	0,12-0,17	0,24-0,99	0,03-0,27	0,01-0,69
Disulfure de butyle propyle	1186	nd	0,00-0,02	0,00-0,03	0,00-0,73
β-Cyclocitral	1201	0,00-0,01	0,00-0,26	0,00-0,01	0,00-0,02
Trisulfure d'ethyle (Z)-1-propenyle	1203	0,18-0,56	0,00-0,46	0,07-0,35	0,14-0,61
Trisulfure d'ethyle (E)-1-propenyle	1210	0,23-0,70	0,10-0,58	0,07-0,40	0,18-0,64
Disulfure de methyle hexyle	1216	0,03-0,06	nd	nd	nd
Disulfure de methyle (methylthio)propyle	1233	0,11-0,29	nd	nd	nd
Salicylate d'éthyle	1245	0,00-0,06	0,01-0,06	nd	nd
Undecanone-2	1273	nd	nd	0,05-0,19	0,07-0,22
Trisulfure de diallyle	1285	0,05-0,12	nd	0,02-0,77	0,00-0,06
Trisulfure d'allyle propyle	1293	0,52-2,02	nd	0,00-0,02	0,00-0,29
Trisulfure de dipropyle	1308	10,38-14,23	9,54-17,86	9,57-15,71	8,52-18,51
Trisulfure de 1-propenyle propyle	1312	1,96-2,35	nd	2,55-3,43	4,18-5,98
Sulfure d'octyle propyle	1382	0,03-0,07	nd	nd	nd
2-Hexyl-5-methyl-3(2H)-furanone	1407	0,05-0,17	0,73-5,55	0,38-0,77	nd
Tridecanone-2	1476	0,02-0,05	0,10-2,06	0,16-0,45	0,00-0,47
Pentadecane	1500	nd	0,08-0,19	0,07-0,14	0,00-0,43
Tetrasulfure de dipropyle	1543	1,13-1,63	2,12-2,87	1,80-2,41	1,79-2,84
Tetrasulfure de propenyle propyle	1563	0,93-1,40	nd	nd	nd
Tetrasulfure de 1-Propenyle propyle	1579	0,00-0,18	nd	nd	nd

Ces huiles essentielles sont globalement très similaires, même si quelques métabolites ont uniquement été identifiés dans les huiles essentielles de poireau, notamment le tétrasulfure de propényle propyle. Un mélange de deux de ces huiles essentielles pourrait être difficile à détecter en utilisant un GC-FID, particulièrement un mélange entre les huiles essentielles d'échalote et de ciboulette, car cette étude de composition n'a pas permis de mettre en évidence d'éventuels marqueurs.

Une étude préliminaire par EA-C/P-IRMS est réalisée. Cette étude a permis de montrer des différences significatives sur les isotopes $\delta^{13}C$, $\delta^{2}H$ et $\delta^{34}S$. Une seconde étude est alors réalisée par GC-C/P-IRMS pour déterminer avec plus de précision les ratios isotopiques $\delta^{13}C$ et $\delta^{2}H$ et par GC/MC-ICP-MS pour déterminer le $\delta^{34}S$. La détermination de ces valeurs isotopiques globales et ciblées, combinées aux concentrations relatives des principaux constituants des différentes espèces des *Allium*, permet d'aboutir à authentifier la naturalité, et la pureté de ces huiles essentielles, en utilisant des outils chimiométriques. Ces travaux, décrits ci-après, ont fait l'objet d'une publication dans *Food Control*.

Multi-element (^{13}C, ^{2}H and ^{34}S) bulk and compound-specific stable isotope analysis for authentication of *Allium* species essential oils.

Aurélien Cuchet[a,b,*] ; Anthony Anchisi[b] ; Philippe Telouk[c] ; Yijiao Yao[c]; Frédéric Schiets[b] ; François Fourel[d] ; Yohann Clément[b] ; Pierre Lantéri[b] ; Elise Carénini[a] ; Patrick Jame[b] ; Hervé Casabianca[b]

[a]*Albert Vieille SAS, 629 Route de Grasse, 06220 Vallauris, France*

[b]*Univ Lyon, CNRS, Université Claude Bernard Lyon 1, Institut des Sciences Analytiques, UMR 5280, 5 rue de la Doua, F-69100 Villeurbanne, France*

[c]*Université de Lyon, ENSL, UCBL, CNRS, LGL-TPE, F-69364 Lyon, France*

[d]*Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, ENTPE, UMR 5023 LEHNA, F-69622 Villeurbanne, France*

Abstract

Allium species essential oils are primarily used in the food industry, but due to their low yield, production quantities can be difficult to achieve and thus can be highly expensive. Due to these problems, adulterations are a reality in this field. The purpose of this research is to develop a multi element stable isotope analysis methodology for authentication of the essential oils of leek, onion, shallot, and chive. Naturalness of these essential oils was achieved by assessment of compound specific $\delta^{13}C$ and $\delta^{34}S$: an addition of 5% of synthetic compound can be detected. Chemometric models were undertaken to assess purity by distinction of the *Allium* samples according to their species origin using bulk stable and compound specific $\delta^{13}C$, $\delta^{2}H$, $\delta^{34}S$, and compositions of their major metabolites dipropyl disulfide, dipropyl trisulfide, methyl propyl disulfide, and methyl propyl trisulfide.

Keywords: *Allium* essential oil; Authentication; Multicollector-inductively coupled plasma mass spectrometry; Isotope ratio mass spectrometry

1. Introduction

The *Allium* genus from the *Alliaceae* family includes many vegetal species principally cultivated as culinary ingredients, due to their strong aromas. *Allium* genus is widely distributed in North Africa, Europe, Asia and America (El-Wakil et al., 2015). Some of these species, such as bulbs of onion, garlic, and leek, are used to obtain essential oils by steam distillation and are incorporated as flavourings in the food industry. The essential oils extracted from these vegetal species have similar medicinal properties: diuretic properties (Satyal et al., 2017a), antimicrobial activities (Casella et al., 2013), and antioxidant activities (Ye et al., 2013) which have been reported in previous studies. For instance, chinese chive and onion essentials oils (EOs) have a high antibacterial activity whereas shallot and leek EOs were the strongest antioxidants (Mnayer et al., 2014).

The composition of these oil extracts is relatively similar, as they all contain a high level of sulphur compounds. Dipropyl disulfide (DPDS) and dipropyl trisulfide (DPTS) are the main constituents of essential oils of the leek *Allium porrum*, the shallot *Allium ascalonicum*, the onion *Allium cepa*, and the chive *Allium schoenoprasum.* The relative compositions of DPDS are approximately 45% in leek, 30% in onion, 20% in chive and 15% in shallot, and the content of DPTS is close to 15% in leek, onion, and chive, and near 10% in shallot (Mnayer et al., 2014). Other major components of these essential oils are methyl propyl disulfide (MPDS) and methyl propyl trisulfide (MPTS). Essential oils of garlic *Allium savitum*, wild garlic *Allium ursinum* and garlic chive *Allium tuberosum* are principally composed of diallyle disulfides (DADS), diallyle trisulfides (DATS), methyl allyl disulfides (MADS) and methyl allyl trisulfides (MATS) (Dziri et al., 2014).

Similarly, with other natural products that present low extraction yields leading to expensive production costs, essential oils from *Allium* species are subject to fraud (e.g., the price of leek essential oil is near 1000 €/kg). To obtain a quantity of 100 g of leek essential oils, it is necessary to treat approximately 1 T of leek raw material. For the same quantity of essential oil, raw materials needed for chive, shallot, onion, and garlic are 2.5 T, 1.5 T, 0.8 T and 0.1 T respectively. It is then necessary to ensure the naturalness of these essential oils by highlighting any adulteration with synthetic compounds. Furthermore, their similar chemical composition makes the mixture detection of these essential oils more difficult.

Authentication of naturalness of *Allium* essential oils based on chiral properties cannot be achieved because these molecules of interest do not present any stereoselectivity. Identification of synthetic impurities is also hardly achievable as residual impurities such as halogens precursors can be eliminated with a purification process. Additionally, the complexity of the matrix, with many different metabolites (Mnayer et al., 2014) and the tendency of sulphur-containing molecules to rearrange

during gas chromatography (GC) injections, lead to the formation of derived sulphur components (Cantrell et al., 2020). Among the various analytical techniques involved for the assessment of the authenticity of natural products, stable isotope analyses have been widely used to trace or to ensure the origins.

Multi-isotopic (^{13}C, ^{2}H, ^{18}O, ^{15}N, and ^{34}S) approaches sometimes associated with inorganic multi-elemental analyses have been used to track the geographical origin of allium products: Korean onions (Park et al., 2019), Korean garlic (Choi et al., 2020) or Italian red garlic (Pianezze et al., 2019). In these studies, the geographical origins are correlated to specific cultivation practices allowing the production of high quality of theses food condiments. Regarding essential oils, bulk stable isotope analysis was recently used to authenticate naturalness of wintergreen essential oils (Cuchet et al., 2019). Bulk stable isotope analyses are usually performed using an elemental analyser linked to an isotope ratio mass spectrometer in continuous flow mode for determination of $\delta^{2}H$ via pyrolysis (EA-P-IRMS) and $\delta^{13}C$ and $\delta^{34}S$ via combustion (EA-C-IRMS). Over a period of a few years, several systems have been developed and manufactured using a combustion approach to simultaneously analyse C, N and S either based on chromatographic separation of the gases with a flash Thermo system (Kracht, 2011) or with a purge-and-trap separation device for the Elementar system (Fourel et al., 2014).

However, these methods only produce bulk analyses, and the study of the targeted main secondary metabolites could supply new criteria to improve authentication on more complex essential oils matrices. Gas chromatography – combustion / pyrolysis – isotope ratio mass spectrometry (GC-C/P-IRMS) is an alternative technique allowing to assess compound-specific $\delta^{13}C$ and $\delta^{2}H$ compound-specific isotope ratios. Authentication of naturalness and purity of several essential oils have been achieved on this GC-C/P-IRMS system: oregano and thyme (Nhu-Trang et al., 2006b), lemongrass (Nhu-Trang et al., 2006a), or citrus (Schipilliti et al., 2012b) essential oils for example.

However, due to the high oxidation degree of sulphur, a combustion interface with gas chromatography is difficult to set up for ^{34}S assessment, and therefore, it has not yet been achieved via GC-C/P-IRMS. An alternative is to use gas chromatography (GC) connected on line to a multi-collector-inductively coupled plasma mass spectrometry coupling system (GC/MC-ICP-MS) to assess the compound-specific isotopic ratio of this element. This technique has been developed during the past ten years (Amrani et al., 2009; Clough et al., 2006; Said-Ahmad and Amrani, 2013) essentially applied to petrochemical products. Several recent papers also describe the use of GC/MC-ICP-MS for the analysis of organic sulphur compounds (Kümmel et al., 2020; Said-Ahmad et al., 2017) but not for food chemistry yet.

In this study, we propose a novel methodology to authenticate the naturalness and the purity of the extracted essential oils of *Allium* species based on $\delta^{13}C$, $\delta^{2}H$, and $\delta^{34}S$ performed with both bulk stable isotope analysis via EA-C/P-IRMS as well as compound-specific stable isotope analysis via GC-C/P-IRMS and GC/MC-ICP-MS. The aim of this work is to develop a method that supplies naturalness authentication of these essential oils and highlights the isotope differences between the different *Allium* species, using chemometric tools. Simultaneous determination of bulk and compound specific values for $\delta^{13}C$, $\delta^{2}H$ and $\delta^{34}S$ can lead to the discrimination of the origins of authentic essential oils and synthetic molecules. This method is tested on essential oils of leek, onion, shallot and chive that share similar metabolites.

2. Material and methods

2.1. Sample description

2.1.1. Essential oils

Six Egyptian leek (*Allium porrum* L.) essential oils (EO), nine German Shallot (*Allium ascalonicum* L.) EO, and eleven Egyptian onion (*Allium cepa* L.) EO were provided by Albert Vieille SAS (Vallauris, Alpes Maritime, France). Two leek EO, two shallot EO, ten chives (*Allium ascalonicum* L.) EO, and two onion EO originating from France were supplied by Ferrand PHE (Rodelinghem, Pas de Calais, France). More information can be found in **Supplementary Table S1.**

2.1.2. Organosulfides standards

Commercial synthetic molecules of organosulfides (propyl sulfide, dipropyl disulfide, dipropyl trisulfide, methyl propyl disulfide, and methyl propyl trisulfide) were purchased from TCI (Tokyo, Japan) and Sigma Aldrich (Saint Louis, MO, USA). Chemosynthetic origin was confirmed by radiocarbon activity assessment. The undertaken method is fully described in a previous study (Cuchet et al., 2019).

2.2. Stable Isotope Ratio Analysis

Isotopic results are expressed in the delta unit (δ) according to the following formula (Brand et al., 2014):

$$\delta^{i}\mathrm{E} = \frac{({}^{i}\mathrm{R}_{Sample} - {}^{i}\mathrm{R}_{Reference})}{{}^{i}\mathrm{R}_{Reference}}$$

where i is the mass number of the heavier isotope of element E, R_{Sample} is the respective isotope ratio of a sample, $R_{Reference}$ is the relevant internationally recognized reference material. The delta values are

multiplied by 1000 and are expressed in units "per mil" (‰). SI unit for isotopic ratio is the Urey (Ur), but for practical reasons, the unit used here is the per mil: 1 per mil = 1 mUr.

High-purity gases of carbon dioxide 99.998% (4.8 Messer), hydrogen 99.999% (5.0 Messer). and N45 high-purity SO_2 (Linde Gas France), previously calibrated versus international references (V-PDB, V-SMOW, and V-CDT), were used as the working monitoring gas with each sample. Helium flow at 99.999% was used as a carrier gas.

International reference materials IAEA CH7 (polyethylene foil: $\delta^{13}C_{V\text{-}PDB}$ (‰) -32.15, $\delta^{2}H_{V\text{-}SMOW}$ (‰) -100), USGS40 (L-glutamic acid: $\delta^{13}C_{V\text{-}PDB}$ (‰) -26.39), NBS127 (barium sulfate, $BaSO_4$: $\delta^{34}S_{V\text{-}CDT}$ = +20.3‰), (Halas and Szaran, 2001) and S1 (silver sulfide, Ag_2S: $\delta^{34}S_{V\text{-}CDT}$ = -0.3‰), (Robinson, 1995), supplied by IAEA (International Agency of Atomic Energy, Vienna, Austria) were used to calibrate all of our studied samples, which allowed us to anchor our $\delta^{13}C$ results to the Vienna Pee Dee Belemnite (V-PDB) scale, our $\delta^{2}H$ results to the Standard Mean Ocean Water (V-SMOW) scale and our $\delta^{34}S$ results to the Vienna-Canyon Diablo Troilite (V-CDT) scale. Each sample was analysed versus a monitoring gas for which two pulses were admitted with each analyte. All sample values were analysed in duplicate and verified by bracketing the analytical sequence with international reference materials every six analyses. The $\delta^{13}C$ values are given within a maximum standard deviation of ± 0.28‰, $\delta^{2}H$ within SD = ± 5‰ and $\delta^{34}S$ within SD = ± 0.34‰

2.2.1. EA-C/P-IRMS

The $\delta^{2}H$ measurement was conducted using a TC-EA elemental analyser linked to a Delta V Plus via a Conflo IV interface (all Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany). Samples weighed in silver capsules (3.3 X 5 mm, Säntis Analytical AG, Teufen, Switzerland) were dropped into the pyrolysis unit held at 1400°C. This high temperature reactor was constructed of an inner glassy carbon tube half filled with glassy carbon granules (IVA Analysentechnik, Meerbusch, Germany) integrated into an external ceramic tube. Hydrogen is converted into H_2 and separated on a gas chromatography column prior to the introduction in the IRMS via the same Conflo IV interface. The interface allows the introduction of monitoring gas pulses.

Carbon and sulphur isotope compositions were measured using a Vario PYRO cube elemental analyser (Elementar GmbH, Langenselbold, Germany) equipped with a “purge and trap” gas separation module in combustion mode. The elemental analyser was interfaced in continuous-flow mode with an Isoprime 100 isotope ratio mass spectrometer (Elementar UK Ltd, Cheadle, UK). The applied technique is fully described in a previous study (Fourel et al., 2015). For each sample, 3 aliquots of 200 mg of essential oils were loaded in tin foil capsules. Data are reported as $\delta^{34}S$ in ‰ vs. V-CDT.

2.2.2. GC-C/P-IRMS

GC-C/P-IRMS analyses were performed using a 6890N GC gas chromatograph system (Agilent) connected to an Isoprime GV isotope ratio mass spectrometer (Elementar UK Ltd, Cheadle, UK) via the GC5MK1 GV combustion or pyrolysis interface. The system can be configured for either $\delta^{13}C$ or $\delta^{2}H$ analyses. All samples were analysed in triplicate and verified by bracketing the analytical sequence with sulfides standards every six analyses. Organosulfides standards were calibrated to the international references V-PDB and V-SMOW using the EA-C/P-IRMS technique.

An amount of 1 µL of diluted liquid sample (10 µL in 1 mL of ethanol) was injected using a 7683 Agilent Technologies auto-sampler into the 6890N gas chromatograph equipped with an Agilent HP-5 column (60 m*0.320 mm*0.25 µm I.D film thickness) used in chromatographic separation. The injection port was held at 250°C, fitted with a split liner containing glass wool, and operated in split mode (10:1). The oven temperature programme started at 50°C during 2 min, increased to 120°C at a rate of 10 °C min^{-1}, increased to 210°C at a rate of 5°C min^{-1}, increased to 280°C at a rate of 20 °C min^{-1}, and held for 5 min. Compounds were separated at a flow rate of 1 $mL.min^{-1}$.

A heart split valve connected to the outlet of the GC column enabled the components to be obtained either in the combustion/pyrolysis tube or in the FID detector. This process allows elimination of the solvent peak as well as unwanted compounds.

The combustion of carbon in carbon dioxide was undertaken using a tube containing copper oxide maintained at 850°C in a furnace. Silver wool was placed in the second portion of the tube to trap halogens and sulphur. A Nafion water trap, placed between the combustion furnace and the IRMS, was used to remove water produced during the combustion.

Pyrolysis of the sample for ^{2}H measurement as H_2 was conducted at higher temperature (1050°C) using a tube containing chromium powder. Chromium was used as a pyrolysis catalyser to convert organic components into H_2. Furthermore, chromium is not affected by any carryover effects and directly traps other elements such as halogens and sulphur (Kelly et al., 2001).

The targeted molecules present a high percentage of sulphur, which can generate disruptions to metabolite combustion and/or pyrolysis within the interface. To prevent such perturbations, it is necessary to retain the sulphur by addition of silver wool in the combustion tubes. The pyrolysis temperature is too high for silver wool use, but fortunately, the chromium pyrolysis catalyser has a sulphur-trapping property.

2.2.3. GC/MC-ICP-MS

A Trace 1300 gas chromatograph (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) was coupled to a Neptune Plus MC-ICP-MS (Thermo Fisher Scientific) using a GCI 300 interface (Thermo Fisher Scientific). GC setting parameters were as follows: 1 µL of each diluted sample (20 µL in 0.5 mL of ethanol) or standard (10 µL in 1 mL of ethanol) was injected in split mode (120:1) with the injector temperature maintained at 300 °C. The helium carrier gas was regulated at a constant flow rate of 2 mL/min. Separation of volatile compounds was realised on a TraceGOLD TG-5MS capillary column (30 m × 0.25 mm × 0.25 µm; Thermo Fisher Scientific). Initial oven temperature was held at 150 °C for 4 min, then ramped at 20 °C/min to 300 °C and held for 2 min. The transfer line temperature was maintained at 280 °C.

The Neptune Plus MC-ICP-MS was used in high-resolution mode to avoid any interference for ^{32}S (O_2) and ^{34}S ($^{33}S^1H$ and O_2). Due to the low abundance of ^{33}S (0.76%), ratio precision with ^{33}S was poor and finally not recorded. After acquisition (parameters are described in **Supplementary Table S2**), data were analysed using IsoDat Software Version 3.0.94.12 (Thermo Fisher Scientific) for background subtraction, peak integration, and ratio calculation. MC-ICP-MS optimisation was performed prior to connection with the GCI 300 interface using an Aridus II desolvating system (Teledyne CETAC Technologies, Omaha, NE, USA) with a 1 mg/L sulphur solution. Argon (1 L/min) was added via T piece inside the Trace 1310 GC to enhance the low helium flow rate for separation (2 mL/min). The capillary exit from the GC column entered the GCI 300 interface for approximately 13 cm with this piece. Argon surrounded the capillary tube for this length and was mixed with helium inside the GCI 300 interface before entering the torch injector. **Table S2** describes the applied parameters.

All samples were analysed in triplicate and were verified by bracketing the analytical sequence with organosulfide standards every six analyses. Organosulfide standards were calibrated to the international standard V-CDT (Vienna Canyon Diablo Troilite) using the EA-C/P-IRMS technique.

In order to obtain an accurate isotope ratio measurement (Yang et al., 2018), the MC-ICP-MS mass bias needs to be corrected, according to the Russell law (Russell et al., 1978):

$$R\left({}^{34}S/{}^{32}S\right)_{True} = R\left({}^{34}S/{}^{32}S\right)_{Measured} * \left(\frac{34}{32}\right)^{f} \Leftrightarrow f = \frac{\ln\left[\frac{R\left({}^{34}S/{}^{32}S\right)_{True}}{R\left({}^{34}S/{}^{32}S\right)_{Measured}}\right]}{\ln\left[\frac{34}{32}\right]}$$

Where $R\left({}^{34}S/{}^{32}S\right)_{Measured}$ is the integrated $^{34}S/^{32}S$ ion-current ratio of samples; $R\left({}^{34}S/{}^{32}S\right)_{True}$ is the true $R\left({}^{34}S/{}^{32}S\right)$ value after correction; and f is the correction factor.

2.3. Statistical Analysis

Univariate and multivariate statistical analyses were performed using Xlstat© (Addinsoft, Paris). The Pearson correlation test was carried out to determine pairwise correlations between isotope ratio values. Unidimensional test of equality was realized to determine significant differences between species, within a confidence level p-value < 0.05.

Principal component analysis (PCA) (Jolliffe, 2002) was preliminary used in this study to describe and to assess the quality and homogeneity of the 42 samples of interest. Machine learning algorithm linear discriminant analysis (LDA) (Haghighat et al., 2016), and partial least square method – discriminant analysis (PLS-DA) (Tenenhaus, 1998) were then used to classify the different Allium species on the basis of their isotopic signature and chemical composition. Due to a small number of data points, a 7-fold stratified cross validation was repeated 20 times to avoid overfitting the small number of data-points. Features were ranked according to the variable importance projection (VIP) from PLS-DA. The model's quality was evaluated based on the residuals (R^2X, R^2Y) and the model's predictive ability parameter (Q^2_{cum}) (Levet et al., 2013). More information can be found in **Supplementary data**. The overall quality of models was also assessed using confusion matrix.

3. Results and discussion

3.1. Variations of the isotopic composition

The Bulk Stable Isotope Analysis (BSIA) and Compound Specific Isotope Analysis (CSIA) $\delta^{13}C$, $\delta^{2}H$, and $\delta^{34}S$ values of leek, shallot, chive, and onion essential oils are reported in **Table 1** and **Supplementary Table S3**.

3.1.1. BSIA and CSIA $\delta^{13}C$ analyses

Bulk $\delta^{13}C$ stable isotope ratio analyses show differences amongst the studied species (p-value $p < 0.05$). Leek essential oils present $\delta^{13}C$ values in the range of -35.41‰ to -36.79‰, which are slightly depleted compared with the values measured for other species. Chive essential oils have $\delta^{13}C$ values measured between -33.36‰ and -34.17‰, and onion essential oils have $\delta^{13}C$ values between -31.67‰ and -33.34‰. Shallot essential oils have a wider range of $\delta^{13}C$ values, spreading between -31.73‰ and -35.19‰. These $\delta^{13}C$ isotopic values correspond to essential oils from C3 plant, which is in line with the C3 plant origin of *Allium* species (Choi et al., 2020; Park et al., 2019; Pianezze et al., 2019). $\delta^{13}C$ typical values of C3 plants generally range from -34‰ to -24‰ (Krueger and Reesman, 1982) but it has been reported in some cases more negative values for $\delta^{13}C$ in essential oils extracted from C3 plants (Cuchet et al., 2019). To our knowledge, stable isotopic analysis on *Allium* essential oils have never been

referenced in the literature before. However, isotopic analyses were realized on *Allium* raw materials. Park et al. (2019) presented an average $\delta^{13}C$ value of Korean onions ranging from -26.5‰ to -25.4‰, which differs from the analyses undertaken on onion essential oils. This could be due to the fact that raw material isotope signature could be influenced by cellulose, proteins, carbohydrates, and other constituents which are not present in essential oils. Moreover, this can also be attributed to isotopic fractionation during distillation processes. These *Allium* essential oils are peculiar amongst essential oils as they are produced from degradation when exposed to air, and from heating processes. This generates organosulphur compounds from precursors, such as allicine (Ramirez et al., 2017), which can result to more negative $\delta^{13}C$ values.

The global isotopic values for $\delta^{13}C$ are similar to the measured CSIA values, especially for DPDS and DPTS. However, the $\delta^{13}C_{MPDS}$ and $\delta^{13}C_{MPTS}$ values are systematically depleted compared with $\delta^{13}C_{DPDS}$ and $\delta^{13}C_{DPTS}$ in all samples analysed. The $\delta^{13}C$ CSIA values are different amongst several vegetal species of this study, especially for leek essential oils, for which it can be noticed that the $\delta^{13}C_{MPTS}$ values (-40.41‰ to -43.59‰) are significantly different from those of the other essential oils: -33.98‰ to -36.91 ‰ in shallot essential oils, -34.31‰ to -35.15‰ in chive essential oils, and -35.42‰ to -37.81‰ in onion essential oils. The $\delta^{13}C_{DPDS}$ (-33.50‰ to -35.22‰) and $\delta^{13}C_{DPTS}$ (-34.88‰ to -35.97‰) values for leek essential oils are also more depleted.

3.1.2. BSIA and CSIA $\delta^{2}H$ analyses

Bulk $\delta^{2}H$ analyses from all of the studied species are relatively similar (leek, shallot and chive essential oil $\delta^{2}H$ values are spread between -218‰ and -227‰, p-value > 0.05), including samples from various geographical origins. However, deuterium isotope fractionation is noticeably more important in the case of onion essential oils ($\delta^{2}H$ between -172‰ and -251‰). Onion samples with higher $\delta^{2}H$ isotopic ratios were resulting from a different extraction process (OE9, OE10, and OE11, see **Supplementary table S1**), where the whole onion bulb was crushed. This grinding process accelerates the organosulfur precursors oxidation (Tocmo et al., 2014; Zhang et al., 2021), leading to a possible isotopic enrichment.

The CSIA $\delta^{2}H$ natural isotopic values are significantly lower than the $\delta^{2}H$ synthetic values. Amongst the essential oils, the CSIA $\delta^{2}H$ values are relatively similar, except for onion essential oil batches in which we noticed a larger isotopic fractionation.

Table 1. *Mean, max, min, and standard deviation (SD) of bulk stable and compound-specific $\delta^{13}C$, $\delta^{2}H$, and $\delta^{34}S$ isotope values, and DPDS, DPTS, MPDS, and MPTD chemical composition, of leek, shallot, chive, and onion essential oils (n=number of samples).*

Isotopic Values	Leek essential oils (n=8)				Shallot essential oils (n=11)				Chive Essential oils (n=10)				Onion essential oils (n=13)			
	Mean	Max	Min	SD	Mean	Max	Min	SD	Mean	Max	Min	SD	Mean	Max	Min	SD
$\delta^{13}C_{bulk}$ (‰)	-36,02	-34,63	-36,79	0,73	-32,41	-31,73	-35,19	1,35	-33,61	-33,31	-34,17	0,29	-32,63	-31,67	-34,32	0,65
$\delta^{2}H_{bulk}$ (‰)	-218	-211	-227	6	-223	-218	-226	2	-223	-217	-227	3	-209	-172	-251	25
$\delta^{34}S_{bulk}$(‰)	7,5	10,4	1,0	3,7	3,0	4,1	-0,2	1,6	0,7	1,4	0,0	0,5	3,9	7,2	1,2	1,7
$\delta^{13}C_{DPDS}$ (‰)	-34,27	-33,50	-35,22	0,64	-32,14	-31,52	-34,11	0,96	-32,08	-31,66	-32,44	0,25	-32,43	-30,00	-34,13	1,00
$\delta^{2}H_{DPDS}$ (‰)	-189	-145	-251	42	-198	-184	-216	9	-227	-216	-252	12	-199	-164	-253	30
$\delta^{34}S_{DPDS}$ (‰)	12,1	15,2	6,9	3,2	8,0	8,8	6,4	0,8	6,1	8,8	3,9	1,4	7,9	10,7	5,1	1,9
$\delta^{13}C_{DPTS}$ (‰)	-35,59	-34,88	-35,97	0,41	-33,16	-32,36	-35,43	1,12	-32,68	-32,15	-33,14	0,32	-33,27	-31,12	-34,95	1,02
$\delta^{2}H_{DPTS}$ (‰)	-217	-204	-251	15	-196	-154	-228	25	-236	-164	-266	36	-208	-152	-273	37
$\delta^{34}S_{DPTS}$ (‰)	9,7	12,9	2,4	3,9	5,8	7,8	2,7	1,4	2,9	3,5	1,6	0,6	6,8	10,2	3,7	1,8
$\delta^{13}C_{MPDS}$ (‰)	-39,24	-38,66	-39,81	0,45	-37,55	-36,97	-38,87	0,66	-37,19	-36,10	-38,17	0,63	-38,56	-35,69	-40,13	1,02
$\delta^{2}H_{MPDS}$ (‰)	-229	-211	-253	13	-220	-184	-237	16	-221	-171	-249	20	-201	-162	-231	21
$\delta^{13}C_{MPTS}$ (‰)	-42,29	-40,41	-43,59	1,13	-34,78	-33,98	-36,91	1,00	-34,67	-34,31	-35,15	0,24	-36,37	-34,65	-37,81	0,73
$\delta^{34}S_{MPTS}$ (‰)	6,5	11,2	2,5	3,0	2,9	5,4	0,1	1,8	1,5	3,5	-0,2	1,3	1,0	6,1	-2,3	2,5
$\%_{DPDS}$	38,4	46,2	34,7	3,5	18,5	20,7	14,0	2,3	22,5	26,6	17,0	3,0	21,5	28,3	14,4	4,1
$\%_{DPTS}$	12,7	14,2	10,4	1,5	16,0	18,5	8,5	3,5	12,7	15,7	8,6	2,1	14,9	17,9	9,5	2,9
$\%_{MPDS}$	5,5	7,9	2,1	2,1	2,4	3,9	1,5	0,7	1,6	2,3	0,7	0,5	1,9	4,6	1,2	0,9
$\%_{MPTS}$	4,9	5,7	4,4	0,6	8,7	9,2	7,9	0,4	5,4	6,3	4,9	0,4	6,9	10,7	5,5	1,3

3.1.3. BSIA and CSIA $\delta^{34}S$ analyses

The $\delta^{34}S$ isotopic fingerprint of sulphur-containing volatile metabolites which is the components of *Allium* essential oils is dependent on sulphur issued from rainwater, soil, and external supply. The sulphur $^{34}S/^{32}S$ isotope ratio in plants might be influenced by several factors, including geological characteristics of a location (Sulfides abundance) (Choi et al., 2020), climatic conditions (Nehlich, 2015), sea spray effect in coastal regions (Norman et al., 2006), and soils bacterial processes (Pianezze et al., 2019). $\delta^{34}S$ values are also affected by anthropogenic effects such as the sulphur supplied by fertilizers (Mizota and Sasaki, 1996) under the SO_4^{2-} sulfate ion form. Depending on the origin of the fertilizers used, the global isotopic ratio of ^{34}S can theoretically differ, offering the potential to observe different agricultural practices.

Egyptian leek essential oils have $\delta^{34}S$ values ranging from 9.0‰ to 10.4‰, as compared with $\delta^{34}S$ values from French essential oils, which show significantly more depleted $\delta^{34}S$ values (from 1.0‰ to 2.6‰). Egyptian samples are located in the Nile Delta region, and are probably affected by sulphates from the Nile Delta, which could explain these higher values. These results are also observed amongst onion samples of Egyptian and French origins.

The CSIA $\delta^{34}S$ values of DPDS, DPTS, and MPTS were determined via GC/MC-ICP-MS. In order to validate this recent technique for our type of samples, comparison measurements between CSIA and BSIA analyses were first done. Similarities were observed between CSIA $\delta^{34}S$ and BSIA $\delta^{34}S$, as the isotopic values were on the same scale, between -2.3 and 15.2‰. Furthermore, similar isotopic trends were observed between species and geographical origin. For example, the $\delta^{34}S_{Bulk}$ values of French leek essential oils were depleted compared to their Egyptian equivalent, as well as the compound-specific $\delta^{34}S$ values for DPDS, DPTS, and MPTS. This demonstrates the accuracy of values measured with the ICP methodology. However, a systematic discrepancy was also observed between IRMS and MC-ICP-MS values. The MC-ICP-MS is a precise isotope ratio measurement method, which usually achieve precise ratio determination using 20 to 40 cycles (4 to 8 seconds per cycle). However, in our configuration, with the fast-transient signal obtained from the GC system, the MC-ICP-MS technology was at the limit of the Faraday cup detector response time, and to correct for that drawback, we used a Tau correction for the amplifiers. It is well known that MC-ICP-MS suffers mass bias problems from the torch, the interface, the lens stack, or the mass spectrometer, and it should be corrected to obtain the true ratio (Yang et al., 2018). On Sr, Hf, or Nd isotope measurements, it is possible to use a stable ratio for mass bias correction. When this is not possible (Pb or Cu for example), a correction with another element (like Zn or Tl) can be used. However, for sulfur measurements, there is no stable ratio available, and the addition of another element for mass bias correction is not possible because the

mass dispersion authorized by the spectrometer is not sufficient. The only way to do the measurement is the sample bracketing technique (Amrani et al., 2009; Clough et al., 2006, Said-Ahmad and Amrani, 2013). Unfortunately, the absolute value for $^{32}S/^{34}S$ cannot be obtained due to the impossibility to correct for mass bias, which explains the systematic discrepancy observed between IRMS and MC-ICP-MS results. The relative differences between the samples obtained with GC/MC-ICP-MS still supply significant $\delta^{34}S$ to characterise our samples.

Measured $\delta^{34}S$ isotopic values differed amongst species and geographical origins. Egyptian leek essential oils presented higher $\delta^{34}S_{DPDS}$ (11.7-15.2‰) and $\delta^{34}S_{DPTS}$ (10.4-12.8‰) values compared with French leek values ($\delta^{34}S_{DPDS}$, 6.9-7.7‰; $\delta^{34}S_{DPTS}$, 2.4-4.9‰). However, the ranges were similar for $\delta^{34}S_{MPTS}$ values, between 2.5 and 11.2‰. German shallot samples presented higher $\delta^{34}S_{DPTS}$ values (4.6-7.8‰) than French samples (2.7- 4.6‰). However, shallot essential oil values for $\delta^{34}S_{DPDS}$ (6.4- 8.8‰) and $\delta^{34}S_{MPTS}$ (0.1-5.4‰) were within the same range for both geographical origins. Sulphur isotope fractionation was noticeably important in the case of onion essential oils. Egyptian and French onion samples presented $\delta^{34}S_{DPDS}$ values between 5.1 and 10.7‰, $\delta^{34}S_{DPTS}$ values between 3.7 and 10.2‰, and $\delta^{34}S_{MPTS}$ values between -2.30 and 6.1‰. Moreover, chive essential oils presented $\delta^{34}S_{DPDS}$ values ranging between 3.92and 8.8‰; $\delta^{34}S_{DPTS}$ values between 1.6 and 3.5‰; and $\delta^{34}S_{MPTS}$ values between -0.2 and 3.5‰.

3.2. Naturalness authentication

$\delta^{13}C$, $\delta^{2}H$ and $\delta^{34}S$ stable isotope signature can differ between natural and synthetic molecules. Synthetic-origin molecules are not subject to the same isotopic fractionation phenomenon than natural metabolites, as they are not produced from similar pathways. Whereas *Allium* natural organosulfides compounds are produced from biosynthesis pathways, synthetic components are produced from petrochemical processes. Alkyl and allyl sulphides, from *Allium* essential oils, are generated during heating process from allicin and other thiosulfinates degradation (Ramirez et al., 2017). These secondary metabolites represent the enzymatic hydrolysis product of alkyl cysteine sulfoxides (ACSO) (Jones et al., 2004) which are produced from several biosynthesis steps influenced notably by the assimilation of SO_4^{2-}, and the photosynthesis pathways of CO_2. Syntheses of organic disulfides molecules has been usually prepared by nucleophile substitution reactions of alkyl halides with sulphur containing products (Abbasi et al., 2016; Bhaumik and Misra, 2017; Soleiman-Beigi and Mohammadi, 2012). All of these pathways generate symmetric alkyl disulfides with elevated yields. Other common synthetic pathways use a sulfonate (Filippi et al., 2007).

3.2.1. Analysis of synthetic organosulfides

In order to compare natural and synthetic compounds, synthetic $\delta^{13}C_{DPDS}$ were measured, generating values between -28.52‰ and -26.26‰, significantly different from natural values between -31.66‰ and -36.79‰. The same observations were noted for DPTS and MPTS. Nevertheless, the $\delta^{13}C$ value of one MPDS synthetic compound (-37.17‰) is comparable to the $\delta^{13}C$ value from MPDS in essential oils, whereas, considering hydrogen data, its $\delta^{2}H$ value is enriched, which outlines the power of multi-isotope approaches. Most synthetic commercial standards have shown enriched $\delta^{13}C$ values (-26.18‰ to -28.68‰) compared with the natural essential oils reported in the study. Those results are in line with the literature. Synthetic compounds are petrochemicals by-products, which have generally a $\delta^{13}C$ value ranging between -25 and -30‰ (Krueger and Reesman, 1982). Based on this significant $\delta^{13}C$ isotopic gap between natural and synthetic origins for those compounds, adulteration of essential oils with addition of synthetic molecules to natural products could be clearly established with $\delta^{13}C$ bulk analyses. Therefore, we have established an efficient indicator of authentication for *Allium* essential oils.

As it was the case for $\delta^{13}C$ values, synthetic standard molecules show more positive $\delta^{2}H$ values (ranging from -105‰ to -170‰), and thus adulteration of natural *Allium* extract with synthetic compounds is expected to increase the $\delta^{2}H$ bulk value and could also be detected. A majority of synthetic samples present $\delta^{34}S$ values close to 0‰ (ranging from 2.0‰ to -3.1‰), except for one MPDS sample that has a more positive value (7.3‰). Differentiation was realised between synthetic DPDS and DPTS molecules and natural essential oils of *Allium* species. Synthetic DPDS values of $\delta^{34}S$ (-0.8‰ and -3.0‰) and $\delta^{13}C$ (-28.52‰ and -26.26‰) and the synthetic DPTS $\delta^{13}C$ value (-26.18‰) differed significantly from natural isotopic values. However, synthetic (2.0‰) and natural $\delta^{34}S_{DPTS}$ values were within the same range. Comparisons between $\delta^{34}S$ values from natural and synthetic compounds are also promising.

3.2.2. Correlation study

A univariate Pearson's correlation is realized on the data set to determine correlation coefficients and pairwise correlations, described in **Supplementary Table S4**. It appears that several data are linearly correlated with each other: a correlation of $\delta^{13}C$ and $\delta^{34}S$ values determined on *Allium* metabolites DPDS, DPTS, MPDS, and MPTS, was established, especially $\delta^{13}C_{DPDS}$ and $\delta^{13}C_{DPTS}$ (r=0.94), $\delta^{13}C_{DPDS}$ and $\delta^{13}C_{MPTS}$ (r=0.84), and $\delta^{34}S_{DPDS}$ and $\delta^{34}S_{DPTS}$ (r=0.84). These $\delta^{13}C$ and $\delta^{34}S$ isotopic filiations between organosulphur metabolites were expected as these metabolites are sulphur-enriched from the same sulphite SO_3^{2-} source. Furthermore, the biosynthesis pathways at the origin of their formation during plant photosynthesis are composed of similar precursors. All metabolites DPDS, DPTS, MPDS, and

MPTS were affected by the same isotopic fractionation effects. However, no correlation was observed with δ^2H analysis, which is probably because δ^2H values are mainly affected by climatic effects / geographical origins. This $\delta^{13}C$ and $\delta^{34}S$ linear correlation is useful in authentication as the potential addition of the same metabolite from a different source (synthetic or natural) will not show the same correlation. For instance, this means that an addition of DPDS or DPTS from another source can be highlighted. This is an important result for the use of the CSIA method in an authentication approach.

3.2.3. Adulteration of samples by synthetic samples

To evaluate the detection limits for the addition of synthetic molecules in essential oil, a known sample of leek essential oil was adulterated with 5%, 10%, and 20% of DPDS and DPTS from synthetic origins. Results are presented in **Fig. 1**. It is observed that due to a different isotopic ratio between DPDS/DPTS from synthetic and natural origins, the adulterated samples no longer fall on the previously obtained correlation line.

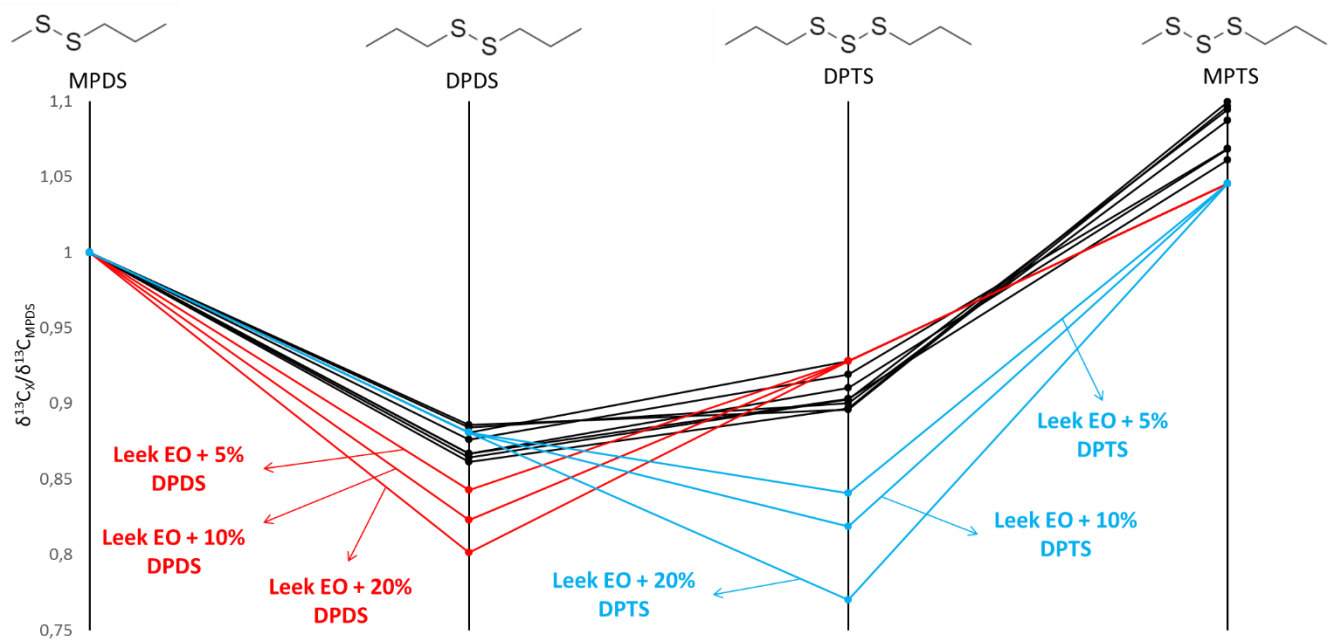

Fig. 1. *Parallel plots of $\delta^{13}C_{MPDS}$, $\delta^{13}C_{DPDS}$, $\delta^{13}C_{DPTS}$, and $\delta^{13}C_{MPTS}$ values compared with $\delta^{13}C_{MPDS}$ and measured on 8 natural leek essential oils (in black), one essential oil adulterated with 5, 10, and 20% of synthetic DPDS (in red), and one essential oil adulterated with 5, 10, and 20% of synthetic DPTS.*

The CSIA approach allows the comparison between metabolites contained in the various essential oil that were investigated. The result of those isotopic measurements is that the combination of $\delta^{13}C$, δ^2H, and $\delta^{34}S$ values supply useful information for deciphering the authentication of *Allium* natural

products. Moreover, the combination of $\delta^{13}C$ and $\delta^{34}S$ values can be used to discriminate synthetic molecules and natural essential oils and thereby indicate potential adulterations.

3.3. Multivariate analyses – Chemometric study

In order to understand the capability of our variables to predict the species origin of the *Allium* essential oil samples, a multivariate analysis was carried out on the entire sample data set (42 samples), with all the 17 following parameters as variables: BSIA ($\delta^{13}C_{Bulk}$, $\delta^{2}H_{Bulk}$, $\delta^{34}S_{Bulk}$) and CSIA ($\delta^{13}C_{DPDS}$, $\delta^{13}C_{DPTS}$, $\delta^{13}C_{MPDS}$, $\delta^{13}C_{MPTS}$, $\delta^{2}H_{DPDS}$, $\delta^{2}H_{DPTS}$, $\delta^{2}H_{MPDS}$, $\delta^{34}S_{DPDS}$, $\delta^{34}S_{DPTS}$, $\delta^{34}S_{MPTS}$) stable isotope data, as well as relative concentration of major organosulfides (DPDS, DPTS, MPDS, and MPTS). This statistical analysis consisted in a preliminary PCA to describe the dataset, followed by a LDA and a PLS DA analyses to classify the samples and exhibit clusters. The main objective of this statistical multivariate analysis is to authenticate the species origin of the samples. Although many studies describe the possibility to assess the geographical origin of samples using isotopic data and chemometric (Diomande et al., 2015; Drivelos and Georgiou, 2012), it has not been realised here as the dataset does not have enough representative samples of each origin.

3.3.1. Principal Component Analysis

We depict scores and loadings plots of the first two principal components (F1 and F2) of the PCA in **Fig. 2**, which constituted 63.5% of the total variance. PCA supported our earlier observations. Species differentiation was observed, especially for leek essential oils. Onion essential oils were highly scattered, because of their large isotopic fractionation. Individual clusters were identified for shallot and chive essential oils. Shallot and chive essential oils were closely grouped however, even if a slight separation was exhibited on F2. These two essential oils have closely related isotopic range values and share similar compositions.

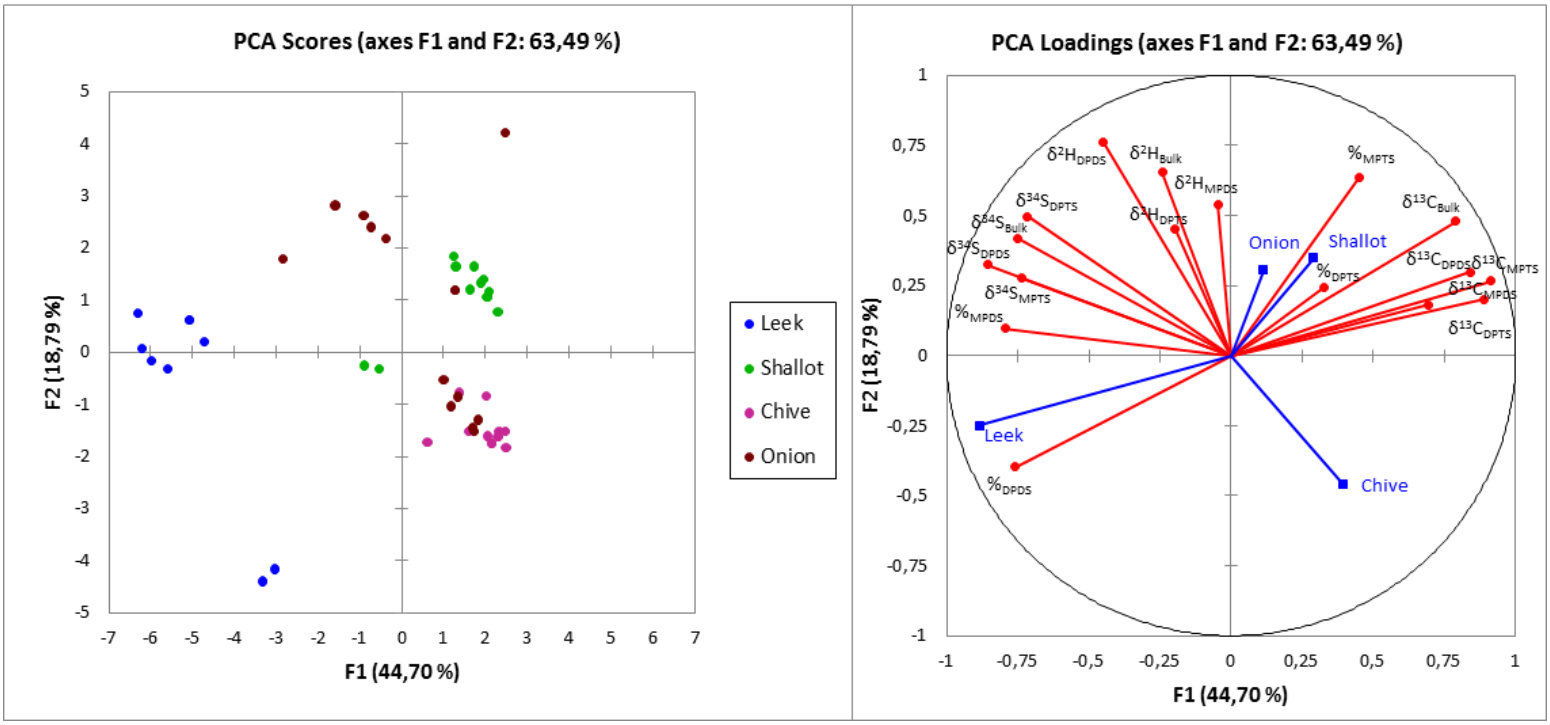

Fig. 2. *Scores and loadings plots of principal component F1 and F2 of PCA model developed from all isotopic values (BSIA and CSIA), and DPDS, DPTS, MPDS, and MPTD chemical composition, of leek, shallot, chive, and onion essential oils.*

Essential oils from leek were also grouped according to the geographical origin of the raw material, being the two samples from France allocated in more negative values of F2. The variables involved in this separation are hydrogen isotopic ratios (δ^2H_{Bulk}, δ^2H_{DPDS}, δ^2H_{DPTS}, and δ^2H_{MPDS}), which are known to be highly dependent on geographical origins (Hoefs, 2018; Pianezze et al., 2019). Shallot essential oils were also geographically separated in component F2, making the use of δ^2H ratios more robust for geographic assignments.

3.3.2. Discriminant models (LDA and PLS-DA)

Classification of the oil extracts according to allium species was first addressed by means of linear discriminant analysis (LDA) using all the stable isotopes and the chemical composition. This statistical model is one of the most popular multivariate analytical tool to highlight data clusters in authentication. Unlike PCA, LDA considers differences between data classes. The analytical target was to increase the separation between species. LDA scores and loadings plots can be observed in **Fig. 3**; grouped by species. The confusion matrix for estimated samples is displayed on **Table 1**.

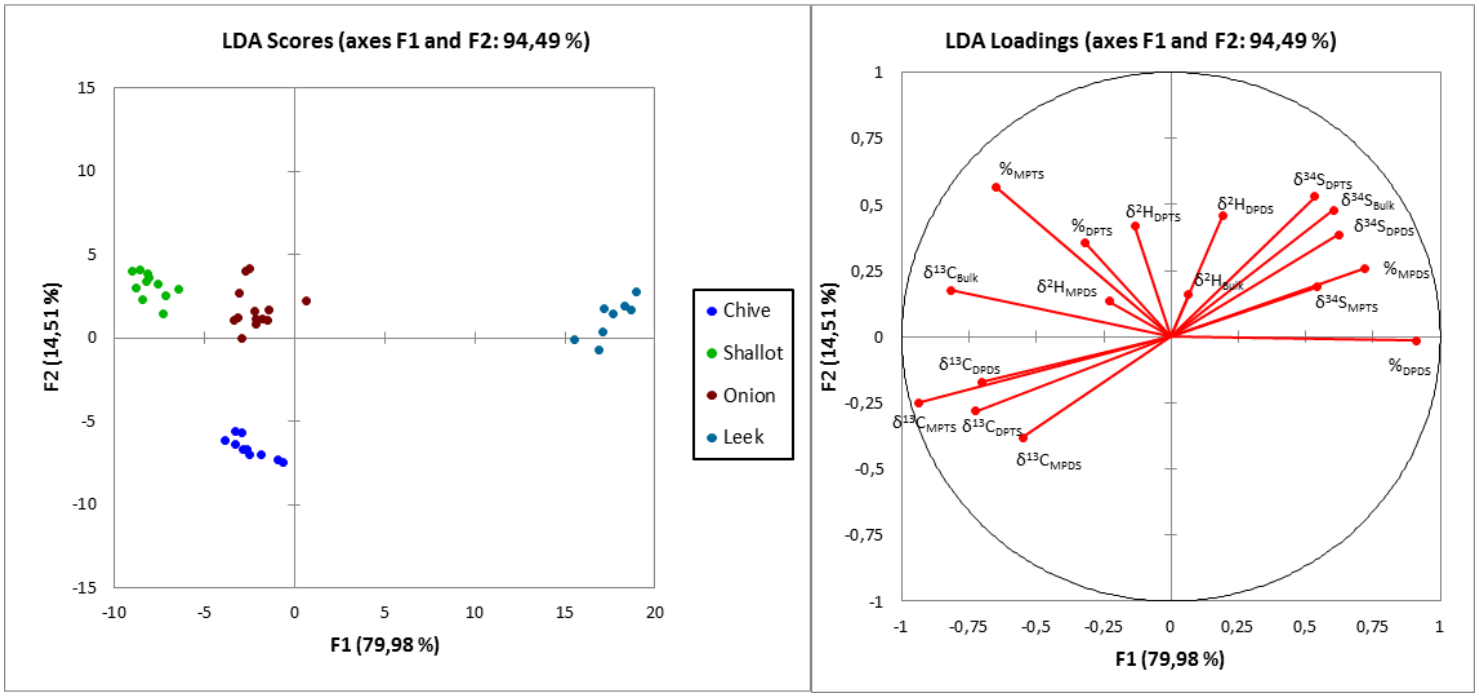

Fig. 3. *Linear Discriminant Analysis (LDA) scores and loadings plots of all isotopic values (BSIA and CSIA) and DPDS, DPTS, MPDS, and MPTD chemical composition, determined on Allium essential oils samples grouped by species*

Only BSIA isotope values were first included in the LDA study, but only 85.7% of samples were well classified, with several shallot and onion essential oils samples wrongly attributed. This study showed that the use of CSIA isotope values and relative concentration of principal metabolites lead to 100% of classification of species origin. With regard to species, score plots of the linear discriminants F1 (80.0%) and F2 (14.5%) constituted 94.5% of the total variance. Several parameters highly contribute to the clustering. F1 correlated positively notably with $\delta^{34}S_{Bulk}$ (0.602), $\delta^{34}S_{DPDS}$ (0.622), $\delta^{34}S_{DPTS}$ (0.534), $\delta^{34}S_{MPTS}$ (0.542), $\%_{DPDS}$ (0.909), and $\%_{MPDS}$ (0.721), and negatively with $\delta^{13}C_{Bulk}$ (-0.819), $\delta^{13}C_{DPDS}$ (-0.701), $\delta^{13}C_{DPTS}$ (-0.726), $\delta^{13}C_{MPDS}$ (-0.552), $\delta^{13}C_{MPTS}$ (-0.937), and $\%_{MPTS}$ (-0.653); whereas F2 correlated negatively with $\delta^{34}S_{DPTS}$ (-0.531), and positively with $\%_{MPTS}$ (0.568).

In order to conclude the study and establish a predictive statistical model, a partial least square – discriminant analysis (PLS-DA) was also conducted. PLS-DA scores and loadings plots are represented in **Fig. 4**.

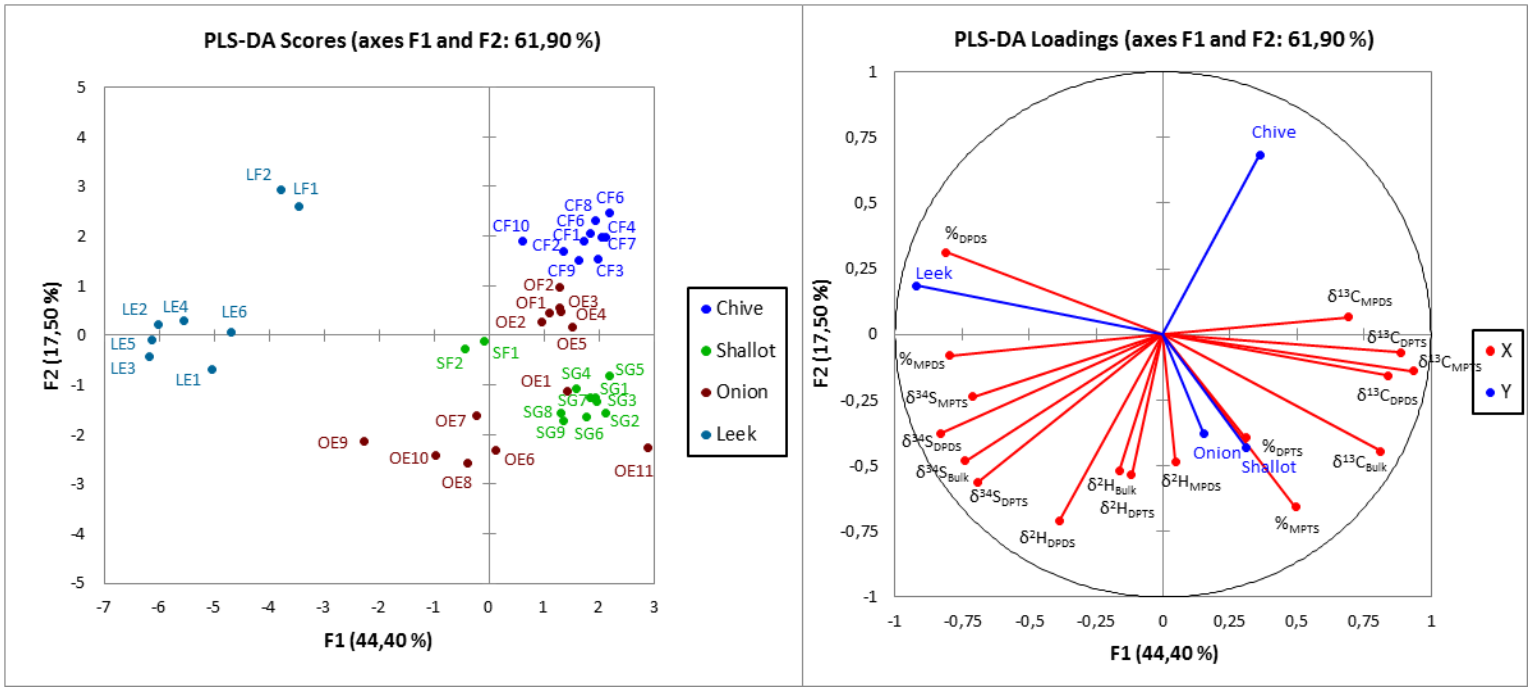

Fig. 4. *Partial Least Square – discriminant analysis (PLS-DA) scores and loadings plots of all isotopic values (BSIA and CSIA) and DPDS, DPTS, MPDS, and MPTD chemical composition, determined on Allium essential oils samples.*

The component F1 is mostly correlated positively with $\delta^{13}C$ isotopic values ($\delta^{13}C_{Bulk}$ (0.814), $\delta^{13}C_{DPDS}$ (0.839), $\delta^{13}C_{DPTS}$ (0.886), and $\delta^{13}C_{MPDS}$ (0.934)), and negatively with $\delta^{34}S$ isotopic values and organosulfides composition ($\delta^{34}S_{Bulk}$ (-0.738), $\delta^{34}S_{DPDS}$ (-0.828), $\delta^{34}S_{DPTS}$ (-0.691), $\delta^{34}S_{MPTS}$ (-0.710), $\%_{DPDS}$ (-0.811), and $\%_{MPDS}$ (-0.797)). The component F2 is mostly correlated negatively with $\delta^{2}H$ isotopic values ($\delta^{2}H_{Bulk}$ (-0.520), $\delta^{2}H_{DPDS}$ (-0.710), $\delta^{2}H_{DPTS}$ (-0.535), and $\delta^{2}H_{MDPS}$ (-0.484)). Essential oils from leek presented more negative values on F1 than other *Allium* species, whereas shallot, onion, and chive essential oils were separated in component F2. According to the **Table 2**, varieties were significantly clustered with 100% of sample classification. The performances of this model in this study are comparable to the LDA. Both models successively allow to distinguish the different classes of *Allium* species.

Moreover, geographical separations can also be distinguished, in the PLS-DA model, between French leek essential oils (Samples LF1 and LF2) and Egyptian samples, and between French shallot essential oils (SF1 and SF2) and German samples. The geographical origin has not such influence in LDA analysis, because LDA is based on the analysis of variance (ANOVA model), whereas PLS-DA is based on the

covariance between the predictors X and the response Y instead, which could explain a higher sensitivity of the PLS-DA model.

Table 2. *LDA and PLS-DA confusion matrices using BSIA, CSIA, and chemical composition as variables (17 variables)*

Model	from \ to	Chive	Shallot	Onion	Leek	%correct
LDA	Chive	10	0	0	0	100%
	Shallot	0	11	0	0	100%
	Onion	0	0	13	0	100%
	Leek	0	0	0	8	100%
PLS-DA	Chive	10	0	0	0	100%
	Shallot	0	11	0	0	100%
	Onion	0	0	13	0	100%
	Leek	0	0	0	8	100%

4. Conclusion

Authentication of essential oils of *Allium* varieties was performed using bulk stable and compound specific isotope analysis of carbon, hydrogen, and sulphur elements determined in EA-C/P-IRMS, and GC-C/P-IRMS, as well as GC/MC-ICP-MS. This last technique was used for the first time to measure organic compounds in essential oils. The isotopic filiation demonstrated in $\delta^{13}C$ and $\delta^{34}S$ produces better precision in authenticating naturalness of these types of essential oils. We demonstrated that an addition of 5% of synthetic-origin DPDS or DPTS can be detected. The results also showed that this methodology is applicable to assess purity. Combination of BSIA, CSIA, and metabolite composition leads to varieties discrimination: LDA and PLS-DA models performances achieved 100% of sample classification. Furthermore, the methodology could be employed to improve the authentication of other sulphur component-based essential oils, such as garlic *Allium sativum* and other *Allium* essential oils composed of allyl components, such *as A. ursinum* and *A. tuberosum* essential oils.

Acknowledgments

This work was conducted in partial fulfilment of the PhD requirements for Aurélien Cuchet who has received a grant from the Association Nationale de la Recherche et de la Technologie (ANRT, Paris, France). The research was supported by a contract between Albert Vieille SAS and ISA (Institut des

Sciences Analytiques, Villeurbanne, France). The authors are grateful to Ferrant PHE (Rodelinghem, France) for providing authentic samples of leek, onion, chive, and shallot essential oils, and to Thermo Fisher Scientific for providing the Trace 1300 GC and GCI 300 interface. This study was partially performed using the INSU/CNRS MC-ICP-MS national facility at ENS-LYON. This study was also partially realized on the Isoprime 100 IRMS hosted by the platform "Ecologie Isotopique" of the 'Laboratoire d'Ecologie des Hydrosystèmes Naturels et Anthropisés' (LEHNA, UMR 5023, Villeurbanne, France), a member of the RéGEF network.

Declaration of Competing Interests

The authors declare that there are no conflicts of interest.

CONCLUSION

Une perspective d'approche d'authentification de la naturalité des huiles essentielles d'ail, composées d'organosulfures de type allyles, peut être envisagée, en reproduisant les travaux présentés dans ce chapitre sur les molécules de disulfure de diallyle et de triallyle, par exemple.

La détermination de ratios isotopiques de métabolites ciblés permet d'étudier, avec plus de précision, par comparaison avec l'approche globale par EA-C/P-IRMS, la composition isotopique des huiles essentielles. Les molécules authentiques, contenues dans un même échantillon d'huile essentielle, ont subi des fractionnements isotopiques identiques, à partir de voies de biosynthèses et d'un environnement géographique similaire. C'est pourquoi la composition isotopique d'une molécule est corrélée à une autre, comme cela a été montré avec le $\delta^{13}C$ du DPDS et du DPTS par exemple. L'ajout d'une molécule d'origine différente, qu'elle soit de synthèse, ou d'une autre origine botanique, peut ainsi être détecté. En effet, la composition isotopique de cette molécule ne sera plus liée avec les autres molécules de l'huile essentielle adultérée.

L'étude de la composition moléculaire des échantillons, réalisée en amont, est une nécessité pour authentifier les huiles essentielles. Associée aux ratios isotopiques ciblés, les différentes espèces des alliacées ont pu être discriminées. Les ratios isotopiques ciblées ne sont donc pas toujours suffisants, et doivent être combinés à d'autres techniques analytiques pour mettre en évidence des différences, telles que l'analyse de la composition, ou bien la détermination des rapports énantiomériques, si les molécules présentent des centres de stéréosélectivités.

La mise en évidence de l'origine géographique est également réalisable avec un suivi isotopique. L'expérimentation nécessite cependant d'analyser un plus grand nombre d'échantillons de différents terroirs, ce qui n'a pas pu être réalisé dans cette étude sur les alliacées. Cela demande en effet la création d'une banque de données conséquente qui prend en compte les variations isotopiques des différents millésimes sur plusieurs années. Une analyse isotopique ciblée de plusieurs métabolites est pertinente, car elle apportera beaucoup plus de garanties qu'une analyse globale. En effet, les différences entre échantillons de mêmes espèces, mais de lieux de récoltes différents, seront minimes en EA-C/P-IRMS.

CHAPITRE 4

EMPREINTES ISOTOPIQUES ET ÉNANTIOMÉRIQUES DES HUILES ESSENTIELLES : APPLICATION À L'HUILE ESSENTIELLE DE NÉROLI

Ce chapitre est en cours de publication :

Article 3

Determination of Enantiomeric and Stable Isotope Ratio Fingerprints of Active Secondary Metabolites of Neroli (Citrus aurantium L.) Essential Oils for Geographical and Purity Authentication Control

INTRODUCTION

Les huiles essentielles, composées d'un grand nombre de monoterpènes et de monoterpénoïdes, sont intéressantes en authentification, car il est alors envisageable d'établir des profils énantiomériques sur un nombre important de métabolites chiraux. La signature énantiomérique peut apporter de nombreuses informations sur la pureté et la naturalité des huiles essentielles analysées.

Combinées aux analyses isotopiques, l'établissement de profiling peut alors devenir un puissant outil d'authentification, et permettre de mettre en évidence des adultérations relativement difficiles à détecter, telles que des coupes entre différentes origines botaniques relativement proches. Il est également possible de discriminer géographiquement les échantillons.

Ce chapitre présente une étude des profils énantiomériques et isotopiques d'environ quinze métabolites issus des huiles essentielles de néroli.

ÉTUDE DE L'HUILE ESSENTIELLE DE NÉROLI

Les huiles essentielles de néroli sont obtenues à partir de la distillation à la vapeur d'eau des fleurs du bigaradier (*Citrus aurantium*).

Les compositions relatives des huiles essentielles de néroli et de petigrain sont listées dans le **Tableau 12**. La caractérisation des échantillons a été déterminée par analyse GC-FID sur colonne polaire (HP-Innowax), et colonne apolaire (HP-1). Au total, 90 échantillons (81 huiles essentielles de néroli, et 9 huiles essentielles de petitgrain), provenant de différentes origines géographiques, ont été analysés. Au total, 33 composés, représentant plus de 97% des échantillons, ont été identifiés. Ces huiles essentielles sont principalement composées de monoterpènes hydrocarbonés et de monoterpènes oxygénés.

Les composés principaux du néroli sont le linalol (31.82 – 42.06%), le limonène (9,94 – 14,26%), l'acétate de linalyle (3,84 – 12,27%), le β-pinene (4,02 – 14,27%), le (E) β-ocimene (4,11 – 7,62%), le (E) nérolidol (1,61 – 4.05%), le (E, E) farnésol (1.05 – 4,36%), et l'α-terpinéol (3,40 – 5,27%).Les compositions sont conformes avec la norme ISO 3517, et avec les compositions précédemment reportées dans la littérature (Ammar et al., 2012; Azanchi et al., 2014; Boussaada and Chemli, 2006).

Cette étude de composition montre des differences de composition relative entre les huiles essentielles d'origines géographiques différentes. Le linalol est la molécule la plus importante dans les échantillons originaires d'Egypte et du Liban, tandis que le β-pinene est plus concentré dans les huiles essentielles de néroli marocaines et tunisiennes. L'acétate de linalyle est présent à plus de 12% dans l'origine égyptienne, alors qu'il est seulement présent à environ 4% dans l'huile essentielle originaire du Maroc.

Les constituants principaux des huiles essentielles de petitgrain sont similaires aux huiles essentielles de néroli. La composition relative entre néroli et petitgrain est intrasèquement différente cependant, l'acétate de linalyle étant le constituant majoritaire des huiles essentielles de petitgrain (41,97%). Les huiles essentielles de néroli et de petitgrain partagent les mêmes composés, à l'exception notable des molécules azotées (indole et anthranilate de méthyle), qui sont uniquement reportées dans les huiles essentielles de néroli, ce qui est conforme avec les précédentes études réalisées sur les mêmes huiles essentielles (De Rovira, 2017; Grumezescu and Holban, 2017).

Tableau 12 : Composition des huiles essentielles de néroli et de petitgrain de différentes origines

Composés	RI HP1	RI Innowax	% Aire totale des pics (FID)					
			Maroc (n=26)	Liban (n=4)	Tunisie (n=16)	Egypte (n=22)	Espagne (n=11)	Petitgrain (n=9)
α-Thuyène	924	1037	0,04 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,01
α-Pinène	932	1037	0,97 ± 0,21	0,42 ± 0,12	0,93 ± 0,14	0,39 ± 0,05	0,35 ± 0,25	0,14 ± 0,05
Camphène	945	1088	0,07 ± 0,02	0,03 ± 0,01	0,07 ± 0,14	0,02 ± 0,01	0,03 ± 0,02	0,01 ± 0,00
Sabinène	966	1138	1,31 ± 0,24	0,80 ± 0,23	1,29 ± 0,38	1,78 ± 0,81	1,27 ± 0,82	0,47 ± 0,23
β-Pinène	972	1129	14,27 ± 3,26	8,05 ± 2,86	13,92 ± 1,72	4,02 ± 0,88	7,09 ± 4,31	1,29 ± 0,27
Myrcène	981	1177	2,02 ± 0,17	1,70 ± 0,15	2,24 ± 0,14	2,06 ± 0,22	1,27 ± 0,47	1,97 ± 0,42
α-Phellandrène	999	1185	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,04 ± 0,02	0,01 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,06 ± 0,10
δ-3-Carène	1007	1173	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,04 ± 0,04	0,12 ± 0,05	0,03 ± 0,03	0,05 ± 0,03
α-Terpinène	1011	1202	0,15 ± 0,05	0,06 ± 0,06	0,22 ± 0,03	0,14 ± 0,05	0,06 ± 0,06	0,05 ± 0,02
Para Cymène	1013	1295	0,04 ± 0,01	0,05 ± 0,04	0,03 ± 0,01	0,06 ± 0,04	0,06 ± 0,10	0,01 ± 0,01
Limonène	1023	1219	14,26 ± 1,84	10,17 ± 0,52	12,39 ± 1,04	9,94 ± 2,38	7,85 ± 2,06	4,87 ± 3,18
1,8 Cinéole + β-Phellandrène	1023	1229	0,25 ± 0,07	0,16 ± 0,04	0,33 ± 0,04	0,13 ± 0,02	0,15 ± 0,06	0,08 ± 0,01
(Z) β-Ocimène	1026	1250	0,82 ± 0,07	0,75 ± 0,08	1,10 ± 0,43	0,96 ± 0,17	0,86 ± 0,76	0,74 ± 0,12
(E) β-Ocimène	1037	1269	7,62 ± 0,54	6,34 ± 0,52	7,27 ± 0,21	4,11 ± 0,88	4,80 ± 1,07	2,23 ± 0,30
γ Terpinène	1050	1269	0,27 ± 0,14	0,13 ± 0,03	0,40 ± 0,20	0,24 ± 0,08	0,12 ± 0,07	0,06 ± 0,04
Oxyde de (Z) Linalol	1058	1463	0,10 ± 0,04	0,06 ± 0,00	0,13 ± 0,06	0,15 ± 0,05	0,14 ± 0,05	0,12 ± 0,02
Oxyde de (E) Linalool	1072	1491	0,04 ± 0,02	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,02	0,10 ± 0,05	0,14 ± 0,07	0,06 ± 0,01
Terpinolène	1080	1308	0,45 ± 0,07	0,41 ± 0,04	0,53 ± 0,07	0,42 ± 0,09	0,32 ± 0,09	0,39 ± 0,07
Linalol	1084	1561	33,09 ± 3,85	41,08 ± 1,51	31,82 ± 4,15	42,06 ± 2,42	31,14 ± 12,13	28,38 ± 3,35
Cyanade de benzyle	1089	1914	-	-	-	0,10 ± 0,03	-	-
Terpinène-4-ol	1162	1622	0,29 ± 0,10	0,19 ± 0,03	0,40 ± 0,13	0,40 ± 0,17	0,22 ± 0,22	0,14 ± 0,04
α-Terpinéol	1172	1715	3,40 ± 0,60	3,62 ± 0,24	3,65 ± 0,64	5,27 ± 0,93	2,94 ± 1,49	5,02 ± 0,50
Nérol	1210	1810	0,87 ± 0,10	1,02 ± 0,09	0,98 ± 0,22	1,43 ± 0,38	0,85 ± 0,21	1,15 ± 0,11
Néral	1215	1708	0,09 ± 0,03	0,03 ± 0,00	0,17 ± 0,08	0,07 ± 0,01	0,04 ± 0,04	0,03 ± 0,00
Géraniol	1233	1866	2,35 ± 0,27	2,72 ± 0,36	2,43 ± 0,27	3,51 ± 0,91	2,40 ± 0,63	2,95 ± 0,30
Acétate de inalyle	1240	1580	3,84 ± 1,78	6,52 ± 1,96	6,38 ± 4,55	12,27 ± 2,41	16,12 ± 8,48	41,97 ± 8,81
Géranial	1242	1760	-	-	-	-	-	0,04 ± 0,01
Indole	1252	2466	0,21 ± 0,06	0,26 ± 0,00	0,20 ± 0,14	0,13 ± 0,03	0,11 ± 0,13	-
Anthranilate de méthyle	1305	2281	0,19 ± 0,12	0,19 ± 0,08	0,19 ± 0,13	0,22 ± 0,19	0,10 ± 0,11	-
Acétate de néryle	1342	1746	1,40 ± 0,13	1,80 ± 0,12	1,37 ± 0,14	1,39 ± 0,26	2,45 ± 1,01	1,85 ± 0,12
Acétate de géranyle	1360	1776	2,70 ± 0,26	3,48 ± 0,19	2,67 ± 0,18	2,52 ± 0,62	4,54± 1,99	3,44 ± 0,22
(E) β-Caryophyllène	1419	1628	0,62 ± 0,12	0,58 ± 0,10	0,73 ± 0,30	0,80 ± 0,20	0,62 ± 0,51	1,21 ± 0,14
(E)-Nérolidol	1547	2056	4,05 ± 1,40	3,52 ± 0,52	2,19 ± 0,40	1,61 ± 0,40	5,51 ±2,81	0,10 ±0,01
(E, E) Farnésol	1701	2380	2,84 ± 1,41	4,36 ± 0,76	2,13 ± 0,80	1,05 ± 0,28	4,81 ± 3,70	-
Acétate de (E, E) farnesyle	1815	2285	-	0,13 ± 0,02	0,15 ± 0,02	0,02 ± 0,01	0,05 ± 0,03	-
Total identifié			98,68	98,70	97,30	97,63	96,35	98,85

Les compositions extrêmement proches entre néroli et petitgrain ne permettent pas d'identifier d'éventuels mélanges réalisés entre les deux huiles essentielles. Ces matrices sont riches en composés chiraux (α-thujene, α-pinene, camphene, β-pinene, δ-3-carene, α-phellandrene, limonene, β-phellandrene, linalool, linalyl acetate, terpinène-4-ol, α-terpinéol and (E) nerolidol), et de nombreuses molécules sont dans des concentrations suffisamment importantes pour pouvoir être analysés en GC-C/P-IRMS. La constitution et l'interprétation, de cette banque de donnée, sont décrites dans l'article présenté ci-après, qui est actuellement en révision avant publication.

Determination of Enantiomeric and Stable Isotope Ratio Fingerprints of Active Secondary Metabolites of Neroli (*Citrus aurantium* L.) Essential Oils for Geographical and Purity Authentication Control

Aurélien Cuchet[a,b,*]; Anthony Anchisi[b]; Frédéric Schiets[b]; Yohann Clément[b]; Pierre Lantéri[b]; Patrick Jame[b]; Elise Carénini[a]; Hervé Casabianca[b]

[a]*Albert Vieille SAS, 629 Route de Grasse, 06220 Vallauris, France*

[b]*Université de Lyon, CNRS, Université Claude Bernard Lyon 1, Institut des Sciences Analytiques, UMR 5280, 5 rue de la Doua, F-69100 Villeurbanne, France*

Abstract:

Neroli essential oil (EO), extracted from bitter orange blossoms, is one of the most expensive natural products on the market due to its poor yield and its use in fragrance compositions, such as cologne. Multiple adulterations of neroli EO are found on the market, and several authentication strategies, such as enantioselective gas chromatography (GC) and isotope ratio mass spectrometry (IRMS), have been developed in the last few years. However, neroli EO adulteration is becoming increasingly sophisticated, and analytical improvements are needed to increase precision. Enantiomeric and compound-specific isotopic profiling of numerous metabolites using multidimensional GC and GC-IRMS was carried out. These analyses proved to be efficient for geographical tracing, especially to distinguish neroli EO of Egyptian origin. In addition, δ2H values and enantioselective ratios can identify petitgrain EO adulteration. These results demonstrate that enantioselective and stable isotopic metabolite fingerprint determination is currently a necessity to control EOs.

Keywords: Isotope ratio mass spectrometry, Multidimensional gas chromatography, Enantioselective analysis, Stable isotope analysis, Neroli essential oil, Authentication

1. Introduction

The essential oil (EO) of neroli is produced via hydrodistillation or steam distillation of bitter orange (*Citrus aurantium* L.) blossoms. This EO is highly expensive due to its very low production yield (0.1%) (Peyron, 2002): at least one metric ton of fresh orange blossoms is required to produce only one kilogram of pure EO. The price of EO can fluctuate between 2,500 and 6,000 €/kg depending on the country and the year. The quantity of EO produced worldwide is estimated between 4.5 to 6.5MT per year. Neroli EO is nowadays an iconic product in the fragrance industry, due to its olfactive profile (Floral, orange blossom, green, methyl-like, and honeyed) in demand in the perfume industry (Berger, 2007). Many biological studies have reported neurotonic properties (Duval, 2012) and antimicrobial, antioxidant (Ammar et al., 2012; Dosoky and Setzer, 2018; Hsouna et al., 2013; Sarrou et al., 2013), anticonvulsant (Azanchi et al., 2014), analgesic and anti-inflammatory activities (Khodabakhsh et al., 2015) for this EO. Currently, this EO *(C. aurantium* L *ssp amara var. pumilla)* is mainly produced in Morocco, Tunisia, and Egypt but also in Spain, and Lebanon. The EO of another variety (*C. aurantium* L *ssp amara* var. *daidai)* is produced in China.

Adulteration is a common problem in the EO industry, especially with expensive EOs such as neroli. These adulterations are generally carried out to meet standard requirements, increase artificial EO quantities, or develop economic strategies. Orange blossom harvesting requires caution, and the production quality is a function of the weather and temperature conditions throughout the year. EO adulteration varies and alters the purity and naturalness of EOs. In the case of neroli EO, several known adulterations have been reported in the literature: blending with inexpensive EOs such as sweet orange EO (*Citrus sinensis*) (Dugo and Mondello, 2011), bitter orange EO (Dugo and Mondello, 2011), and petitgrain EO (König and Hochmuth, 2004); addition of synthetic components such as linalool and linalyl acetate; and dilution with vegetable oils or solvents, such as sunflower oil (Mbogning Feudjio et al., 2017) or ethanol (Singhal et al., 2001).

Typical identification and characterization techniques, such as gas chromatography (GC) quality control or olfactive panel tests, cannot always differentiate a natural molecule from various origins (species or geographical) or a natural molecule from its synthetic equivalent. EO authentication requires the combination of several advanced analytical techniques to accurately identify adulteration with high precision. Currently, several methods are commonly used, such as the determination of synthetic residual impurities and natural markers (Cuchet et al., 2019), enantioselective analyses (Nhu-Trang et al., 2006a), radiocarbon activity assessment (Cuchet et al., 2019; Gershon et al., 2019), and stable isotope analysis (Cuchet et al., 2021, 2019; Nhu-Trang et al., 2006a, 2006b; Pellati et al., 2013; Schipilliti et al., 2012b).

Enzymatic synthesis of asymmetric carbon molecules provides stereoselectivity. In most cases, one enantiomer is significantly in excess compared to the other enantiomer. However, organic synthesis will lead to a racemic mixture of both enantiomers. Adulteration of an EO can also be determined with a chiral study if some enantiomer proportions are reversed between the two EOs. Analysis of chiral molecules with enantioselective GC, monitored on cyclodextrin-based capillary columns, enables efficient determination of the enantiomeric ratios of compounds of interest. Chiral analysis is an effective tool to authenticate neroli EO purity. Several studies have been performed to determine the enantiomeric ratios of major metabolites in neroli EO, including linalool and linalyl acetate (Casabianca et al., 1998), α-pinene, β-pinene, limonene (Dugo and Mondello, 2011; Mosandl, 1995), and other components (Bonaccorsi et al., 2011b).

Isotope ratio mass spectrometry (IRMS) is another powerful tool used to highlight the addition of synthetic molecules to an EO, blending with another natural extract, or assessment of its geographical origin. GC – combustion/pyrolysis – IRMS (GC-C/P-IRMS) allows for the determination of compound-specific $\delta^{13}C$ and $\delta^{2}H$ isotope ratios. This analytical technique is especially useful in the EO field, which presents complex matrices with several metabolites in nonnegligible quantities. Several studies have reported GC-C/P-IRMS methodologies used to authenticate EOs, such as those of rose (Pellati et al., 2013), oregano and thyme (Nhu-Trang et al., 2006b), *Allium* species (Cuchet et al., 2021), lemongrass and citronella (Nhu-Trang et al., 2006a), and lemon (Schipilliti et al., 2012b). Several studies have also determined several secondary metabolites in neroli EOs, such as linalool and linalyl acetate (Hör et al., 2001), and other components (β-pinene, myrcene, limonene, terpinen-4-ol, α-terpineol, nerol, neryl acetate, geranyl acetate, β-caryophyllene, (E)-nerolidol, and (E)-(E)-farnesol) (Bonaccorsi et al., 2011b; Mosandl and Juchelka, 1997).

The present study aimed to assess the geographical origin of neroli EOs and to improve the purity authentication of neroli EO adulterations by providing chiral and isotopic data on many secondary metabolites to increase data banks and by use of chemometric analyses.

The first part of this study illustrates the use of these data to geographically discriminate neroli EO samples. Geographical traceability is relevant because an EO is defined by its extraction process, its species, and its location. Furthermore, prices vary with the geographical origin of harvest.

The second part of this study is a focus on the purity of neroli EO samples. Although EO naturalness can be easily authenticated by ^{14}C activity assessment or chiral studies, purity is much harder to detect, especially the addition of petitgrain EO, which is also manufactured from bitter orange. Petitgrain EO is obtained from the distillation process of bitter orange leaves and twigs. Neroli and petitgrain EOs are mainly composed of monoterpenic hydrocarbons and oxygenated monoterpenoids. The principal

components of neroli and petitgrain EOs are linalool, limonene, linalyl acetate, β-pinene, (E) β-ocimene, (E)-nerolidol, (E) (E) farnesol, and α-terpineol (Ammar et al., 2012; Azanchi et al., 2014; Boussaada and Chemli, 2006). Neroli and petitgrain EOs share similar compounds, except for nitrogen-containing trace compounds (indole and methyl anthranilate), which have only been reported in neroli EO (De Rovira, 2017; Grumezescu and Holban, 2017).

2. Materials and methods

2.1. Essential Oil Information

All studied samples (*C. aurantium* L *ssp amara var. pumilla*) were provided by Albert Vieille SAS (Vallauris, France). The traceability and provenance of the EOs were certified. Neroli EOs came from Morocco (26 samples), Lebanon (4 samples), Tunisia (16 samples), Egypt (22 samples), and Spain (11 samples) via several official producers. Petitgrain EOs were from Madagascar (3 samples) and Paraguay (6 samples). More information can be found in **Supplementary Table S1** including the year of production, harvest location details, the vegetative stage at time of harvest, and the extraction process.

2.2. Enantioselective Analyses

2.2.1. Sample Preparation

Two hundred microliters of each EO sample were settled on silica gel 60A (35-70 µm particle size, Carlo Erba Reagents, Val-de-Reuil, France). A primary fraction was collected by elution with 200 mL of pentane. This nonpolar fraction, largely composed of monoterpene and sesquiterpene molecules, was called Fraction 1. A second fraction was obtained by elution with 200 mL of diethyl ether. This polar fraction, mainly composed of alcohols and esters, was called Fraction 2. Fractions 1 and 2 were then evaporated with a rotary evaporator (Rotavapor R200, Büchi, Villebon-sur-Yvette, France) and diluted in 1 mL of hexane. This sample preparation was applied to dispose of 1-8 cineole from Fraction 1, which can interfere with limonene and β-phellandrene detection in Enantio-GC.

2.2.2. Multidimensional Gas Chromatography (MDGC) Analyses

MDGC analyses were performed on a 7890A GC gas chromatograph system (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) equipped with a flame ionization detector (FID) operating at a detector temperature of 250°C.

One microliter of each Fraction 1 was injected into the GC in split mode (120:1). Helium was used as the carrier gas with a constant inlet pressure of 26.4 psi. The flow rate was set to 0.7 mL/min in the

first column and 2 mL/min in the second column. Separation of volatile compounds was realized on an HP-1 primary capillary column (15 m* 0.200 mm* 0.5 µm, Agilent Technologies) combined with a Dean Switch system (heart cutting program) with a second Cyclosil β column (30 m * 0.250 mm * 0.25 µm, Agilent Technologies) coated with cyclodextrin stationary phase. The initial oven temperature was 55°C held for 15 min, followed by an initial increase at 1°C/min to reach a temperature of 85°C. An additional increase in temperature at 10°C/min was then applied to reach a final temperature of 200°C and held for 10 min. Enantiomeric ratios were determined for α-thujene, α-pinene, camphene, sabinene, β-pinene, α-phellandrene, δ-3-carene, limonene, and β-phellandrene, as reported in **Figure 1a**.

An aliquot 0.2 µL in volume of each Fraction 2 was injected into the GC in split mode (60:1). Helium was used as the carrier gas (18.8 psi applied inlet pressure). The flow rate was set to 0.7 mL/min in the primary column and 1.7 mL/min in the secondary column. Separation of volatile compounds was realized on an HP-1 column (15 m*0.200 mm*0.5 µm, Agilent Technologies) combined with a DEtTBuSilBetaCDX PS086 cyclodextrin stationary phase column (25 m*0.25 mm*0.25 µm, Mega, Legano, Italy) and a Dean Switch system (heart cutting program). The oven temperature program was as follows: the initial temperature was held at 60°C for 5 min, increased at a rate of 1°C/min to reach a temperature of 95°C, and held for 9 min. An additional increase at 1°C/min was applied to reach 150°C. Then, a final increase at 10°C/min was carried out to reach 200°C, which was held for 10 min. Enantiomeric ratios were determined for linalool, terpinen-4-ol, α-terpineol, linalyl acetate, and (E)-nerolidol, as reported in **Figure 1b**.

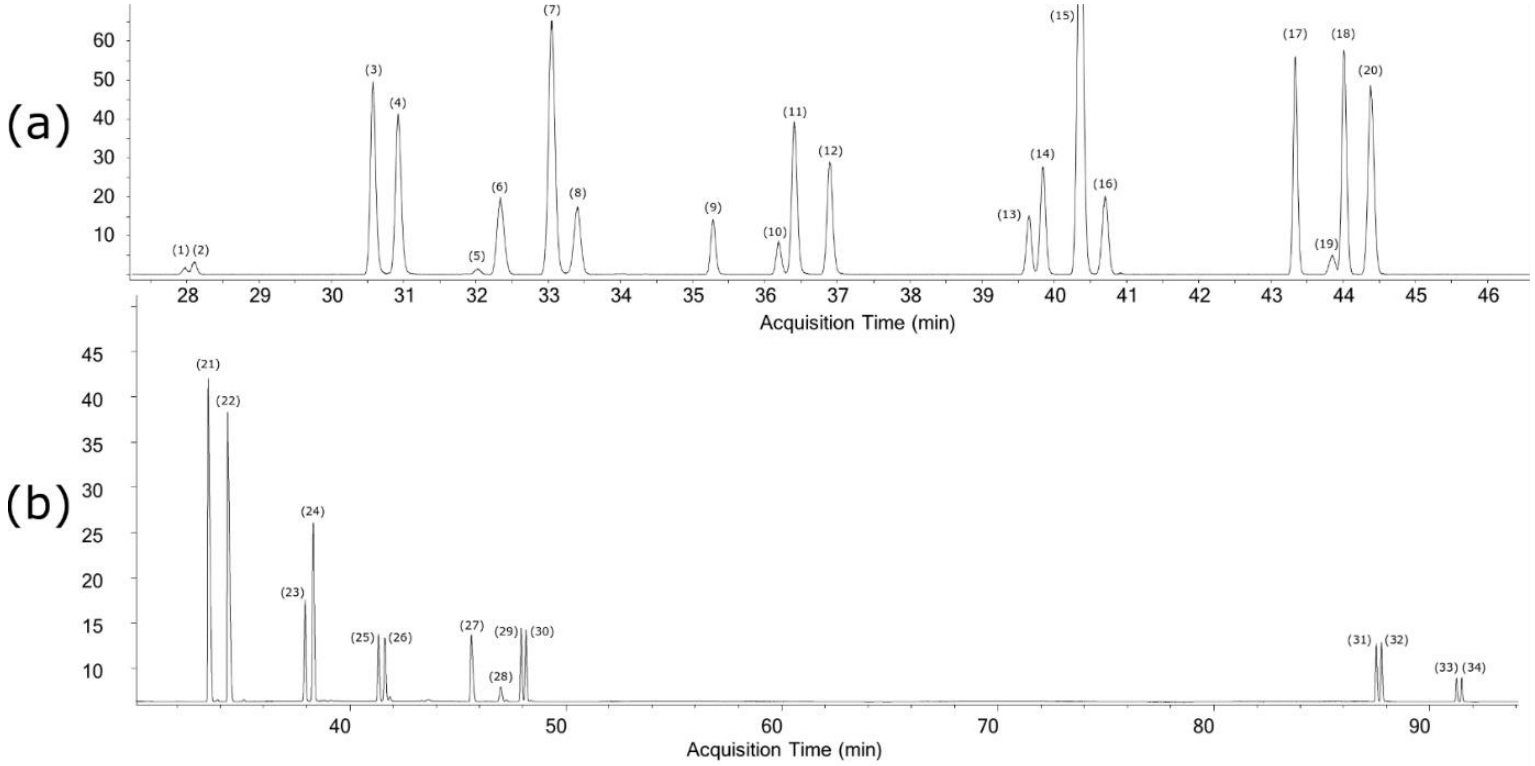

Figure 1. *(a) Second dimension chromatographic profile obtained with MDGC (Columns HP-1 15m*0.200mm*0.5um. combined by Dean Switch system with a second column Cyclosil Ɓ 30m*0.250mm*0.25um). This method enables the separation of 10 chiral metabolites: α-thujene 1(+), 2(-); α-pinene 3(-), 4(+); α-fenchene 5(+), 6(-); camphene 7(-), 8(+); sabinene 9(+), 10(-); Ɓ-pinene 11(+), 12(-); α-phellandrene 13(-), 14(+); δ-3-carene 15(+), 16(-); limonene 17(-), 18(+); Ɓ-phellandrene 19(-), 20(+). (b) Second dimension chromatographic profile obtained with MDGC (HP-1 column 15m*0.200mm*0.5um, combined by Dean Switch system, with a second column DEtTBuSilBetaCDX PS086 25m*0.25mm*0.25µm). This method enables the separation of 7 chiral metabolites: linalool 21(+), 22(-); borneol 23(-), 24(+); terpinen-4-ol 25(+), 26(-); α-terpineol 27(-), 28(+); linalyl acetate 29(+), 30(-). (Z)-nerolidol 31(+), 32(-); (E)-nerolidol 33(-), 34(+).*

2.3. Isotopic Analyses

2.3.1. Data Expression

Isotopic results are expressed in delta (δ) units according to the following formula (Brand et al., 2014):

$$\delta^{i}\mathrm{E} = \frac{({}^{i}\mathrm{R}_{Sample} - {}^{i}\mathrm{R}_{Reference})}{{}^{i}\mathrm{R}_{Reference}}$$

where i is the mass number of the heavy isotope of element E, R_{Sample} is the isotope ratio of the sample, and $R_{Reference}$ is the isotope ratio of a relevant internationally recognized reference material. The δ values were multiplied by 1000 and are expressed in units "per mil" (‰).

High-purity gases of carbon dioxide (99.998%, 4.8 Messer) and hydrogen (99.999%, 5.0 Messer) were used as the working reference gases injected with each sample. Helium (99.999% purity) was used as a carrier gas.

All studied metabolites in the EOs of interest were calibrated with a mixture of molecules (β-pinene, limonene, (E)-β-ocimene, linalool, linalyl acetate, α-terpineol, neryl acetate, geranyl acetate, nerol, geraniol, and (E)-nerolidol) purchased from Sigma Aldrich (Saint Louis, MO, USA) and TCI (Tokyo, Japan). These molecules were previously calibrated against international standards in elemental analysis – combustion/pyrolysis – IRMS (EA-C/P-IRMS).

International reference materials IAEA CH7 (polyethylene foil: $\delta^{13}C$ (‰) -32.15, $\delta^{2}H$ (‰) -100) and USGS40 (L-glutamic acid: $\delta^{13}C$ (‰) -26.39), supplied by the International Agency of Atomic Energy (IAEA, Vienna, Austria), were used to calibrate each molecule in the mixture, which allowed us to express our $\delta^{13}C$ results relative to the Vienna Pee Dee Belemnite (V-PDB) scale and our $\delta^{2}H$ results relative to the Standard Mean Ocean Water (V-SMOW) scale. Each sample was analyzed versus a monitoring gas for which two pulses were admitted with each analyte. All sample values were analyzed in duplicate and verified by bracketing the analytical sequence with international reference materials every six analyses. The $\delta^{13}C$ values are expressed within a maximum standard deviation of ± 0.28‰ and those of $\delta^{2}H$ within SD = ± 5‰. $\delta^{13}C$ isotopic analyses of the standards molecules were conducted using a Flash HT elemental analyzer connected to a Delta V Plus via a Conflo V interface. The $\delta^{2}H$ measurements were carried out using a TC-EA elemental analyzer linked to a Delta V Plus via a Conflo V interface (all Thermo Fisher Scientific). The method is fully explained in a previous study (Cuchet et al., 2019).

2.3.2. Gas Chromatography - Mass Spectrometry - Combustion/Pyrolysis - Isotope Ratio Mass Spectrometry (GC-MS-C/P-IRMS)

The $\delta^{13}C$ and $\delta^{2}H$ values of targeted neroli and petitgrain EO metabolites were determined by GC-C/P-IRMS using a GC Trace 1310 simultaneity connected to an ISQ MS quadrupole mass spectrometer and to a Delta V Plus isotope ratio mass spectrometer via a GC Isolink II interface. (Thermo Fisher, Bremen, Germany). This equipment enabled the identification of compounds via the ISQ MS instrument and specific compound isotopic ratio measurements of $\delta^{13}C$ and $\delta^{2}H$ via IRMS. Isotopic ratios were determined for β-pinene, limonene, (E)-β-ocimene, linalool, linalyl acetate, α-terpineol, neryl acetate, geranyl acetate, nerol, geraniol and (E)-nerolidol.

One microliter of diluted EO (1 µL into 100 µL of ethanol) was injected using a Tri Plus RSH autosampler in a Trace 1310 gas chromatograph equipped with an Agilent HP-Innowax column (60 m * 0.250 mm * 0.50 µm internal diameter film thickness) used for chromatographic separation. The injection port was held at 250°C, fitted with a split liner containing glass wool and operated in split mode (120:1 for linalool and linalyl acetate assessment, 10:1 for the other compounds). The oven temperature program started at 60°C for 2 min, increased to 100°C at a rate of 2°C/min, increased to 150°C at a rate of 5°C/min, increased to 200°C at a rate of 2°C/min, and increased to 260°C at a rate of 1°C/min (which was for 5 min). Components were separated at a flow rate of 1.2 mL/min and divided in 2 ways using a Sil Flow connector.

The combustion of carbon in carbon dioxide was achieved using an alumina tube containing nickel oxide maintained at 1000°C in a furnace. Pyrolysis of the sample for ^{2}H measurement in H_2 was carried out at a high temperature (1400°C) using an alumina conversion tube (Thermo Fischer Scientific). Undecane, $C_{11}H_{24}$ (Sigma Aldrich), was regularly added to regenerate the alumina pyrolysis tube.

2.4. Statistical analysis

Multivariate statistical analyses were performed using R version 4.0.3 (R Core Team, Vienna, Austria)(R Core Team, 2020) with corrplot (Wei and Simko, 2017) , ropls (Thévenot et al., 2015), Factoextra (Kassambara and Mundt, 2020), and FactoMiner (Lê et al., 2008) packages. The Pearson correlation test was carried out to determine pairwise correlations between isotope ratio values. Univariate analysis was realized to determine significant differences between species, within a confidence level $p\text{-value} < 0.05$.

For multivariate data analyses, data were first analysed with unsupervised method such as principal component analysis (PCA) (Jolliffe, 2002) and clustering. PCA was used in this study to describe and to assess the quality and homogeneity of the 90 samples of interest (81 neroli EO and 9 petitgrain EO).

Supervised methods were then carried out, including orthogonal partial least square– discriminant analysis (OPLS-DA), to link models and variables responsible for the separation observed on the unsupervised method (Tenenhaus, 1998).

A 7-fold stratified cross validation was repeated 50 times to avoid overfitting the small number of data-points. Features were ranked according to the variable importance projection (VIP) from OPLS-DA. S-plot verifies the selectivity and the specificity of the selected features. The model's quality was evaluated based on the residuals (R^2X, R^2Y) and the models predictive ability parameter (Q^2_{cum}) (Levet et al., 2013). The statistical significances of models were also assessed using confusion matrix.

3. Results and discussion

3.1. Enantiomeric Ratio Fingerprint

3.1.1. Neroli Essential Oils

Enantiomeric ratio determination was conducted in this study to minor chiral compounds in neroli EOs to obtain a complete enantiomeric signature of the studied EOs to improve authentication. This study was achieved using a MDGC approach. This technique was previously applied to authenticate other EOs, such as rosemary EO (Mondello et al., 2006). Thirteen chiral components were identified in the EO: α-thujene, α-pinene, camphene, β-pinene, δ-3-carene, sabinene, limonene, β-phellandrene, linalool, linalyl acetate, terpinen-4-ol, α-terpineol, and (E)-nerolidol.

The results are depicted in **Table 1**. The neroli EOs from Morocco, Tunisia and Lebanon showed the same chiral profile: α-thujene, α-pinene, camphene, sabinene, β-pinene, δ-3-carene, β-phellandrene, linalool, linalyl acetate, and terpinen-4-ol all had levorotary (-) forms in excess; and limonene, α-terpineol, and (E)-nerolidol were predominantly dextrorotary (+). The α-pinene, β-pinene, limonene, linalool, linalyl acetate, terpinene-4-ol, α-terpineol and (E)-nerolidol chiral results were consistent with those of previous enantioselective studies of neroli EOs (Casabianca et al., 1998; Dugo and Mondello, 2011; Mosandl, 1995).

Several samples from Egypt featured different chiral signatures: racemization of α-pinene and β-phellandrene was observed, and reversions of sabinene and terpinen-4-ol enantiomer amounts were also detected. These results were in good correlation with those found in the literature (Bonaccorsi et al., 2011b), except for a contradiction with the α-terpineol enantiomeric ratio previously indicated in

the literature, as we reported the R enantiomer as the major enantiomer. These results suggest differences in varieties between neroli EO samples from Egypt and other geographical origins. One hypothesis, based on our harvested area data, would be that several neroli EOs originating from Egypt were harvested from flowers of a citrus hybrid *aurantium x sinensis*. Sweet orange *Citrus sinensis* cultivars are the most widely grown among *Citrus* species in Egypt (accounting for 69% of the total cultivated area) (Abobatta, 2019) and bitter orange *Citrus Aurantium* tree is the main C*itrus* rootstock used in Egypt.

Several enantiomeric discrepancies were detected for minor compounds (α-pinene, sabinene, terpinen-4-ol, and β-phellandrene), which were all present at less than 2% of the total composition of neroli EOs. Differences between neroli EOs of Egyptian and other origins would have been undetected if only chiral analyses of major compounds were conducted. This highlights the interest in carrying out a complete enantiomeric profiling approach to authenticate EOs. These results are compelling, as neroli EOs from Egypt also present perceptible olfactive profiles. Indeed, EO is fresher, lemony, and less methylated than Morocco origin and more green and less honeyed than Tunisian.

3.1.1. Petitgrain Essential Oils

Petitgrain EO is a common adulterant in neroli EO. This adulteration can be unintentional if producers are not meticulous enough during harvest, as they must harvest only flowers of *C. aurantium* and not the leaves. It can be tricky to detect such adulterations, as major compounds, including linalool and linalyl acetate, are similar between the two types of hydrodistilled *C. aurantium* EOs. Enantiomeric fingerprints of chiral metabolites can also highlight EO blending. Several studies have established chiral databases on petitgrain, sweet, and bitter orange EOs (Bonaccorsi et al., 2011a; Dugo and Mondello, 2011; Mosandl, 1995). By comparison with chiral data for sweet orange and bitter orange EOs, adulteration of neroli EO can be detected. However, literature databases suggest that the petitgrain chiral profile is similar to that of neroli.

The petitgrain EO chiral signature is detailed in Table 1. Enantiomeric ratios were determined in 9 samples from Madagascar and Paraguay. α-Pinene, β-pinene, limonene, linalool, linalyl acetate, terpinen-4-ol, and α-terpineol chirality were consistent with previous investigations (Dugo and Mondello, 2011; Juchelka et al., 1996; Mosandl, 1995).

Table 1: *Enantiomeric distribution of chiral secondary metabolites of neroli and petitgrain essential oils from different geographical origins: Morocco, Tunisia, Lebanon, Egypt, Spain, Madagascar, and Paraguay.*

Essential oil type	Geographical origin	Number of Samples	Enantiomeric distribution (%)																							
			α-Thujene S-(+)		α-Pinene S-(-)		Camphene 1S, 4R-(-)		Sabinene S-(-)		β-Pinene S-(-)		δ-3-Carene 1S-(+)		Limonene S-(-)		β-Phellandrene S-(+)		Linalool S-(+)		Terpinen-4-ol S-(+)		α-Terpineol S-(-)		Linalyl Acetate S-(+)		(E)-Nerolidol S	
			Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Neroli	Morocco	26	0,0	0,0	87,9	2,5	98,6	1,0	93,3	6,9	99,2	1,9	0,6	2,9	1,9	1,0	25,8	10,8	26,7	1,4	35,7	1,8	30,8	1,3	1,9	0,9	98,6	0,4
Neroli	Tunisia	16	3,3	6,9	88,9	3,1	97,9	1,3	79,5	16,4	99,1	1,0	9,6	16,6	2,6	0,9	23,6	14,0	23,0	1,3	40,4	5,2	31,9	0,9	1,2	0,4	98,2	0,4
Neroli	Lebanon	4	0,0	0,0	90,8	2,6	100,0	0,0	95,4	0,8	99,8	0,1	11,3	22,7	1,7	0,3	27,3	15,2	20,7	1,2	36,6	1,4	30,0	0,4	1,4	0,4	98,8	0,2
Neroli	Egypt	22	23,4	26,7	65,9	9,6	94,3	6,1	24,9	20,8	94,6	17,3	0,3	1,1	2,5	0,6	53,1	18,1	18,6	4,0	59,8	6,2	32,5	6,2	0,7	0,1	97,5	1,5
Neroli	Spain	11	12,0	26,7	86,5	9,5	97,7	3,5	77,1	30,9	99,5	0,8	0,0	0,0	2,2	0,8	40,0	18,3	28,2	3,4	42,7	9,9	29,7	2,5	1,4	0,3	98,4	1,0
Petitgrain	Madagascar	3	0,0	0,0	92,7	3,0	100,0	0,0	92,0	0,6	98,2	0,9	0,0	0,0	9,2	2,8	18,3	16,7	24,4	4,3	30,9	7,8	27,6	1,2	0,4	0,3	81,0	5,5
Petitgrain	Paraguay	6	5,5	6,1	81,0	4,4	100,0	0,0	73,9	27,7	98,4	0,6	0,9	0,8	24,0	2,3	53,5	4,9	28,1	3,4	42,3	10,2	27,0	0,2	0,4	0,2	77,0	6,2

No significant differences were observed between petitgrain and neroli profiling, except for limonene and nerolidol (+) forms, which were less predominant in the petitgrain profile than in the neroli profile. Enantiomeric profiles of petitgrain and neroli EOs are not sufficiently distinct to highlight an addition of petitgrain EO in neroli EO. A complementary analysis is required to detect such adulteration.

3.2. $\delta^{13}C$ and $\delta^{2}H$ Isotopic Composition

Multiple isotope (^{13}C and ^{2}H) analysis of multiple components results in a large amount of information about the samples: compound-specific isotope analysis with GC-C/P-IRMS enables the assessment of the complete isotope fingerprint of neroli EO samples via determination of the $\delta^{13}C$ and $\delta^{2}H$ ratios of major metabolites.

Carbon isotope ratios are dependent on the metabolic pathways for carbon fixation in photosynthesis. *C. aurantium* is a C3 plant (Calvin cycle (Calvin and Bassham, 1962)). Its $\delta^{13}C$ is between -20 and -33 ‰ (O'Leary, 1988). By comparison, a C4 plant (Hatch and Slack pathway (Hatch and Slack, 1970)), such as lemongrass (Nhu-Trang et al., 2006a), has a $\delta^{13}C$ value slightly more positive, between -9 and -16 ‰ (van Leeuwen et al., 2014). The $\delta^{13}C$ stable isotopic ratios of several metabolites of the samples are detailed in **Table 2**. These values are in line with the C3 plant range stated in the literature. The results were also consistent with those of previous $\delta^{13}C$ analyses conducted with neroli EOs (Bonaccorsi et al., 2011b). Furthermore, the results were not significantly different among geographical origins. It was expected that all the samples were neroli EOs and came from the same *C. aurantium* natural plant variety.

Hydrogen isotopic ratios are predominantly influenced by the geographical origin of a plant due to the hydrological cycle (Hoefs, 2018), resulting in $\delta^{2}H$ being dependent on the geographical area. Neroli EO $\delta^{2}H$ values are detailed in **Table 3**. Several differences were observed among the different geographical origins. It is important to note that the samples from Egypt were different than other samples, with mean $\delta^{2}H$ values higher than those of samples with other origins. According to Hör et al. (2001) (Hör et al., 2001), neroli EOs have $\delta^{2}H$ values (measured in 4 samples) ranging between -234‰ and -253‰ for linalool and -270‰ and -272‰ for linalyl acetate. In this study, $\delta^{2}H$ values of the 86 samples were higher than the previously reported values, with mean values between -200‰ (Egypt) and -214‰ (Tunisia) for linalool and between -218‰ (Egypt) and -240‰ (Tunisia) for linalyl acetate.

In conclusion, compound-specific stable isotopic data are relevant because they provide a stable isotopic fingerprint that provides geographical information, as the samples from Egypt were clearly different than those from Morocco, Lebanon, and Tunisia.

Table 2: *Stable isotope $\delta^{13}C$ and $\delta^{2}H$ distribution of secondary metabolites of neroli and petitgrain essential oils from different geographical origins: Morocco, Tunisia, Lebanon, Egypt, Spain, Madagascar, and Paraguay.*

Essential oil type	Geographical origin	Number of Samples	Isotopic Distribution (‰)																	
			β-Pinene $\delta^{13}C$		Limonene $\delta^{13}C$		Linalool $\delta^{13}C$		Linalyl Acetate $\delta^{13}C$		α-Terpineol $\delta^{13}C$		Neryl Acetate $\delta^{13}C$		Gernayl Acetate $\delta^{13}C$		Nerol $\delta^{13}C$		Geraniol $\delta^{13}C$		(E) Nerolidol $\delta^{13}C$	
			Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Neroli	Morocco	26	-26,32	0,97	-26,77	1,20	-25,47	0,95	-25,08	1,19	-26,64	1,90	-27,96	0,88	-26,77	0,98	-26,35	1,13	-26,58	0,78	-29,64	2,05
Neroli	Tunisia	16	-26,99	2,32	-27,33	1,02	-26,03	0,47	-26,15	1,23	-26,99	2,19	-29,30	2,01	-28,87	1,31	-27,39	1,36	-28,09	2,33	-30,65	2,45
Neroli	Lebannon	4	-26,99	1,08	-27,83	0,63	-26,37	0,65	-25,54	0,35	-28,10	1,69	-28,41	0,42	-27,38	0,60	-27,18	0,51	-27,19	0,75	-29,44	0,65
Neroli	Egypt	22	-26,71	1,57	-27,54	1,19	-25,96	0,88	-26,35	0,84	-27,88	1,54	-28,68	0,77	-27,67	0,89	-26,45	1,70	-27,02	1,00	-29,03	0,73
Neroli	Spain	11	-27,29	0,87	-28,31	0,94	-26,85	0,35	-27,54	1,24	-28,39	0,72	-28,99	0,72	-28,42	0,61	-27,17	0,80	-28,63	1,48	-27,98	1,17
Petitgrain	Madagascar	3	-28,01	1,31	-35,52	0,60	-29,73	0,21	-29,43	0,36	-28,31	0,08	-33,80	1,14	-33,38	0,82	-27,98	3,07	-30,77	0,47	N/A	N/A
Petitgrain	Paraguay	6	-31,51	2,92	-34,21	2,97	-29,48	0,23	-28,40	0,57	-28,21	1,68	-34,20	0,51	-32,89	0,85	-28,62	1,37	-31,99	1,16	N/A	N/A

Table 3: *Stable isotope $\delta^{13}C$ distribution of secondary metabolites of neroli and petitgrain essential oils from different geographical origins: Morocco, Tunisia, Lebanon, Egypt, Spain, Madagascar, and Paraguay.*

Essential oil type	Geographical origin	Number of Samples	Isotopic Distribution (‰)																	
			β-Pinene $\delta^{2}H$		Limonene $\delta^{2}H$		Linalool $\delta^{2}H$		Linalyl Acetate $\delta^{2}H$		α-Terpineol $\delta^{2}H$		Neryl Acetate $\delta^{2}H$		Geranyl Acetate $\delta^{2}H$		Nerol $\delta^{2}H$		Geraniol $\delta^{2}H$		(E) Nerolidol $\delta^{2}H$	
			Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Neroli	Morocco	26	-213	12	-221	12	-210	7	-223	24	-224	12	-210	9	-203	14	-196	11	-201	11	-102	8
Neroli	Tunisia	16	-214	12	-223	8	-210	6	-237	17	-228	15	-208	11	-204	10	-189	9	-204	15	-106	8
Neroli	Lebannon	4	-218	4	-229	5	-209	7	-227	3	-222	5	-202	8	-203	16	-198	7	-205	4	-103	4
Neroli	Egypt	22	-208	32	-216	17	-199	16	-217	15	-217	14	-187	16	-182	9	-177	15	-188	9	-84	11
Neroli	Spain	11	-211	6	-212	21	-210	16	-220	32	-223	7	-214	11	-205	12	-198	17	-194	10	-101	14
Petitgrain	Madagascar	3	-212	15	-217	3	-219	5	-212	6	-239	3	-221	3	-229	2	-271	14	-220	1	N/A	N/A
Petitgrain	Paraguay	6	-205	4	-239	10	-239	5	-240	8	-255	4	-240	5	-241	4	-291	12	-232	17	N/A	N/A

3.3. Chemometric Analyses

3.3.1. Geographical Origin Authentication

Principal component analysis (PCA) was carried out on the entire sample data set (83 samples of neroli), with 33 parameters as variables (enantiomeric ratios and $\delta^{13}C$ and $\delta^{2}H$ isotopic ratios) to obtain a visual representation of the collected data (**Figure 2a**). Two different clusters could be observed: one comprising neroli EOs from Morocco, Lebanon, and Tunisia, and another including neroli EOs from Egypt. Most Spanish samples were in the first cluster, but two commercial samples were found in the second cluster. These results suggest adulteration in terms of origin: these EOs were probably of Egyptian origin and were mislabeled with Spain origin. The Moroccan and Tunisian samples were also slightly separated from each other.

Hierarchical clustering was then realized to distinguish the clusters with more accuracy. This clustering technique calculates the difference in distance between each sample. The cluster plot (**Figure 2b**) helps to distinguish three different clusters: one comprising samples from Spain, Morocco, Tunisia, and Lebanon (Cluster 1) and two clusters including samples from Egypt (Clusters 2 and 3). Both Egyptian clusters corresponded to different providers. Geographical location differences might explain these differences: Cluster 2 includes only samples from the specific Egyptian region of Gharbia Governorate, whereas Cluster 3 regroups other samples from Egypt.

As described in **Supplementary Table S1**, neroli essential oils were extracted from two different several processes: steam distillation and hydrodistillation. Based on the clustering, the extraction process does not affect the enantiomeric and isotopic compositions, as no differences were observed between steam distilled and hydrodistilled samples. The vegetative stage at time of harvest, the type of resources (wild or cultivated flowers), and the year of production do not impact chirality and isotopy of neroli EO metabolites too.

This study highlights the differences in quality between Egyptian and other neroli EOs. Authentication criteria need to be different among the two groups of EO samples to avoid misinterpreting analytical results from Egypt samples.

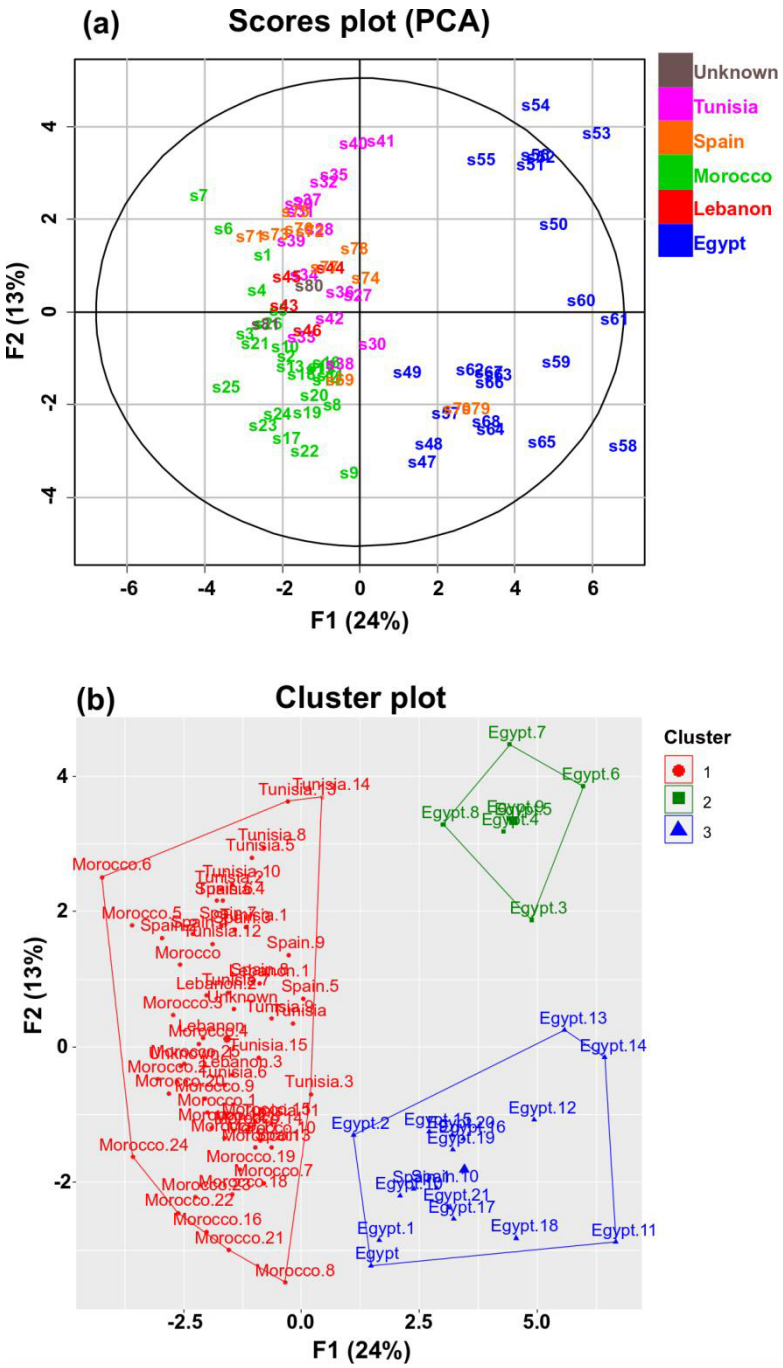

Figure 2. *(a) Score plot of principal component F1 (24%) and F2 (13%) of Principal Component Analysis (PCA) model developed from enantiomeric ratio percentages and* $\delta^{13}C$ *and* $\delta^{2}H$ *compound specific isotope analysis (CSIA) values determined on neroli essential oils from different geographical origins: Morocco (in green), Egypt (in blue), Tunisia (in pink), Lebanon (in red), and Spain (in orange). Samples with unknown geographical origins are represented in grey. Clusters are represented via (b) hierarchical cluster plot. Cluster 1 (in red) includes Moroccan, Lebanese, Tunisian, and most Spanish samples. Cluster 2 (in green) includes only Egyptian samples. Cluster 3 (in blue) comprises some Egyptian and two Spanish samples.*

3.3.2. Purity Authentication

An additional PCA process was realized, this time including petitgrain samples. **Figure 3a** depicts the score plot of the principal components F1 and F2, which accounted for 49% of the total variance in the data. Differences between neroli and petitgrain EOs were successfully visualized.

Orthogonal partial least squares – discriminant analysis (OPLS-DA) was conducted to identify discriminant variables. This model was built from all samples using all parameters. The projection of the individual samples is represented in **Figure 3b**: neroli and petitgrain are significantly separated on the OPLS-DA score plot. The S-Plot visualization represented in **Figure 3c** highlights discriminant variables. The S-plot represents the variable confidence (correlation) against the variable contribution (covariance). Variables with the highest contributions and reliability are δ^2H stable isotope values, including nerol, geranyl acetate, geraniol, and α-terpineol. The geographical origins of petitgrain samples (Madagascar, Paraguay) probably affecting this discrimination, but this large isotopic fractionation is also explained by the differences between leaves and flowers. (E)-Nerolidol and limonene enantiomeric distributions also present high contributions. The $\delta^{13}C$ parameter did not seem to contribute to clustering based on this S-Plot representation.

Finally, petitgrain was added to the Moroccan neroli EO samples. Three levels of adulteration were applied (10%, 20%, and 50% adulteration). PCA (**Figure 4**) was then performed to observe the effects of this addition on the data. Since neroli EOs presented geographical variations, as seen earlier, only Moroccan samples were represented. As observed in the figure, adulterated samples were no longer in the neroli cluster. Even 10% adulteration can be detected with the determination of enantiomeric and stable isotope ratio fingerprints of the major metabolites of neroli EO.

This study shows the importance of determining the most complete enantiomeric and isotopic signature to investigate adulterations, especially if the matrices are similar to those of neroli and petitgrain EOs.

Acknowledgments

This work was conducted in partial fulfilment of the PhD requirements for Aurélien Cuchet who received a grant from the Association Nationale de la Recherche et de la Technologie (ANRT, Paris, France). The research was supported by a contract between Albert Vieille SAS and ISA (Institut des Sciences Analytiques, Villeurbanne, France).

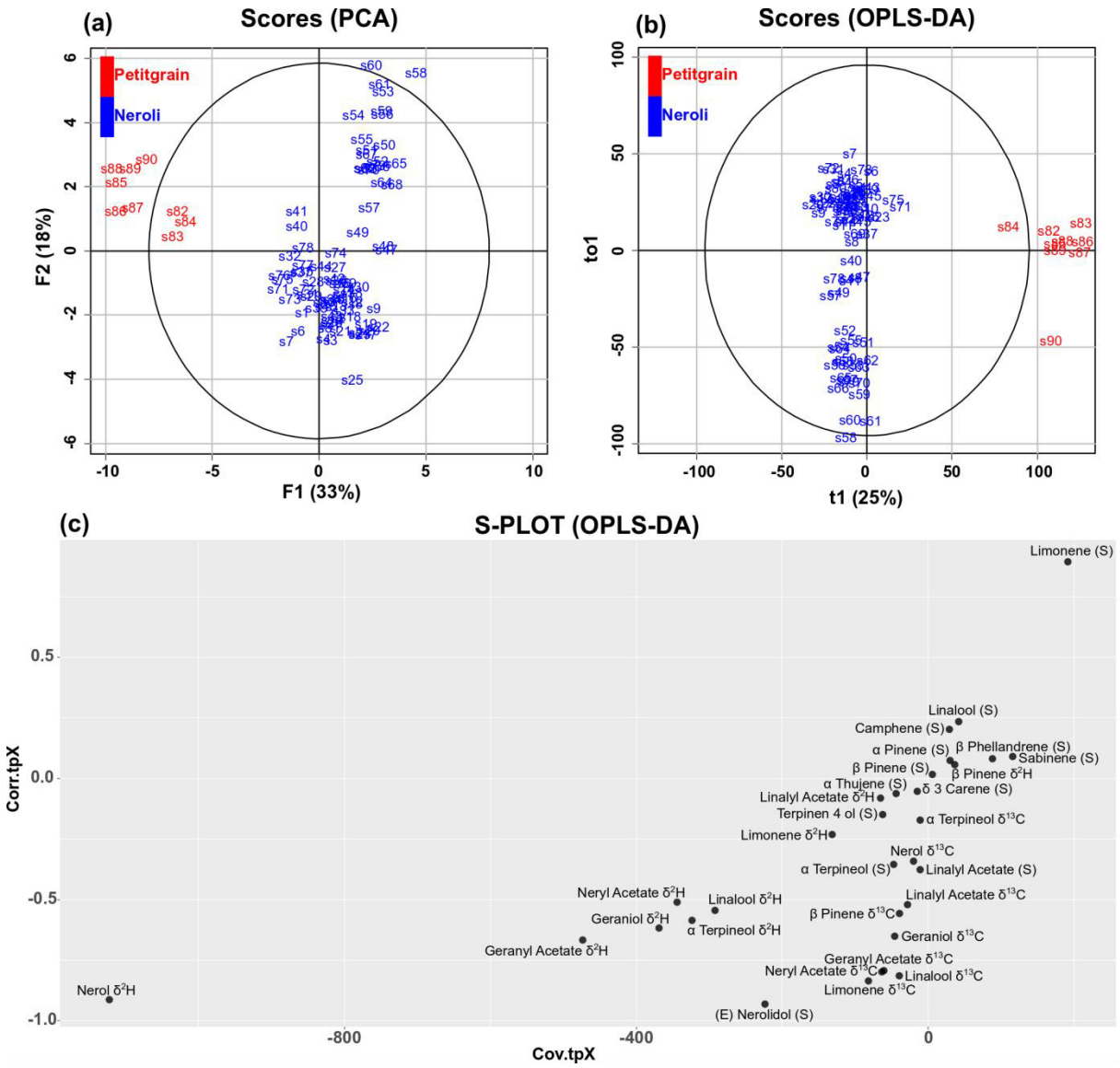

Figure 3. *(a) Score plot of principal component F1 (33%) and F2 (18%) of Principal Component Analysis (PCA) model developed from enantiomeric ratio percentages and $\delta^{13}C$ and $\delta^{2}H$ compound specific isotope analysis (CSIA) values determined on neroli (in blue) and petitgrain (in red) essential oils. (b) Orthogonal Partial Least Square – Discriminant Analysis (OPLS-DA) score plot of enantiomeric ratio percentages and $\delta^{13}C$ and $\delta^{2}H$ CSIA values. (c) OPLS-DA loadings S-Plot. This representation shows the correlation against the covariance.*

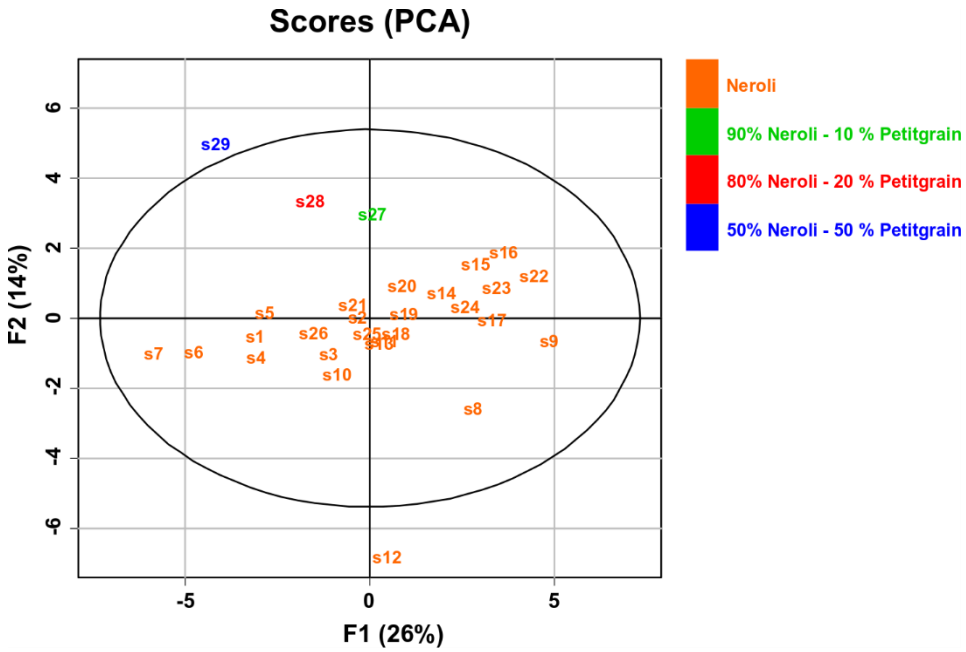

Figure 5. Principal Component Analysis representation of the addition of petitgrain in neroli essential oil. Three levels of adulteration were undertaken: 10% (green), 20% (red), and 50% (blue) additions of petitgrain in 100% pure and natural Moroccan neroli essential oils (Samples represented in orange).

CONCLUSION

Les travaux réalisés sur l'huile essentielle de néroli ont permis de mettre en évidence l'intérêt d'utiliser simultanément les analyses énantiomériques et isotopiques pour authentifier aussi bien l'origine géographique, que l'origine botanique de l'huile essentielle.

Cette étude est reproductible sur d'autres espèces présentant des profils chromatographiques similaires, c'est-à-dire riches en monoterpènes et monoterpénoïdes chiraux. En effet, l'établissement de banques de données énantiomériques et isotopiques des différents métabolites principaux de chaque huile essentielle d'intérêt permettra l'authentification botanique et géographique, qui nécessite un grand nombre de données authentiques sur de multiples variables pour aboutir à des discriminations.

Durant ces travaux de thèse, de nombreuses banques de données énantiomériques et isotopiques ont été construites sur diverses huiles essentielles. Il est possible de citer non exhaustivement les huiles essentielles d'aneth, d'angélique, de baies roses, de cardamome, de ciste de cyprès, d'élémi, d'eucalyptus, de galbanum, de génévrier, de laurier, de shiu, de marjolaine, de muscade, d'origan, d'osmanthus, de pins, de poivre noir, de romarin, de santal, de sauge sclarée ou encore de tea tree. Ces banques de données, à l'état de construction, permettent différents contrôles. Par exemple, les huiles essentielles de poivre noir peuvent être différentiées géographiquement, ou encore de mettre en évidence des coupes entre huiles essentielles d'eucalyptus globuleux et romarin type 1,8 cinéole.

Les fraudes se complexifient petit à petit, ce qui complique les contrôles d'authenticité. Ces travaux mettent en exergue l'importance de collecter un grand nombre de données pour mettre en évidence des anomalies qui n'auraient pu être décelées par un simple contrôle de routine.

CHAPITRE 5

DÉVELOPPEMENT DE MÉTHODOLOGIES COMPLÉMENTAIRES $\delta^{18}O$ EN GC-P-IRMS POUR LA MISE EN ÉVIDENCE D'ADULTÉRATIONS COMPLEXES

INTRODUCTION

La demande en matières premières aromatiques naturelles est de plus en plus importante pour alimenter l'industrie agroalimentaire, la parfumerie ou les cosmétiques. Pour satisfaire cet accroissement, la recherche s'est orientée vers la biotechnologie, permettant de produire des arômes et des fragrances par d'autres origines végétales. Mais les conséquences de ces diversifications peuvent entrainer de nouvelles fraudes sophistiquées. Les adultérations que l'on retrouve sur le marché sont en constantes évolutions, et il n'est pas rare aujourd'hui d'observer des ajouts de molécules obtenues par des procédés biotechnologiques. Ces nouveaux procédés permettent de créer des molécules en apparence naturelle. Dans le domaine des arômes, il est possible de citer l'exemple de la vanilline, qui peut être obtenue à partir d'acide férulique (Perini et al., 2019), ou de la frambinone (Berger, 2015), la production mondiale de framboise ne permettant de produire de quantité suffisante de frambinone.

Les composés dits d'hémisynthèses, c'est-à-dire des molécules produites à partir de réactifs naturels, sont suspectées d'être utilisées pour adultérer certaines huiles essentielles. Quelques exemples sont cités dans la littérature, tels que la molécule de carvacrol, obtenue à partir de la carvone d'une huile essentielle de carvi, ajoutée à une huile essentielle d'origan (Greule et al., 2008), ou le cinnamaldéhyde, réalisé à partir de benzaldéhyde d'amande amère, ajouté à une huile essentielle de cannelle (G. Remaud et al., 1997). Ces procédés ne correspondent pas à de la biotechnologie naturelle. Dans le domaine des huiles essentielles, les molécules doivent provenir de la matière première de référence pour être considérées comme étant pures et naturelles. Ces hémisynthèses, réalisées à partir d'autres huiles essentielles, permettent aux fraudeurs de contourner de nombreuses méthodes analytiques.

Une huile essentielle qui aura subi un ajout d'une molécule issue d'un processus d'hémisynthèse sera plus difficile à détecter. Les analyses énantiomériques ne seront pas efficaces, dans le cas où la chiralité est similaire, car la stéréochimie sera conservée. Les analyses de détermination de l'activité du radiocarbone ne permettront pas de révéler cet ajout. En effet, la composition en carbone biosourcée sera préservée, si tous les réactifs utilisés sont d'origine naturelle. De plus, les analyses isotopiques du carbone et de l'hydrogène seront généralement peu efficaces, car les transformations réalisées ne vont pas engendrer de variations significatives sur les ratios isotopiques $\delta^{13}C$ et $\delta^{2}H$.

Il existe cependant différentes solutions. Une première possibilité est la mise en évidence d'impuretés résiduelles issues des hémisynthèses. Cette approche est toutefois limitée, car ces molécules peuvent être éliminées par purification. L'utilisation de la méthode de fractionnement isotopique naturel

spécifique par résonance magnétique nucléaire (SNIF-NMR) est aussi réalisable. Cette technique permet de mesurer les fractionnements isotopiques de sites spécifiques d'une molécule, permettant de mettre en évidence l'origine du produit analysé (Akoka and Remaud, 2020). Cette méthode a été appliquée sur différents produits naturels. (Guyader et al., 2019; Martin et al., 1995; G. Remaud et al., 1997) Cependant, cette technique nécessite que les molécules analysées soient d'une pureté importante, ce qui est difficile à réaliser sur de nombreuses huiles essentielles présentant plusieurs métabolites secondaires majoritaires. De plus, il existe un risque de fractionnement isotopique lors de l'étape de la purification. La SNIF-NMR étant une technqiue peu sensible, il est également nécessaire d'utiliser une grande quantité d'échantillon pour l'analyse.

L'analyse isotopique de l'oxygène peut être une approche intéressante. Dans de nombreux cas d'hémisynthèse de terpènes oxygénés ou de phénylpropanoïdes, la synthèse se caractérise par l'ajout d'un atome d'oxygène extérieur à la molécule d'origine. Les ratios $\delta^{18}O$ peuvent donc être différents, et il semble pertinent de les mesurer. Pour déterminer ce ratio isotopique, l'utilisation d'un système de mesure GC-P-IRMS est nécessaire pour s'adapter à la majorité des huiles essentielles. Ce couplage, difficile à opérer, est peu utilisé en authentification sur les produits naturels.

L'étude présentée dans ce chapitre décrit le développement de l'analyse $\delta^{18}O$ par GC-P-IRMS, appliqué aux huiles essentielles de menthe crépue, de cannelle et d'amande amère, pour la mise en évidence d'ajouts de composés issus de processus hémisynthétiques (carvone, (E)-cinnamaldéhyde, benzaldéhyde).

DÉVELOPPEMENT DU COUPLAGE GC-P-IRMS POUR LA MESURE DU $\delta^{18}O$

1. Etat de l'art – Etude générale de la technique

La GC-P-IRMS pour l'analyse isotopique de l'oxygène est très peu employée, principalement à cause des difficultés pour assurer une pyrolyse complète et régulière des oxygènes d'une molécule. En effet, plusieurs contraintes sont liées au couplage GC-P-IRMS pour analyser le $\delta^{18}O$, qui n'affectent pas l'analyse du $\delta^{2}H$. La conversion des hydrogènes en H_2 se réalise sans difficulté particulière, car ces atomes sont facilement arrachés de la molécule. Cependant, il est beaucoup plus difficile d'extraire complètement les atomes d'oxygènes car il faut non seulement casser les liaisons chimiques très fortes avec les autres atomes de la molécule (aldéhydes, alcools, cétones…), mais également lier les atomes d'oxygènes avec les atomes de carbones apportés par le tube à pyrolyse, pour produire du monoxyde de carbone, gaz analysable en IRMS.

Pour pallier ces contraintes, différentes conceptions de réacteur à pyrolyse ont été conçues, évaluées et sont présentées dans la littérature, afin d'optimiser au mieux l'instrumentation pour la mesure du $\delta^{18}O$ réalisé par GC-P-IRMS. La configuration présentant les meilleurs résultats consiste en un tube en céramique, contenant un tube en platine rempli de fils de nickel utilisés comme catalyseur (Zech and Glaser, 2009). Ce tube est régulièrement conditionné avec un approvisionnement en carbone par injection régulière en GC d'un alcane : cette étape permet de former un revêtement en carbone sur la paroi interne du tube, composé nécessaire pour permettre la transformation des oxygènes en monoxyde de carbone (CO). Pour de meilleurs résultats, la conversion des atomes d'oxygène en CO, réalisée à haute température, est favorisée avec l'utilisation d'un gaz composé de 99% d'He et d'1% d'H_2 à flux réduit (0,6 mL/min). Ce gaz additionnel permet d'assurer des conditions de réductions constantes dans le réacteur, ainsi que de maintenir l'intégrité de ^{18}O pendant la conversion (Zech et al., 2013).

Outre les contraintes liées à la pyrolyse, d'autres problématiques sont à prendre en considération pour éviter d'altérer les performances du système. Tout d'abord, il est nécessaire d'avoir une instrumentation parfaitement hermétique à l'air, sinon le carbone va se transformer en CO_2 par interaction avec l'air (combustion) et le catalyseur risque de s'oxyder. Un système bien isolé permet d'éviter les interactions avec l'azote atmosphérique N_2, de même m/z 28 que le CO. Enfin, il a été observé dans de précédentes études que les valeurs $\delta^{18}O$ pouvaient dériver avec le temps. Ce biais doit être corrigé régulièrement avec l'utilisation de standards externes.

Il existe peu d'applications publiées de ce système de mesure du $\delta^{18}O$ dans le domaine des huiles essentielles. L'authenticité d'huiles essentielles d'estragon, de basilic, de piment, de laurier et de tagette a été évaluée en mesurant les ratios isotopiques $\delta^{2}H$, $\delta^{13}C$ et $\delta^{18}O$ de l'estragol et du méthyleugénol par GC-C/P-IRMS, en complément d'une analyse de caractérisation par GC-MS (Ruff et al., 2002). Ces analyses permettent notamment de différencier une origine de synthèse, d'une origine naturelle. Une stratégie analytique similaire d'authentification a aussi été entreprise sur des huiles essentielles de lavande (Jung et al., 2005), en utilisant les ratios énantiomériques obtenus par analyse chromatographique multidimensionnelle. Des études isotopiques sur les éléments carbones, hydrogènes et oxygènes ont été réalisées en GC-C/P-IRMS pour assurer l'authenticité d'huiles essentielles de fenouil (trans-anéthol), de thym (thymol), d'origan et de sarriette (carvacrol), en complément d'analyses de chiralité Enantio-GC (Greule et al., 2008)).

2. Présentation de l'instrumentation GC-P-IRMS pour l'analyse du $\delta^{18}O$

L'analyse est réalisée à l'aide d'un système chromatographique en phase gazeuse GC Trace 1310 (Thermo), équipé d'un spectromètre de masse MS ISQ QD (Thermo) et couplé à un IRMS Delta V Plus (Thermo), via un four de pyrolyse GC Isolink II (Thermo) et d'une interface de couplage Conflo IV (Thermo). L'échantillon à analyser est injecté dans la GC sous forme liquide, via un système TriPlus RSH (Thermo). Le schéma de l'instrumentation est décrit en **Figure 36**.

Les composés sont séparés dans une colonne chromatographique. Un débit d'hélium constant est appliqué dans la colonne. En sortie de colonne, un raccord multi-voies va permettre, grâce à des capillaires de diamètres et longueurs variés, d'envoyer différentes proportions du mélange gazeux vers le four à pyrolyse, la MS et le FID. L'alimentation comprend un débit additionnel (1,2 mL/min) de gaz auxiliaire (98% d'hélium et 2% de H_2).

Le réacteur de pyrolyse utilisé est constitué d'un tube non poreux en alumine (oxyde d'aluminium) externe, et d'un un tube de platine interne, rempli de fils de nickel (Thermo). La température du four est maintenue à 1280°C.

Le tube est conditionné avec l'injection de 1 µL d'undécane dans la GC en mode split 5 :1, selon la programmation de température suivante : 80°C maintenu pendant 1 min, puis un gradient de température de 10°C/min est appliqué jusqu'à 325°C. Pour obtenir une répartition homogène d'une couche de carbone dans le tube de platine, le débit d'hélium appliqué dans la colonne est de 0,8 mL/min, et le gaz additionnel est coupé. Pendant le conditionnement, la vanne backflush est fermée.

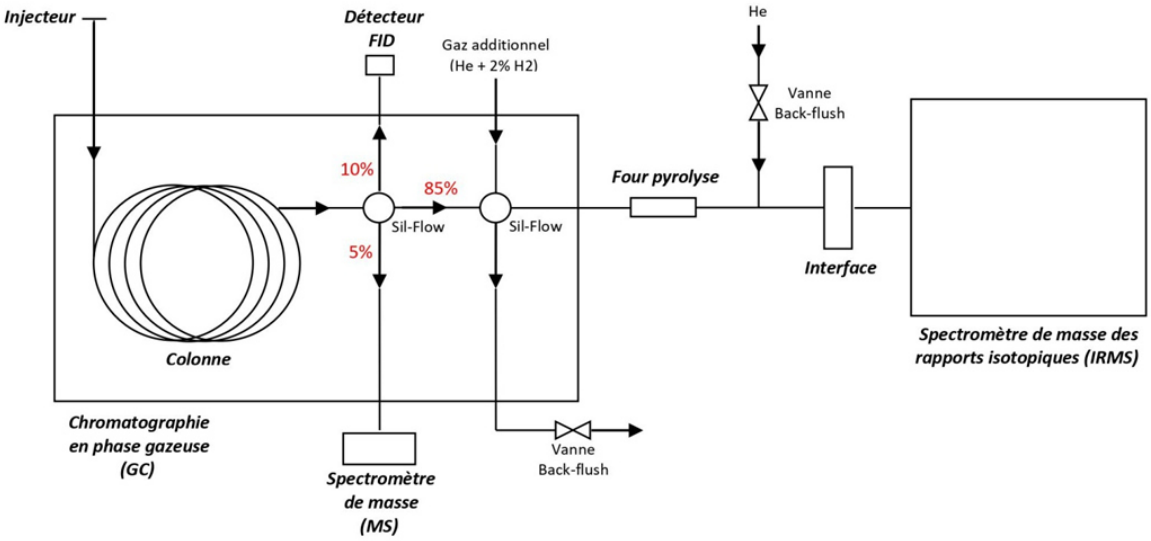

Figure 36 : Système GC-MS-P-IRMS pour la détermination de la valeur isotopique $\delta^{18}O$

Le gaz de référence, du monoxyde de carbone calibré par rapport à V-SMOW, est introduit dans l'IRMS par le système Dual Inlet, à l'aide d'une ampoule. En effet, ce dernier étant mortel pour l'être humain (à une concentration de 15000 ppm, soit 1,5 % de CO dans l'air), la bouteille de gaz se trouve à l'extérieur du bâtiment et n'est pas connectée avec l'IRMS. La mesure isotopique $^{18}O/^{16}O$ est effectuée par rapport au CO, fourni pour chaque cycle d'analyse par le Dual Inlet.

APPLICATIONS

Le système GC-P-IRMS de mesure du $\delta^{18}O$ est appliqué à différentes huiles essentielles. D'autres analyses sont également réalisées en fonction des matrices d'études : recherche d'impuretés, analyses énantiomériques, analyses isotopiques $\delta^{13}C$ et $\delta^{2}H$.

1. Etude de l'huile essentielle de menthe crépue

1.1. Contexte

Les huiles essentielles de menthe crépue *Mentha spicata* L. sont des huiles essentielles majoritairement composées de carvone (Golparvar and Hadipanah, 2016; Hussain et al., 2010; Mejd et al., 2015; Orav et al., 2013; Padalia et al., 2013; Zhao et al., 2013). Ces extraits sont généralement rectifiés pour obtenir une qualité d'huile essentielle riche en carvone à plus de 80%. Ces produits sont principalement originaires de Chine, d'Inde et des Etats-Unis.

Ces huiles essentielles sont parmi les plus importantes du marché des huiles essentielles en termes de volumes produits, et donc fortement sujettes aux fraudes. L'ajout de carvone de synthèse est une fraude connue, mais facilement identifiable par une mesure de chiralité (Pragadheesh et al., 2015; Ravid et al., 1992a), ou par un contrôle olfactif, car la carvone présente une odeur différente en fonction de son isomère, comme précédemment expliqué dans le chapitre 1. Une fraude est apparue sur le marché récemment. Il s'agit de molécules de carvone issues de limonène d'origine naturelle, provenant de l'huile essentielle d'orange douce (Panten and Surburg, 2015). Cette dernière est l'huile essentielle la plus vendue dans le monde, et aussi l'une des moins chères du marché. Le limonène représente plus de 90% de la constitution de l'huile essentielle d'orange douce.

La synthèse de la carvone à partir du limonène, présentée ci-dessous (**Figure 37**), a la particularité d'introduire un oxygène (Rothenberger et al., 1980). Un suivi isotopique du $\delta^{18}O$ peut potentiellement présenter un intérêt pour mettre en exergue l'origine hémisynthétique de la carvone.

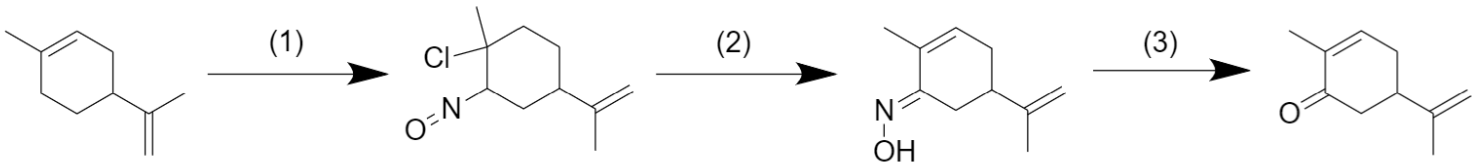

Figure 37 : Synthèse en 3 étapes de la carvone à partir de limonène

1.2. Matériels et méthodes

1.2.1. Echantillons

48 échantillons d'huiles essentielles de menthe crépue *Mentha spicata var crispa*, provenant d'Inde, des Etats-Unis, de Chine, et de France, ont été analysés pour cette étude. Parmi ces échantillons, 12 ont été fournis par les entreprises Albert Vieille et Young Living, certifiés 100% purs et naturels, et un échantillon a été distillé en laboratoire, à partir de feuilles de menthe crépue fraiches. Les autres huiles essentielles analysées sont des échantillons commerciaux.

Des échantillons de carvone (R), fournis par Aldrich et Fluka, ont aussi été analysés, et utilisés comme standards de références pour les analyses isotopiques par GC-C/P-IRMS.

1.2.2. Synthèse de la carvone à partir de limonène

Deux échantillons de carvone (R) et (S) ont été synthétisés en laboratoire, à partir de limonène (S) et (R).

Cette synthèse de la carvone est réalisable en 3 étapes. La première étape conduit à la formation d'un premier intermédiaire, le nitrosochlorure de limonène (1). La seconde aboutit à la synthèse du carvoxime (2). Ce dernier composé permet d'aboutir à la formation de la carvone (3). Le limonène, maintenu à une température comprise entre 0 et 10°C, est préalablement dilué dans de l'isopropanol, puis une solution d'acide chloridrique à 37% et d'isopropanol est ajoutée progressivement. La solution obtenue est ensuite mélangée avec du $NaNO_2$ dans de l'eau déionisée. Le nitrosochlorure de limonène obtenu est purifié par filtration Buchner et séché au dessiccateur sous vide. Ce produit est ensuite dissout dans du diméthylformamide et d'isopropanol, puis porté à reflux. Le carvoxime est ensuite extrait avec de l'éther, et un lavage de la phase organique par de l'eau ultra pure est réalisée jusqu'à pH neutre. La solution est ensuite séchée avec du sulfate de sodium anhydre puis filtrée. L'éther est ensuite évaporé par évaporateur rotatif, et le carvoxime est dissous dans une solution aqueuse d'acide oxalique à 5%, puis porté à reflux pendant 30 minutes. La carvone obtenue est extraite par entraînement à la vapeur.

1.2.3. Stratégie analytique

1.2.3.1. Analyses énantiomériques

Les échantillons d'huiles essentielles de menthe sont tout d'abord analysés par Enantio-GC. Le système chromatographique est un 6890N GC (Agilent). 0,2 µL d'huile essentielle de menthe crépue, préalablement diluée dans de l'éthanol (1 :100), est injecté à 250°C, en mode split 100 :1. La séparation est réalisée avec une colonne Supelco β-DEX 225 (30 m * 0,250 mm * 0,25 µm). Cette colonne capillaire permet la résolution des énantiomères de la carvone. Un débit constant d'H_2 de 1,2 mL/min est appliqué. Le programme de température utilisé est le suivant : une température initiale de 80°C, maintenue pendant 5 minutes, puis montée à 2°C/min jusqu'à 130°C, puis montée à 5°C/min jusqu'à 180°C. Cette température finale est maintenue 2 minutes.

1.2.3.2. GC-P-IRMS

Les analyses $\delta^{18}O$ ont été réalisées en utilisant le système GC-P-IRMS détaillé précédemment. Les analyses $\delta^{13}C$ er $\delta^{2}H$ ont été réalisées en utilisant un système chromatographique en phase gazeuse 6890N GC (Agilent), connecté à un IRMS Isoprime 1000 (Elementar UK), via une interface de combustion ou de pyrolyse GC5MK1. Une quantité d'1 µL d'échantillon liquide (huile essentielle diluée dans de l'acétone), est injecté dans la GC. L'injection est réalisée à 250°C, en mode split (20:1).

L'analyse de la carvone est réalisée à l'aide d'une colonne capillaire Agilent HP-Innowax (60 m * 0,250 mm * 0,50 µm). La programmation de température pour l'analyse de la carvone est la suivante : la température initiale du four est de 70°C, maintenue pendant 2 minutes, puis une première rampe de température de 20°C/min est appliquée jusqu'à atteindre 200°C, température maintenue pendant 6 minutes. Un second gradient de température est ensuite réalisé (20°C/min) jusqu'à la température finale de 240°C, maintenue pendant 2 minutes. Le débit du gaz vecteur (hélium) est maintenu constant pendant toute la durée de l'analyse à 2,0 mL/min.

Chaque échantillon est analysé au minimum en deux réplicats, et la séquence analytique est encadrée toutes les six analyses par un échantillon de carvone, préalablement calibré en EA-C/P-IRMS par rapport aux références internationales V-PDB et V-SMOW. La pyrolyse est propre à une molécule, cela impose que le standard de référence soit la même molécule. La dérive des valeurs isotopiques $\delta^{18}O$ dans le temps impose de passer des standards de référence régulièrement.

1.2.1. Extraction de la carvone de l'huile essentielle de menthe et analyses EA-P-IRMS

Afin de vérifier les performances du système GC-P-IRMS $\delta^{18}O$, les valeurs isotopiques des carvones mesurées sont comparées avec des mesures réalisées en EA-P-IRMS. Il est nécessaire de réaliser l'extraction de la carvone en amont des analyses isotopiques.

Dans une ampoule à décanter de 250 mL remplie de silice imprégnée de pentane distillé, on dépose 200 µl d'HE de menthe. Une première élution par 200 mL de pentane est réalisée, afin d'éliminer la fraction terpénique. Une seconde élution est ensuite réalisée par 200 mL d'un mélange pentane-éther distillé 95/5 en volume afin de recueillir la carvone. Le solvant est ensuite éliminé par évaporation. Trois réplicats sont réalisés pour chaque échantillon pour contrôler le fractionnement isotopique éventuel lors de l'extraction.

La carvone extraite est analysée en EA-P-IRMS pour déterminer sa valeur $\delta^{18}O$. L'appareil utilisé est un analyseur élémentaire TC-EA (Thermo), couplé à un IRMS Delta V Plus (Thermo), via une interface Conflo IV (Thermo). Les échantillons sont préalablement pesés dans des capsules d'argent, puis introduits dans le système de pyrolyse, maintenu à 1400°C. Le réacteur est constitué d'un tube en céramique externe, et d'un tube en carbone vitrifié interne, à moitié rempli de granules de carbones. Les échantillons sont calibrés avec un standard international : IAEA-601 (acide benzoïque : $\delta^{18}O$ (‰) +23,3).

1.3. Résultats et discussion

1.3.1. Comparaisons des valeurs obtenues par EA-P-IRMS et GC-P-IRMS

Les mesures $\delta^{18}O$ obtenues sur les deux instrumentations sont représentées sur la **Figure 38**. Les valeurs isotopiques de la carvone mesurée par GC-P-IRMS sur les huiles essentielles de menthe crépue non traitées suivent la même tendance que les valeurs mesurées en EA-P-IRMS sur les carvones extraites, pour un même échantillon. Un léger biais est cependant observé entre les valeurs EA-P-IRMS et GC-P-IRMS, probablement dues aux différences entre les deux systèmes de pyrolyse, mais les points sont linéairement corrélés, ce qui permet d'interpréter les résultats.

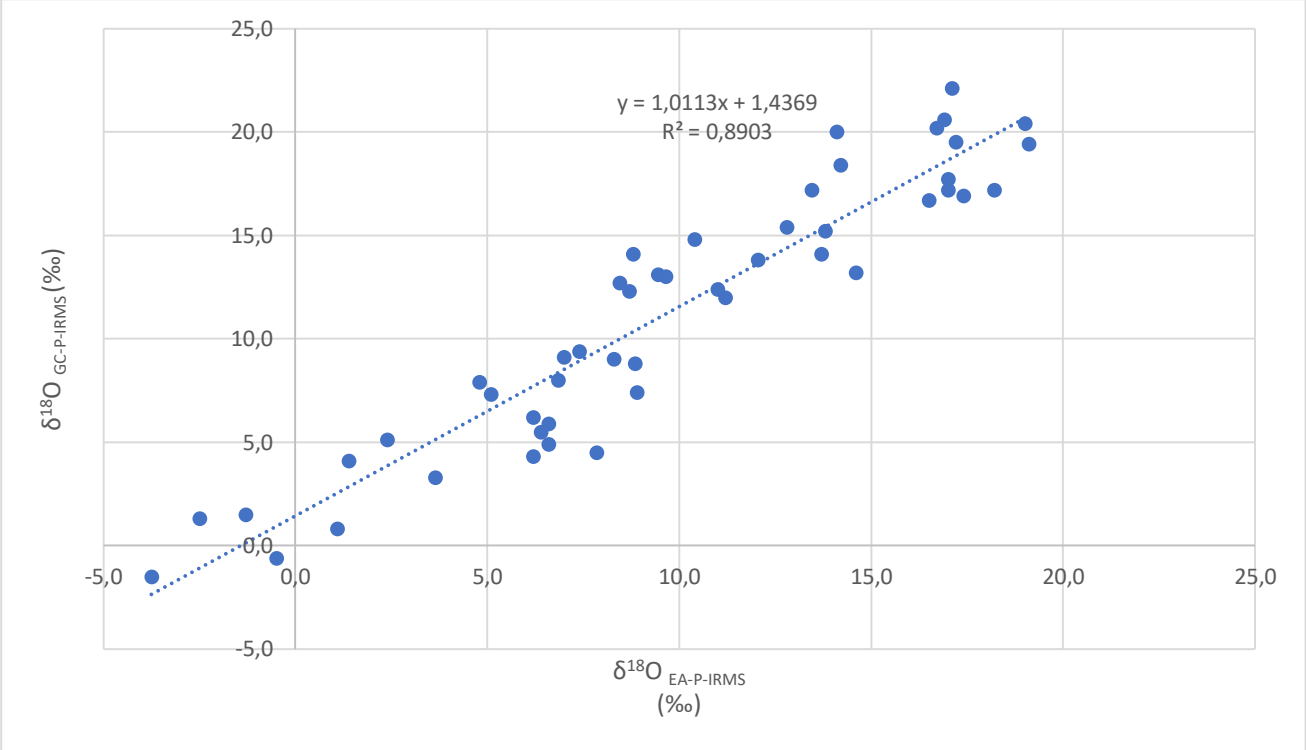

Figure 38 : Comparaisons des valeurs $\delta^{18}O$ obtenues par EA-C/P-IRMS et GC-C/P-IRMS

Plusieurs pistes permettent d'interpréter ce biais. Cela peut s'expliquer par les différents systèmes de pyrolyse utilisés : les catalyseurs employés dans les tubes de pyrolyse sont distincts, tout comme la température appliquée. De plus, la configuration du tube n'est pas la même. Le tube est en position verticale pour l'EA-P-IRMS, et en position horizontale pour la GC-P-IRMS. Il est également possible que du solvant résiduel puisse perturber la mesure en EA-P-IRMS. En revanche, ce biais n'est pas dû à un possible fractionnement isotopique réalisé lors de l'extraction, car aucune différence n'a été identifiée entre les différents réplicats.

Les analyses EA-P-IRMS et GC-P-IRMS conduisent aux mêmes conclusions. Il est donc tout à fait possible de s'affranchir de l'étape d'extraction de la carvone et d'analyser l'échantillon directement par GC-P-IRMS $\delta^{18}O$.

1.3.2. Analyse des résultats

Les données énantiomériques et isotopiques sont détaillées dans le **Tableau 13**.

La mesure du ratio énantiomérique permet de vérifier que les huiles essentielles de carvone n'ont pas subi d'ajout de carvone d'origines de synthèse pétrochimique. La teneur énantiomérique du carvone (R) est mesurée entre 97,3 et 100,0%. Tous les échantillons analysés présentent l'énantiomère (R) de la carvone en fort excès, ce qui correspond aux données de la littérature (Pragadheesh et al., 2015; Ravid et al., 1992a). Aucune différence significative n'est observée entre les échantillons authentiques et les échantillons commerciaux.

La composition isotopique $\delta^{13}C$ des molécules de carvone, issues d'huiles essentielles de menthe crépues authentiques (-29,35 ± 1,54 ‰) est la même que celles des huiles essentielles commerciales analysées (-29,63 ± 0,87 ‰). Ces valeurs sont en accord avec l'origine C3 de la menthe crépue. Le $\delta^{13}C$ de la carvone ne permet pas de distinguer une carvone d'origine naturelle d'une origine de synthèse. En effet, les molécules de carvone d'origine pétrochimiques ont des valeurs comprises entre -30,24 et -26,40, ce qui coïncident avec la gamme de valeurs $\delta^{13}C$ des huiles essentielles authentiques. Un constat similaire est observé avec la carvone issue du limonène ($\delta^{13}C$ = -29,81‰).

Concernant les valeurs isotopiques $\delta^{2}H$, des fractionnements isotopiques importants sont observés entre les échantillons (Echantillons authentiques : -262 ± 31 ‰, échantillons commerciaux : -242 ± 29 ‰), probablement liés aux origines géographiques diverses. En considérant les échantillons par lieux de culture, il en ressort une moyenne des valeurs isotopiques $\delta^{2}H$ de -235 ± 18 ‰ pour l'origine Chine, -282 ± 28 ‰ pour l'origine Etats-Unis, et -226 ± 27 ‰ pour l'origine Inde. Nous constatons que les échantillons chinois et indiens sont plus enrichis en deutérium que les échantillons américains. Les valeurs naturelles $\delta^{2}H$ sont significativement plus négatives que les valeurs mesurées sur les molécules

de carvone synthétisées à partir de produits pétroliers (-190 ± 24‰). L'étude des ratios isotopiques de l'hydrogène permet potentiellement de mettre en évidence une origine de synthèse. Cependant, cela n'est pas possible dans le cas d'une carvone provenant du limonène, car la valeur $\delta^{2}H$ mesurée est dans la gamme des valeurs d'échantillons authentiques.

Enfin, l'étude des valeurs isotopiques $\delta^{18}O$ met en évidence des différences isotopiques intéressantes entre les échantillons authentiques et commerciaux. Les valeurs $\delta^{18}O$ des carvones 100% pures et naturelles sont comprises entre 14,1‰ et 22,1‰. Ces valeurs sont plus positives que la valeur $\delta^{18}O$ mesurée sur la carvone (R) obtenue à partir de limonène (9,2‰). Parmi les échantillons commerciaux, certains présentent des valeurs $\delta^{18}O$ similaires à la gamme de mesure déterminée sur les échantillons authentiques, mais d'autres échantillons ont des valeurs $\delta^{18}O$ beaucoup plus basses, qui peuvent potentiellement indiquer que ces échantillons ont été adultérés avec des carvones hémisynthétiques.

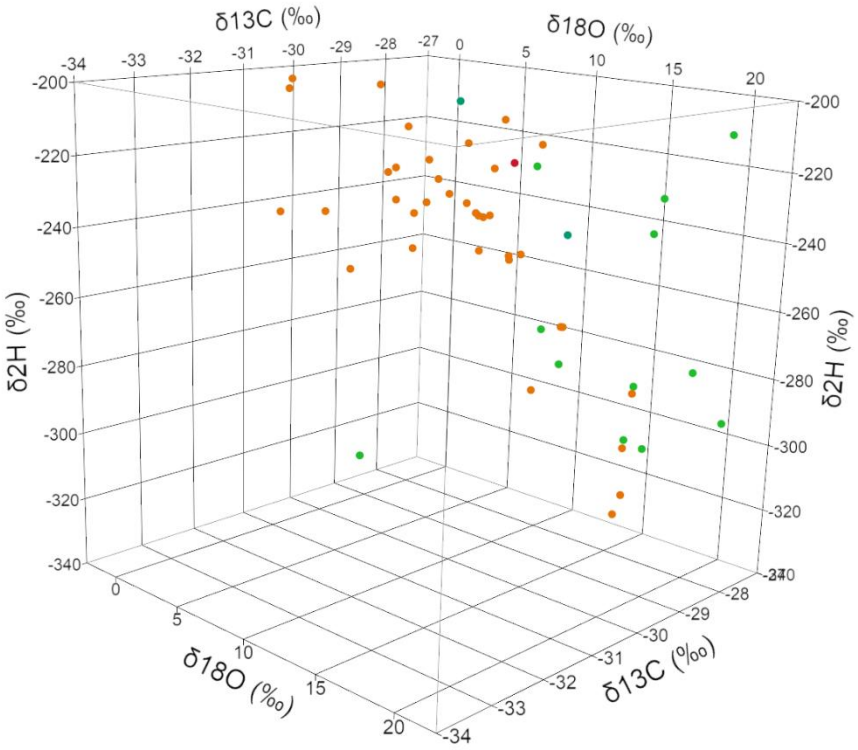

Figure 39 : Représentation tridimensionnelle des analyses isotopiques GC-C/P-IRMS $\delta^{13}C$, $\delta^{2}H$ et $\delta^{18}O$ de carvones issues d'huiles essentielles de menthe crépues authentiques (en vert) et commerciales (en orange), ainsi que de carvone de synthèse (en rouge) et d'hémisynthèses à partir de limonène (en bleu)

Tableau 13 : Valeurs énantiomériques (%R carvone) et isotopiques $\delta^{13}C$, $\delta^{2}H$ et $\delta^{18}O$ de carvones issues d'huiles essentielles de menthe crépues, de carvones de synthèse, et de carvones obtenues à partir de limonène, déterminées par GC-C/P-IRMS.

Echantillons	**Ratio énantiomériques mesuré par GC-FID**				**Valeurs isotopiques de la carvone, mesurées par GC-C/P-IRMS (‰)**											
	% Carvone (R)				**$\delta^{13}C$**				**$\delta^{2}H$**				**$\delta^{18}O$**			
	Moyenne	**Min**	**Max**	**SD**	**Moyenne**	**Min**	**Max**	**SD**	**Moyenne**	**Min**	**Max**	**SD**	**Moyenne**	**Min**	**Max**	**SD**
Huile essentielle de menthes crépues authentiques (n=12)	99,7	98,7	100,0	0,4	-29,35	-33,34	-27,24	1,54	-262	-294	-211	31	18,4	14,1	22,1	2,6
Huile essentielle de menthes crépues commerciales (n=36)	99,1	97,3	100,0	0,7	-29,63	-30,96	-28,15	0,87	-242	-321	-201	29	9,0	-1,5	18,4	5,6
Carvone (R) de synthèse (n=3)	100,0	100,0	100,0	0,0	-27,94	-30,24	-26,40	2,03	-190	-217	-176	24	13,2	10,9	14,5	2,0
Carvone (R) obtenue à partir de limonène (S) (n=1)	99,4	-	-	-	-29,81	-	-	-	-204	-	-	-	9,2	-	-	-

2. Etude de l'huile essentielle de cannelle et d'amande amère

2.1. Contexte

Les huiles essentielles de cannelle et d'amande amère sont parmi les huiles essentielles les plus vendues du marché, notamment dans l'industrie agroalimentaire. L'huile essentielle d'amande amère est issue principalement de l'extraction des noyaux d'amandier *Prunus amygdalus* var. amara (DC.) Focke et d'abricots *Prunus armeniaca* L.. Cette huile essentielle présente une composition à plus de 95% de benzaldéhyde. L'huile essentielle de cannelle se présente quant à elle sous deux formes : l'huile essentielle de cannelle *Cinnamomum cassia* (L.) J.Presl, provenant principalement de Chine et issue de la distillation de bois et/ou de feuilles, et l'huile essentielle de cannelle *Cinnamomun verum* J.Presl (syn. *Cinnamomum zeylanicum* Blume), provenant principalement du Sri Lanka, d'Inde, et du Madagascar, et issu d'une distillation de l'écorce de cannelle. Ces deux huiles essentielles sont riches en (E)-cinnamaldéhyde.

De nombreuses fraudes sont associées aux huiles essentielles d'amande amère et de cannelle. L'origine cassia de la cannelle étant beaucoup moins chère que celle de Ceylan, les mélanges entre les deux huiles essentielles sont courants. Il est toutefois possible de mettre en évidence ce type d'ajout en étudiant les différences de composition entre les deux huiles essentielles (Wang et al., 2013), ou par analyse spectroscopique NIR et FTIR (Cantarelli et al., 2020; Li et al., 2013). Les ajouts de synthèse de (E)-cinnamaldéhyde et de benzaldéhyde sont également identifiables par analyse du radiocarbone (Culp and Noakes, 1992b). Cependant, comme montré dans le chapitre 2 avec l'exemple du salicylate de méthyle, et identifié par Culp sur le benzaldéhyde (Culp and Noakes, 1990), un marquage de la molécule de synthèse rend inefficace la mesure de l'activité du ^{14}C. Des méthodes isotopiques par GC-P-IRMS $\delta^{2}H$ sont applicables pour mettre en évidence les ajouts de synthèse sur le benzaldéhyde (Ruff et al., 2000) et le (E)-cinnamaldéhyde (Sewenig et al., 2003), ainsi que la SNIF-RMN (G. Remaud et al., 1997). La synthèse du (E)-cinnamaldéhyde, à partir de benzaldéhyde, produit une impureté résiduelle, le 5-phénylpenta-2,4-diénal (Do et al., 2015), qui est identifiable par GC, si le produit n'a pas été suffisamment purifié.

De la même manière que pour la menthe, le (E)-cinnamaldéhyde peut aussi être obtenu par hémisynthèse, à partir du benzaldéhyde issu de l'huile essentielle d'amande amère. Le schéma de réaction, présenté en **Figure 40**, montre que le (E)-cinnamaldéhyde est obtenu par aldolisation du benzaldéhyde (1) (G. Remaud et al., 1997). Lors de la réaction, l'oxygène du benzaldéhyde est éliminé et un oxygène issu de l'acétaldéhyde est introduit pour former le (E)-cinnamaldéhyde. Un suivi isotopique présente donc là encore un réel intérêt. Les prix étant fluctuants, l'huile essentielle

d'amande amère est parfois moins chère que l'huile essentielle de cannelle écorce (*C. verum*). La fraude peut être inversée. Le benzaldéhyde peut également être hémisynthétisé à partir de (E)-cinnamaldéhyde (G. Remaud et al., 1997), selon une réaction de rétro aldolisation (2). Cette fois ci, l'oxygène du benzaldéhyde obtenu est issu de l'eau. Cependant, l'utilisation de carbonates dans la réaction laisse supposer des échanges isotopiques.

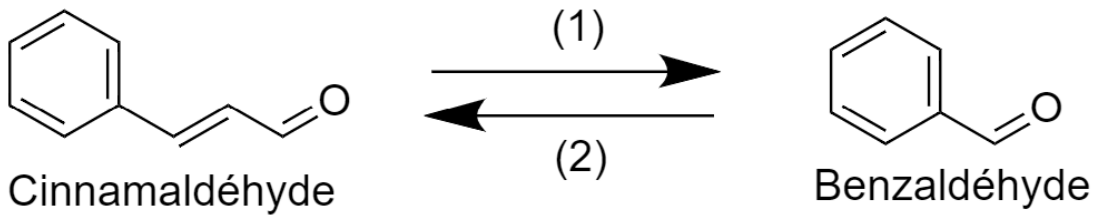

Figure 40 : Schéma réactionnel d'aldolisation du benzaldéhyde (2) et de rétroaldolisation du (E)-cinnamaldéhyde (1).

L'adultération peut donc se faire dans les deux sens, suivant les prix du marché. L'huile essentielle de cassia est 10 fois moins chère que les deux autres, elle reste la principale source de fraude.

2.2. Matériels et méthodes

2.2.1. Echantillons

21 échantillons d'huiles essentielles de cannelle *Cinnamomum verum*, originaires du Sri Lanka et de Madagascar sont étudiées, ainsi que 31 échantillons d'huiles essentielles de cannelle *Cinnamomum cassia*, provenant de Chine, et deux échantillons d'origine inconnue. Parmi ces échantillons, certains ont été fournis par Albert Vieille, Astérale, ou encore Young Living, tandis que d'autres ont été achetés directement dans le commerce. En plus des échantillons précédemment cités, plusieurs distillations d'écorces de cannelles ont été réalisés en laboratoire pour obtenir six échantillons authentiques d'huiles essentielles de cannelle *Cinnamomum cassia* (origine Chine), *Cinnamomum verum* (origine Sri Lanka), et *Cinnamomum burmanii* (Nees & T.Nees) Blume (origine Indonésie).

11 échantillons d'huiles essentielles d'amande amère, obtenus par entraînement à la vapeur des amandes d'abricots *Prunus armeniaca* L. sont aussi analysés. Ces huiles essentielles, originaires du Maroc, et fournies par Albert Vieille, ont subi un procédé d'élimination de l'acide cyanhydrique. Un échantillon d'huile essentielle d'amande amère provenant de l'extraction des noyaux de prunes *Prunus domestica* L. est également étudié.

Des échantillons de (E)-cinnamaléhyde et de benzaldéhyde d'origine pétrochimiques, fournis par Acros, Aldrich, Alfa Aesar, et Fluka, ont été analysés, et utilisés comme standards de références pour les analyses isotopiques par GC-C/P-IRMS. Les valeurs isotopiques δ^2H et la détection d'impuretés de synthèses ont permis de vérifier l'origine de synthèse de ces échantillons.

2.2.2. Synthèse de (E)-cinnamaldéhyde et de benzaldéhyde

2.2.2.1. Réaction d'aldolisation du benzaldéhyde

10 échantillons de (E)-cinnamaldéhyde ont été produits en laboratoire par aldolisation de benzaldéhyde d'origine de synthèse (provenant d'Alfa Aesar) et d'origine naturelle, issu de différentes huiles essentielles d'amandes amères. Le protocole de synthèse réalisé est décrit ci-dessous.

Un volume de 600 µL de benzaldéhyde est dilué dans 3 mL d'éthanol 96%. Le mélange est maintenu à 0°C. 1 mL de NaOH 15% est ajouté, et la solution est agitée pendant 5 minutes. Un volume de 200 µL d'acétaldéhyde est ajouté à 0°C. Cette étape est renouvelée quatre fois toutes les 15 minutes pour veiller à ce que l'acétaldéhyde soit maintenu en excès pendant la réaction (l'acétaldéhyde s'évapore à température ambiante). Le mélange est ensuite chauffé à 40°C pendant 10 minutes. De l'acide chlorhydrique concentré est ajouté jusqu'à pH acide. Une extraction à l'éther est réalisée pour récupérer le (E)-cinnamaldéhyde formé puis un lavage à l'eau est réalisé.

2.2.2.2. Réaction de rétro aldolisation du (E)-cinnamaldéhyde

5 échantillons de benzaldéhyde ont été produits en laboratoire par rétro-aldolisation de (E)-cinnamaldéhyde d'origine de synthèse (provenant de Fluka) et d'origine naturelle, issu de différentes huiles essentielles de cannelles *Cinnamomum verum, Cinnamomum cassia,* et *Cinnamomum burmanii*. Le protocole de synthèse réalisé est décrit ci-dessous.

10 grammes de (E)-cinnamaldéhyde ou d'huile essentielle de cannelle sont préalablement dilués dans une solution aqueuse composée à 3% de carbonate de sodium Na_2CO_3. Ce mélange est chauffé à reflux sous agitation pendant 7h. Un entraînement à la vapeur est ensuite réalisé pour extraire le benzaldéhyde.

2.2.3. Stratégie analytique

2.2.3.1. Caractérisation par GC-FID et GC-MS

Les échantillons ont tout d'abord été analysés par GC-FID pour établir leurs profils chromatographiques, en utilisant la méthode utilisée précédemment dans le chapitre 2 pour déterminer les compositions des huiles essentielles de wintergreen. Une méthode GC-MS SIM a

ensuite été développée pour mettre en évidence d'éventuels résidus de synthèses du (E)-cinnamaldéhyde dans les huiles essentielles de cannelle. Cette méthode SIM est détaillée ci-après.

Les analyses GC-MS sont réalisées sur un système de chromatographie en phase gazeuse 6890N (Agilent Technologies), couplé avec un spectromètre de masse équipé d'une source d'ionisation à impact électronique 5975 inert XL MSD (70 eV). Un volume de 1 µL d'échantillon d'huile essentielle de cannelle est injecté dans la GC, en mode split (100:1), avec une température à l'injecteur fixée à 250°C. L'hélium est utilisé comme gaz vecteur, avec un débit constant fixé à 1,0 mL/min. Les composés volatiles présents dans l'huile essentielle de cannelle sont séparés à l'aide d'une colonne capillaire HP-5 (30 m * 0,250 mm * 0,25 µm, Agilent Technologies). La rampe de température utilisée est la suivante : la température initiale du four GC est réglée à 60°C et maintenue pendant 3 minutes, puis un gradient de 5°C/min est appliqué jusqu'à 160°C. Un second gradient de température, fixé à 10°C/min est appliqué jusqu'à la température finale de 300°C. Cette température de 300°C est ensuite maintenue pendant 4 min. Les paramètres SIM sont les suivants : les ratios m/z des ions cibles sont 128, 129 et 158, pour détecter le 5-phénylpenta-2,4-diénal.

2.2.3.2. Analyse GC-C/P-IRMS

Les valeurs isotopiques $\delta^{13}C$, $\delta^{2}H$, et $\delta^{18}O$ du (E)-cinnamaldéhyde et du benzaldéhyde ont été déterminées par GC-C/P-IRMS.

Les analyses $\delta^{18}O$ ont été réalisées en utilisant le système GC-P-IRMS détaillé précédemment. Les analyses $\delta^{13}C$ er $\delta^{2}H$ ont été réalisées en utilisant un système chromatographique en phase gazeuse 6890N GC (Agilent), connecté à un IRMS Isoprime 1000 (Elementar UK), via une interface de combustion ou de pyrolyse GC5MK1. Une quantité d'1 µL d'échantillon liquide (huile essentielle diluée dans de l'acétone 1 :100) est injectée dans la GC. L'injection est réalisée à 250°C, en mode split (10:1).

L'analyse du (E)-cinnamaldéhyde est réalisée à l'aide d'une colonne capillaire Agilent HP-5 (60 m * 0,250 mm * 0,25 µm). La programmation de température pour l'analyse du (E)-cinnamaldéhyde est la suivante : la température initiale du four est de 60°C, maintenue pendant 2 minutes, puis une première rampe de température de 10°C/min est appliquée jusqu'à atteindre 180°C. Un second gradient de température est ensuite réalisé (2°C/min jusqu'à 205°C), puis une dernière rampe de température (20°C/min) est appliquée jusqu'à la température finale de 325°C, maintenue pendant 5 minutes. Le débit du gaz vecteur (hélium) est maintenu constant pendant toute la durée de l'analyse à 1 mL/min.

L'analyse du benzaldéhyde est réalisée à l'aide d'une colonne capillaire Agilent HP-Innowax (60 m * 0,250 mm * 0,50 µm). La programmation de température pour l'analyse du benzaldéhyde est la suivante : la température initiale du four est de 50°C, maintenue pendant 2 minutes, puis une première

rampe de température de 20°C/min est appliquée jusqu'à atteindre 160°C. Un second gradient de température est ensuite réalisé (2°C/min jusqu'à 190°C), puis une dernière rampe de température (20°C/min) est appliquée jusqu'à la température finale de 260°C, maintenue pendant 5 minutes. Le débit du gaz vecteur (hélium) est maintenu constant pendant toute la durée de l'analyse à 1,3 mL/min.

Chaque échantillon est analysé au minimum en deux réplicats, et la séquence analytique est encadrée toutes les six analyses par un échantillon de (E)-cinnamaldéhyde ou de benzaldéhyde selon l'analyse, préalablement calibré en EA-C/P-IRMS par rapport aux références internationales V-PDB et V-SMOW.

2.3. Résultats et discussion

2.3.1. Etude de la composition des huiles essentielles de cannelle

Les compositions d'huiles essentielles de cannelle *verum* et *cassia* sont décrites dans le **Tableau 14** et les formules chimiques des principaux constituants sont représentées sur la **Figure 41**. Ces deux huiles essentielles sont majoritairement constituées de (E)-cinnamaldéhyde. De nombreuses différences sont observables. La première observation est la présence en trace, dans l'huile essentielle de cannelle cassia, de plusieurs constituants, tel que l'eugénol **(7)** (0,03 ± 0,01%), le limonène **(2)** (0,03 ± 0,01%), le linalol **(3)** (0,44 ± 0,27%), le (E)-β-caryophyllène **(11)** (0,16 ± 0,15%), ou encore le benzoate de benzyle **(14)** (0,04 ± 0,02), alors qu'ils sont beaucoup plus concentrés dans les échantillons de l'espèce verum (eugénol : 4,39 ± 2,51% ; limonène 1,88 ± 2,06% ; linalol 2,82 ± 1,56%; (E)-β-caryophyllène 3,73 ± 1,94% ; benzoate de benzyle 1,15 ± 0,76%). A l'inverse, les molécules de coumarine **(9)** et de (E)-o-methoxycinnamaldéhyde **(12)** représentent une plus grande proportion dans les huiles essentielles de cassia (coumarine : 2,59 ± 1,08% ; (E)-o-methoxycinnamaldéhyde : 3,83 ± 3,70%) que dans les huiles essentielles verum (coumarine : 0,23 ± 0,77% ; (E)-o-methoxycinnamaldéhyde : 0,48 ± 0,52%). Ces différences de composition permettent de distinguer parfaitement les deux origines, comme représentés sur l'analyse par composante principale (**Figure 42**), réalisée en utilisant comme variable les concentrations relatives des différents constituants.

Après s'être assuré de la pureté des échantillons, la naturalité de ces derniers est contrôlée en vérifiant, par GC-MS en mode SIM, la présence ou non du 5-phénylpenta-2,4-diénal **(15)**, impureté résiduelle de synthèse du (E)-cinnamaldéhyde à partir de benzaldéhyde. Sur les 50 échantillons analysés, 39 échantillons présentent des traces de cette impureté. L'origine du (E)-cinnamaldéhyde de ces échantillons n'est donc pas 100% naturelle.

Tableau 14 : Composition des huiles essentielles de cannelle

Composé	No	KI HP1	KI Innowax	Aire total de pic (%)							
				Huile essentielle de cannelle verum (n=22)				Huile essentielle de cannelle cassia (n=32)			
				Moyenne	Min	Max	SD	Moyenne	Min	Max	SD
Benzaldéhyde	(1)	929	1546	0,19	0,04	0,35	0,10	0,83	0,24	2,13	0,42
Limonène	(2)	1023	1219	1,88	0,28	8,48	2,06	0,03	0,01	0,05	0,01
Linalol	(3)	1084	1561	2,82	0,36	5,27	1,56	0,44	0,11	1,27	0,27
(Z)-Cinnamaldéhyde	(4)	1183	1916	0,26	0,07	0,55	0,14	0,25	0,05	0,58	0,15
(E)-Cinnamaldéhyde	(5)	1230	2070	59,80	45,12	71,77	7,19	72,75	60,73	86,31	7,18
Alcool cinnamique	(6)	1270	2310	0,17	0,03	0,46	0,15	0,25	0,07	0,79	0,16
Eugénol	(7)	1327	2196	4,39	0,39	10,63	2,51	0,03	0,01	0,04	0,01
α-Copaène	(8)	1377	1517	0,27	0,02	0,55	0,16	0,33	0,10	1,69	0,29
Coumarine	(9)	1384	2498	0,23	0,00	3,06	0,77	2,59	0,72	4,34	1,08
Acétate de cinnamyle	(10)	1410	2186	3,61	0,48	7,05	2,28	3,27	0,49	9,15	2,20
(E)-β-Caryophyllène	(11)	1419	1628	3,73	0,98	7,89	1,94	0,16	0,03	0,66	0,15
(E)-o-methoxycinnamaldéhyde	(12)	1484	2487	0,48	0,00	2,15	0,52	3,83	0,69	9,91	3,70
Acétate d'eugenyle	(13)	1489	2287	11,95	0,09	22,37	8,17	9,29	0,12	18,87	6,41
Benzoate de benzyle	(14)	1724	2684	1,15	0,19	2,94	0,76	0,04	0,02	0,09	0,02
Total identifié				90,94				94,07			

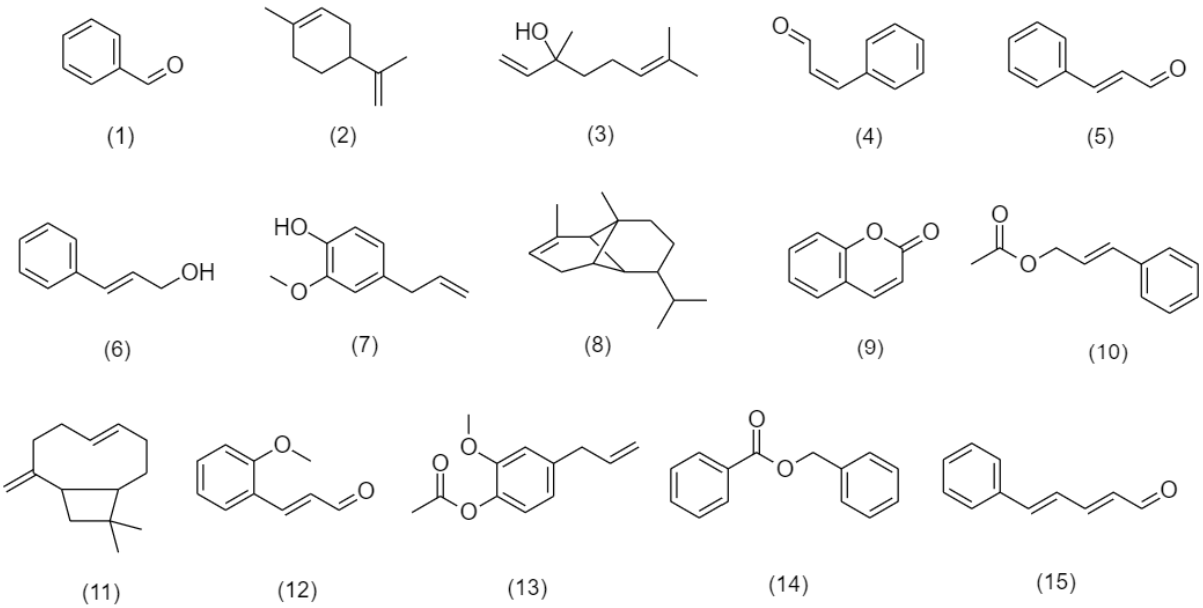

Figure 41 : Formule chimique des différents métabolites composant les huiles essentielles de cannelle Cinnamomum verum et Cinnamomum cassia.

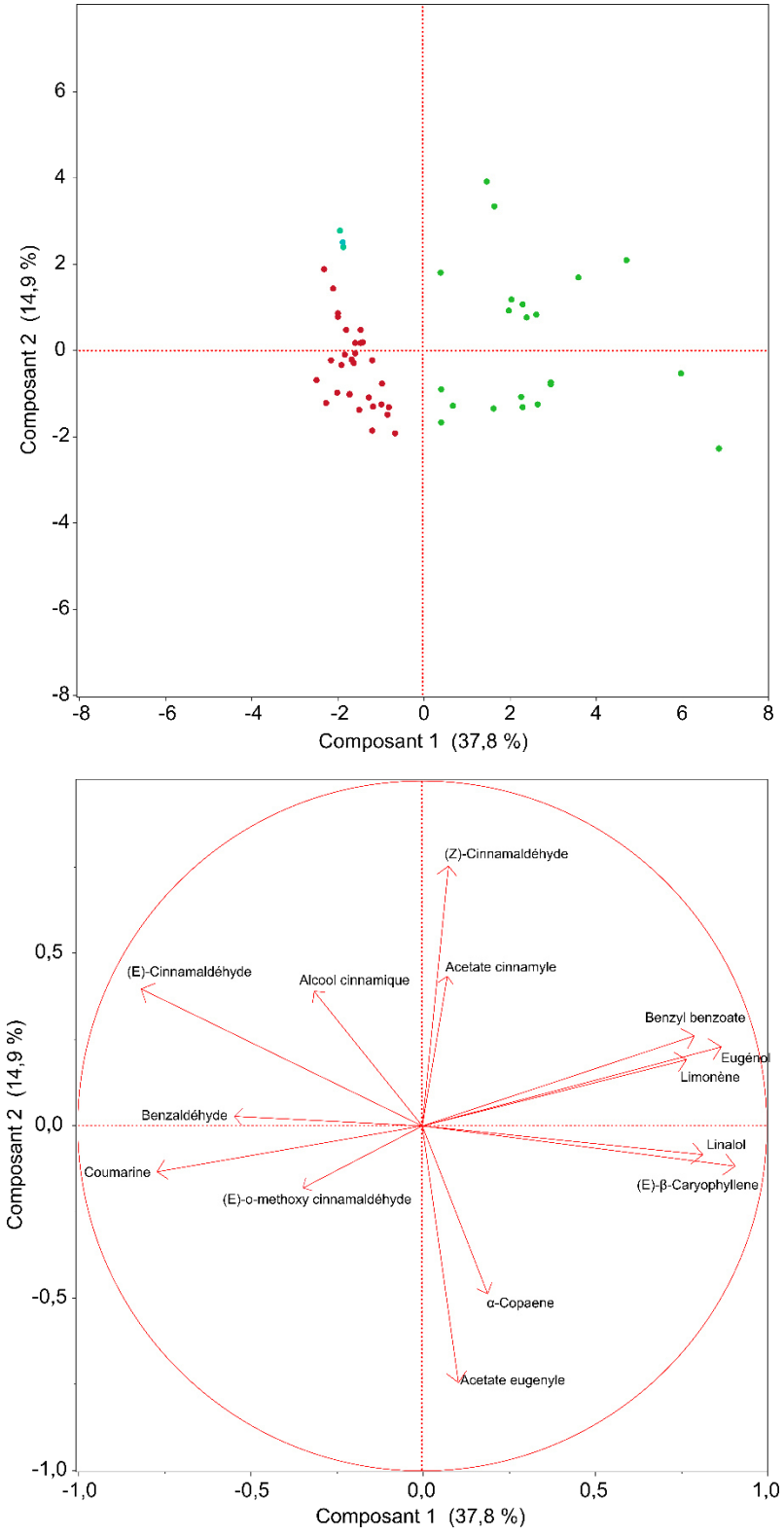

Figure 42 : Scores et loadings de l'analyse en composante principale réalisées sur les 54 échantillons de cannelle cassia (en rouge), verum (en vert), et Burmanii (en bleu), à partir des concentrations relatives des principaux métabolites

2.3.2. Analyses isotopiques GC-C/P-IRMS

2.3.2.1. Etude isotopique du (E)-cinnamaldéhyde

Quelques valeurs isotopiques de références du (E)-cinnamaldéhyde ont été publiées. La valeur $\delta^{13}C$ du (E)-cinnamaldéhyde issu d'huile essentielle de cannelle naturelle est comprise entre -28,20 et -28,60‰ selon Culp (1990, 1992) et entre -24,2 et -27,1‰ selon Sewenig (2003), tandis que les valeurs $\delta^{13}C$ de (E)-cinnamaldéhyde de synthèse obtenu à partir de l'oxydation du toluène, sont comprises entre -24,61 et -25,70‰. D'après la littérature, les valeurs $\delta^{2}H$ de (E)-cinnamaldéhyde naturel sont données entre -142 et -101‰ (Culp and Noakes, 1992b, 1990; Sewenig et al., 2003). Les (E)-cinnamaldéhyde d'origine pétrochimique sont beaucoup plus enrichis en deutérium, ce qui résulte à des valeurs $\delta^{2}H$ beaucoup plus hautes, comprises entre 464 et 569‰ d'après Culp (1990, 1992). Enfin, le (E)-cinnamaldéhyde d'origine naturel, produit de la voie shikimique de biosynthèse, devrait présenter une valeur $\delta^{18}O$ autour de 14.9‰ (Schmidt et al., 2001).

Les valeurs isotopiques du (E)-cinnamaldéhyde des différentes huiles essentielles de cannelle analysées, déterminés par GC-C/P-IRMS, sont décrites dans le **Tableau 15** et représentées en 3D sur la **Figure 43**.

Les (E)-cinnamaldéhydes des huiles essentielles de cannelle, qui ne présentaient pas d'impuretés, ont des ratios isotopiques $\delta^{13}C$ de -28,37 ± 1,14‰ et $\delta^{2}H$ de -142 ± 10‰. Ces résultats sont en accord avec les valeurs isotopiques naturelles présentées par Culp et Sewenig. Nos valeurs $\delta^{2}H$ sont parfois plus négatives toutefois. Les valeurs $\delta^{18}O$ mesurées sont de 13,9 ± 2,2‰, ce qui est proche de la valeur proposée par Schmidt. Toutes ces valeurs sont en accord avec une origine naturelle.

Les huiles essentielles de cannelle qui présentaient des impuretés ont des valeurs isotopiques variées. On peut distinguer celles qui ont des $\delta^{2}H$ indicateurs d'une origine de synthèse, des autres. Les premières ont des ratios isotopiques $\delta^{13}C$ -24,70 ± 1,66‰ et $\delta^{2}H$ entre -42 et 844‰. Ces valeurs isotopiques montrent un enrichissement en ^{2}H et ^{13}C par rapport aux échantillons naturels. Les valeurs $\delta^{2}H$ les plus élevées sont indicatrices d'une origine de synthèse à partir du toluène, tandis que les valeurs les moins élevées semblent correspondre à une origine chlorure de benzyle. Le $\delta^{18}O$ est quant à lui très variable, les valeurs fluctuant de 1,2 à 21,8‰. Les analyses isotopiques viennent confirmer la détection des résidus de synthèse : ces échantillons ont subi un ajout partiel ou total de (E)-cinnamaldéhyde d'origine de synthèse ou d'hémisynthèse.

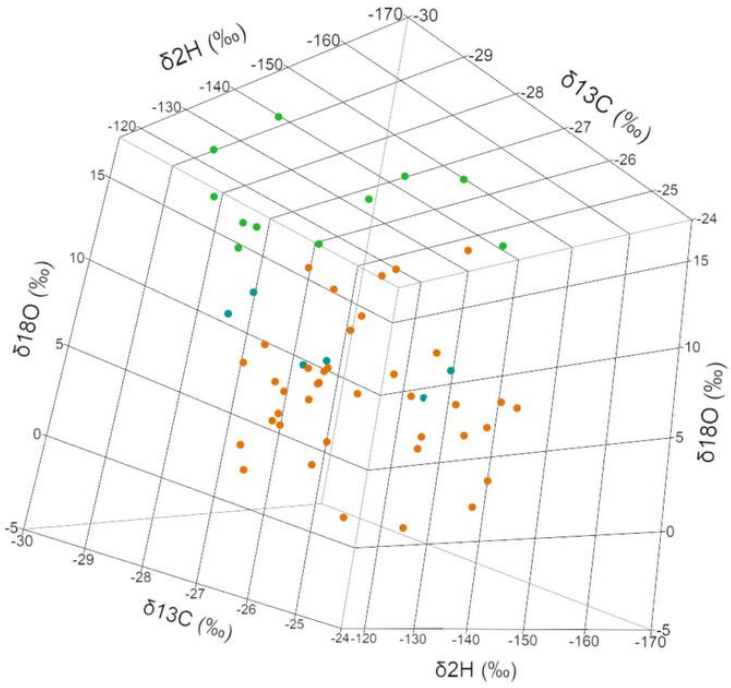

Figure 43 : Représentation tridimensionnelle des analyses isotopiques GC-C/P-IRMS $\delta^{13}C$, $\delta^{2}H$ et $\delta^{18}O$ de (E)-cinnamaldéhydes issus d'huiles essentielles de cannelle sans impuretés (en vert) et avec impuretés (en orange), ainsi que des (E)-cinnamaldéhyde obtenus par hémisynthèses à partir de benzaldéhyde (en bleu). Les échantillons constitués de (E)-cinnamaldéhyde d'origine pétrochimique ont été exclus de cette représentation (valeur $\delta^{2}H$ supérieure à -42‰)

Cependant, d'autres échantillons, qui avaient pourtant dans leur composition des traces de 5-phénylpenta-2,4-diénal, présentent des valeurs isotopiques de (E)-cinnamaldéhyde d'origine naturelle ($\delta^{13}C$ -27,54 ± 0,65‰ et $\delta^{2}H$ -147 ± 12‰). Cependant, on peut constater que les valeurs en $\delta^{18}O$ sont plus faibles (4,0 ± 3,3‰). Les valeurs en oxygène ne correspondent pas à une origine naturelle issue de la voie biosynthétique des phénylpropanoïdes à partir de l'acide shikimique. L'oxygène du (E)-cinnamaldéhyde a été probablement altéré, à partir d'un réactif d'origine naturelle.

Pour vérifier cette hypothèse, plusieurs hémisynthèses de (E)-cinnamaldéhyde ont été réalisées, par aldolisation de benzaldéhydes, provenant de différents échantillons d'huiles essentielles d'amande amère. Les valeurs isotopiques $\delta^{13}C$ et $\delta^{2}H$ obtenues correspondent à une origine naturelle du (E)-cinnamaldéhyde, mais ce n'est pas le cas du $\delta^{18}O$, qui est mesuré entre 7,9‰ et 9,5‰. Ces valeurs sont plus basses que les valeurs mesurées précédemment sur les huiles essentielles de cannelle naturelles, et cela ne correspond pas non plus à la valeur indiquée par Schmidt (2001).

L'oxygène introduit lors de l'aldolisation du benzaldéhyde provient de l'acétaldéhyde utilisé comme réactif. C'est ce dernier qui va influencer la valeur finale du $\delta^{18}O$ du (E)-cinnamaldéhyde produit par cette hémisynthèse. Pour vérifier cette affirmation, les deux échantillons commerciaux d'acétaldéhyde utilisés pour produire les échantillons par aldolisation, sont analysés en EA-P-IRMS, par introduction directe. La mesure de leur valeur $\delta^{18}O$ est de 8,7 ± 0.1‰. Par comparaison, la valeur moyenne $\delta^{18}O$ mesurée sur les 7 échantillons de (E)-cinnamaldéhyde obtenus par aldolisation de benzaldéhyde naturel est de 8,8 ± 0.6‰.

Ces résultats confirment l'origine de la molécule d'oxygène introduite lors de la synthèse à partir du benzaldéhyde. Si la valeur $\delta^{18}O$ de l'acétaldéhyde est plus négative, les (E)-cinnamaldéhydes produits lors de l'aldolisation auront également des valeurs $\delta^{18}O$ plus négatives, ce qui peut expliquer les valeurs très faibles mesurées sur certains échantillons suspects. En effet, l'acétaldéhyde est produit industriellement à partir d'éthanol agricole, dont les valeurs $\delta^{18}O$ sont faibles (entre 3,0‰ et 8,1‰ d'après Schmidt, 2001). Il est donc possible que des synthèses puissent être réalisées avec des acétaldéhydes faiblement enrichis en ^{18}O.

2.3.2.2. Etude isotopique du benzaldéhyde

En ce qui concerne le benzaldéhyde, les valeurs isotopiques d'origines naturelles indiquées dans la littérature sont comprises entre -27,06 et -29,58‰ pour $\delta^{13}C$, et entre -145 et -84‰ pour $\delta^{2}H$ d'après l'étude de Culp et Noakes (1990, 1992), et entre -113 et -148‰ pour $\delta^{2}H$ d'après Ruff et al. (2000), pour une origine amande amère. Schmidt et al. (2001) présentent une valeur $\delta^{18}O$ pour un benzaldéhyde d'origine naturelle issue de la voie shikimique, autour de 19,3‰. Les travaux de Ruff et al. (2000) ont aussi portés sur des échantillons de benzaldéhyde naturel ex-*Cinnamomum cassia*, les valeurs $\delta^{2}H$ données sont comprises entre -83 et -144‰, ce qui se confond avec la gamme de valeurs du benzaldéhyde naturel issu de l'huile essentielle d'amande amère. Les valeurs isotopiques du benzaldéhyde de synthèse sont différentes selon le procédé de synthèse. Un benzaldéhyde issu de l'hydrolyse acide ou basique du (dichlorométhyl)benzène présente des valeurs comprises entre -28,52 et -29,99‰ pour $\delta^{13}C$ (Culp and Noakes, 1992b, 1990), entre -47 et -85‰ pour $\delta^{2}H$ (Culp and Noakes, 1992b, 1990; Ruff et al., 2000), et autour de 6,8‰ pour $\delta^{18}O$, tandis qu'un benzaldéhyde obtenu par oxydation du toluène aura une valeur $\delta^{13}C$ comprise entre -24,70 et -26,50‰ selon Culp et Noakes (1990, 1992), une valeur isotopique $\delta^{2}H$ fortement positive, comprise entre 420‰ et 720‰ environ, et une valeur $\delta^{18}O$ autour de 14,1‰ selon la publication de Schmidt et al. (2001).

Les valeurs isotopiques du benzaldéhyde des différentes huiles essentielles d'amande amère analysées, déterminées par GC-C/P-IRMS, sont décrites dans le **Tableau 16** et représentées en 3D sur la **Figure 44**.

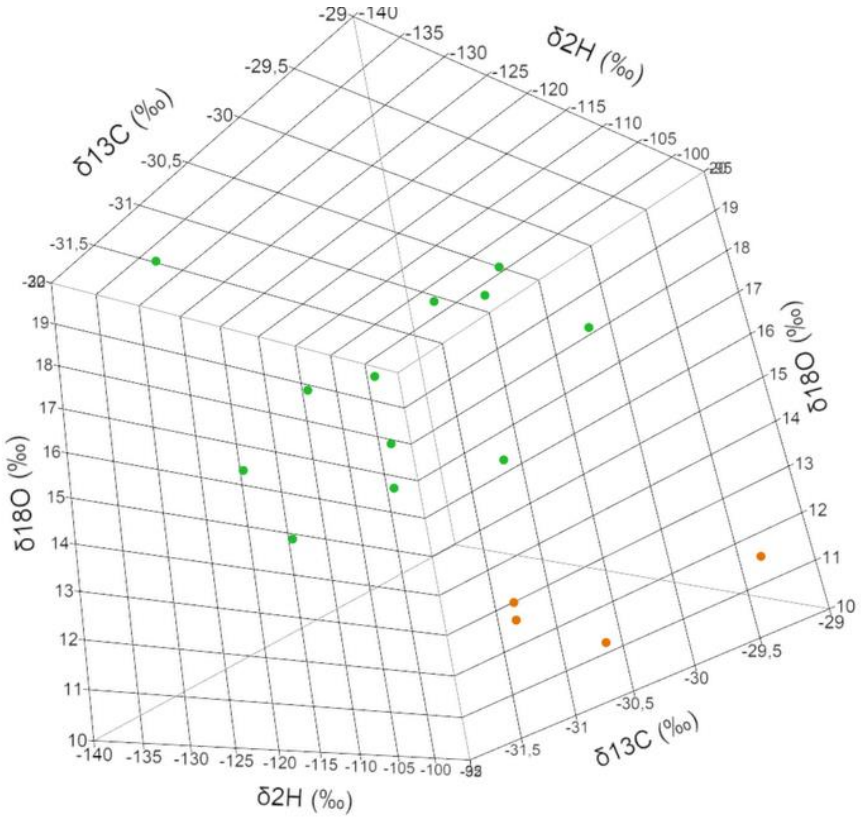

Figure 44 : Représentation tridimensionnelle des analyses isotopiques GC-C/P-IRMS $\delta^{13}C$, $\delta^{2}H$ et $\delta^{18}O$ de benzaldéhydes issus d'huiles essentielles d'amande amère authentiques (en vert) et obtenus par hémisynthèses à partir de benzaldéhyde ex-cassia (en orange). Les échantillons constitués de benzaldéhyde d'origine pétrochimique ont été exclus de cette représentation (valeur δ2H supérieure à 389‰)

Les huiles essentielles d'amande amère ont des valeurs isotopiques correspondant à une origine naturelle du benzaldéhyde, les valeurs isotopiques variant de -31,81 à -29,80‰ pour $\delta^{13}C$, de -131 à -97 pour $\delta^{2}H$, et de 13,4 à 19,4 pour $\delta^{18}O$.

Ces valeurs se distinguent de celles mesurées sur des benzaldéhydes d'origine pétrochimique. En effet, il est possible d'observer des valeurs isotopiques plus positives sur les 3 éléments analysés, ce qui met en évidence un enrichissement plus important en ^{13}C, ^{2}H, et ^{18}O dans les benzaldéhydes de synthèse. Ces valeurs sont caractéristiques d'une synthèse à partir de toluène.

Enfin, différents échantillons de benzaldéhydes, obtenus par rétro aldolisation de (E)-cinnamaldéhydes de différentes origines, ont été analysés. Les hémisynthèses, réalisées à partir de (E)-cinnamaldéhydes

naturels issus d'huiles essentielles de cannelle cassia et verum, présentent des ratios isotopiques stables $\delta^{13}C$ (-29,92 ± 0,54‰) et $\delta^{2}H$ (-108 ± 11‰) similaires aux valeurs obtenues sur les huiles essentielles d'amande amère. Cependant, les valeurs isotopiques $\delta^{18}O$ sont quant à elles plus basses (10,9 ± 0,4‰) que celles de huiles essentielles naturelles.

L'oxygène introduit lors de la réaction de rétro aldolisation du (E)-cinnamaldéhyde est issu de l'eau. Cependant, des échanges isotopiques se produisent entre l'eau et le carbonate utilisé lors de la synthèse (Na_2CO_3), à 100°C (Couchoud, 2008). La valeur $\delta^{18}O$ du benzaldéhyde obtenu par rétroaldolisation est donc dépendante de la valeur isotopique du carbonate utilisé lors de la synthèse, ce qui explique que l'on retrouve des valeurs isotopiques similaires sur les différents benzaldéhydes produits par rétroaldolisation, malgré l'utilisation comme réactif de départ de différentes origines de (E)-cinnamaldéhydes (synthèse ou naturelle à partir d'huiles essentielles d'amande amère).

Le $\delta^{18}O$ de l'eau du robinet, utilisé pour cette synthèse, ne peut être mesuré en EA-P-IRMS. Pour pouvoir réaliser la mesure, nous avons utilisé un système OA-ICOS (Off Axis - Integrated cavity output spectroscopy) (Gupta, 2012; Nehemy et al., 2019; van Geldern et al., 2014). Le $\delta^{18}O$ de l'eau est mesuré à -11‰, tandis que les carbonates sont généralement fortement enrichis en ^{18}O (entre 25 et 30‰, (Couchoud, 2008)). Les échanges isotopiques de l'oxygène entre l'ion carbonate CO_3^{2-} et H_2O conduisent à une valeur intermédiaire qui correspond aux valeurs $\delta^{18}O$ que nous mesurons sur les benzaldéhydes produits par rétro aldolisation.

Tableau 15 : Valeurs isotopiques $\delta^{13}C$, $\delta^{2}H$ et $\delta^{18}O$ de (E)-cinnamaldéhyde naturel issu d'huiles essentielles de cannelle, de (E)-cinnamaldéhyde de synthèse, et de (E)-cinnamaldéhyde obtenus par aldolisation de benzaldéhyde, déterminées par GC-C/P-IRMS.

Echantillons	**Valeurs isotopiques du (E)-cinnamaldéhyde, mesurées par GC-C/P-IRMS (‰)**											
	$\delta^{13}C$				**$\delta^{2}H$**				**$\delta^{18}O$**			
	Moyenne	**Min**	**Max**	**SD**	**Moyenne**	**Min**	**Max**	**SD**	**Moyenne**	**Min**	**Max**	**SD**
Huile essentielle de cannelle, $\delta^{2}H$ conforme, sans impureté (n=11)	-28,37	-29,60	-26,23	1,14	-142	-156	-123	10	13,9	10,9	16,9	2,2
Huile essentielle de cannelle, $\delta^{2}H$ conforme, avec impureté (n=39)	-27,54	-28,68	-26,00	0,65	-147	-168	-125	12	4,0	-2,8	10,5	3,3
Huile essentielle de cannelle, $\delta^{2}H$ non conforme, avec impureté (n=5)	-24,70	-27,57	-23,29	1,66	146	-42	844	391	11,7	1,2	21,8	7,6
(E)-cinnamaldéhyde de synthèse (n=1)	-25,96				540				16,1			
(E)-cinnamaldéhyde obtenu par aldolisation de benzaldéhyde naturel (n=7)	-26,23	-28,51	-24,03	1,68	-125	-138	-109	9	8.8	7.9	9,5	0.6
(E)-cinnamaldéhyde obtenu par aldolisation de benzaldéhyde de synthèse (n=3)	-26,10	-26,69	-25,79	0,51	389	379	407	15	9,4	8,8	9,8	0,5

Tableau 16 : Valeurs isotopiques $\delta^{13}C$, $\delta^{2}H$ et $\delta^{18}O$ de benzaldéhyde naturel issu d'huiles essentielles d'amande amère, de benzaldéhyde de synthèse, et de benzaldéhydes obtenus par rétro-aldolisation de (E)-cinnamaldéhyde, déterminées par GC-C/P-IRMS.

Echantillons	**Valeurs isotopiques du benzaldéhyde, mesurées par GC-C/P-IRMS (‰)**											
	$\delta^{13}C$				**$\delta^{2}H$**				**$\delta^{18}O$**			
	Moyenne	**Min**	**Max**	**SD**	**Moyenne**	**Min**	**Max**	**SD**	**Moyenne**	**Min**	**Max**	**SD**
Huile essentielle d'amande amère (n=12)	-30.72	-31.81	-29.80	1.00	-117	-131	-97	12	16.5	13.4	19.4	2.1
Benzaldéhyde de synthèse (n=3)	-26.17	-26.91	-25.26	0.84	494	389	546	91	20.9	19.2	23.7	2.4
Benzaldéhyde obtenu par rétro aldolisation de (E)-cinnamaldéhyde naturel (n=4)	-29.92	-30.42	-29.18	0.54	-108	-120	-99	11	10.9	10.3	11.2	0.4
(E)-Cinnamaldéhyde obtenu par rétroaldolisation de benzaldéhyde de synthèse (n=1)	-26.57				705				11.2			

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les résultats présentés dans ce chapitre sont prometteurs, car il n'y a actuellement pas de solutions analytiques avec le radiocarbone, les analyses $\delta^{2}H$ et $\delta^{13}C$, et énantiomériques, pour mettre en évidence ces fraudes par hémisynthèse. De plus, la biotechnologie va continuer à s'accroitre pour produire de nouvelles origines de molécules par différents procédés, les mesures isotopiques $\delta^{18}O$ vont présenter un intérêt plus important en fonction des avancées technologiques.

Il peut être envisagé d'autres pistes d'investigations similaires. Par exemple, les huiles essentielles d'origan *Origanum vulgare* sont principalement constituées de carvacrol. Cette molécule peut être hémisynthétisée à partir de limonène (composé majoritaire de l'orange douce) et / ou de carvone (composé majoritaire de la menthe crépue et du carvi) (Gozzi et al., 2009). L'étude de l'hémisynthèse du trans-anéthol, à partir de méthyl chavicol peut être une autre piste envisageable. Le méthyl chavicol est une molécule provenant des huiles essentielles de basilic tropical *Ocimum basilicum*, d'estragon *Artemisia dracunculus*, et de cerfeuil *Anthriscus cerefolium.* Cette molécule, après hémisynthèse, peut servir d'adultérant pour frauder les huiles essentielles anisées (anis *Pimpinella anisum*, badiane *Illicium verum*, fenouil *Foeniculum vulgare*).

Ce système analytique n'est cependant pas restreint à la détection de fraude d'hémisynthèses. De nombreuses applications sont potentiellement réalisables en fonction de la matrice d'étude. L'analyse $\delta^{18}O$ de composés spécifiques par GC-P-IRMS peut en effet être un nouvel outil complémentaire d'authentification, d'autant que de nombreux constituants oxygénés sont présents dans la composition des huiles essentielles, et que ces molécules n'ont pas encore été étudiées par IRMS $\delta^{18}O$. Nos travaux présentés dans le chapitre 2 ont montré que la valeur isotopique $\delta^{18}O$ peut être utilisée pour mettre en évidence une origine pétrochimique. De plus, cette valeur permet le contrôle de l'origine géographique des huiles essentielles, les fractionnements isotopiques de l'oxygène étant, tout comme ceux de l'hydrogène, liés aux cycles atmosphériques de l'eau.

CHAPITRE 6

ÉTUDE DE LA DÉTECTION D'AJOUT D'HUILES VÉGÉTALES DANS LES HUILES ESSENTIELLES

INTRODUCTION

1. L'adultération par ajout d'huile végétale

L'adultération par ajout d'huile végétale ou de solvants dans les produits naturels est une fraude très ancienne. Cette manipulation illégale est généralement réalisée pour augmenter de manière artificielle les volumes de productions d'huiles essentielles. L'ajout de solvants organiques est aujourd'hui peu répandu car très facilement détectable par chromatographie gazeuse. Ce n'est cependant pas le cas des ajouts d'huiles minérales ou végétales peu chères, qui permettent d'augmenter la densité des huiles essentielles, pour pouvoir être revendues plus cher. L'huile essentielle d'ylang-ylang est particulièrement ciblée par ce type de fraude, car son prix de vente est calculé en fonction de son poids. Différents ajouts sont cités dans la littérature, tels que l'ajout d'huile de ricin, de coco ou d'huile de frein (Benini et al., 2010).

Pour identifier un ajout d'huile végétale, l'AFNOR préconise de diluer l'huile essentielle supposée fraudée dans de l'éthanol, mais certaines huiles végétales se solubilisent bien lorsqu'elles sont mélangées dans l'huile essentielle. D'autre part, certaines huiles essentielles riches en sesquiterpènes ne sont pas totalement solubles dans l'éthanol (cas des baies roses, des baies de genièvres ou de l'ylang-ylang). Une mesure de la densité n'est également pas toujours pertinente car certaines huiles végétales ont des densités proches des huiles essentielles. Ces techniques restent dont très perfectibles. La détection d'ajouts d'huile végétale est difficile à l'aide des méthodes classiques d'authentification. En effet, les huiles végétales sont essentiellement composées de triglycérides, qui ne sont pas détectables par GC-FID, en condition classique d'analyse de la composition des huiles essentielles, car ce sont des substances faiblement volatiles.

2. Stratégie analytique

2.1. Analyse des triglycérides par chromatographie en phase gazeuse

Les triglycérides sont composés de trois esters d'acides gras liés entre eux par un glycérol. Les triglycérides sont les constituants majoritaires des huiles végétales. Afin de pouvoir analyser, par chromatographie en phase gazeuse, les triglycérides, au sein d'une huile végétale, une préparation d'échantillon est nécessaire. Le procédé utilisé consiste tout d'abord par hydrolyser le triglycéride pour libérer les acides gras, puis une étape de dérivatisation est employée, pour produire des molécules plus volatiles et moins polaires, ce qui permet d'améliorer l'analyse (Topolewska et al., 2015). Les dérivés d'acides gras obtenus sont généralement des esters méthylés d'acides gras, également appelés

FAMEs (Fatty Acid Methyl Esters, **Figure 45**). De nombreuses méthodes de dérivatisation peuvent être employées (Kail et al., 2012; Topolewska et al., 2015).

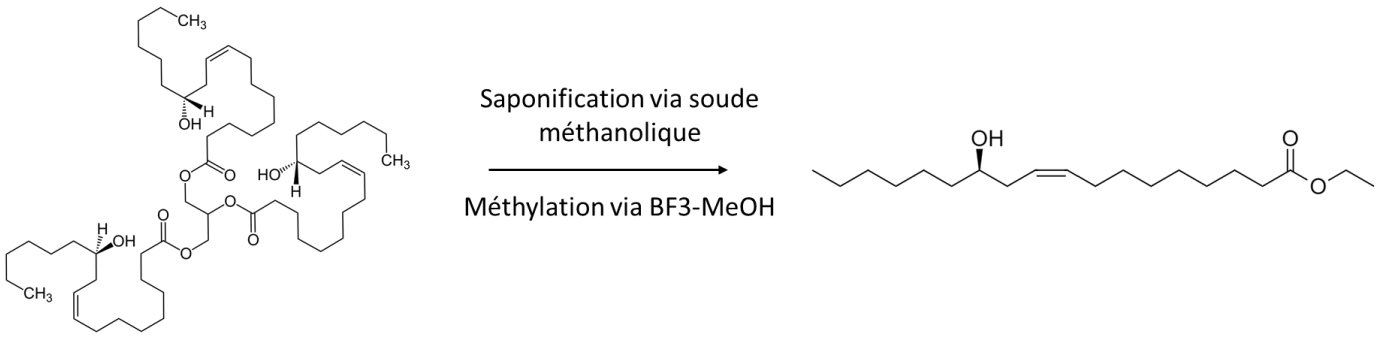

Figure 45 : Exemple d'analyse de dérivatisation : la ricinoléine est dérivée en ester méthylé d'acide ricinoléique

Cette étape de préparation d'échantillons étant contraignante pour l'analyse des triglycérides dans les huiles végétales, les constructeurs ont récemment commencé à développer des colonnes chromatographiques permettant d'atteindre une stabilité thermique de 370°C, tel que la Rxi-65TG (Restek) pour permettre de visualiser les monoglycérides, les diglycérides, et les triglycérides non dérivatisés.

2.2. Analyse thermogravimétrique

L'analyse thermogravimétrique permet de mesurer l'évolution de la masse d'un échantillon au cours du temps en fonction de la température appliquée. L'échantillon est préalablement pesé dans une nacelle en céramique ou en alumine, placé dans un four, et suspendu par un fil de platine à une balance à compensation. Au cours du temps, en fonction du gradient de température appliqué, l'échantillon va progressivement s'évaporer. La balance détermine la perte de masse en fonction des différences de courants mesurées.

Les huiles essentielles sont principalement constituées de terpènes, qui sont plus volatils que les triglycérides présents dans les huiles végétales. De précédentes études ont montré que 97% environ des constituants de l'huile essentielle sont évaporés après avoir atteint une température de plus 200°C (Hazra et al., 2004; Mazollier, 2013; Ochocka et al., 1992). Les analyses TGA réalisées sur les huiles essentielles ne montrent qu'une perte de masse, correspondant à l'élimination des terpènes (Hazra et al., 2002). Ce type d'analyse peut donc potentiellement permettre de mettre en évidence des ajouts d'huile végétale dans l'huile essentielle.

L'objectif est de mettre au point une méthode qui permet d'évaporer entièrement tous les constituants visibles en GC (Molécules de température d'évaporation inférieure à la paraffine C30). La masse résiduelle d'une huile essentielle sera alors minimale voire nulle, étant donné que la quasi-totalité de la matrice sera éliminée. A l'inverse, les huiles végétales sont principalement constituées de triglycérides, composés non volatils. La dégradation de ces produits n'est pas observable à 300°C. Il est donc attendu des profils différents pour les huiles essentielles adultérées avec deux pertes de masse : la première concernant les terpènes, et la 2eme concernant les triglycérides dégradés.

2.3. Analyses spectroscopiques par Infra Rouge

D'autres techniques analytiques permettent la mise en évidence d'impuretés résiduelles, telles que les méthodes spectroscopiques qui ont l'avantage d'analyser rapidement un échantillon. Ces méthodes sont de bonnes alternatives aux analyses isotopiques $\delta^{13}C$ par IRMS (Pironti et al., 2016). La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier par analyse de réflectance total atténuée (FTIR-ATR) permet d'identifier les fonctions chimiques présentes dans les huiles essentielles analysées, tandis que l'analyse par proche infrarouge (NIR) nécessite quant à elle l'application de méthodes chimiométriques pour être exploitée.

De nombreuses applications sont référencées dans la littérature. La FTIR-ATR a notamment été utilisée pour authentifier de nombreuses huiles essentielles (Bounaas et al., 2018), principalement celles de laurier (Ordoudi et al., 2020), de tea tree (Gallart-Mateu et al., 2018), d'eucalyptus (Baranska et al., 2006), et de sauge sclarée (Gudi et al., 2015). La NIR a quant à elle été appliquée à des huiles essentielles de santal (Kuriakose et al., 2010; Kuriakose and Joe, 2012, 2013), de lavande (Lafhal et al., 2016, 2015), de tea tree (Gallart-Mateu et al., 2018) ou encore d'origan (Camps et al., 2014), ainsi qu'à des huiles végétales (Christy et al., 2004). L'utilisation de la spectroscopie Raman est reportée pour des applications sur des huiles essentielles de lavande et lavandin (Lafhal et al., 2016, 2015), de fenouil (Strehle et al., 2005) ou encore d'eucalyptus (Baranska et al., 2006).

3. L'huile essentielle de cypriol

Ces problématiques d'ajout d'huile végétale touchent de nombreuses huiles essentielles, incluant les huiles essentielles de patchouli, d'ylang ylang, de litsea cubeba, ou encore du vétiver. Ce chapitre se consacre à la mise en évidence d'ajout d'huile végétale dans l'huile essentielle de cypriol. Cette dernière est une huile essentielle originaire d'Inde, obtenue par distillation à la vapeur d'eau des rhizomes du *Cyperus scariosus* R.Br. Principalement utilisée en parfumerie, son rendement est cependant très faible (0,4%). Peu de données sont référencées dans la littérature concernant l'huile essentielle de cypriol. Sa composition est principalement constituée de sesquiterpènes (cypérène) et comprend également de nombreux oxydes, alcools, et cétones (Clery et al., 2016).

Cyperus scariosus présente la particularité d'être une plante C4 (Kumar et al., 2017, 2016), ce qui reste très rare dans la nature. Outre les analyses citées précédemment, il peut aussi être envisagé de réaliser des analyses $\delta^{13}C$ par EA-C-IRMS sur l'échantillon total. Les valeurs isotopiques attendues doivent être comprises entre -14,83‰ et -11,15‰. Une mesure plus négative indiquera une coupe avec un extrait issu d'une plante C3. La plupart des huiles végétales bon marché sont issues d'une plante C3, comme le tournesol, le colza, l'olive, la noix de coco et le ricin. L'huile végétale de maïs, issue d'une plante C4 est une des rares exceptions (Woodbury et al., 1998a, 1998b).

MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. Echantillons

30 échantillons d'huiles essentielles de cypriol *Cyperus scariosus* R.Br., obtenus par distillation à la vapeur d'eau des racines du cypriol nagarmotha, provenant d'Inde, ont été analysés dans cette étude.

Des analyses préliminaires en TGA et GC-MS ont été réalisées sur un échantillon d'huile essentielle de Patchouli *Pogostemon cablin* Bentham d'origine Indonésie, obtenu par distillation à la vapeur d'eau des feuilles séchées.

Plusieurs échantillons d'huiles végétales ont été testés lors de cette étude : huile de ricin *Ricinus communis*, huile d'olive *Olea europaea*, huile de tournesol *Helianthus annuus*, huile de colza *Brassica napus,* huile de maïs *Zea mays.*

2. Méthodes analytiques

2.1. Détermination du profil thermogravimétrique

Les huiles essentielles sont tout d'abord analysées par TGA jusqu'à évaporation complète des échantillons, pour déterminer le profil thermogravimétrique.

L'appareil utilisé est un modèle TGA Q50 (TA Instruments). Un flux d'azote vertical (10 mL/min) est utilisé comme gaz de balayage pour protéger l'électronique de mesure contre les vapeurs de l'échantillon. Un second flux d'azote (90 mL/min) horizontal est appliqué dans le four, où se trouve la nacelle contenant l'échantillon. Des prélèvements d'environ 130 mg d'échantillons sont pesés dans une nacelle en céramique. Sous gaz inerte N_2, le programme de température appliqué est le suivant : T°C ambiante pendant 5 min puis un gradient de température de 10°C/min est réalisé, jusqu'à une température finale de 600°C.

En amont des analyses TGA, un calibrage en masse est réalisé avec des poids certifiés. Un calibrage en température est réalisé en déterminant le point de Curie du nickel (température théorique de 358°C). Pour cela, un barreau de nickel est placé dans le four, et une rampe de température de 10°C/min est appliquée jusqu'à 450°C. Pendant l'analyse, un aimant est placé sous le four. Le nickel présente des propriétés magnétiques qui lui permettent d'intéragir avec le champ de l'aimant. Une force additionnelle induit une augmentation de poids apparent. A la température de Curie, le nickel perd son aimantation permanente, ce qui se traduit par une différence de masse de plus de 2% observée sur le thermogramme.

2.2. Analyse des résidus par GC-MS

2.2.1. Analyse thermogravimétrique

Une seconde méthode TGA est développée dans le but d'éliminer uniquement les constituants habituellement présents dans les huiles essentielles (terpènes, phénylpropanoïdes), observables en GC-FID. Les corps gras, éventuellement présents dans les échantillons en cas d'adultération, ne seront pas dégradés, et seront présents en fin d'analyse dans le résidu final.

Sous gaz inerte N_2, le programme de température appliqué est le suivant : une isotherme à temprature ambiante est maintenue pendant 5 minutes, puis un gradient de température de 10°C/min est réalisé, jusqu'à la température finale de 200°C, isotherme maintenue pendant 1000 minutes.

2.2.2. Protocole de dérivatisation et analyse GC-MS

Les résidus obtenus en TGA, contenus dans les nacelles, sont extraits avec du chloroforme au bain à ultrasons. Le chloroforme est ensuite évaporé sous flux d'azote. L'échantillon résiduel est ensuite dilué dans 1 mL de soude méthanolique 0,5 N (2 g de soude mis en solution dans 100 mL d'un mélange 99,5% méthanol et 0,5% eau). Le mélange est chauffé à reflux pendant 15 minutes. Cette étape de saponification permet de transformer les acides en carboxylates. 1 à 2 mL d'une solution de BF_3^- méthanol est ensuite ajouté dans le ballon et porté à reflux pendant 10 minutes. Cette étape de méthylation va transformer les carboxylates en ester. Le mélange est ensuite refroidi à température ambiante. Un volume équivalant d'une solution saturée en hydrogénocarbonate, diluée dans l'eau, est ensuite ajouté jusqu'à pH basique. Cette troisième étape est nécessaire pour neutraliser l'excès d'acide produit par l'ajout de BF_3^-. Après dégagement du dioxyde de carbone, la phase organique est ensuite extraite par ajout de 2 mL d'hexane, et traitée avec plusieurs lavages à la saumure pour éliminer toute trace de base. Le surnageant, contenant les esters méthylés d'acide gras, est récupéré, et analysé par GC-MS.

Les analyses GC-MS ont été réalisées à l'aide d'un système chromatographique 6890N GC (Agilent Technologies), couplé à un spectromètre de masse 5975 inert XL MSD, avec une source d'ionisation de type impact électronique (70 eV). Un volume de 1 µL de surnageant prélevé est injecté dans la GC en mode split (50 :1), avec une température d'injection fixée à 280°C. Le débit constant d'hélium (gaz vecteur) est fixé à 1,0 mL/min. Les composés volatiles sont séparés à l'aide d'une colonne capillaire HP-5 (30 m * 0.250 mm * 0.25 µm, Agilent Technologies). La température initiale est maintenue à 50°C pendant 3 minutes, puis un gradient de température de 5°C/min est appliqué jusqu'à atteindre la température finale de 315°C ; maintenue pendant 8 minutes. La gamme de masse scannée en TIC est comprise entre 35 et 350 m/z.

2.3. Analyse par couplage TGA-FTIR

L'analyse de résidu étant longue, une méthode par couplage TGA-FTIR a été développée pour tester son efficacité pour la détection d'ajouts d'huiles végétales dans les échantillons d'huiles essentielles.

Le couplage TGA-FTIR permet de caractériser, par analyse spectroscopique FTIR en transmission, les gaz qui se dégagent d'un échantillon pendant l'analyse TGA. L'appareil utilisé est un modèle TGA Q50 (TA Instruments) couplé, à l'aide d'une interface TGA AEM, à un spectromètre FTIR Nexus 70 (Thermo), équipé d'un détecteur MCT.

Un flux d'azote (10 mL/min) est utilisé comme gaz de balayage dans la balance. Le débit d'azote appliqué sur l'échantillon est de 90 mL/min. 130 mg d'échantillons sont pesés dans une nacelle en céramique. Sous gaz inerte N_2, le programme de température appliqué est le suivant : une isotherme à temprature ambiante est maintenue pendant 5 minutes puis un gradient de température de 10°C/min est réalisé, jusqu'à la température finale de 800°C, isotherme maintenue pendant 5 minutes.

Les molécules issues de la dégradation de l'échantillon, au cours de la rampe de température appliquée, traversent ensuite une ligne de transfert connectée à l'appareil FTIR. Cette ligne de transfert est chauffée à 245°C, pour éviter que les molécules se condensent. Le gaz rentre ensuite dans une cellule de gaz FTIR. Le faisceau IR est dévié par un miroir, traverse une cellule KBr, puis passe à travers l'échantillon, sous forme gaz, avant d'être réfléchi par un second miroir vers le détecteur MCT. L'énergie transmise est mesurée par le détecteur, et un spectre IR est généré. La mesure FTIR est réalisée entre les longueurs d'ondes 4000 et 650 cm^{-1}. Un spectre IR est généré toutes les 15 secondes d'analyses, et la résolution appliquée est de 4 cm^{-1}.

A l'issue de l'analyse TGA-FTIR, un profil de la quantité de gaz détecté au cours de l'analyse est obtenu, le Gram Schmidt. Chaque point de ce profil correspond à un spectre IR. Il est également possible d'extraire un chemigramme correspondant au profil de dégagement gazeux d'un pic donné.

2.4. Analyse EA-C-IRMS : comparaisons $\delta^{13}C$ entre plantes C3 et C4

Afin de comparer les performances avec les méthodes d'authentification par TGA, et TGA-FTIR, des analyses EA-C-IRMS ont été réalisées, afin de mettre en évidence des différences entre échantillons de plantes en C3 et en C4, par détermination du $\delta^{13}C$.

Les analyses $\delta^{13}C$ ont été effectuées, en EA-C-IRMS, sur le couplage Flash HT-Delta V Plus (Thermofisher). Les échantillons prélevés en capsule d'étain tombent dans une unité de combustion maintenue à 950°C dans un courant d'hélium additionné d'oxygène. Le carbone est transformé en CO_2, puis les gaz passent sur du cuivre réduit chauffé à 650°C ou l'excès d'oxygène est retenu suivi d'un piège à eau avant d'être envoyé dans le spectromètre de masse des rapports isotopique via l'interface Conflo IV. Les calibrations du couplage sont vérifiées par le passage de prélèvements de référence internationales : IAEA CH7 (feuille de polyéthylène : $\delta^{13}C$(‰) -32,15), et USGS40 (acide L glutamique: $\delta^{13}C$ (‰) -26,39)

2.5. Analyses GC-FID – tests d'une colonne chromatographique à stabilité thermique élevée

Enfin, des analyses par GC-FID ont également été réalisées à l'aide d'une colonne chromatographique à stabilité thermique élevée Rxi-65TG (30 m*0.320 mm*0.10 µm, Restek). L'appareil chromatographique utilisé est un système 6890N (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), équipé d'un détecteur FID, dont la température est réglée à 365°C. Les échantillons purs sont préalablement dilués dans de l'isooctane (100 mg dans 5 mL), avant d'être injectés (1 µL) en mode split (25 :1), à une température d'injection de 360°C. Un débit constant d'H_2 (gaz vecteur) de 2 mL/min est appliqué. La programmation de température réalisée pendant l'analyse est la suivante : la température initiale de 200°C est maintenue pendant 1,2 minutes, puis un gradient de température de 21,7°C/min est appliqué jusqu'à atteindre 350°C. Une seconde rampe de température de 1,2°C/min est réalisée jusqu'à la température finale de 365°C, maintenue pendant 15 minutes.

APPLICATIONS

1. Investigations

1.1. Détermination du profil thermogravimétrique

Des premiers travaux sont réalisés sur une huile essentielle de patchouli. Cette huile essentielle présente un profil thermogravimétrique avec une unique perte de masse (**Figure 46**). 99,3% de la masse initiale de l'huile essentielle sont évaporés à 300°C. Cette perte de masse correspond aux différents terpènes (monoterpènes et sesquiterpènes) de l'huile essentielle de patchouli.

Des ajouts d'huiles végétales sont ensuite réalisés. De l'huile végétale de colza, une des huiles végétales les moins chères du marché, est ajoutée à l'huile essentielle de patchouli. Deux niveaux d'adultérations sont réalisés : 5 et 10%. Les profils TGA de ces deux échantillons (**Figure 46**) montrent l'apparition d'une seconde perte de masse, qui correspond à l'huile végétale de colza ajoutée. Cette deuxième perte de masse correspond aux ajouts réalisés : la première huile essentielle présente 5,1% de résidu, et la seconde 9,8%, correspondant aux pourcentages d'adultérations (**Figure 47**).

Dans un second temps, des huiles essentielles de cypriol sont analysées. La 1ère huile essentielle de cypriol, authentique, ne présente pas de seconde perte de masse. Elle présente cependant un résidu d'environ 1,5%, qui peut s'expliquer par la présence importante de sesquiterpènes dans ce type de matière. Les deux échantillons suivants (Cypriol n°18 et n°21) présentent une seconde perte de masse suspecte qui pourrait correspondre à un ajout d'huile végétale.

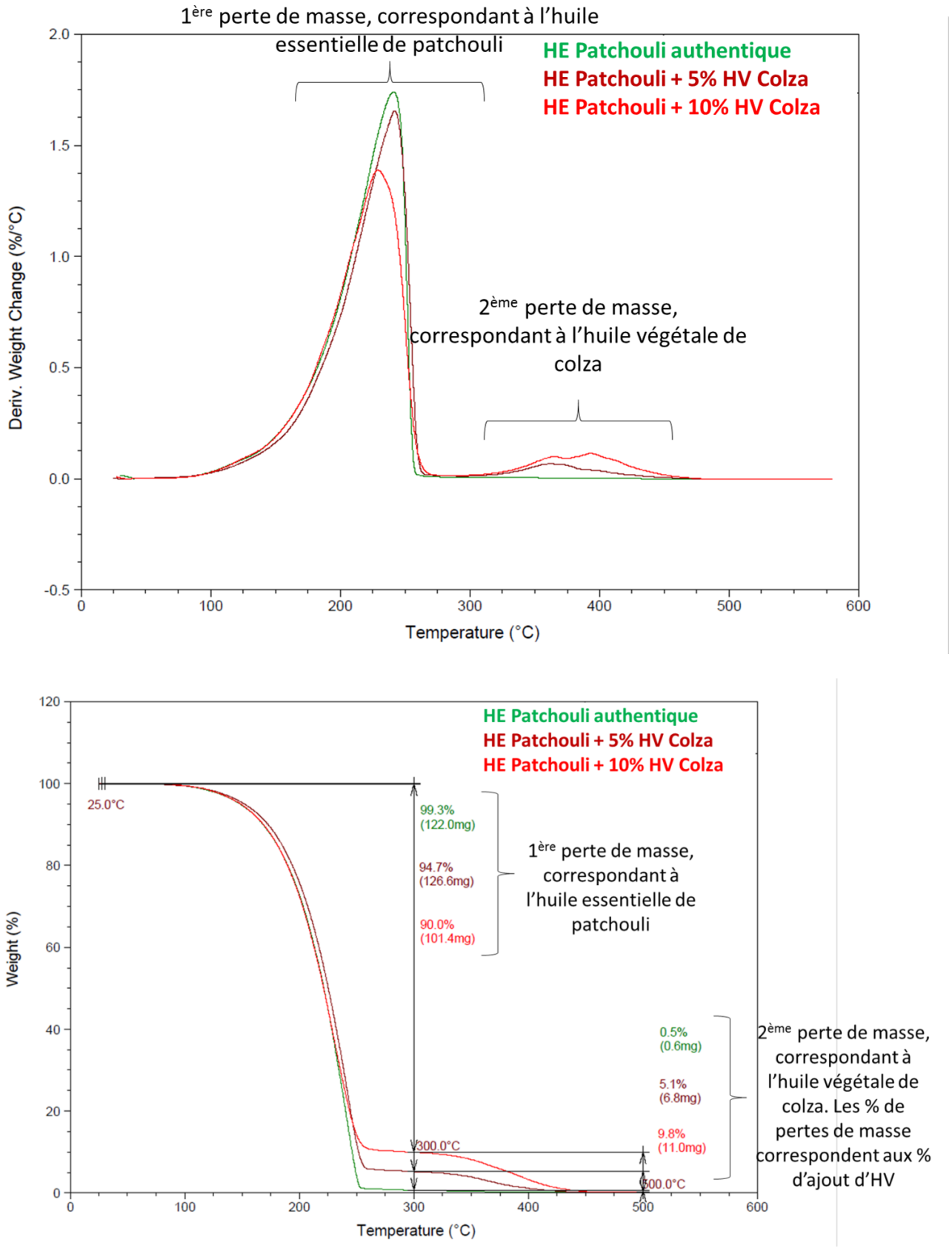

Figure 46 : Profil thermogravimétrique d'une huile essentielle de patchouli authentique et adultérée avec 5 et 10% d'huile végétale de colza.

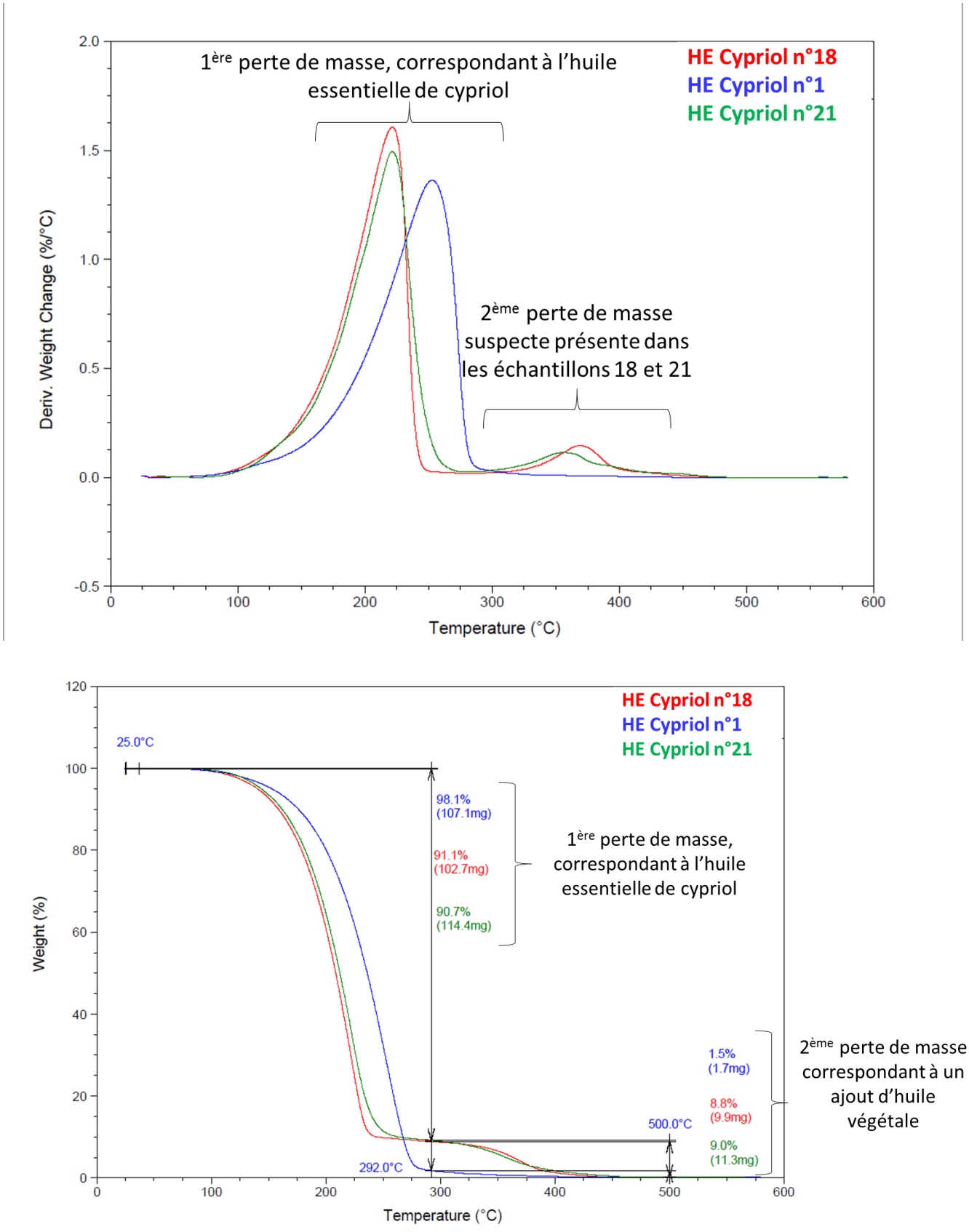

Figure 47 : Profil thermogravimétrique de trois échantillons d'huiles essentielles de cypriol.

1.2. Analyse des résidus par GC-MS

Dans le but de caractériser la 2ème perte de masse observée sur certains profils thermogravimétriques, une seconde méthode TGA est développée, avec l'application d'une isotherme de 1000 minutes à 200°C. Cette programmation de température permet d'évaporer les composés habituellement présents dans les huiles essentielles, correspondant à la 1ère perte de masse. Le résidu obtenu en fin d'analyse correspond à la seconde perte de masse observée.

Une huile végétale de colza est tout d'abord testée avec cette méthode, et son résidu est analysé, après dérivatisation, par GC-MS. Le spectre obtenu est comparé avec le spectre de ce même échantillon, avant analyse TGA (**Figure 48**). Les profils GC-MS sont similaires, ce qui permet de conclure que la méthode ne dégrade pas la composition du résidu, l'huile de colza n'est pas détériorée à 200°C sous N_2. La méthode est donc appliquée à l'échantillon d'huile essentielle de patchouli, adultéré avec 10% d'huile végétale de colza. Le profil obtenu en GC-MS (**Figure 48**) correspond bien à l'huile végétale de colza. En conclusion, la seconde perte de masse correspond bien aux molécules constituant l'huile végétale, et permet de mettre en évidence des ajouts d'huiles végétales.

La stratégie analytique est employée pour déterminer la nature des résidus suspects des huiles essentielles de cypriol 18 et 21. Ces résidus, après dérivatisation, contiennent, en grande quantité, des esters méthylés d'acide ricinoléique, ce qui correspond à la présence de ricinoléine dans ces deux échantillons d'huiles essentielles. Les profils GC-MS des résidus sont similaires à la composition d'une huile végétale de ricin (**Figure 49**), ce qui nous permet de conclure que les échantillons 18 et 21 sont adultérés avec de l'huile végétale de ricin. Cet ajout est estimé à moins de 10% de l'huile essentielle. Aucune seconde perte de masse n'était observée pour l'échantillon de cypriol n°1, ce qui indique qu'il n'a pas été adultéré avec un corps gras.

L'analyse des résidus permet de conclure sur l'utilisation de l'analyse TGA pour l'authentification d'huiles essentielles adultérées avec des huiles végétales. La technique TGA est une méthode peu chère, rapide, et efficace pour la détection de ces ajouts.

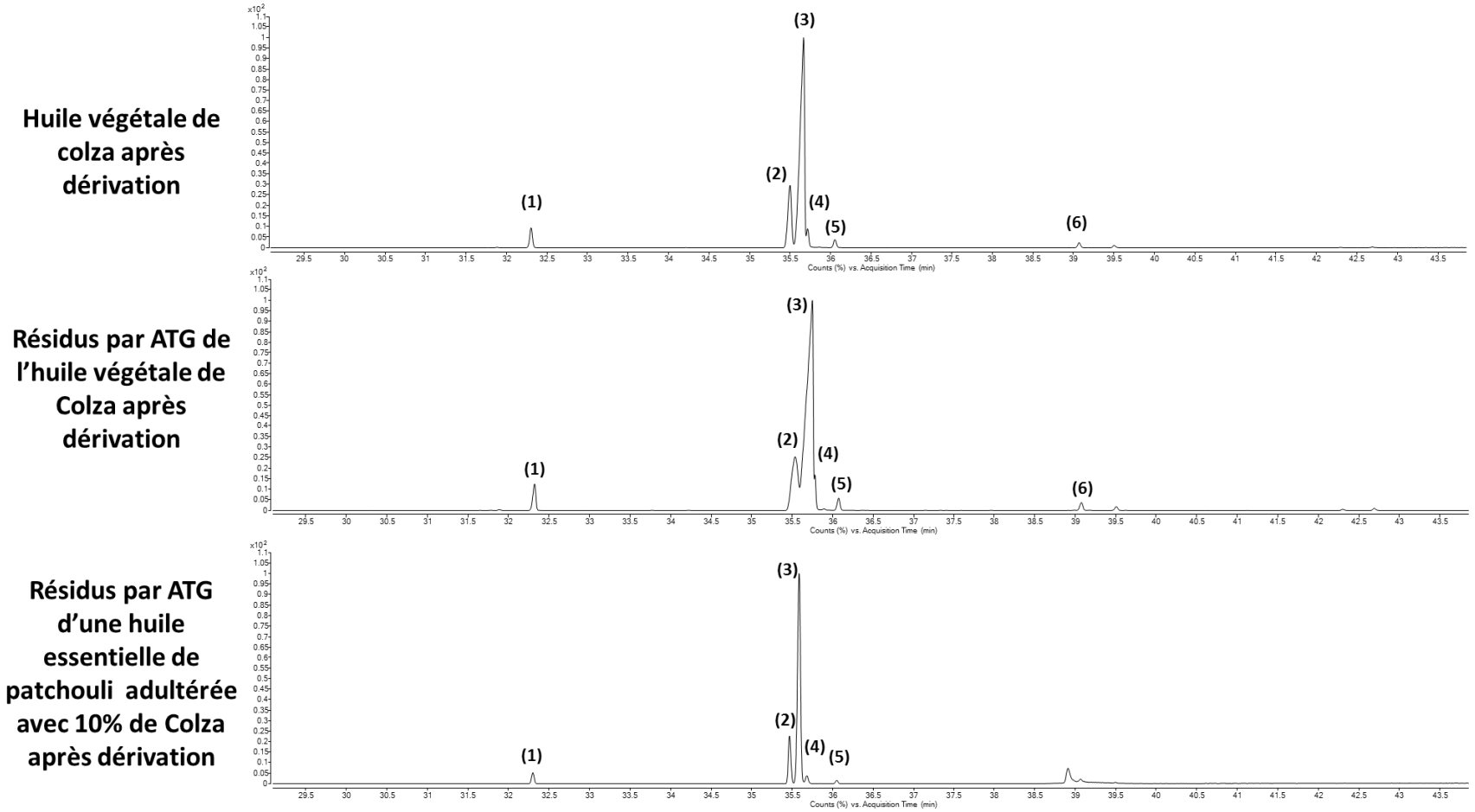

Figure 48 : Profils GC-MS, après application d'un protocole de dérivatisation, d'une huile végétale de colza, des résidus TGA d'une huile végétale de colza, et des résidus TGA d'une huile essentielle de patchouli adultérée avec 10% d'huile végétale de colza. Composés identifiés : Ester méthylique de l'acide palmitique (1), de l'acide linoléique (2), de l'acide oléique (3), de l'acide élaïdique (4), de l'acide stéarique (5), et de l'acide11- écosénoïque (6)

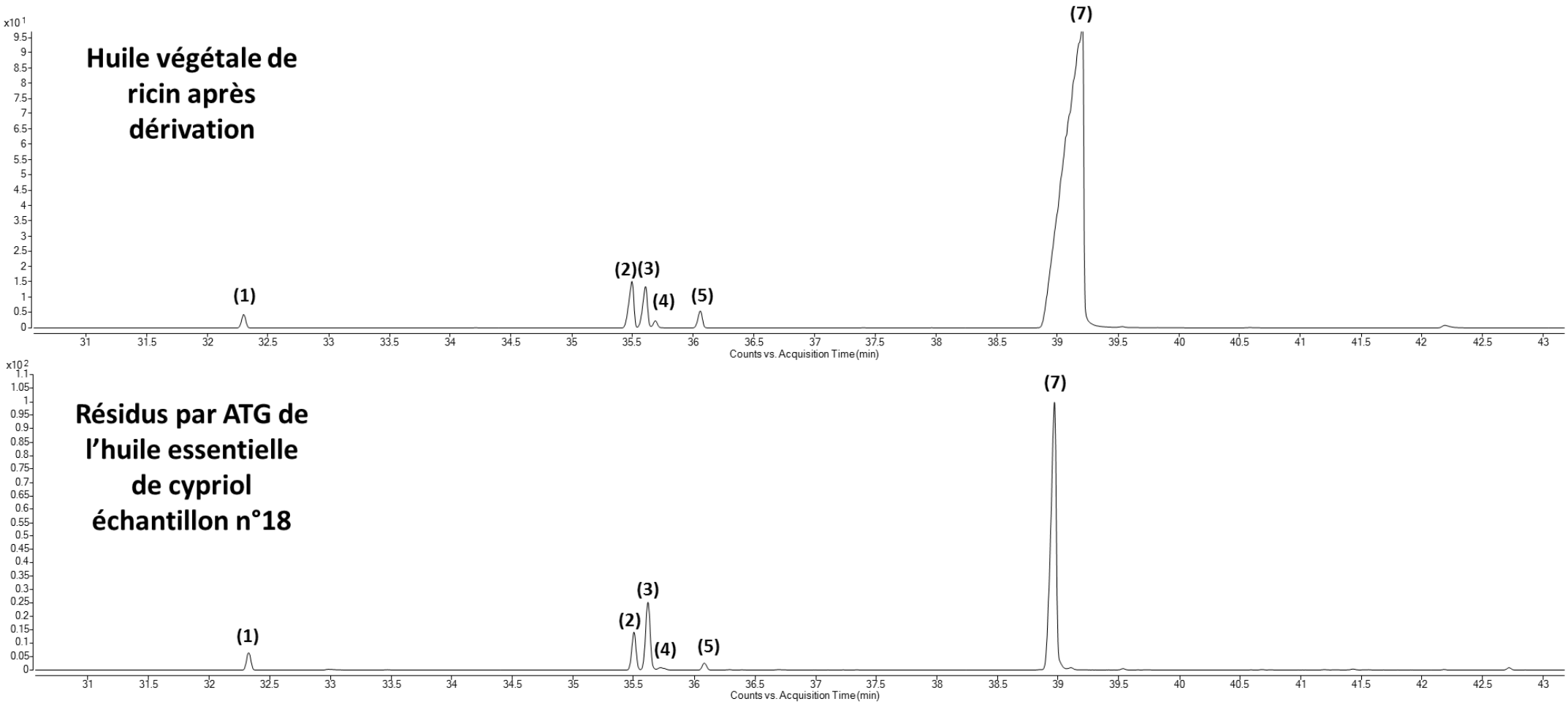

Figure 49 : Profils GC-MS, après application d'un protocole de dérivatisation, d'une huile végétale de ricin, et des résidus TGA d'une huile essentielle de cypriol (Echantillon n°18). Composés identifiés : Ester méthylique de l'acide palmitique (1), de l'acide linoléique (2), de l'acide oléique (3), de l'acide élaïdique (4), de l'acide stéarique (5), et de l'acide ricinoléique (7)

1.3. Analyse TGA-FTIR

Les trois échantillons d'huiles essentielles de cypriol sont investigués en couplage TGA-FTIR, pour tester l'efficacité de cette méthode. Cette technique permet de caractériser, par infrarouge, les gaz qui se dégagent d'un échantillon analysé par TGA. Cela permet ainsi d'analyser en continu les dégagements gazeux observés lors de l'apparition de la seconde perte de masse des échantillons 18 et 21.

L'objectif est de mettre en évidence des différences de spectres IR entre huile essentielle naturelle et huile essentielle adultérée. Les triglycérides des huiles végétales possèdent plusieurs fonctions esters caractéristiques.

Le spectre ci-après (**Figure 50**) correspond à l'échantillon HE cypriol n°1 à 260°C, on observe les bandes caractéristiques d'un alcène $=CH_2$ (3079 cm^{-1}, 1644 cm^{-1}), de groupes CH_3 et CH_2 (2959, 2933 et 2879 cm^{-1}), et de deux carbonyles différents (1724 et 1692 cm^{-1}). Ce spectre est observé pour les trois échantillons.

Des dégagements gazeux sont détectés pour l'huile essentielle de cypriol n°1. De la vapeur d'eau et du CO_2 sont détectés de la température ambiante initiale à 155°C, puis entre 310 et 800°C. Deux composés carbonylés sont identifiés entre 310 et 500°C. Enfin, pendant toute la durée de l'analyse, les dégagements gazeux d'un alcène et de chaines alkyles sont détectés.

Pour les huiles n°18 et 21, on observe les mêmes dégagements que pour l'huile n°1. On détecte en plus un ester entre 70 et 800°C (bande à 1232cm^{-1}), et un acide gras insaturé entre 320 et 510°C (bandes à 1122, 1775 et 3579 cm^{-1}). Pour l'huile n°18, on observe également une bande carbonyle à 1749cm^{-1} entre 320 et 510°C, et du monoxyde de carbone.

On observe des différences entre l'huile essentielle de cypriol de référence n°1 et les deux huiles essentielles suspectées d'être adultérées à l'huile de ricin n°18 et 21. Ces différences se traduisent par le dégagement d'un ester et d'acides gras insaturés, caractéristiques d'une huile végétale, en l'occurrence, l'huile de ricin.

L'analyse spectroscopique FTIR est une technique intéressante pour l'analyse de l'ajout d'huiles végétales. Couplée à l'analyse TGA, elle permet d'analyser les résidus suspects pour confirmer le diagnostic de fraude.

Cette étude montre la pertinence d'utiliser des analyses spectroscopiques pour l'authentification des matières premières aromatiques naturelles. Des tests en proche infrarouges (NIR) pourraient être intéressants pour ce type de contrôle.

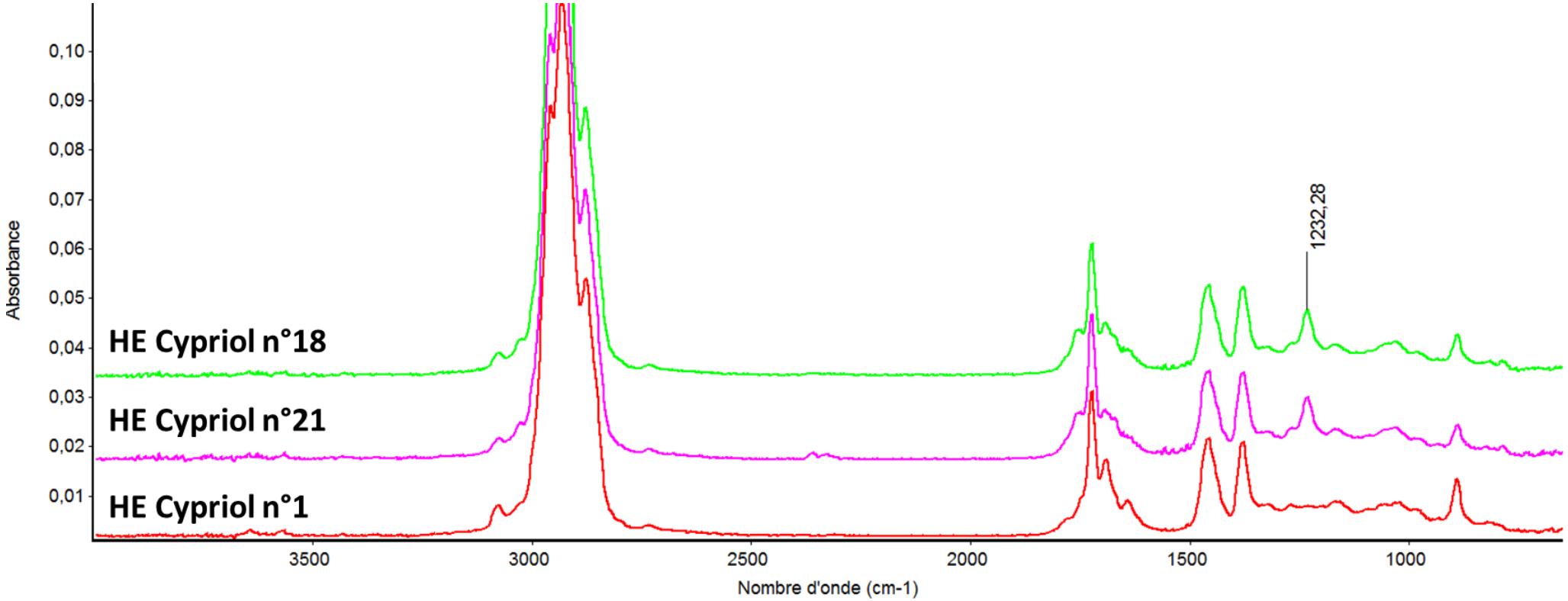

Figure 50 : Comparaison des spectres infrarouge des trois huiles essentielles de cypriol à 280°C

2. Résultats et discussions

Les différentes stratégies analytiques précédemment développées ont été appliquées à 30 échantillons d'huiles essentielles de cypriol. Le ratio isotopique $\delta^{13}C$ a aussi été déterminé sur tous les échantillons par EA-C-IRMS. Les résultats sont résumés dans le **Tableau 17**.

Aucune anomalie n'a été détectée dans les échantillons d'huiles essentielles de cypriol 1 à 13. Le pourcentage de résidu de ces échantillons authentiques est compris entre 1,40% et 2,20%. Aucune bande caractéristique de présence d'huile végétale n'a été détectée en IR. Enfin, les valeurs $\delta^{13}C$ correspondent à la littérature, avec des valeurs comprises entre -14,83% et -13,37‰, caractéristiques d'une origine de plante C4 (Kumar et al., 2016; van Leeuwen et al., 2014).

Les huiles essentielles de cypriol 14 à 25 présentent quant à elles des valeurs isotopiques $\delta^{13}C$ plus négatives, comprises entre -19,82‰ et -17,99‰, ce qui indique une adultération avec un extrait issu d'une plante C3. Le pourcentage de résidu élevé (compris entre 3,30% et 16,10%), et la détection de bandes caractéristiques de dégagement gazeux d'esters et d'acides gras insaturés, confirment cette hypothèse. Ces huiles essentielles ont été adultérées à l'huile de ricin, comme cela avait été confirmé sur les échantillons 18 et 21, avec l'analyse de leurs résidus TGA par GC-MS, après application d'un protocole de dérivatisation. Un échantillon d'huile de ricin a par ailleurs été analysé en EA-C-IRMS. Sa valeur isotopique $\delta^{13}C$, mesurée à -29,01‰, correspond bien à une plante de type C3.

Enfin, cinq échantillons présentent des résultats d'analyses particuliers :

- La valeur $\delta^{13}C$ de l'échantillon de cypriol 26 (-17,94‰) est non conforme, et cet échantillon présente un résidu TGA élevé, ce qui indique une adultération. Cependant, l'analyse IR ne montre pas de dégagements gazeux indiquant la présence de triglycérides.
- Le pourcentage de résidu et l'analyse IR indique que les échantillons 27 et 28 ont été adultérés avec une huile végétale, mais le ratio isotopique du carbone est pourtant conforme.
- Enfin, les échantillons 29 et 30 présentent de faibles masses résiduelles à 300°C (2,20%), mais les analyses infra rouges et isotopiques indiquent une adultération avec une huile végétale d'origine C3.

Tableau 17 : Analyses par TGA-FTIR, EA-C-IRMS, et GC-FID, de 30 huiles essentielles de cypriol.

Echantillons	% de résidus [a]	Détection de triglycérides en IR [b]	$\delta^{13}C$ (‰) [c]	Détection de triglycérides par GC-FID [d]	Commentaires
Cypriol 1	2,20%	Non détecté	-13,93	Pas d'impureté détectée	Pas d'anomalies détectées
Cypriol 2	1,20%	Non détecté	-14,36	Pas d'impureté détectée	Pas d'anomalies détectées
Cypriol 3	2,30%	Non détecté	-13,48	Pas d'impureté détectée	Pas d'anomalies détectées
Cypriol 4	1,50%	Non détecté	-14,06	Pas d'impureté détectée	Pas d'anomalies détectées
Cypriol 5	1,60%	Non détecté	-13,98	Pas d'impureté détectée	Pas d'anomalies détectées
Cypriol 6	1,60%	Non détecté	-14,25	Pas d'impureté détectée	Pas d'anomalies détectées
Cypriol 7	1,80%	Non détecté	-13,37	Pas d'impureté détectée	Pas d'anomalies détectées
Cypriol 8	2,20%	Non détecté	-13,85	Pas d'impureté détectée	Pas d'anomalies détectées
Cypriol 9	1,50%	Non détecté	-14,11	Pas d'impureté détectée	Pas d'anomalies détectées
Cypriol 10	1,70%	Non détecté	-14,11	Pas d'impureté détectée	Pas d'anomalies détectées
Cypriol 11	1,70%	Non détecté	-14,83	Pas d'impureté détectée	Pas d'anomalies détectées
Cypriol 12	1,80%	Non détecté	-13,92	Pas d'impureté détectée	Pas d'anomalies détectées
Cypriol 13	1,40%	Non détecté	-13,91	Pas d'impureté détectée	Pas d'anomalies détectées
Cypriol 14	14,90%	Détecté	-18,61	Pas d'impureté détectée	Ajout d'huile de ricin
Cypriol 15	15,40%	Détecté	-18,80	Pas d'impureté détectée	Ajout d'huile de ricin
Cypriol 16	16,00%	Détecté	-18,74	Pas d'impureté détectée	Ajout d'huile de ricin
Cypriol 17	16,10%	Détecté	-18,29	Pas d'impureté détectée	Ajout d'huile de ricin
Cypriol 18	10,30%	Détecté	-19,96	Pas d'impureté détectée	Ajout d'huile de ricin
Cypriol 19	10,10%	Détecté	-19,72	Pas d'impureté détectée	Ajout d'huile de ricin
Cypriol 20	9,70%	Détecté	-19,78	Pas d'impureté détectée	Ajout d'huile de ricin
Cypriol 21	9,50%	Détecté	-19,82	Pas d'impureté détectée	Ajout d'huile de ricin
Cypriol 22	5,20%	Détecté	-17,99	Pas d'impureté détectée	Ajout d'huile de ricin
Cypriol 23	5,90%	Détecté	-18,52	Pas d'impureté détectée	Ajout d'huile de ricin
Cypriol 24	14,40%	Détecté	-19,89	Pas d'impureté détectée	Ajout d'huile de ricin
Cypriol 25	3,30%	Détecté	-18,21	Pas d'impureté détectée	Ajout d'huile de ricin
Cypriol 26	6,20%	Non détecté	-17,94	Détection de diglycérides	Ajouts d'émulsifiants (Diglycérides)
Cypriol 27	6,60%	Détecté	-14,21	Détection de triglycérides	Ajout d'une huile végétale C4
Cypriol 28	6,90%	Détecté	-14,41	Détection de triglycérides	Ajout d'une huile végétale C4
Cypriol 29	2,20%	Détecté	-18,12	Détection de triglycérides	Ajout d'une huile végétale C3 (proportions faibles)
Cypriol 30	2,20%	Détecté	-18,21	Détection de triglycérides	Ajout d'une huile végétale C3 (proportions faibles)

[a] Le pourcentage de résidus correspond à la masse résiduelle mesurée à 300°C ;

[b] Détection d'une bande caractéristique à 1232 cm^{-1} ;

[c] Les valeurs isotopiques $\delta^{13}C$ d'une plante C4 doivent être comprises entre -16 et -9‰ (van Leeuwen et al., 2014) ;

[d] Détection des triglycérides en utilisant la méthode développée sur la colonne Rxi-65TG.

3. Analyses GC-FID des triglycérides à haute température

Pour essayer d'interpréter ces cinq échantillons, une dernière étude a été entreprise en GC-FID à l'aide d'une colonne chromatographique composée d'un revêtement interne à haute concentration de phényles, ce qui permet d'être stable à haute température (370°C), et facilite la détection de glycérides sans dérivatisation. Cette colonne (Rxi-65TG, Restek) est tout d'abord testée sur une huile végétale de colza. Le profil chromatographique de cette huile permet d'identifier plusieurs triglycérides entre 15 et 19 minutes d'analyse environ. Par comparaison, le profil d'une huile essentielle de cypriol authentique (Echantillon n°2) ne présente aucun composé après 5 minutes d'analyse, tandis que les molécules monoterpéniques et sesquiterpéniques, qui constituent 100% de l'huile essentielle, sortent de la colonne rapidement en début d'analyse. Un ajout de 10% d'huile végétale de colza dans l'huile essentielle n°2 de cypriol est identifié par la présence des pics caractéristiques des triglycérides qui sont présents dans l'extrait de colza (**Figure 51**).

Cette méthode permet donc de visualiser efficacement les ajouts d'huiles végétales dans les huiles essentielles. Nous avons testé différentes huiles végétales (Olive, colza, tournesol, maïs, arachide, …) pour vérifier l'efficacité de cette colonne. A l'exception de l'huile végétale de ricin, il est à priori possible de détecter tous les ajouts d'huiles végétales dans les huiles essentielles. Cependant, cela n'a pas été le cas du ricin, pour lequel nous n'avons pas observé de pics caractéristiques de triglycérides. L'huile végétale de ricin est constituée principalement de ricinoléine. Ce triglycéride n'est probablement pas suffisamment volatile pour être analysable à 370°C en GC. Cette méthode n'est donc pas universelle, tout comme les analyses par TGA-FTIR et EA-C-IRMS.

Les échantillons précédents qui présentaient des résultats analytiques anormaux ont été investigués avec la méthode GC-FID à haute température (**Figure 52**) :

- Le profil de l'huile essentielle de cypriol n°26 présente des impuretés dans la zone des diglycérides. Il n'a pas été possible de les identifier, mais cela pourrait mettre en évidence un ajout d'émulsifiants pour augmenter artificiellement le volume de l'huile essentielle.
- Les échantillons n°27 et 28, dont les valeurs isotopiques globales $\delta^{13}C$ étaient de -14,21‰ et de -14,41‰, contiennent des triglycérides. Ces huiles essentielles ont été adultérées avec une huile végétale d'origine C4. Cela peut être une huile végétale de maïs, de sorgho, ou d'amarante par exemple.
- Enfin, des triglycérides sont aussi détectés dans les huiles essentielles de cypriol 29 et 30. L'ajout d'huile végétale est faible, car l'analyse TGA n'a pas permis de mettre en évidence l'adultération.

Huile essentielle de cypriol n°2

Huile essentielle de cypriol n°2 adultérée avec 10% d'huile végétale de colza

Huile végétale de colza

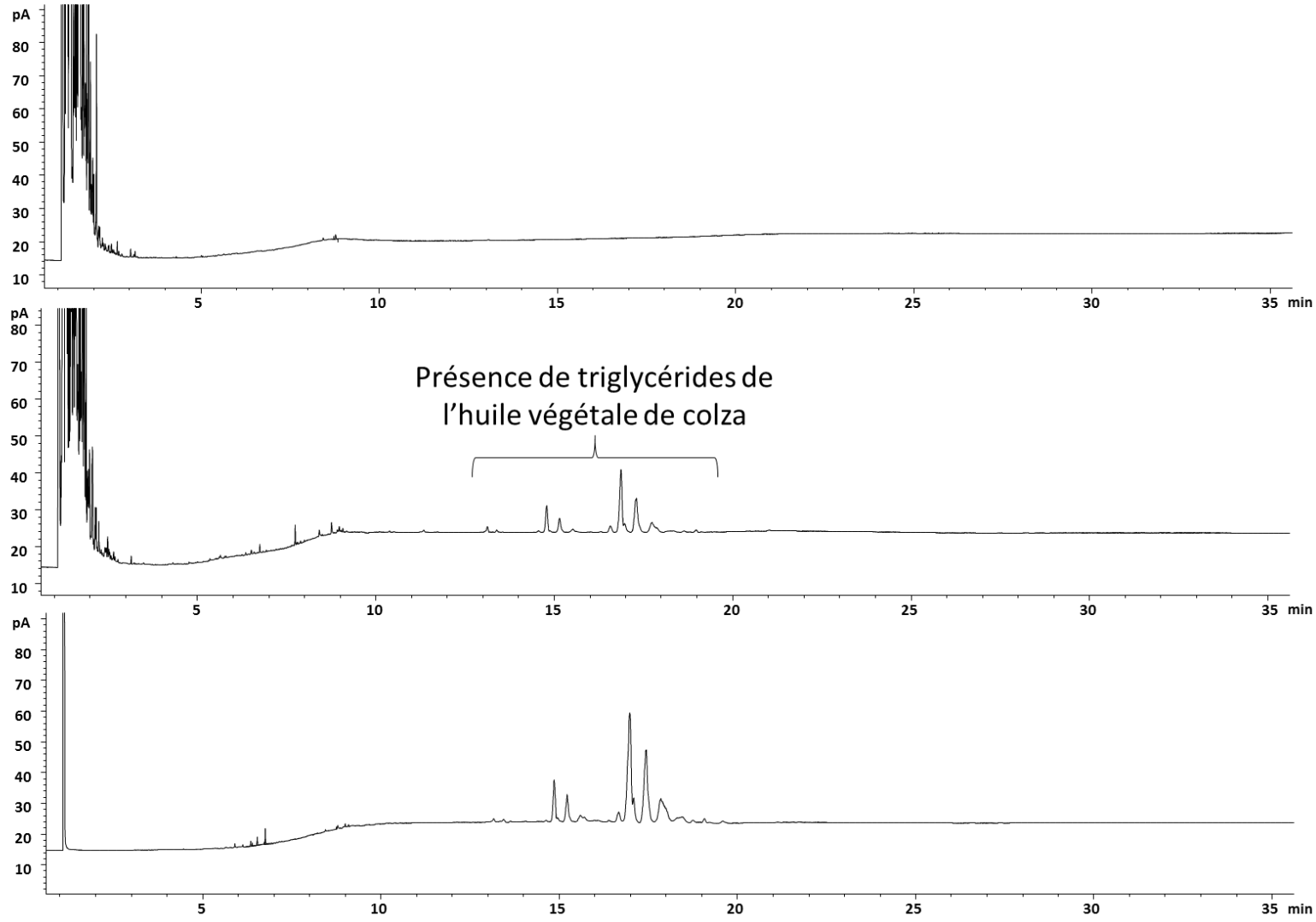

Figure 51 : Profils GC-FID d'une huile végétale de colza, de l'huile essentielle authentique de cypriol n°2, et de ce même échantillon adultéré avec 10% d'huile végétale de colza. Les analyses ont été réalisées à l'aide d'une colonne capillaire stable à haute température (370°C)

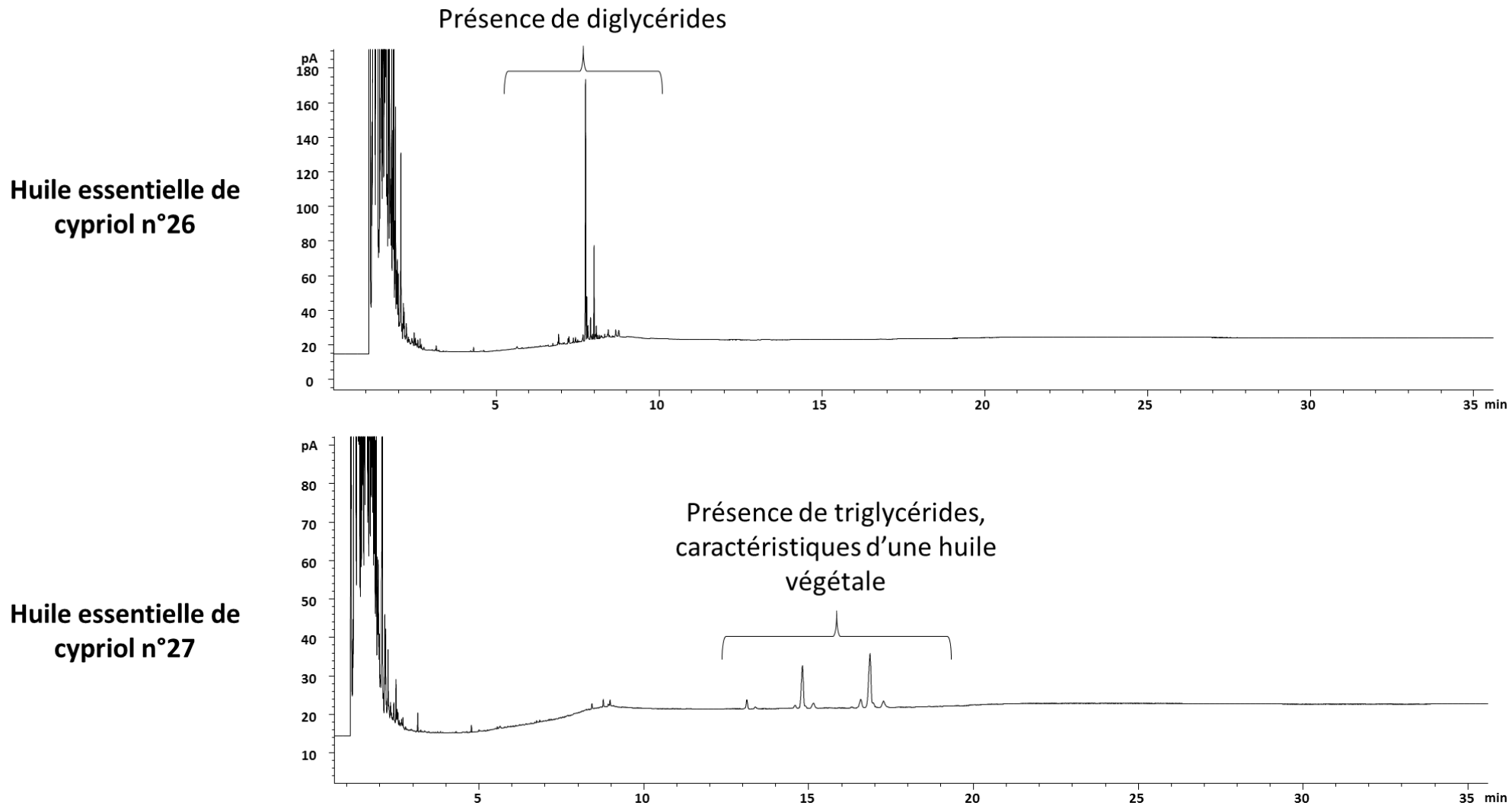

Figure 52 : Profils GC-FID des huiles essentielles suspectes de cypriol n°26 et n°27. Les analyses ont été réalisées à l'aide d'une colonne capillaire stable à haute température (370°C)

CONCLUSION

Les différentes stratégies analytiques présentées permettent de mettre en évidence les différents cas rencontrés pour contrôler les adultérations aux corps gras dans les huiles essentielles.

L'analyse TGA, couplée à un FTIR, se révèle être une technique efficace dans la plupart des cas. Cette méthodologie peut être envisagée sur tout type d'huiles essentielles. Cela nécessite cependant de constituer une banque de données des pourcentages de masses résiduelles pour chaque espèce d'huiles essentielles. De plus, cette technique ne permet pas de déterminer avec précision l'huile végétale de coupe utilisée par le fraudeur. Il est nécessaire de développer une méthode qui permet de récupérer le résidu, et de l'analyser ensuite par GC en appliquant un procédé de dérivatisation pour pouvoir identifier l'adultérant utilisé.

L'analyse globale par EA-C-IRMS $\delta^{13}C$ est particulièrement efficace dans le cas de l'huile essentielle de cypriol, sauf pour le cas isolé d'une fraude avec une huile végétale d'origine C4, tel que le maïs. Cette technique analytique s'applique uniquement pour des huiles essentielles de type C4, telles que le vétiver ou le litsea cubeba, ce qui reste limité.

Enfin, les colonnes chromatographiques stables à haute températures récemment développées sont prometteuses pour la détection d'adultération d'ajout d'huiles végétales. Cependant, ces colonnes ne permettent pour le moment pas d'identifier les triglycérides les plus lourdes, comme la ricinoléine, ce qui ne permet pas de détecter d'ajout d'huile de ricin.

Cette étude montre qu'aucune technique analytique n'est universelle pour identifier ce type de fraude. Selon l'huile essentielle analysée, il convient de choisir méthodiquement la meilleure technique analytique ou d'en combiner plusieurs.

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Le développement de méthodologies basées sur l'étude des métabolites secondaires actifs des plantes permet d'améliorer le contrôle de l'authenticité des matières premières naturelles.

Les travaux présentés dans cette thèse ont été réalisés sur des matrices diverses et variées (gaulthérie, tonka, alliacées, néroli, menthe, cannelle, amande amère, cypriol), pour étudier de multiples problématiques de naturalité (synthèse, hémisynthèse) et de pureté (discriminations botanique et géographique, ajout d'huile végétale). Les méthodes analytiques développées peuvent être appliquées à d'autres huiles essentielles, en fonction de leur composition. Ces études ont en effet montré l'importance de bien étudier la composition initiale d'une huile essentielle avant de proposer une stratégie analytique.

Afin de développer des méthodes efficaces, la construction de bases de données et l'établissement des critères de conformités sont primordiaux. Cela permet ainsi de pouvoir rendre un verdict cohérent sur l'authenticité des matières premières. Pour cela, il est nécessaire de disposer d'un grand nombre d'échantillons de références, sûrs en termes d'authenticité. Ces échantillons doivent être analysés pour pouvoir appliquer des outils chimiométriques. Différentes origines connues précisément doivent être testées pour prendre en compte la variabilité naturelle.

Les travaux ont été réalisés autour de trois axes principaux : la recherche d'impuretés, l'analyse énantiomérique et l'analyse isotopique par IRMS. Ces trois approches permettent de contrôler efficacement l'authenticité des matières premières naturelles, comme l'ont montré les études réalisées. Les nouvelles stratégies d'utilisation des isotopes stables et des énantiomères se rapprochent des études réalisées en métabolomique pour réaliser un profil sur plusieurs molécules. Cela permet de détecter des adultérations « classiques » (ajouts de synthèse, coupes entre huiles essentielles), mais la méthodologie employée durant cette thèse a également conduit à mettre en évidence de nouvelles fraudes (ajouts de composés enrichis en ^{14}C, hémisynthèses).

Ce ne sont toutefois pas les uniques techniques analytiques utilisables pour ce type de contrôle et il serait intéressant d'étudier d'autres approches. En effet, aucune technique analytique n'est universelle, la complémentarité des différentes approches analytiques permet d'améliorer le diagnostic final d'authentification. Parmi les outils analytiques non décrits dans cette thèse, la spectroscopie proche infra rouge NIR est une technique idéale d'authentification pour l'industrie des produits naturels, car elle est rapide, non destructive et simple d'utilisation. La SNIF-RMN est aussi une technique d'intérêt pour le contrôle des huiles essentielles, car elle permet d'étudier plus précisément

les valeurs isotopiques de chaque site spécifique d'une molécule. Enfin, d'autres approches chromatographiques, par GCxGC ou GC-MS haute résolution, peuvent aboutir à une caractérisation de molécules à l'état de trace et d'améliorer la détection d'impuretés ou la discrimination botanique par exemple.

Les méthodes analytiques développées pendant ces travaux doctoraux peuvent être employées dans les laboratoires de contrôle. L'analyse isotopique notamment, utilisée seule ou associée à d'autres outils, est une méthode analytique stratégique pour l'authenticité. Une fois le transfert technologique réalisé, ces méthodes sont rapides et sont appropriées au contexte industriel, pour obtenir des réponses dans des délais courts d'acceptation ou de refus des lots achetés.

Cependant, l'outil analytique n'est pas l'unique moyen permettant de contrôler les produits. La recherche de fraudes potentielles passe par une bonne connaissance des matières premières. Il est important de suivre les prix du marché pour détecter d'éventuelles anomalies, de réaliser des audits auprès des fournisseurs et d'appliquer une traçabilité des filières afin de vérifier toutes les informations d'une matière (nom botanique, origine géographique, partie de plante distillée, procédés d'extraction employés, …).

Toutefois, ce travail de contrôle n'est pas définitif et se doit d'être continu dans le temps. Les fraudes sont amenées à évoluer avec l'avancée des technologies. L'évolution des stratégies analytique est nécessaire pour pouvoir suivre les nouvelles adultérations qui pourraient émerger. C'est par exemple le cas des biotechnologies, pour lesquels nous avons proposé une perspective d'approche innovante avec l'utilisation de l'analyse spécifique GC-P-IRMS $\delta^{18}O$ comme nouvel outil pertinent. Le développement de cette instrumentation reste à approfondir et pourrait apporter d'autres informations pertinentes.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abbasi, M., Mohammadizadeh, M.R., Saeedi, N., 2016. The synthesis of symmetrical disulfides by reacting organic halides with Na2S2O3·5H2O in DMSO. New J. Chem. 40, 89–92. https://doi.org/10.1039/C5NJ01885D

Abdel-Lateef, E., Rabia, I., Abdel-Gawad, M., El-Sayed, M., 2018. In Vitro Antischistosomal Activity of Allium Cepa L. (Red Onion) Extracts and Identification of the Essential Oil Composition by GC-MS. J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci. 7, 421–425. https://doi.org/10.15414/jmbfs.2018.7.4.421-425

Abernethy, J.L., 1969. The historical and current interest in coumarin. J. Chem. Educ. 46, 561. https://doi.org/10.1021/ed046p561

Abobatta, W.F., 2019. Citrus Varieties in Egypt: An Impression. Int. Res. J. Appl. Sci. 4.

Akoka, S., Remaud, G.S., 2020. NMR-based isotopic and isotopomic analysis. Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc. https://doi.org/10.1016/j.pnmrs.2020.07.001

Ammar, A.H., Bouajila, J., Lebrihi, A., Mathieu, F., Romdhane, M., Zagrouba, F., 2012. Chemical Composition and in vitro Antimicrobial and Antioxidant Activities of Citrus aurantium L. Flowers Essential Oil (Neroli Oil). Pak. J. Biol. Sci. 15, 1034–1040. https://doi.org/10.3923/pjbs.2012.1034.1040

Amrani, A., Sessions, A.L., Adkins, J.F., 2009. Compound-Specific δ34S Analysis of Volatile Organics by Coupled GC/Multicollector-ICPMS. Anal. Chem. 81, 9027–9034. https://doi.org/10.1021/ac9016538

Aslam, K., Khosa, M.K., Jahan, N., Nosheen, S., 2010. Synthesis and applications of coumarin. Pak J Pharm Sci 7.

Azanchi, T., Shafaroodi, H., Asgarpanah, J., 2014. Anticonvulsant activity of Citrus aurantium blossom essential oil (neroli): involvment of the GABAergic system. Nat. Prod. Commun. 9, 1615–1618.

Bajer, T., Surmová, S., Eisner, A., Ventura, K., Bajerová, P., 2018. Use of simultaneous distillation-extraction, supercritical fluid extraction and solid-phase microextraction for characterisation of the volatile profile of Dipteryx odorata (Aubl.) Willd. Ind. Crops Prod. 119, 313–321. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.01.055

Balabane, M., Bayle, J.C., Derbesy, M., 1984. Isotopic (carbon-13, deuteron) characterization of natural or synthesized anetholes. Analusis 12, 148–150.

Bantawa, P., Da Silva, J.A.T., Ghosh, S.K., Mondal, T.K., 2011. Determination of essential oil contents and micropropagation of *Gaultheria fragrantissima* , an endangered woody aromatic plant of India. J. Hortic. Sci. Biotechnol. 86, 479–485. https://doi.org/10.1080/14620316.2011.11512792

Baranska, M., Schulz, H., Walter, A., Rösch, P., Quilitzsch, R., Lösing, G., Popp, J., 2006. Investigation of eucalyptus essential oil by using vibrational spectroscopy methods. Vib. Spectrosc. 42, 341–345. https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2006.08.004

Barrie, A., Bricout, J., Koziet, J., 1984. Gas chromatography—stable isotope ratio analysis at natural abundance levels. Biomed. Mass Spectrom. 11, 583–588. https://doi.org/10.1002/bms.1200111106

Bayer, M., Mosandl, A., 2004. Improved gas chromatographic stereodifferentiation of chiral main constituents from different essential oils using a mixture of chiral stationary phases. Flavour Fragr. J. 19, 515–517. https://doi.org/10.1002/ffj.1429

Bazzano, A., 2016. Isotopic analysis of environmental samples using inductively coupled plasma mass spectrometry.

Beck, T., Liepe, J.-M., Nandzik, J., Rohn, S., Mosandl, A., 2000. Comparison of Different Di-tert-butyldimethyl-Silylated Cyclodextrins as Chiral Stationary Phases in Capillary Gas Chromatography. J. High Resolut. Chromatogr. 23, 569–575. https://doi.org/10.1002/1521-4168(20001001)23:10<569::AID-JHRC569>3.0.CO;2-P

Belavagi, N.S., Deshapande, N., Sunagar, M.G., Khazi, I.A.M., 2014. A practical one-pot synthesis of coumarins in aqueous sodium bicarbonate via intramolecular Wittig reaction at room temperature. RSC Adv 4, 39667. https://doi.org/10.1039/C4RA06996J

Benini, C., Danflous, J.-P., Wathelet, J.-P., Fauconnier, M.-L., 2010. L'ylang-ylang [Cananga odorata (Lam.) Hook.f. & Thomson] : une plante à huile essentielle méconnue dans une filière en danger. Biotechnol Agron Soc Env. 13.

Berger, R.G., 2015. Biotechnology as a source of natural volatile flavours. Curr. Opin. Food Sci., Food Chemistry and Biochemistry • Food Bioprocessing 1, 38–43. https://doi.org/10.1016/j.cofs.2014.09.003

Berger, R.G. (Ed.), 2007. Flavours and fragrances: chemistry, bioprocessing and sustainability. Springer, Berlin ; New York.

Berthod, Alain., Li, Weiyong., Armstrong, D.W., 1992. Multiple enantioselective retention mechanisms on derivatized cyclodextrin gas chromatographic chiral stationary phases. Anal. Chem. 64, 873–879. https://doi.org/10.1021/ac00032a009

Bhaumik, I., Misra, A., 2017. Rapid Transformation of Alkyl Halides into Symmetrical Disulfides Using Sodium Sulfide and Carbon Disulfide. SynOpen 01, 0117–0120. https://doi.org/10.1055/s-0036-1588573

Bisht, D., Chanotiya, C.S., Rana, M., Semwal, M., 2009. Variability in essential oil and bioactive chiral monoterpenoid compositions of Indian oregano (Origanum vulgare L.) populations from northwestern Himalaya and their chemotaxonomy. Ind. Crops Prod. 30, 422–426. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2009.07.014

Bocchini, P., Andalò, C., Pozzi, R., Galletti, G.C., Antonelli, A., 2001. Determination of diallyl thiosulfinate (allicin) in garlic (Allium sativum L.) by high-performance liquid chromatography with a post-column photochemical reactor. Anal. Chim. Acta 441, 37–43. https://doi.org/10.1016/S0003-2670(01)01104-7

Bonaccorsi, I., Sciarrone, D., Cotroneo, A., Mondello, L., Dugo, P., Dugo, G., 2011a. Enantiomeric distribution of key volatile components in Citrus essential oils. Rev. Bras. Farmacogn. 21, 841–849. https://doi.org/10.1590/S0102-695X2011005000123

Bonaccorsi, I., Sciarrone, D., Schipilliti, L., Trozzi, A., Fakhry, H.A., Dugo, G., 2011b. Composition of Egyptian nerolì oil. Nat. Prod. Commun. 6, 1009–1014.

Borlinghaus, J., Albrecht, F., Gruhlke, M.C.H., Nwachukwu, I.D., Slusarenko, A.J., 2014. Allicin: Chemistry and Biological Properties. Molecules 19, 12591–12618. https://doi.org/10.3390/molecules190812591

Bouasla, S., Amaro-Gahete, J., Esquivel, D., López, M., Jiménez-Sanchidrián, C., Teguiche, M., Romero-Salguero, F., 2017. Coumarin Derivatives Solvent-Free Synthesis under Microwave Irradiation over Heterogeneous Solid Catalysts. Molecules 22, 2072. https://doi.org/10.3390/molecules22122072

Bounaas, K., Bouzidi, N., Daghbouche, Y., Garrigues, S., de la Guardia, M., El Hattab, M., 2018. Essential oil counterfeit identification through middle infrared spectroscopy. Microchem. J. 139, 347–356. https://doi.org/10.1016/j.microc.2018.03.008

Boussaada, O., Chemli, R., 2006. Chemical Composition of Essential Oils from Flowers, Leaves and Peel of Citrus aurantium L. var. amara from Tunisia. J. Essent. Oil Bear. Plants 9, 133–139. https://doi.org/10.1080/0972060X.2006.10643484

Bowen, G.J., Wilkinson, B., 2002. Spatial distribution of δ18O in meteoric precipitation. Geology 30, 315–318. https://doi.org/10.1130/0091-7613(2002)030<0315:SDOOIM>2.0.CO;2

Brand, W.A., Coplen, T.B., Vogl, J., Rosner, M., Prohaska, T., 2014. Assessment of international reference materials for isotope-ratio analysis (IUPAC Technical Report). Pure Appl. Chem. 86, 425–467. https://doi.org/10.1515/pac-2013-1023

Braun, N.A., Butaud, J.-F., Bianchini, J.-P., Kohlenberg, B., Hammerschmidt, F.-J., Meier, M., Raharivelomanana, P., 2007. Eastern Polynesian Sandalwood Oil (*Santalum insulare* Bertero ex A. DC.) – a Detailed Investigation. Nat. Prod. Commun. 2, 1934578X0700200. https://doi.org/10.1177/1934578X0700200615

Braun, N.A., Meier, M., Hammerschmidt, F.-J., 2005. New Caledonian Sandalwood Oil—a Substitute for East Indian Sandalwood Oil? J. Essent. Oil Res. 17, 477–480. https://doi.org/10.1080/10412905.2005.9698969

Braun, N.A., Meier, M., Pickenhagen, W., 2003. Isolation and Chiral GC Analysis of ~-Bisabolols- Trace Constituents from the Essential Oil of Santa/urn a/bum L. (Santalaceae) 15, 3.

Brenna, E., Fronza, G., Fuganti, C., Gatti, F.G., Grande, V., Serra, S., Guillou, C., Reniero, F., Serra, F., 2005. Stable Isotope Characterization of the *ortho* -Oxygenated Phenylpropanoids: Coumarin and Melilotol. J. Agric. Food Chem. 53, 9383–9388. https://doi.org/10.1021/jf0518507

Burfield, T., 2003. The Adulteration of Essential Oils and the Consequences to Aromatherapy and Natural Perfumery Practice. Presented at the International Federation of Aromatherapists Annual AGM, London.

Cahn, R.S., Ingold, C.K., Prelog, V., 1956. The specification of asymmetric configuration in organic chemistry. Experientia 12, 81–94. https://doi.org/10.1007/BF02157171

Calderone, G., 2005. Application des techniques isotopiques modernes pour la caractérisation de produits alimentaires et de boissons. Université de Nantes.

Calvin, M., Bassham, J.A., 1962. The Photosyntheis of Carbon Compounds. Benjamin, New York. https://doi.org/10.2172/910351

Camps, C., Gérard, M., Quennoz, M., Brabant, C., Oberson, C., Simonnet, X., 2014. Prediction of essential oil content of oregano by hand-held and Fourier transform NIR spectroscopy. J. Sci. Food Agric. 94, 1397–1402. https://doi.org/10.1002/jsfa.6427

Cantarelli, M.Á., Moldes, C.A., Marchevsky, E.J., Azcarate, S.M., Camiña, J.M., 2020. Low-cost analytic method for the identification of Cinnamon adulteration. Microchem. J. 159, 105513. https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105513

Cantrell, M.S., Seale, J.T., Arispe, S.A., McDougal, O.M., 2020. Determination of Organosulfides from Onion Oil. Foods 9, 884. https://doi.org/10.3390/foods9070884

Casabianca, H., Graff, J.B., Faugier, V., Fleig, F., Grenier, C., 1998. Enantiomeric Distribution Studies of Linalool and Linalyl Acetate. A Powerful Tool for Authenticity Control of Essential Oils. J. High Resolut. Chromatogr. 21, 107–112. https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4168(19980201)21:2<107::AID-JHRC107>3.0.CO;2-A

Casella, S., Leonardi, M., Melai, B., Fratini, F., Pistelli, L., 2013. The Role of Diallyl Sulfides and Dipropyl Sulfides in the *In Vitro* Antimicrobial Activity of the Essential Oil of Garlic, *Allium sativum* L., and Leek, *Allium porrum* L. Phytother. Res. 27, 380–383. https://doi.org/10.1002/ptr.4725

Cassel, E., Vargas, R.M.F., Martinez, N., Lorenzo, D., Dellacassa, E., 2009. Steam distillation modeling for essential oil extraction process. Ind. Crops Prod. 29, 171–176. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2008.04.017

Centre de datation par le Radiocarbone, Lefèvre, J.-C., 2015. Courbe récente [WWW Document]. Cent. Datation Par Radiocarbone. URL http://carbon14.univ-lyon1.fr/SPIP-v3/spip/spip.php?article8 (accessed 2.17.21).

Chanotiya, C., Yadav, A., 2009. Enantiomeric Composition of (3R)-(-)- and (3S)-(+)-Linalool in Various Essential Oils of Indian Origin by Enantioselective Capillary Gas Chromatography-Flame Ionization and Mass Spectrometry Detection Methods. Nat. Prod. Commun. 4, 563–6.

Choi, S.-H., Bong, Y.-S., Park, J.H., Lee, K.-S., 2020. Geographical origin identification of garlic cultivated in Korea using isotopic and multi-elemental analyses. Food Control 111, 107064. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.107064

Christy, A.A., Kasemsumran, S., Du, Y., Ozaki, Y., 2004. The Detection and Quantification of Adulteration in Olive Oil by Near-Infrared Spectroscopy and Chemometrics. Anal. Sci. 20, 935–940. https://doi.org/10.2116/analsci.20.935

Clery, R.A., Cason, J.R.L., Zelenay, V., 2016. Constituents of Cypriol Oil (*Cyperus scariosus* R.Br.): N-Containing Molecules and Key Aroma Components. J. Agric. Food Chem. 64, 4566–4573. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b00680

Clough, R., Evans, P., Catterick, T., Evans, E.H., 2006. δ34S Measurements of Sulfur by Multicollector Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. Anal. Chem. 78, 6126–6132. https://doi.org/10.1021/ac060875h

Collin, H.A., Britton, G., 1993. Allium cepa L. (Onion): In Vitro Culture and the Production of Flavor, in: Bajaj, Y.P.S. (Ed.), Medicinal and Aromatic Plants V, Biotechnology in Agriculture and Forestry.

Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 23–40. https://doi.org/10.1007/978-3-642-58062-8_2

Conde-Hernández, L.A., Espinosa-Victoria, J.R., Trejo, A., Guerrero-Beltrán, J.Á., 2017. CO2-supercritical extraction, hydrodistillation and steam distillation of essential oil of rosemary (Rosmarinus officinalis). J. Food Eng. 200, 81–86. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.12.022

Cong, F., Joshi, K.R., Devkota, H.P., Watanabe, T., Yahara, S., 2015. Dhasingreoside: new flavonoid from the stems and leaves of *Gaultheria fragrantissima*. Nat. Prod. Res. 29, 1442–1448. https://doi.org/10.1080/14786419.2014.1003932

Connors, K.A., 1997. The Stability of Cyclodextrin Complexes in Solution. Chem. Rev. 97, 1325–1358. https://doi.org/10.1021/cr960371r

Couchoud, I., 2008. Les isotopes stables de l'oxygène et du carbone dans les spéléothèmes : Des archives paléoenvironnementales. Quaternaire 19, 275–291.

Craig, H., 1957. Isotopic standards for carbon and oxygen and correction factors for mass-spectrometric analysis of carbon dioxide. Geochim. Cosmochim. Acta 12, 133–149. https://doi.org/10.1016/0016-7037(57)90024-8

Cuchet, A., Anchisi, A., Telouk, P., Yao, Y., Schiets, F., Fourel, F., Clément, Y., Lantéri, P., Carénini, E., Jame, P., Casabianca, H., 2021. Multi-element (13C, 2H and 34S) bulk and compound-specific stable isotope analysis for authentication of Allium species essential oils. Food Control 126, 108086. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108086

Cuchet, A., Jame, P., Anchisi, A., Schiets, F., Oberlin, C., Lefèvre, J.-C., Carénini, E., Casabianca, H., 2019. Authentication of the naturalness of wintergreen (Gaultheria genus) essential oils by gas chromatography, isotope ratio mass spectrometry and radiocarbon assessment. Ind. Crops Prod. 142, 10. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111873

Culp, R.A., Noakes, J.E., 1992a. Determination of synthetic components in flavors by deuterium/hydrogen isotopic ratios. J. Agric. Food Chem. 40, 1892–1897. https://doi.org/10.1021/jf00022a033

Culp, R.A., Noakes, J.E., 1992b. Determination of synthetic components in flavors by deuterium/hydrogen isotopic ratios. J. Agric. Food Chem. 40, 1892–1897. https://doi.org/10.1021/jf00022a033

Culp, R.A., Noakes, J.E., 1990. Identification of isotopically manipulated cinnamic aldehyde and benzaldehyde. J. Agric. Food Chem. 38, 1249–1255. https://doi.org/10.1021/jf00095a021

Davies, N.W., Larkman, T., Marriott, P.J., Khan, I.A., 2016. Determination of Enantiomeric Distribution of Terpenes for Quality Assessment of Australian Tea Tree Oil. J. Agric. Food Chem. 64, 4817–4819. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b01803

Dayan, F.E., Cantrell, C.L., Duke, S.O., 2009. Natural products in crop protection. Bioorg. Med. Chem., Modern Trends in Agrochemistry 17, 4022–4034. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2009.01.046

De Rovira, D., 2017. Dictionary of Flavors, 3rd Edition [WWW Document]. Wiley.com. URL https://www.wiley.com/en-fr/Dictionary+of+Flavors%2C+3rd+Edition-p-9781118856413 (accessed 1.10.19).

Delplancq, C., 2015. Dérivés salicylés issus de *Gaultheria yunnanensis* : activités anti-inflammatoires et analgésiques, toxicité et données pharmacocinétiques. Université de Picardie Jules Verne.

Desage, M., Guilluy, R., Brazier, J.L., Chaudron, H., Girard, J., Cherpin, H., Jumeau, J., 1991. Gas chromatography with mass spectrometry or isotope-ratio mass spectrometry in studying the geographical origin of heroin. Anal. Chim. Acta 247, 249–254. https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)83820-9

Dewick, P.M., 2002. The biosynthesis of C5–C25 terpenoid compounds. Nat. Prod. Rep. 19, 181–222. https://doi.org/10.1039/b002685i

Diomande, D., Antheaume, I., Leroux, M., Lalande, J., Balayssac, S., Remaud, G.S., Tea, I., 2015. Multi-element, multi-compound isotope profiling as a means to distinguish the geographical and varietal origin of fermented cocoa (Theobroma cacao L.) beans. Food Chem. 188, 576–582. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.040

Do, T.K.T., Hadji-Minaglou, F., Antoniotti, S., Fernandez, X., 2015. Authenticity of essential oils. TrAC Trends Anal. Chem. 66, 146–157. https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.10.007

Dosoky, N., Setzer, W., 2018. Biological Activities and Safety of Citrus spp. Essential Oils. Int. J. Mol. Sci. 19, 1966. https://doi.org/10.3390/ijms19071966

Drivelos, S.A., Georgiou, C.A., 2012. Multi-element and multi-isotope-ratio analysis to determine the geographical origin of foods in the European Union. TrAC Trends Anal. Chem. 40, 38–51. https://doi.org/10.1016/j.trac.2012.08.003

D'Souza, J., Nagaraju, N., 2007. Esterification of salicylic acid with methanol/dimethyl carbonate over anion-modified metal oxides. Indian J. Chem. Technol. 9.

Dugo, G., Mondello, L. (Eds.), 2011. Citrus oils: composition, advanced analytical techniques, contaminants, and biological activity, Medicinal and aromatic plants--industrial profiles. CRC Press, Boca Raton, FL.

Duval, L., 2012. Les huiles essentielles à l'officine. UFR de Medecine et de Pharmacie de Rouen.

Dziri, S., Casabianca, H., Hanchi, B., Hosni, K., 2014. Composition of garlic essential oil (Allium sativum L.) as influenced by drying method. J. Essent. Oil Res. 26, 91–96. https://doi.org/10.1080/10412905.2013.868329

Ehlers, D., Pfister, M., Bork, W.-R., Toffel-Nadolny, P., 1995. HPLC analysis of tonka bean extracts. Z. Für Lebensm.-Unters. -Forsch. 201, 278–282. https://doi.org/10.1007/BF01193004

Ehlers, D., Pfister, M., Gerard, D., Quirin, K.-W., Bork, W.-R., Toffel-Nadolny, P., 1996. Reducing the coumarin content of tonka bean extracts using supercritical CO2. Int. J. Food Sci. Technol. 31, 91–95. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1996.19-319.x

Elementar, 2021. Collectors Technical Description, in: Isoprime PrecisION User Manual.

El-Wakil, E.A., El-Sayed, M.M., Abdel-Lateef, E.E.-S., 2015. GC-MS Investigation of Essential oil and antioxidant activity of Egyptian White Onion (Allium cepa L.). Int. J. Pharma Sci. Res. 6, 537–543.

Esteki, M., Shahsavari, Z., Simal-Gandara, J., 2018. Use of spectroscopic methods in combination with linear discriminant analysis for authentication of food products. Food Control 91, 100–112. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.03.031

Evin, J., Oberlin, C., 2005. La méthode de datation par le radiocarbone, in: La Datation En Laboratoire, Archéologiques. Errance, Paris, pp. 77–119.

Faber, B., Bangert, K., Mosandl, A., 1997. GC-IRMS and enantioselective analysis in biochemical studies in dill (Anethum graveolens L.). Flavour Fragr. J. 12, 305–314. https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1026(199709/10)12:5<305::AID-FFJ659>3.0.CO;2-7

Faulhaber, S., Hener, U., Mosandl, A., 1997a. GC/IRMS Analysis of Mandarin Essential Oils. 2. $\delta^{13}C_{PDB}$ Values of Characteristic Flavor Components. J. Agric. Food Chem. 45, 4719–4725. https://doi.org/10.1021/jf970534s

Faulhaber, S., Hener, U., Mosandl, A., 1997b. GC/IRMS Analysis of Mandarin Essential Oils. 1. $\delta^{13}C_{PDB}$ and $\delta^{15}N_{AIR}$ Values of Methyl *N* -Methylanthranilate. J. Agric. Food Chem. 45, 2579–2583. https://doi.org/10.1021/jf9607728

Feakins, S.J., Sessions, A.L., 2010. Crassulacean acid metabolism influences D/H ratio of leaf wax in succulent plants. Org. Geochem. 41, 1269–1276. https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2010.09.007

Filippi, J.-J., Fernandez, X., Duñach, E., 2007. Volatile organosulfur compounds (VOSCs) in flavor chemistry. Sci. Aliments 27, 23–46.

Fourel, F., Lécuyer, C., Balter, V., 2015. New Frontiers for Sulfur Isotopic Analyses. Procedia Earth Planet. Sci., 11th Applied Isotope Geochemistery Conference AIG-11 13, 232–239. https://doi.org/10.1016/j.proeps.2015.07.055

Fourel, F., Martineau, F., Seris, M., Lécuyer, C., 2014. Simultaneous N, C, S stable isotope analyses using a new purge and trap elemental analyzer and an isotope ratio mass spectrometer. Rapid Commun. Mass Spectrom. 28, 2587–2594. https://doi.org/10.1002/rcm.7048

Franchomme, P., Jollois, R., Pénoël, D., 2012. L'aromathérapie exactement: encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles : fondements, démonstration, illustration et applications d'une science médicale naturelle. Roger Jollois, Limoges.

Frank, C., Dietrich, A., Kremer, U., Mosandl, A., 1995. GC-IRMS in the Authenticity Control of the Essential Oil of Coriandrum sativum L. J. Agric. Food Chem. 43, 1634–1637. https://doi.org/10.1021/jf00054a041

Freitas, J.V.B., Alves Filho, E.G., Silva, L.M.A., Zocolo, G.J., de Brito, E.S., Gramosa, N.V., 2018. Chemometric analysis of NMR and GC datasets for chemotype characterization of essential oils from different species of Ocimum. Talanta 180, 329–336. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.12.053

Galimov, E.M., 1985. The Biological Fractionation of Isotopes. Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-273970-5.X5001-4

Gallart-Mateu, D., Largo-Arango, C.D., Larkman, T., Garrigues, S., de la Guardia, M., 2018. Fast authentication of tea tree oil through spectroscopy. Talanta 189, 404–410. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.07.023

Gershon, H., Lykkeberg, A., Goren, F., Mason, S., 2019. Identifying Fraudulent Natural Products: A Perspective on the Application of Carbon-14 Analysis. J. Agric. Food Chem. 67, 13393–13399. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b01821

Gleye, C., Lewin, G., Laurens, A., Jullian, J.-C., Loiseau, P., Bories, C., Hocquemiller, R., 2003. Acaricidal Activity of Tonka Bean Extracts. Synthesis and Structure−Activity Relationships of Bioactive Derivatives. J. Nat. Prod. 66, 690–692. https://doi.org/10.1021/np020563j

Golparvar, A.R., Hadipanah, A., 2016. Diversity in chemical composition and yield of essential oil from two Mentha species. Genetika 48, 1101–1110. https://doi.org/10.2298/GENSR1603101G

González-González, A., Aparicio-Solano, D.M., Aguilar-Mariscal, H., Gómez-Rivera, A., Roa, L.F., Alvarado-Sánchez, C., Lobato-García, C.E., Romero-Ceronio, N., 2016. Synthesis of 3-carboxylated Coumarins by Knoevenagel Condensation and Exploratory Anti-inflammatory Activity Evaluation by in vivo model. Am. J. Org. Chem. 12.

Gozzi, C., Convard, A., Husset, M., 2009. Heterogeneous acid-catalysed isomerization of carvone to carvacrol. React. Kinet. Catal. Lett. 97, 301–306. https://doi.org/10.1007/s11144-009-0030-4

Graczyk, D.G., McLain, D.R., Tsai, Y., Chamberlain, D.B., Steeb, J.L., 2019. Correcting nonlinearity and mass-bias in measurements by Inductively coupled plasma quadrupole mass spectrometry. Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc. 153, 10–18. https://doi.org/10.1016/j.sab.2019.01.003

Greule, M., Hänsel, C., Bauermann, U., Mosandl, A., 2008. Feed additives: authenticity assessment using multicomponent-/multielement-isotope ratio mass spectrometry. Eur. Food Res. Technol. 227, 767–776. https://doi.org/10.1007/s00217-007-0785-7

Grumezescu, A.M., Holban, A.M., 2017. Soft Chemistry and Food Fermentation.

Gudi, G., Krähmer, A., Krüger, H., Schulz, H., 2015. Attenuated Total Reflectance–Fourier Transform Infrared Spectroscopy on Intact Dried Leaves of Sage (Salvia officinalis L.): Accelerated Chemotaxonomic Discrimination and Analysis of Essential Oil Composition. J. Agric. Food Chem. 63, 8743–8750. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b03852

Gupta, M., 2012. Cavity-Enhanced Laser Absorption Spectrometry for Industrial Applications. Gases Instrum. Mag. 7.

Guyader, S., Thomas, F., Jamin, E., Grand, M., Akoka, S., Silvestre, V., Remaud, G.S., 2019. Combination of 13C and 2H SNIF-NMR isotopic fingerprints of vanillin to control its precursors. Flavour Fragr. J. 0. https://doi.org/10.1002/ffj.3486

Guyon, F., Vaillant, F., Montet, D., 2020. Traceability of fruits and vegetables. Phytochemistry 173, 112291. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2020.112291

Haghighat, M., Abdel-Mottaleb, M., Alhalabi, W., 2016. Discriminant Correlation Analysis: Real-Time Feature Level Fusion for Multimodal Biometric Recognition. IEEE Trans. Inf. Forensics Secur. 11, 1984–1996. https://doi.org/10.1109/TIFS.2016.2569061

Halas, S., Szaran, J., 2001. Improved thermal decomposition of sulfates to SO2 and mass spectrometric determination of δ34S of IAEA SO-5, IAEA SO-6 and NBS-127 sulfate standards. Rapid Commun. Mass Spectrom. 15, 1618–1620. https://doi.org/10.1002/rcm.416

Hammerschmidt, F.-J., Krammer, G.E., Meier, L., Stöckigt, D., Brennecke, S., Herbrand, K., Lückhoff, A., Schäfer, U., Schmidt, C.O., Bertram, H.-J., 2006. Authentication of Essential Oils, in: Authentication of Food and Wine, ACS Symposium Series. American Chemical Society, pp. 87–108. https://doi.org/10.1021/bk-2007-0952.ch006

Hanneguelle, Sophie., Thibault, J.Noel., Naulet, Norbert., Martin, G.J., 1992. Authentication of essential oils containing linalool and linalyl acetate by isotopic methods. J. Agric. Food Chem. 40, 81–87. https://doi.org/10.1021/jf00013a016

Hanousek, O., Brunner, M., Pröfrock, D., Irrgeher, J., Prohaska, T., 2016. The performance of single and multi-collector ICP-MS instruments for fast and reliable 34S/32S isotope ratio measurements. Anal. Methods 8, 7661–7672. https://doi.org/10.1039/C6AY02177H

Harada, A., Furue, M., Nozakura, S.-I., 1978. Optical resolution of mandelic acid derivatives by column chromatography on crosslinked cyclodextrin gels. J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed. 16, 189–196. https://doi.org/10.1002/pol.1978.170160119

Hartel, A.M., Hanna, J.M., 2009. Preparation of Oil of Wintergreen from Commercial Aspirin Tablets. A Microscale Experiment Highlighting Acyl Substitutions. J. Chem. Educ. 86, 475. https://doi.org/10.1021/ed086p475

Häser, K., Wenk, H.H., Schwab, W., 2006. Biocatalytic Production of Dihydrocoumarin from Coumarin by Saccharomyces cerevisiae. J. Agric. Food Chem. 54, 6236–6240. https://doi.org/10.1021/jf061334w

Hassanein, H.D., El-Gendy, A.E.-N.G., Saleh, I.A., Hendawy, S.F., Elmissiry, M.M., Omer, E.A., 2020. Profiling of essential oil chemical composition of some Lamiaceae species extracted using conventional and microwave-assisted hydrodistillation extraction methods via chemometrics tools. Flavour Fragr. J. 35, 329–340. https://doi.org/10.1002/ffj.3566

Hatch, M.D., Slack, C.R., 1970. Photosynthetic CO2-Fixation Pathways. Annu. Rev. Plant Physiol. 21, 141–162. https://doi.org/10.1146/annurev.pp.21.060170.001041

Hazra, A., Alexander, K., Dollimore, D., Riga, A., 2004. Characterization of some essential oils and their key components: Thermoanalytical techniques. J. Therm. Anal. Calorim. 75, 317–330. https://doi.org/10.1023/B:JTAN.0000017352.86803.6d

Hazra, A., Dollimore, D., Alexander, K., 2002. Thermal analysis of the evaporation of compounds used in aromatherapy using thermogravimetry. Thermochim. Acta 392, 221–229. https://doi.org/10.1016/S0040-6031(02)00104-1

Hener, U., Kreis, P., Mosandl, A., 1991. Enantiomeric distribution of α-pinene, β-pinene and limonene in essential oils and extracts. part 3. oils for alcoholic beverages and seasonings. Flavour Fragr. J. 6, 109–111. https://doi.org/10.1002/ffj.2730060202

Hener, U., Kreis, P., Mosandl, A., 1990. Enantiomeric distribution of α-pinene, β-pinene and limonene in essential oils and extracts. Part 2. Oils, perfumes and cosmetics. Flavour Fragr. J. 5, 201–204. https://doi.org/10.1002/ffj.2730050403

Hilkert, A.W., Douthitt, C.B., Schlüter, H.J., Brand, W.A., 1999. Isotope ratio monitoring gas chromatography/Mass spectrometry of D/H by high temperature conversion isotope ratio mass spectrometry. Rapid Commun. Mass Spectrom. 13, 1226–1230. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0231(19990715)13:13<1226::AID-RCM575>3.0.CO;2-9

Ho, C.-T., Mussinan, C.J., Shahidi, F., Contis, E.T., 2010. Two Decades of Flavor Analysis: Trends Revealed by Radiocarbon (14C) and Stable Isotope (δ13C and δD) Analysis, in: Recent Advances in Food and Flavor Chemistry. pp. 9–27. https://doi.org/10.1039/9781849731782-00009

Hoefs, J., 2018. Stable Isotope Geochemistry, 8th ed, Springer Textbooks in Earth Sciences, Geography and Environment. Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-78527-1

Hör, K., Ruff, C., Weckerle, B., König, T., Schreier, P., 2001. Flavor Authenticity Studies by $^{2}H/^{1}H$ Ratio Determination Using On-line Gas Chromatography Pyrolysis Isotope Ratio Mass Spectrometry. J. Agric. Food Chem. 49, 21–25. https://doi.org/10.1021/jf000829x

Hsouna, A.B., Hamdi, N., Halima, N.B., Abdelkafi, S., 2013. Characterization of Essential Oil from Citrus aurantium L. Flowers: Antimicrobial and Antioxidant Activities. J. Oleo Sci. 62, 763–772. https://doi.org/10.5650/jos.62.763

Hüsnü Can Baser, K., Buchbauer, G., 2016. Handbook of Essential Oil - Science, Technology, and Applications - Second Edition, Second Edition. ed. CRC Press.

Hussain, A.I., Anwar, F., Nigam, P.S., Ashraf, M., Gilani, A.H., 2010. Seasonal variation in content, chemical composition and antimicrobial and cytotoxic activities of essential oils from four Mentha species. J. Sci. Food Agric. 90, 1827–1836. https://doi.org/10.1002/jsfa.4021

IAEA, 2021. Reference Materials Characterized for Stable Isotope Ratios [WWW Document]. nucleus.iaea.org. URL https://nucleus.iaea.org/sites/ReferenceMaterials/Pages/Stable-Isotopes.aspx (accessed 2.17.21).

Iijima, T., Yamaguchi, T., 2008. K 2CO 3-catalyzed direct synthesis of salicylic acid from phenol and supercritical CO 2. Appl. Catal. -Gen. - APPL CATAL -GEN 345, 12–17. https://doi.org/10.1016/j.apcata.2008.03.037

Ikram, R., Low, K.H., Hashim, N.B., Ahmad, W., Nasharuddin, M.N.A., 2018. Characterization of Sulfur-Compounds as Chemotaxonomic Markers in the Essential Oils of *Allium* Species by Solvent-Free Microwave Extraction and Gas Chromatography–Mass Spectrometry. Anal. Lett. 1–12. https://doi.org/10.1080/00032719.2018.1479411

Jadhav, N.H., Sakate, S.S., Rasal, N.K., Shinde, D.R., Pawar, R.A., 2019. Heterogeneously Catalyzed Pechmann Condensation Employing the Tailored Zn0.925Ti0.075O NPs: Synthesis of Coumarin. ACS Omega 4, 8522–8527. https://doi.org/10.1021/acsomega.9b00257

Jalali-Heravi, M., Moazeni, R.S., Sereshti, H., 2011. Analysis of Iranian rosemary essential oil: Application of gas chromatography–mass spectrometry combined with chemometrics. J. Chromatogr. A 1218, 2569–2576. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.02.048

Jalali-Heravi, M., Zekavat, B., Sereshti, H., 2006. Characterization of essential oil components of Iranian geranium oil using gas chromatography–mass spectrometry combined with chemometric resolution techniques. J. Chromatogr. A 1114, 154–163. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.02.034

Jeyasankar, A., 2012. Antifeedant, insecticidal and growth inhibitory activities of selected plant oils on black cutworm, Agrotis ipsilon (Hufnagel) (Lepidoptera: Noctuidae). Asian Pac. J. Trop. Dis. 2, S347–S351. https://doi.org/10.1016/S2222-1808(12)60179-0

Jolliffe, I.T., 2002. Principal Component Analysis - Second Edition. Springer Ser. Stat. https://doi.org/10.1007/b98835

Jones, M.G., Hughes, J., Tregova, A., Milne, J., Tomsett, A.B., Collin, H.A., 2004. Biosynthesis of the flavour precursors of onion and garlic. J. Exp. Bot. 55, 1903–1918. https://doi.org/10.1093/jxb/erh138

Jones, S., 2011. Simple Heart Cutting with Deans Switch and Backflushing with Capillary Flow Technolgy. Agilent 52.

Juchelka, D., Steil, A., Witt, K., Mosandl, A., 1996. Chiral Compounds of Essential Oils. XX. Chirality Evaluation and Authenticity Profiles of Neroli and Petitgrain Oils. J. Essent. Oil Res. 8, 487–497. https://doi.org/10.1080/10412905.1996.9700674

Jung, J., Sewenig, S., Hener, U., Mosandl, A., 2005. Comprehensive authenticity assessment of lavender oils using multielement/multicomponent isotope ratio mass spectrometry analysis and enantioselective multidimensional gas chromatography–mass spectrometry. Eur. Food Res. Technol. 220, 232–237. https://doi.org/10.1007/s00217-004-1049-4

Kail, B.W., Link, D.D., Morreale, B.D., 2012. Determination of Free Fatty Acids and Triglycerides by Gas Chromatography Using Selective Esterification Reactions. J. Chromatogr. Sci. 50, 934–939. https://doi.org/10.1093/chromsci/bms093

Kannaste, A., Copolovici, L., Pazouki, L., Suhhorutsenko, M., Niinemets, U., 2013. Highly variable chemical signatures over short spatial distances among Scots pine (Pinus sylvestris) populations. Tree Physiol. 33, 374–387. https://doi.org/10.1093/treephys/tpt013

Kassambara, A., Mundt, F., 2020. factoextra: Extract and Visualize the Results of Multivariate Data Analyses.

Kelly, S., Brodie, C., Hilkert, A., 2018. Chapter 11 - Isotopic-Spectroscopic Technique: Stable Isotope-Ratio Mass Spectrometry (IRMS), in: Sun, D.-W. (Ed.), Modern Techniques for Food Authentication (Second Edition). Academic Press, pp. 349–413. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814264-6.00011-6

Kelly, S.D., Heaton, K.D., Brereton, P., 2001. Deuterium/hydrogen isotope ratio measurement of water and organic samples by continuous-flow isotope ratio mass spectrometry using chromium as the reducing agent in an elemental analyser. Rapid Commun. Mass Spectrom. 15, 1283–1286. https://doi.org/10.1002/rcm.303

Khaligh, N.G., 2012. Synthesis of coumarins via Pechmann reaction catalyzed by 3-methyl-1-sulfonic acid imidazolium hydrogen sulfate as an efficient, halogen-free and reusable acidic ionic liquid. Catal. Sci. Technol. 2, 1633–1636. https://doi.org/10.1039/C2CY20196H

Khodabakhsh, P., Shafaroodi, H., Asgarpanah, J., 2015. Analgesic and anti-inflammatory activities of Citrus aurantium L. blossoms essential oil (neroli): involvement of the nitric oxide/cyclic-guanosine monophosphate pathway. J. Nat. Med. 69, 324–331. https://doi.org/10.1007/s11418-015-0896-6

Knaggs, A.R., 2003. The biosynthesis of shikimate metabolites. Nat. Prod. Rep. 20, 119–136. https://doi.org/10.1039/b100399m

König, W.A., 1998. Enantioselective capillary gas chromatography in the investigation of stereochemical correlations of terpenoids. Chirality 10, 499–504. https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-636X(1998)10:5<499::AID-CHIR13>3.0.CO;2-V

König, W.A., Fricke, C., Saritas, Y., Momeni, B., Hohenfeld, G., 1997. Adulteration or natural variability? enantioselective gas chromatography in purity control of essential oils. J. High Resolut. Chromatogr. 20, 55–61. https://doi.org/10.1002/jhrc.1240200202

König, W.A., Hochmuth, D.H., 2004. Enantioselective Gas Chromatography in Flavor and Fragrance Analysis: Strategies for the Identification of Known and Unknown Plant Volatiles. J. Chromatogr. Sci. 42, 423–439. https://doi.org/10.1093/chromsci/42.8.423

König, W.A., Krüger, A., Icheln, D., Runge, T., 1992. Enantiomeric composition of the chiral constituents in essential oils. Part 1: Monoterpene hydrocarbons. J. High Resolut. Chromatogr. 15, 184–189. https://doi.org/10.1002/jhrc.1240150310

König, W.A., Rieck, A., Hardt, I., Gehrcke, B., Kubeczka, K.-H., Muhle, H., 1994. Enantiomeric composition of the chiral constituents of essential oils. Part 2: Sesquiterpene hydrocarbons. J. High Resolut. Chromatogr. 17, 315–320. https://doi.org/10.1002/jhrc.1240170507

Kováts, E., 1958. Gas-chromatographische Charakterisierung organischer Verbindungen. Teil 1: Retentionsindices aliphatischer Halogenide, Alkohole, Aldehyde und Ketone. Helv. Chim. Acta 41, 1915–1932. https://doi.org/10.1002/hlca.19580410703

Kracht, O., 2011. Simultaneous N, C and S Isotope Ratio Determination on a DELTA V Isotope Ratio MS using a Flash Elemental Analyzer, 2.

Kreck, M., Scharrer, A., Bilke, S., Mosandl, A., 2002. Enantioselective analysis of monoterpene compounds in essential oils by stir bar sorptive extraction (SBSE)–enantio-MDGC–MS. Flavour Fragr. J. 17, 32–40. https://doi.org/10.1002/ffj.1033

Kreis, P., Mosandl, A., 1992. Chiral compounds of essential oils. Part XI. Simultaneous stereoanalysis of lavandula oil constituents. Flavour Fragr. J. 7, 187–193. https://doi.org/10.1002/ffj.2730070404

Krueger, H.W., Reesman, R.H., 1982. Carbon isotope analyses in food technology. Mass Spectrom. Rev. 1, 205–236. https://doi.org/10.1002/mas.1280010302

Kumar, A., Chahal, K., Kataria, D., 2017. A review on phytochemistry and pharmacological activities of Cyperus scariosus 8.

Kumar, A., Niranjan, A., Lehri, A., Srivastava, R.K., Tewari, S.K., 2016. Effect of Geographical Climatic Conditions on Yield, Chemical Composition and Carbon Isotope Composition of Nagarmotha (Cyperus scariosus R. Br.) Essential Oil. J. Essent. Oil Bear. Plants 19, 368–373. https://doi.org/10.1080/0972060X.2016.1148642

Kumar, A., Niranjan, A., Lehri, A., Tewari, S.K., Amla, D.V., Raj, S.K., Srivastava, R., Shukla, S.V., 2015. Isotopic Ratio Mass Spectrometry Study for Differentiation Between Natural and Adulterated Essential Oils of Lemongrass (Cymbopogon flexuosus) and Palmarosa (Cymbopogon martinii). J. Essent. Oil Bear. Plants 18, 368–373. https://doi.org/10.1080/0972060X.2014.971061

Kümmel, S., Horst, A., Gelman, F., Strauss, H., Richnow, H.H., Gehre, M., 2020. Simultaneous Compound-Specific Analysis of δ33S and δ34S in Organic Compounds by GC-MC-ICPMS Using

Medium- and Low-Mass-Resolution Modes. Anal. Chem. 92, 14685–14692. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c03253

Kuriakose, S., Joe, H., 2012. Qualitative and quantitative analysis in sandalwood oils using near infrared spectroscopy combined with chemometric techniques. Food Chem. 135, 213–218. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.04.073

Kuriakose, S., Joe, I.H., 2013. Feasibility of using near infrared spectroscopy to detect and quantify an adulterant in high quality sandalwood oil. Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc. 115, 568–573. https://doi.org/10.1016/j.saa.2013.06.076

Kuriakose, S., Thankappan, X., Joe, H., Venkataraman, V., 2010. Detection and quantification of adulteration in sandalwood oil through near infrared spectroscopy. The Analyst 135, 2676. https://doi.org/10.1039/c0an00261e

Lachniet, M.S., 2009. Climatic and environmental controls on speleothem oxygen-isotope values. Quat. Sci. Rev. 28, 412–432. https://doi.org/10.1016/j.quascirev.2008.10.021

Lafhal, S., Bombarda, I., Dupuy, N., Jean, M., Ruiz, K., Vanloot, P., Vanthuyne, N., 2019. Chiroptical fingerprints to characterize lavender and lavandin essential oils. J. Chromatogr. A 460568. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460568

Lafhal, S., Vanloot, P., Bombarda, I., Kister, J., Dupuy, N., 2016. Chemometric analysis of French lavender and lavandin essential oils by near infrared spectroscopy. Ind. Crops Prod. 80, 156–164. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.11.017

Lafhal, S., Vanloot, P., Bombarda, I., Valls, R., Kister, J., Dupuy, N., 2015. Raman spectroscopy for identification and quantification analysis of essential oil varieties: a multivariate approach applied to lavender and lavandin essential oils. J. Raman Spectrosc. 46, 577–585. https://doi.org/10.1002/jrs.4697

Lamarti, A., Badoc, A., Deffieux, G., 1994a. Biogénèse des monoterpènes (*) II - La chaîne isoprénique. Bull Soc Pharm Bordx. 133, 100–118.

Lamarti, A., Badoc, A., Deffieux, G., 1994b. Biogénèse des Monoterpènes (*) III - Monoterpènes synthétases 19.

Le Grand, F., George, G., Akoka, S., 2005. Natural Abundance ^{2} H-ERETIC-NMR Authentication of the Origin of Methyl Salicylate. J. Agric. Food Chem. 53, 5125–5129. https://doi.org/10.1021/jf050385a

Lê, S., Josse, J., Husson, F., 2008. FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis. J. Stat. Softw. 25, 1–18. https://doi.org/10.18637/jss.v025.i01

Leffingwell, D., 2011. Chiral chemistry in flavours & fragrances. Spec. Chem. Mag. 6.

LeGrande, A.N., Schmidt, G.A., 2006. Global gridded data set of the oxygen isotopic composition in seawater. Geophys. Res. Lett. 33. https://doi.org/10.1029/2006GL026011

Leuenberger, M.C., Filot, M.S., 2007. Temperature dependencies of high-temperature reduction on conversion products and their isotopic signatures. Rapid Commun. Mass Spectrom. 21, 1587–1598. https://doi.org/10.1002/rcm.2998

Levet, A., Bordes, C., Clément, Y., Mignon, P., Chermette, H., Marote, P., Cren-Olivé, C., Lantéri, P., 2013. Quantitative structure–activity relationship to predict acute fish toxicity of organic solvents. Chemosphere 93, 1094–1103. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.06.002

Li, F., Li, Q., Wu, S., Tan, Z., 2017. Salting-out extraction of allicin from garlic (Allium sativum L.) based on ethanol/ammonium sulfate in laboratory and pilot scale. Food Chem. 217, 91–97. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.08.092

Li, Y., Kong, D., Wu, H., 2013. Analysis and evaluation of essential oil components of cinnamon barks using GC–MS and FTIR spectroscopy. Ind. Crops Prod. 41, 269–278. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.04.056

Lim Ah Tock, M.J., Kamatou, G.P.P., Combrinck, S., Sandasi, M., Viljoen, A.M., 2020. A chemometric assessment of essential oil variation of three Salvia species indigenous to South Africa. Phytochemistry 172, 112249. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2019.112249

Liu, W.-R., Qiao, W.-L., Liu, Z.-Z., Wang, X.-H., Jiang, R., Li, S.-Y., Shi, R.-B., She, G.-M., 2013. Gaultheria: Phytochemical and Pharmacological Characteristics. Molecules 18, 12071–12108. https://doi.org/10.3390/molecules181012071

Loftsson, T., Duchene, D., 2007. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. Int. J. Pharm. 329, 1–11. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.10.044

Lorenzo, D., Dellacassa, E., Atti-Serafini, L., Santos, A., Frizzo, C., Paroul, N., Moyna, P., Mondello, L., Dugo, G., 2000. Composition and stereoanalysis ofCymbopogon winterianus Jowitt oil from Southern Brazil. Flavour Fragr. J. 15, 177–181. https://doi.org/10.1002/1099-1026(200005/06)15:33.0.CO;2-M

Luo, J., Preciado, S., Xie, P., Larrosa, I., 2016. Carboxylation of Phenols with CO2 at Atmospheric Pressure. Chem. – Eur. J. 22, 6798–6802. https://doi.org/10.1002/chem.201601114

Mahne Opatić, A., Nečemer, M., Kocman, D., Lojen, S., 2017. Geographical Origin Characterization of Slovenian Organic Garlic Using Stable Isotope and Elemental Composition Analyses. Acta Chim. Slov. 1048–1055. https://doi.org/10.17344/acsi.2017.3476

Manhas, M.S., Ganguly, S.N., Mukherjee, S., Jain, A.K., Bose, A.K., 2006. Microwave initiated reactions: Pechmann coumarin synthesis, Biginelli reaction, and acylation. Tetrahedron Lett. 47, 2423–2425. https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2006.01.147

Marshall, R.B., Whiteway, J.N., 1985. Automation of an interface between a nitrogen analyser and an isotope ratio mass spectrometer. Analyst 110, 867–871. https://doi.org/10.1039/AN9851000867

Martin, G., Remaud, G., Martin, G.J., 1995. Authentication of natural flavours using SNIF-NMR® new developments on mustard oil and safron, in: Charalambous, G. (Ed.), Developments in Food Science, Food Flavors: Generation, Analysis and Process Influence. Elsevier, pp. 355–378. https://doi.org/10.1016/S0167-4501(06)80166-4

Mazollier, A., 2013. Développement de méthodologies analytiques et statistiques pour le contrôle de la naturalité de matières premières pour la cosmétique et la parfumerie.

Mbogning Feudjio, W., Ghalila, H., Nsangou, M., Majdi, Y., Mbesse Kongbonga, Y., Jaïdane, N., 2017. Fluorescence Spectroscopy Combined with Chemometrics for the Investigation of the

Adulteration of Essential Oils. Food Anal. Methods 10, 2539–2548. https://doi.org/10.1007/s12161-017-0823-4

Mc Garvey, D.J., Croteau, R., 1995. Terpenoid Metabolism. Plant Cell 7, 1015–1026. https://doi.org/DOI: https://doi.org/10.1105/tpc.7.7.1015

McLafferty, F.W., 1959. Mass Spectrometric Analysis. Molecular Rearrangements. Anal. Chem. 31, 82–87. https://doi.org/10.1021/ac60145a015

Mejd, S., Noumi, E., Trabelsi, N., Flamini, G., Papetti, A., De Feo, V., 2015. Mentha spicata Essential Oil: Chemical Composition, Antioxidant and Antibacterial Activities against Planktonic and Biofilm Cultures of Vibrio spp. Strains. Molecules 20, 14402–14424.

Michel, P., Dobrowolska, A., Kicel, A., Owczarek, A., Bazylko, A., Granica, S., Piwowarski, J., Olszewska, M., 2014. Polyphenolic Profile, Antioxidant and Anti-Inflammatory Activity of Eastern Teaberry (Gaultheria procumbens L.) Leaf Extracts. Molecules 19, 20498–20520. https://doi.org/10.3390/molecules191220498

Mizota, C., Sasaki, A., 1996. Sulfur isotope composition of soils and fertilizers: Differences between Northern and Southern hemispheres. Geoderma 71, 77–93. https://doi.org/10.1016/0016-7061(95)00091-7

Mnayer, D., Fabiano-Tixier, A.-S., Petitcolas, E., Hamieh, T., Nehme, N., Ferrant, C., Fernandez, X., Chemat, F., 2014. Chemical Composition, Antibacterial and Antioxidant Activities of Six Essentials Oils from the Alliaceae Family. Molecules 19, 20034–20053. https://doi.org/10.3390/molecules191220034

Mondello, L., Casilli, A., Tranchida, P.Q., Furukawa, M., Komori, K., Miseki, K., Dugo, P., Dugo, G., 2006. Fast enantiomeric analysis of a complex essential oil with an innovative multidimensional gas chromatographic system. J. Chromatogr. A, 28TH INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON CAPILLARY CHROMATOGRAPHY AND ELECTROPHORESIS 1105, 11–16. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.08.013

Montes, I., Sanabria, D., García, M., Castro, J., Fajardo, J., 2006. A Greener Approach to Aspirin Synthesis Using Microwave Irradiation. J. Chem. Educ. 83, 628. https://doi.org/10.1021/ed083p628

Morrison, J., Brockwell, T., Merren, T., Fourel, F., Phillips, A.M., 2001. On-Line High-Precision Stable Hydrogen Isotopic Analyses on Nanoliter Water Samples. Anal. Chem. 73, 3570–3575. https://doi.org/10.1021/ac001447t

Mosandl, A., 1995. Enantioselective capillary gas chromatography and stable isotope ratio mass spectrometry in the authenticity control of flavors and essential oils. Food Rev. Int. 11, 597–664. https://doi.org/10.1080/87559129509541063

Mosandl, A., Hener, U., Kreis, P., Schmarr, H.-G., 1990. Enantiomeric distribution of α-pinene, β-pinene and limonene in essential oils and extracts. Part 1. Rutaceae and gramineae. Flavour Fragr. J. 5, 193–199. https://doi.org/10.1002/ffj.2730050402

Mosandl, A., Juchelka, D., 1997. Advances in the Authenticity Assessment of Citrus Oils. J. Essent. Oil Res. 9, 5–12. https://doi.org/10.1080/10412905.1997.9700706

Mukhopadhyay, M., Bantawa, P., Mondal, T.K., Nandi, S.K., 2016. Biological and phylogenetic advancements of Gaultheria fragrantissima: Economically important oil bearing medicinal plant. Ind. Crops Prod. 81, 91–99. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.11.042

Myrick, J.M., Vendra, V.K., Krishnan, S., 2014. Self-assembled polysaccharide nanostructures for controlled-release applications. Nanotechnol. Rev. 3. https://doi.org/10.1515/ntrev-2012-0050

Narale, S.V., 2018. SYNTHESIS OF COUMARIN AND THEIR DERIVATIVES WITH THEIR APPLICATINS BY DIFFERENT METHODS. World J. Pharm. Res. 7, 7.

Nehemy, M.F., Millar, C., Janzen, K., Gaj, M., Pratt, D.L., Laroque, C.P., McDonnell, J.J., 2019. ^{17} O-excess as a detector for co-extracted organics in vapor analyses of plant isotope signatures. Rapid Commun. Mass Spectrom. 33, 1301–1310. https://doi.org/10.1002/rcm.8470

Nehlich, O., 2015. The application of sulphur isotope analyses in archaeological research: A review. Earth-Sci. Rev. 142, 1–17. https://doi.org/10.1016/j.earscirev.2014.12.002

Nhu-Trang, T.-T., Casabianca, H., Grenier-Loustalot, M.-F., 2006a. Authenticity control of essential oils containing citronellal and citral by chiral and stable-isotope gas-chromatographic analysis. Anal. Bioanal. Chem. 386, 2141–2152. https://doi.org/10.1007/s00216-006-0842-2

Nhu-Trang, T.-T., Casabianca, H., Grenier-Loustalot, M.-F., 2006b. Deuterium/hydrogen ratio analysis of thymol, carvacrol, γ-terpinene and p-cymene in thyme, savory and oregano essential oils by gas chromatography–pyrolysis–isotope ratio mass spectrometry. J. Chromatogr. A 1132, 219–227. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.07.088

Nikolić, M., Marković, T., Mojović, M., Pejin, B., Savić, A., Perić, T., Marković, D., Stević, T., Soković, M., 2013. Chemical composition and biological activity of Gaultheria procumbens L. essential oil. Ind. Crops Prod. 49, 561–567. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.06.002

Noleau, I., Richard, H., Peyroux, A.-S., 1991. Volatile Compounds in Leek and Asafoetida. J. Essent. Oil Res. 3, 241–256. https://doi.org/10.1080/10412905.1991.9697935

Norman, A.-L., Anlauf, K., Hayden, K., Thompson, B., Brook, J.R., Li, S.-M., Bottenheim, J., 2006. Aerosol sulphate and its oxidation on the Pacific NW coast: S and O isotopes in PM2.5. Atmos. Environ., The Pacific 2001 Air Quality Study II 40, 2676–2689. https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2005.09.085

Oberlin, C., Valladas, H., 2015. Datation par le Radiocarbone de la fraction organique de l'os, in: Message d'os. Archéométrie Du Squelette Animal et Humain, Sciences Archéologiques. Éditions des archives contemporaines, Paris, pp. 287–306.

Ochocka, R.J., Wesołowski, M., Lamparczyk, H., 1992. Thermoanalysis supported by principal component analysis (PCA) in quality assessment of essential oil samples. Thermochim. Acta 210, 151–162. https://doi.org/10.1016/0040-6031(92)80285-5

O'Leary, M.H., 1988. Carbon Isotopes in Photosynthesis. BioScience 38, 328–336. https://doi.org/10.2307/1310735

O'Leary, M.H., 1981. Carbon isotope fractionation in plants. Phytochemistry 20, 553–567. https://doi.org/10.1016/0031-9422(81)85134-5

Olennikov, D., Kashchenko, N., Chirikova, N., 2016. Meadowsweet Teas as New Functional Beverages: Comparative Analysis of Nutrients, Phytochemicals and Biological Effects of Four Filipendula Species. Molecules 22, 16. https://doi.org/10.3390/molecules22010016

Orav, A., Kapp, K., Raal, A., 2013. Chemosystematic markers for the essential oils in leaves of Mentha species cultivated or growing naturally in Estonia. Proc. Est. Acad. Sci. 62, 175. https://doi.org/10.3176/proc.2013.3.03

Ordoudi, S.A., Papapostolou, M., Kokkini, S., Tsimidou, M.Z., 2020. Diagnostic Potential of FT-IR Fingerprinting in Botanical Origin Evaluation of Laurus nobilis L. Essential Oil is Supported by GC-FID-MS Data. Molecules 25, 583. https://doi.org/10.3390/molecules25030583

Osmond, C.B., 1978. Crassulacean Acid Metabolism: A Curiosity in Context. Annu. Rev. Plant Physiol. 29, 379–414. https://doi.org/10.1146/annurev.pp.29.060178.002115

Padalia, R., Verma, R., Chauhan, A., Velusamy, S., Chanotiya, C., 2013. Essential oil composition of sixteen elite cultivars of Mentha from western Himalayan region, India. Maejo Int. J. Sci. Technol. 7, 83–93. https://doi.org/10.14456/mijst.2013.7

Pandey, B.P., Thapa, R., Upreti, A., 2017. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of essential oil and methanol extract of Artemisia vulgaris and Gaultheria fragrantissima collected from Nepal. Asian Pac. J. Trop. Med. 10, 952–959. https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2017.09.005

Panten, J., Surburg, H., 2015. Flavors and Fragrances, 1. General Aspects, in: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. American Cancer Society, pp. 1–9. https://doi.org/10.1002/14356007.a11_141.pub2

Park, I.-K., Seo, S.-M., Kim, J., 2011. Nematicidal activity of plant essential oils and components from Gaultheria fragrantissima and Zanthoxylum alatum against the pine wood nematode, Bursaphelenchus xylophilus. Nematology 13, 87–93. https://doi.org/10.1163/138855410X504907

Park, J.H., Choi, S.-H., Bong, Y.-S., 2019. Geographical origin authentication of onions using stable isotope ratio and compositions of C, H, O, N, and S. Food Control 101, 121–125. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.02.023

Pellati, F., Orlandini, G., van Leeuwen, K.A., Anesin, G., Bertelli, D., Paolini, M., Benvenuti, S., Camin, F., 2013. Gas chromatography combined with mass spectrometry, flame ionization detection and elemental analyzer/isotope ratio mass spectrometry for characterizing and detecting the authenticity of commercial essential oils of *Rosa damascena* Mill.: GC/MS, GC/FID and GC/C/IRMS analysis of *Rosa damascena* essential oil. Rapid Commun. Mass Spectrom. 27, 591–602. https://doi.org/10.1002/rcm.6489

Perini, M., Pianezze, S., Strojnik, L., Camin, F., 2019. C and H stable isotope ratio analysis using solid-phase microextraction and gas chromatography-isotope ratio mass spectrometry for vanillin authentication. J. Chromatogr. A S0021967319301633. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.02.032

Peyron, L., 2002. Peyron, L., 2002. Medicinal and Aromatic Plants, Industrial Profiles. 26, p.148.

Phadtare, S.B., Shankarling, G.S., 2012. Greener coumarin synthesis by Knoevenagel condensation using biodegradable choline chloride. Environ. Chem. Lett. 10, 363–368. https://doi.org/10.1007/s10311-012-0360-8

Pianezze, S., Perini, M., Bontempo, L., Ziller, L., D'Archivio, A.A., 2019. Geographical discrimination of garlic (Allium Sativum L.) based on Stable isotope ratio analysis coupled with statistical methods: The Italian case study. Food Chem. Toxicol. 134, 110862. https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110862

Pietsch, M., König, W.A., 1997. Enantiomeric composition of the chiral constituents of essential oils—part 3: Diterpene hydrocarbons. J. High Resolut. Chromatogr. 20, 257–260. https://doi.org/10.1002/jhrc.1240200503

Pironti, C., Proto, A., Camin, F., Cucciniello, R., Zarrella, I., Motta, O., 2016. FTIR and NDIR spectroscopies as valuable alternatives to IRMS spectrometry for the δ 13 C analysis of food. Talanta 160, 276–281. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.06.053

Pragadheesh, V.S., Yadav, A., Chanotiya, C.S., 2015. Role of substituents in cyclodextrin derivatives for enantioselective gas chromatographic separation of chiral terpenoids in the essential oils of Mentha spicata. J. Chromatogr. B 1002, 30–41. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.07.034

Prakash, K., 2015. Assessment of Toxicity, Antifeedant Activity, and Biochemical Responses in Stored-Grain Insects Exposed to Lethal and Sublethal Doses of *Gaultheria procumbens* L. Essential Oil. J. Agric. Food Chem. 63, 10518–10524. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b03797

Preston, T., Owens, N.J.P., 1985. Preliminary 13C measurements using a gas chromatograph interfaced to an isotope ratio mass spectrometer. Biomed. Mass Spectrom. 12, 510–513. https://doi.org/10.1002/bms.1200120913

R Core Team, 2020. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

Ramirez, D.A., Locatelli, D.A., González, R.E., Cavagnaro, P.F., Camargo, A.B., 2017. Analytical methods for bioactive sulfur compounds in Allium : An integrated review and future directions. J. Food Compos. Anal. 61, 4–19. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2016.09.012

Randle, W.M., 1997. Onion Flavor Chemistry and Factors Influencing Flavor Intensity, in: Spices, ACS Symposium Series. American Chemical Society, pp. 41–52. https://doi.org/10.1021/bk-1997-0660.ch005

Ravid, U., Putievsky, E., Katzir, I., 1994a. Chiral gc analysis of enantiomerically pure (r)(—)-linalyl acetate in some lamiaceae, myrtle and petitgrain essential oils. Flavour Fragr. J. 9, 275–276. https://doi.org/10.1002/ffj.2730090515

Ravid, U., Putievsky, E., Katzir, I., 1994b. Enantiomeric distribution of piperitone in essential oils of some mentha spp., calamintha incána (sm.) heldr. and artemisia judaica L. Flavour Fragr. J. 9, 85–87. https://doi.org/10.1002/ffj.2730090210

Ravid, U., Putievsky, E., Katzir, I., Ikan, R., 1992a. Chiral gc analysis of enantiomerically pure fenchone in essential oils. Flavour Fragr. J. 7, 169–172. https://doi.org/10.1002/ffj.2730070314

Ravid, U., Putievsky, E., Katzir, I., Weinstein, V., Ikan, R., 1992b. Chiral GC analysis of (S)(+)- and (R)(−)-carvone with high enantiomeric purity in caraway, dill and spearmint oils. Flavour Fragr. J. 7, 289–292. https://doi.org/10.1002/ffj.2730070511

Reece, J., Urry, L.A., Cain, M.L., Wasserman, S.A., Minorsky, P.V., Jackson, R.B., 2013. Campbell Biology, 10th Edition. ed. Pearson.

Reichert, S., Fischer, D., Asche, S., Mosandl, A., 2000. Stable isotope labelling in biosynthetic studies of dill ether, using enantioselective multidimensional gas chromatography, online coupled with isotope ratio mass spectrometry. Flavour Fragr. J. 15, 303–308. https://doi.org/10.1002/1099-1026(200009/10)15:5<303::AID-FFJ912>3.0.CO;2-2

Remaud, G., Debon, A.A., Martin, Y., Martin, G.G., Martin, G.J., 1997. Authentication of Bitter Almond Oil and Cinnamon Oil: Application of the SNIF-NMR Method to Benzaldehyde. J. Agric. Food Chem. 45, 4042–4048. https://doi.org/10.1021/jf970143d

Remaud, G.S., Martin, Y.-L., Martin, G.G., Naulet, N., Martin, G.J., 1997. Authentication of Mustard Oils by Combined Stable Isotope Analysis (SNIF-NMR and IRMS). J. Agric. Food Chem. 45, 1844–1848. https://doi.org/10.1021/jf960448c

Ribnicky, D.M., Poulev, A., Raskin, I., 2003. The Determination of Salicylates in Gaultheria procumbens for Use as a Natural Aspirin Alternative. J. Nutraceuticals Funct. Med. Foods 4, 39–52. https://doi.org/10.1300/J133v04n01_05

Robinson, B.W., 1995. Sulphur isotope standards (Proceedings of a Consultants' Meeting held in Vienna, 1–3. Dec. 1993. No. IAEA-TECDOC-825).

Rothenberger, O.S., Krasnoff, S.B., Rollins, R.B., 1980. Conversion of (+)-Limonene to (-)-Carvone: An organic laboratory sequence of local interest. J. Chem. Educ. 57, 741. https://doi.org/10.1021/ed057p741

Ruff, C., Hör, K., Weckerle, B., König, T., Schreier, P., 2002. Authenticity Assessment of Estragole and Methyl Eugenol by On-Line Gas Chromatography−Isotope Ratio Mass Spectrometry. J. Agric. Food Chem. 50, 1028–1031. https://doi.org/10.1021/jf011204h

Ruff, C., Hör, K., Weckerle, B., Schreier, P., König, T., 2000. 2H/1H Ratio Analysis of Flavor Compounds by On-Line Gas Chromatography Pyrolysis Isotope Ratio Mass Spectrometry (HRGC-P-IRMS): Benzaldehyde. J. High Resolut. Chromatogr. 23, 357–359. https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4168(20000501)23:5<357::AID-JHRC357>3.0.CO;2-R

Russell, W.A., Papanastassiou, D.A., Tombrello, T.A., 1978. Ca isotope fractionation on the Earth and other solar system materials. Geochim. Cosmochim. Acta 42, 1075–1090. https://doi.org/10.1016/0016-7037(78)90105-9

Rutledge, D.N., 2021. Chimiometrie et Metabolomique. Ann. Falsif. Expert. Chim. Toxicol. 993, 73–84.

Safe food processing: common standards for extraction solvents (No. 2009/32/EC), 2009.

Said-Ahmad, W., Amrani, A., 2013. A sensitive method for the sulfur isotope analysis of dimethyl sulfide and dimethylsulfoniopropionate in seawater. Rapid Commun. Mass Spectrom. 27, 2789–2796. https://doi.org/10.1002/rcm.6751

Said-Ahmad, W., Wong, K., Mcnall, M., Shawar, L., Jacksier, T., Turich, C., Stankiewicz, A., Amrani, A., 2017. Compound-Specific Sulfur Isotope Analysis of Petroleum Gases. Anal. Chem. 89, 3199–3207. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b05131

Saint-Lary, L., Roy, C., Paris, J.-P., Martin, J.-F., Thomas, O.P., Fernandez, X., 2016. Metabolomics as a tool for the authentication of rose extracts used in flavour and fragrance area. Metabolomics 12, 49. https://doi.org/10.1007/s11306-016-0963-3

Sakamoto, N., Ishida, T., Arima, T., Idemitsu, K., Inagaki, Y., Furuya, H., Kawamura, H., Matsuoka, N., Tawaki, S., 2002. Concentrations of Radiocarbon and Isotope Compositions of Stable Carbon in Food. J. Nucl. Sci. Technol. 39, 323–328. https://doi.org/10.1080/18811248.2002.9715196

Sarrou, E., Chatzopoulou, P., Dimassi-Theriou, K., Therios, I., 2013. Volatile Constituents and Antioxidant Activity of Peel, Flowers and Leaf Oils of Citrus aurantium L. Growing in Greece. Molecules 18, 10639–10647. https://doi.org/10.3390/molecules180910639

Satyal, P., Craft, J.D., Dosoky, N.S., Setzer, W.N., 2017a. The Chemical Compositions of the Volatile Oils of Garlic (Allium sativum) and Wild Garlic (Allium vineale). Foods 6. https://doi.org/10.3390/foods6080063

Satyal, P., Jones, T.H., Lopez, E.M., McFeeters, R.L., Ali, N.A.A., Mansi, I., Al-kaf, A.G., Setzer, W.N., 2017b. Chemotypic Characterization and Biological Activity of Rosmarinus officinalis. Foods 6, 20. https://doi.org/10.3390/foods6030020

Schipilliti, L., Bonaccorsi, I., Sciarrone, D., Dugo, L., Mondello, L., Dugo, G., 2012a. Determination of petitgrain oils landmark parameters by using gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry and enantioselective multidimensional gas chromatography. Anal. Bioanal. Chem. 405. https://doi.org/10.1007/s00216-012-6031-6

Schipilliti, L., Bonaccorsi, I.L., Mondello, L., 2018. Evaluation of the carbon isotope ratios of selected volatiles determined in several citrus authentic petitgrain oils. Bigarade (C. aurantium) petitgrain oil's first case report. J. Essent. Oil Res. 0, 1–12. https://doi.org/10.1080/10412905.2018.1556745

Schipilliti, L., Dugo, P., Bonaccorsi, I., Mondello, L., 2012b. Authenticity control on lemon essential oils employing Gas Chromatography–Combustion-Isotope Ratio Mass Spectrometry (GC–C-IRMS). Food Chem. 131, 1523–1530. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.09.119

Schipilliti, L., Tranchida, P.Q., Sciarrone, D., Russo, M., Dugo, P., Dugo, G., Mondello, L., 2010. Genuineness assessment of mandarin essential oils employing gas chromatography-combustion-isotope ratio MS (GC-C-IRMS). J. Sep. Sci. 33, 617–625. https://doi.org/10.1002/jssc.200900504

Schmidt, H.-L., Werner, R.A., Eisenreich, W., 2003. Systematics of 2H patterns in natural compounds and its importance for the elucidation of biosynthetic pathways. Phytochem. Rev. 2, 61–85. https://doi.org/10.1023/B:PHYT.0000004185.92648.ae

Schmidt, H.-L., Werner, R.A., Eisenreich, W., Fuganti, C., Fronza, G., Remaud, G., Robins, R.J., 2006. The prediction of isotopic patterns in phenylpropanoids from their precursors and the mechanism of the NIH-shift: Basis of the isotopic characteristics of natural aromatic compounds. Phytochemistry 67, 1094–1103. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.03.014

Schmidt, H.-L., Werner, R.A., Roßmann, A., 2001. 18O Pattern and biosynthesis of natural plant products. Phytochemistry 58, 9–32. https://doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00017-6

Schomburg, G., Husamanm, H., Hübinger, E., König, W.A., 1984. Multidimensional capillary gas chromatography-enantiomeric separations of selected cuts using a chiral second column. J. High Resolut. Chromatogr. 7, 404–410. https://doi.org/10.1002/jhrc.1240070711

Schreyen, L., Dirinck, P., Van Wassenhove, F., Schamp, N., 1976. Volatile flavor components of leek. J. Agric. Food Chem. 24, 336–341. https://doi.org/10.1021/jf60204a056

Schubert, V., Mosandl, A., 1991. Chiral compounds of essential oils. VIII: Stereodifferentiation of linalool using multidimensional gas chromatography. Phytochem. Anal. 2, 171–174. https://doi.org/10.1002/pca.2800020406

Sciarrone, D., Schipilliti, L., Ragonese, C., Tranchida, P.Q., Dugo, P., Dugo, G., Mondello, L., 2010. 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, Chiral Separations 1217, 1101–1105. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.09.080

Sessions, A.L., Burgoyne, T.W., Hayes, J.M., 2001. Determination of the H_3 Factor in Hydrogen Isotope Ratio Monitoring Mass Spectrometry. Anal. Chem. 73, 200–207. https://doi.org/10.1021/ac000488m

Sessions, A.L., Hayes, J.M., 2005. Calculation of hydrogen isotopic fractionations in biogeochemical systems. Geochim. Cosmochim. Acta 69, 593–597. https://doi.org/10.1016/j.gca.2004.08.005

Sewenig, S., Hener, U., Mosandl, A., 2003. Online determination of 2H/1H and 13C/12C isotope ratios of cinnamaldehyde from different sources using gas chromatography isotope ratio mass spectrometry. Eur. Food Res. Technol. 217, 444–448. https://doi.org/10.1007/s00217-003-0801-5

Shakil, Md.R., Meguerdichian, A.G., Tasnim, H., Shirazi-Amin, A., Seraji, M.S., Suib, S.L., 2019. Syntheses of ZnO with Different Morphologies: Catalytic Activity toward Coumarin Synthesis via the Knoevenagel Condensation Reaction. Inorg. Chem. 58, 5703–5714. https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.9b00053

Sharif, K.M., Chin, S.-T., Kulsing, C., Marriott, P.J., 2016. The microfluidic Deans switch: 50 years of progress, innovation and application. TrAC Trends Anal. Chem. 82, 35–54. https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.05.005

Sharp, Z.D., Atudorei, V., Durakiewicz, T., 2001. A rapid method for determination of hydrogen and oxygen isotope ratios from water and hydrous minerals. Chem. Geol. 178, 197–210. https://doi.org/10.1016/S0009-2541(01)00262-5

Shellie, R., Marriott, P., Cornwell, C., 2001. Application of comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC×GC) to the enantioselective analysis of essential oils. J. Sep. Sci. 24, 823–830. https://doi.org/10.1002/1615-9314(20011101)24:10/11<823::AID-JSSC823>3.0.CO;2-H

Sieper, H.-P., Kupka, H.-J., Lange, L., Roßmann, A., Tanz, N., Schmidt, H.-L., 2010. Essential methodological improvements in the oxygen isotope ratio analysis of N-containing organic compounds. Rapid Commun. Mass Spectrom. 24, 2849–2858. https://doi.org/10.1002/rcm.4714

Singh, V., Ali, M., 2017. Isolation of volatile constituents and biological studies of aerial parts of Gaultheria Procumbens L. Int. J. Green Pharm. IJGP 5. http://dx.doi.org/10.22377/ijgp.v11i04.1359

Singhal, R., Kulkarni, P., Rege, D., 2001. Quality indices for spice essential oils, in: Handbook of Herbs and Spices. CRC Press, Boca Raton, pp. 22–23.

Sjödin, K., Persson, M., Borg-Karlson, A.-K., Norin, T., 1996. Enantiomeric compositions of monoterpene hydrocarbons in different tissues of four individuals of Pinus sylvestris. Phytochemistry 41, 439–445. https://doi.org/10.1016/0031-9422(95)00652-4

Sjödin, K., Persson, M., Faldt, J., Ekberg, I., Borg-Karlson, A.-K., 2000. Occurrence and Correlations of Monoterpene Hydrocarbon Enantiomers in Pinus sylvestris and Picea abies. J. Chem. Ecol. 26, 1701–1720. https://doi.org/10.1023/A:1005547131427

Sjödin, K., Persson, M., Norin, T., 1992. Enantiomeric compositions of monoterpene hydrocarbons in the wood of healthy and top-cut Pinus sylvestris. Phytochemistry, The International Journal of Plant Biochemistry 32, 53–56. https://doi.org/10.1016/0031-9422(92)80105-N

Soleiman-Beigi, M., Mohammadi, F., 2012. A novel copper-catalyzed, one-pot synthesis of symmetric organic disulfides from alkyl and aryl halides: potassium 5-methyl-1,3,4-oxadiazole-2-thiolate as a novel sulfur transfer reagent. Tetrahedron Lett. 53, 7028–7030. https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2012.10.016

Soria, A.C., Rodríguez-Sánchez, S., Sanz, J., Martínez-Castro, I., 2014. Gas Chromatographic Analysis of Food Bioactive Oligosaccharides, in: Food Oligosaccharides. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 370–398. https://doi.org/10.1002/9781118817360.ch20

Southwell, I., Dowell, A., Morrow, S., Allen, G., Savins, D., Shepherd, M., 2017. Monoterpene chiral ratios: Chemotype diversity and interspecific commonality in Melaleuca alternifolia and M. linariifolia. Ind. Crops Prod. 109, 850–856. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.09.057

Stratakos, A.C., Koidis, A., 2016. Chapter 4 - Methods for Extracting Essential Oils, in: Preedy, V.R. (Ed.), Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety. Academic Press, San Diego, pp. 31–38. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416641-7.00004-3

Strehle, M.A., Rösch, P., Baranska, M., Schulz, H., Popp, J., 2005. On the way to a quality control of the essential oil of fennel by means of Raman spectroscopy. Biopolymers 77, 44–52. https://doi.org/10.1002/bip.20178

Stuart-Williams, H., Wong, S.C., Farquhar, G.D., Keitel, C., Clayton, S., 2008. An innovative molybdenum column liner for oxygen and hydrogen stable isotope analysis by pyrolysis. Rapid Commun. Mass Spectrom. 22, 1117–1126. https://doi.org/10.1002/rcm.3474

Su, X., Li, J., Xiao, F., Wei, W., Sun, Y., 2009. Esterification of Salicylic Acid with Dimethyl Carbonate over Mesoporous Aluminosilicate. Ind. Eng. Chem. Res. 48, 3685–3691. https://doi.org/10.1021/ie801148v

Tateo, F., Mariotti, M., Bononi, M., 1998. Essential Oil Composition and Enantiomeric Distribution of Some Monoterpenoid Components of *Coridothymus capitatus* (L.) Rchb. Grown on the Island of Kos (Greece). J. Essent. Oil Res. 10, 241–244. https://doi.org/10.1080/10412905.1998.9700895

Tenenhaus, M., 1998. La régression PLS: théorie et pratique. Editions TECHNIP.

Thévenot, E.A., Roux, A., Xu, Y., Ezan, E., Junot, C., 2015. Analysis of the Human Adult Urinary Metabolome Variations with Age, Body Mass Index, and Gender by Implementing a Comprehensive Workflow for Univariate and OPLS Statistical Analyses. J. Proteome Res. 14, 3322–3335. https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.5b00354

Tocmo, R., Lin, Y., Huang, D., 2014. Effect of Processing Conditions on the Organosulfides of Shallot (Allium cepa L. Aggregatum Group). J. Agric. Food Chem. 62, 5296–5304. https://doi.org/10.1021/jf500739n

Topolewska, A., Czarnowska, K., Haliński, Ł.P., Stepnowski, P., 2015. Evaluation of four derivatization methods for the analysis of fatty acids from green leafy vegetables by gas chromatography. J. Chromatogr. B 990, 150–157. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.03.020

Vagner, I., Varlam, C., Faurescu, I., Faurescu, D., Bucura, F., 2017. Comparison of two methods for 14C analysis from essential oils using LSC. J. Radioanal. Nucl. Chem. 314, 709–713. https://doi.org/10.1007/s10967-017-5386-8

van Deemter, J.J., Zuiderweg, F.J., Klinkenberg, A., 1956. Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of nonideality in chromatography. Chem. Eng. Sci. 5, 271–289. https://doi.org/10.1016/0009-2509(56)80003-1

van Geldern, R., Nowak, M.E., Zimmer, M., Szizybalski, A., Myrttinen, A., Barth, J.A.C., Jost, H.-J., 2014. Field-Based Stable Isotope Analysis of Carbon Dioxide by Mid-Infrared Laser Spectroscopy for Carbon Capture and Storage Monitoring. Anal. Chem. 86, 12191–12198. https://doi.org/10.1021/ac5031732

van Leeuwen, K.A., Prenzler, P.D., Ryan, D., Camin, F., 2014. Gas Chromatography-Combustion-Isotope Ratio Mass Spectrometry for Traceability and Authenticity in Foods and Beverages: GC-C-IRMS for authentication in foods…. Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. 13, 814–837. https://doi.org/10.1111/1541-4337.12096

Vekariya, R.H., Patel, H.D., 2014. Recent Advances in the Synthesis of Coumarin Derivatives via Knoevenagel Condensation: A Review. Synth. Commun. 44, 2756–2788. https://doi.org/10.1080/00397911.2014.926374

Vilar, S., Quezada, E., Santana, L., Uriarte, E., Yánez, M., Fraiz, N., Alcaide, C., Cano, E., Orallo, F., 2006. Design, synthesis, and vasorelaxant and platelet antiaggregatory activities of coumarin–resveratrol hybrids. Bioorg. Med. Chem. Lett. 16, 257–261. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2005.10.013

Vogt, T., 2010. Phenylpropanoid Biosynthesis. Mol. Plant 3, 2–20. https://doi.org/10.1093/mp/ssp106

Wang, M., Chittiboyina, A.G., Parcher, J.F., Ali, Z., Ford, P., Zhao, J., Avula, B., Wang, Y.-H., Khan, I.A., 2019. Piper nigrum Oil – Determination of Selected Terpenes for Quality Evaluation. Planta Med. 85, 185–194. https://doi.org/10.1055/a-0782-0548

Wang, M., Zhao, J., Avula, B., Wang, Y.-H., Chittiboyina, A.G., Parcher, J.F., Khan, I.A., 2015. Quality Evaluation of Terpinen-4-ol-Type Australian Tea Tree Oils and Commercial Products: An Integrated Approach Using Conventional and Chiral GC/MS Combined with Chemometrics. J. Agric. Food Chem. 63, 2674–2682. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b00147

Wang, X., Jia, C., Wan, H., 1995. The Direct Chiral Separation of Some Optically Active Compounds in Essential Oils by Multidimensional Gas Chromatography. J. Chromatogr. Sci. 33, 22–25. https://doi.org/10.1093/chromsci/33.1.22

Wang, Y.-H., Avula, B., Nanayakkara, N.P.D., Zhao, J., Khan, I.A., 2013. Cassia Cinnamon as a Source of Coumarin in Cinnamon-Flavored Food and Food Supplements in the United States. J. Agric. Food Chem. 61, 4470–4476. https://doi.org/10.1021/jf4005862

Wei, T., Simko, V., 2017. R package "corrplot": Visualization of a Correlation Matrix.

Weinert, B., Ulrich, M., Mosandl, A., 1999. GC-IRMS analysis of black Ceylon, Assam and Darjeeling teas. Z. Für Leb. -Forsch. A 208, 277–281. https://doi.org/10.1007/s002170050417

Werkhoff, P., Bretschneider, W., Güntert, M., Hopp, R., Surburg, H., 1991. Chirospecific analysis in flavor and essential oil chemistry Part B. Direct enantiomer resolution of frans-α-ionone and trans-α-damascone by inclusion gas chromatography. Z. Für Lebensm.-Unters. Forsch. 192, 111–115. https://doi.org/10.1007/BF01202622

West, R.N., Wong, Y.F., Marriott, P.J., 2015. Enantioselective Multidimensional Gas Chromatography for the Analysis of Selected Monoterpenic Compounds in Melaleuca alternifolia (Tea Tree) oil. Reinvention Int. J. Undergrad. Res. 8.

Whelan, T., Sackett, W.M., Benedict, C.R., 1973. Enzymatic Fractionation of Carbon Isotopes by Phosphoenolpyruvate Carboxylase from C4 Plants. Plant Physiol. 51, 1051–1054. https://doi.org/10.1104/pp.51.6.1051

Winkler, F., 1984. Application of natural abundance stable isotope mass spectrometry in food control, in: Chromatography and Mass Spectrometry in Nutrition Science and Food Safety. Elsevier Science Ouvlisgers B.V., Amsterdam, pp. 173–190.

Wong, Y.F., Davies, N.W., Chin, S.-T., Larkman, T., Marriott, P.J., 2015a. Enantiomeric distribution of selected terpenes for authenticity assessment of Australian Melaleuca alternifolia oil. Ind. Crops Prod. 67, 475–483. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.01.066

Wong, Y.F., West, R.N., Chin, S.-T., Marriott, P.J., 2015b. Evaluation of fast enantioselective multidimensional gas chromatography methods for monoterpenic compounds: Authenticity control of Australian tea tree oil. J. Chromatogr. A 1406, 307–315. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.06.036

Woodbury, S.E., Evershed, R.P., Rossell, J.B., 1998a. Purity assessments of major vegetable oils based on δ13C values of individual fatty acids. J. Am. Oil Chem. Soc. 75, 371–379. https://doi.org/10.1007/s11746-998-0055-2

Woodbury, S.E., Evershed, R.P., Rossell, J.B., 1998b. δ13C analyses of vegetable oil fatty acid components, determined by gas chromatography–combustion–isotope ratio mass spectrometry, after saponification or regiospecific hydrolysis. J. Chromatogr. A 805, 249–257. https://doi.org/10.1016/S0021-9673(97)01304-6

Woolley, C.L., Suhail, M.M., Smith, B.L., Boren, K.E., Taylor, L.C., Schreuder, M.F., Chai, J.K., Casabianca, H., Haq, S., Lin, H.-K., Al-Shahri, A.A., Al-Hatmi, S., Young, D.G., 2012. Chemical differentiation of Boswellia sacra and Boswellia carterii essential oils by gas chromatography and chiral gas chromatography–mass spectrometry. J. Chromatogr. A, High Speed and High Resolution

Separations. In Honour of Professor Milton Lee on the Occasion of his 65th Birthday 1261, 158–163. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.06.073

Wörner, M., Schreier, P., 1991. Volatile constituents of tonka beans (Dipteryx odorata Willd.). Z. Für Lebensm.-Unters. Forsch. 193, 21–25. https://doi.org/10.1007/BF01192011

Yamori, W., Hikosaka, K., Way, D.A., 2014. Temperature response of photosynthesis in C3, C4, and CAM plants: temperature acclimation and temperature adaptation. Photosynth. Res. 119, 101–117. https://doi.org/10.1007/s11120-013-9874-6

Yang, L., Sturgeon, R.E., 2003. Comparison of mass bias correction models for the examination of isotopic composition of mercury using sector field ICP-MS. J. Anal. At. Spectrom. 18, 1452–1457. https://doi.org/10.1039/B307973B

Yang, L., Tong, S., Zhou, L., Hu, Z., Mester, Z., Meija, J., 2018. A critical review on isotopic fractionation correction methods for accurate isotope amount ratio measurements by MC-ICP-MS. J. Anal. At. Spectrom. 33, 1849–1861. https://doi.org/10.1039/C8JA00210J

Yassaa, N., Youcef Meklati, B., Cecinato, A., 2000. Evaluation of monoterpenic biogenic volatile organic compounds in ambient air around Eucalyptus globulus, Pinus halepensis and Cedrus atlantica trees growing in Algiers city area by chiral and achiral capillary gas chromatography. Atmos. Environ. 34, 2809–2816. https://doi.org/10.1016/S1352-2310(99)00436-7

Ye, C.-L., Dai, D.-H., Hu, W.-L., 2013. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil from onion (Allium cepa L.). Food Control 30, 48–53. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.07.033

Zawirska-Wojtasiak, R., Wąsowicz, E., 2009. GC Analysis of Rosemary Aroma Isolated Traditionally by Distillation and by SPME. J. Essent. Oil Res. 21, 8–15. https://doi.org/10.1080/10412905.2009.9700094

Zech, M., Glaser, B., 2009. Compound-specific δ18O analyses of neutral sugars in soils using gas chromatography–pyrolysis–isotope ratio mass spectrometry: problems, possible solutions and a first application. Rapid Commun. Mass Spectrom. 23, 3522–3532. https://doi.org/10.1002/rcm.4278

Zech, M., Saurer, M., Tuthorn, M., Rinne, K., Werner, R.A., Siegwolf, R., Glaser, B., Juchelka, D., 2013. A novel methodological approach for δ18O analysis of sugars using gas chromatography-pyrolysis-isotope ratio mass spectrometry. Isotopes Environ. Health Stud. 49, 492–502. https://doi.org/10.1080/10256016.2013.824875

Zhang, B., Zheng, Z., Liu, N., Liu, P., Qiu, Z., Qiao, X., 2021. Effect of different combined mechanical and thermal treatments on the quality characteristics of garlic paste. J. Food Sci. Technol. 58, 1061–1071. https://doi.org/10.1007/s13197-020-04620-1

Zhao, D., Xu, Y.W., Yang, G.L., Husaini, A.M., Wu, W., 2013. Variation of essential oil of Mentha haplocalyx Briq. and Mentha spicata L. from China. Ind. Crops Prod. 42, 251–260. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.06.010

ANNEXES

ANNEXE 1: Article 2 - Supplementary Information

Multi-element (^{13}C, ^{2}H and ^{34}S) bulk and compound-specific stable isotope analysis for authentication of *Allium* species essential oils.

Supplementary Tables

Table S1. *Sample information of the 42-studied leek, shallot, chive, and onion essential oils. Information includes species and geographical origin, year of production, harvest details, and distillation process. A specific sample tag was attributed to each sample of the study.*

Species	Origin	Year of production	Sample tag	Harvest informations	Distillation process
Leek	Egypt Nile Delta	2018	LE1	Freshly bulbs cultivated and harvested manually in March and April to get a freshly bulb before the flowering	Steam distillation
Leek	Egypt Nile Delta	2018	LE2	Freshly bulbs cultivated and harvested manually in March and April to get a freshly bulb before the flowering	Steam distillation
Leek	Egypt Nile Delta	2018	LE3	Freshly bulbs cultivated and harvested manually in March and April to get a freshly and matured complete bulb before the flowering	Steam distillation
Leek	Egypt Nile Delta	2017	LE4	Freshly bulbs cultivated and harvested manually from March to April to get a freshly and matured complete bulb before the flowering	Steam distillation
Leek	Egypt Nile Delta	2018	LE5	Freshly bulbs cultivated and harvested manually in March and April to get a freshly and matured complete bulb before the flowering	Steam distillation
Leek	Egypt Nile Delta	2018	LE6	Freshly bulbs cultivated and harvested manually in Mai to November	Steam distillation
Leek	France Rodelinghem, Pas-de-Calais	2018	LF1	Freshly bulbs cultivated and harvested manually in March and April to get a freshly and matured complete bulb before the flowering	Steam distillation
Leek	France Rodelinghem, Pas-de-Calais	2018	LF2	Freshly bulbs cultivated and harvested manually in March and April to get a freshly and matured complete bulb before the flowering	Steam distillation
Shallot	Germany	2015	SG1	Freshly cultivated bulb	Steam distillation
Shallot	Germany	2015	SG2	Freshly cultivated bulb	Steam distillation
Shallot	Germany	2016	SG3	Freshly cultivated bulb	Steam distillation
Shallot	Germany	2017	SG4	Freshly cultivated bulb	Steam distillation
Shallot	Germany	2017	SG5	Freshly cultivated bulb	Steam distillation
Shallot	Germany	2017	SG6	Freshly cultivated bulb	Steam distillation
Shallot	Germany	2017	SG7	Freshly cultivated bulb	Steam distillation
Shallot	Germany	2017	SG8	Freshly cultivated bulb	Steam distillation

Shallot	Germany	2017	SG9	Freshly cultivated bulb	Steam distillation
Shallot	France Rodelinghem, Pas-de-Calais	2018	SF1	Freshly cultivated bulb	Steam distillation
Shallot	France Rodelinghem, Pas-de-Calais	2018	SF2	Freshly cultivated bulb	Steam distillation
Chive	France Rodelinghem, Pas-de-Calais	2015	CF1	Freshly chive leaves	Steam distillation
Chive	France Rodelinghem, Pas-de-Calais	2015	CF2	Freshly chive leaves	Steam distillation
Chive	France Rodelinghem, Pas-de-Calais	2015	CF3	Freshly chive leaves	Steam distillation
Chive	France Rodelinghem, Pas-de-Calais	2015	CF4	Freshly chive leaves	Steam distillation
Chive	France Rodelinghem, Pas-de-Calais	2015	CF5	Freshly chive leaves	Steam distillation
Chive	France Rodelinghem, Pas-de-Calais	2015	CF6	Freshly chive leaves	Steam distillation
Chive	France Rodelinghem, Pas-de-Calais	2017	CF7	Freshly chive leaves	Steam distillation
Chive	France Rodelinghem, Pas-de-Calais	2017	CF8	Freshly chive leaves	Steam distillation
Chive	France Rodelinghem, Pas-de-Calais	2017	CF9	Freshly chive leaves	Steam distillation
Chive	France Rodelinghem, Pas-de-Calais	2017	CF10	Freshly chive leaves	Steam distillation
Onion	Egypt Nile Delta	2014	OE1	Freshly cultivated bulb harvested from December to June	Steam distillation
Onion	Egypt Nile Delta	2014	OE2	Freshly cultivated bulb harvested from December to June	Steam distillation
Onion	Egypt Nile Delta	2014	OE3	Freshly cultivated bulb harvested from December to June	Steam distillation
Onion	Egypt Nile Delta	2014	OE4	Freshly cultivated bulb harvested from December to June	Steam distillation
Onion	Egypt Nile Delta	2014	OE5	Freshly cultivated bulb harvested from December to June	Steam distillation
Onion	Egypt Nile Delta	2014	OE6	Freshly cultivated bulb harvested from December to June	Steam distillation
Onion	Egypt Nile Delta	2016	OE7	Freshly cultivated bulb harvested from December to June	Steam distillation
Onion	Egypt Nile Delta	2018	OE8	Freshly cultivated bulb harvested from December to June	Steam distillation
Onion	Egypt Nile Delta	2017	OE9	Whole crushed onion bulb	Steam distillation
Onion	Egypt Nile Delta	2017	OE10	Whole crushed onion bulb	Steam distillation
Onion	Egypt Nile Delta	2018	OE11	Whole crushed onion bulb	Steam distillation
Onion	France Rodelinghem, Pas-de-Calais	2018	OF1	Freshly cultivated bulb	Steam distillation
Onion	France Rodelinghem, Pas-de-Calais	2018	OF2	Freshly cultivated bulb	Steam distillation

Table S2. *Neptune Plus multi collector inductively coupled plasma mass spectrometry configuration*

Mass Spectrometer Settings		Measurements Settings	
Parameters	Value	Parameters	Value
RF Power	1200 W	Cup configuration	^{32}S (L4), ^{33}S (C), ^{34}S (H4)
Cool gas	15 L/min	Resolution mode	High
Auxiliary gas	0.9 L/min	Acquisition	10000 cycles
Sample gas	2 mL/min He from GC1310 1 L/min Ar via T-insert piece inside the GC	Integration time	0.131 s
Cones	Standard sampler+ H skimmer	Duration	21.8 min

Table S3. *Bulk stable isotope ratios ($\delta^{13}C_{bulk}$, $\delta^{2}H_{bulk}$, and $\delta^{34}S_{bulk}$ determined with EA-C/P-IRMS), compound specific isotope ratios ($\delta^{13}C$ and $\delta^{2}H$ of DPDS, DPTS, MPDS, and MPTS molecules determined with GC-C/P-IRMS, $\delta^{34}S$ of DPDS, DPTS, and MPTS molecules determined with GC-MC-ICP-MS), and chemical composition (relative peak area (%) of MPDS, MPTS, DPDS, and DPTS determined with GC-FID) of essential oils of leek, shallot, chive, onions, and synthetic molecules of DPDS, DPTS, MPDS, MPTS, and DPS.*

Botanical species	Sample tag	Bulk Stable Isotope Analyses			Dipropyl Disulfide DPDS				Dipropyl Trisulfide DPTS				Methyl Propyl Disulfide MPDS			Methyl Propyl Trisulfide MPTS		
		$\delta^{13}C$ (‰)	$\delta^{2}H$ (‰)	$\delta^{34}S$ (‰)	$\delta^{13}C$ (‰)	$\delta^{2}H$ (‰)	$\delta^{34}S$ (‰)	Relative peak area (%)	$\delta^{13}C$ (‰)	$\delta^{2}H$ (‰)	$\delta^{34}S$ (‰)	Relative peak area (%)	$\delta^{13}C$ (‰)	$\delta^{2}H$ (‰)	Relative peak area (%)	$\delta^{13}C$ (‰)	$\delta^{34}S$ (‰)	Relative peak area (%)
Leek	LE1	-35,41	-218	9,9	-33,50	-149	14,8	37,5	-34,88	-208	12,8	14,2	-38,89	-220	4,4	-42,75	3,7	4,4
Leek	LE2	-34,63	-216	10,4	-34,28	-207	14,0	34,7	-35,97	-251	12,4	11,3	-39,13	-232	7,6	-41,82	11,2	5,4
Leek	LE3	-36,39	-211	10,3	-34,05	-168	15,2	36,4	-35,87	-211	12,9	11,7	-38,66	-231	7,9	-40,41	8,9	5,7
Leek	LE4	-36,06	-214	7,5	-34,17	-145	12,3	37,6	-35,69	-214	10,7	10,4	-39,53	-228	4,9	-43,26	6,5	4,5
Leek	LE5	-36,79	-217	9,4	-34,15	-173	14,4	36,1	-35,86	-219	10,4	11,9	-39,39	-218	7,7	-42,07	8,4	5,7
Leek	LE6	-35,75	-211	9,0	-33,60	-169	11,7	38,9	-35,01	-226	11,3	14,2	-38,77	-211	4,8	-41,13	6,9	4,4
Leek	LF1	-36,46	-226	2,6	-35,20	-251	6,9	39,8	-35,83	-206	4,9	14,2	-39,81	-253	2,1	-43,29	3,5	4,4
Leek	LF2	-36,64	-227	1,0	-35,22	-249	7,7	46,2	-35,63	-204	2,4	13,6	-39,76	-240	4,6	-43,59	2,5	4,7
Shallot	SG1	-31,76	-225	3,9	-31,63	-199	8,7	17,0	-32,57	-215	7,0	18,5	-37,64	-237	1,5	-34,15	1,1	8,4
Shallot	SG2	-31,73	-225	3,6	-31,63	-196	7,8	17,5	-32,93	-192	5,8	18,1	-37,79	-220	1,5	-34,37	0,1	8,3
Shallot	SG3	-31,87	-221	3,5	-31,52	-195	7,9	18,0	-32,58	-228	5,8	18,0	-37,32	-221	1,7	-34,48	4,3	8,9
Shallot	SG4	-31,77	-222	3,5	-31,73	-201	8,5	20,7	-32,67	-218	6,1	17,3	-37,07	-229	2,4	-34,66	4,2	8,9
Shallot	SG5	-31,86	-223	4,1	-31,86	-200	6,4	20,6	-32,36	-214	4,6	16,4	-37,03	-227	2,5	-34,67	0,1	8,9
Shallot	SG6	-31,74	-222	3,9	-31,67	-191	7,9	19,7	-32,41	-184	5,8	17,6	-37,41	-228	2,4	-33,98	3,9	8,9

Shallot	SG7	-31,84	-222	3,9	-31,71	-193	6,7	20,1	-32,77	-209	6,0	17,4	-36,97	-230	2,6	-34,03	3,4	9,1
Shallot	SG8	-31,81	-225	3,6	-31,82	-195	8,7	20,2	-32,89	-207	7,8	17,6	-37,14	-227	2,4	-34,31	5,4	9,2
Shallot	SG9	-31,83	-223	3,5	-31,81	-184	8,7	20,2	-32,76	-182	7,3	16,5	-37,15	-221	3	-34,44	3,1	8,8
Shallot	SF1	-35,19	-218	-0,2	-34,05	-216	8,8	14,0	-35,43	-154	2,7	9,6	-38,69	-198	2,2	-36,56	4,2	8,1
Shallot	SF2	-35,07	-226	0,0	-34,11	-208	8,3	15,1	-35,36	-156	4,6	8,5	-38,87	-184	3,9	-36,91	2,2	7,9
Chive	CF1	-33,44	-224	0,8	-32,04	-231	6,3	26,0	-32,63	-251	3,4	15,0	-37,14	-249	1,6	-34,31	1,1	6,3
Chive	CF2	-33,51	-219	1,4	-32,37	-217	7,3	24,8	-33,01	-251	2,3	14,1	-37,78	-230	1,5	-34,61	0,3	5,6
Chive	CF3	-33,31	-217	0,5	-32,03	-219	6,5	17,0	-32,76	-245	3,1	12,9	-37,29	-206	0,7	-34,83	2,8	5,1
Chive	CF4	-33,38	-225	0,7	-32,15	-229	5,4	19,9	-32,59	-263	3,0	13,1	-37,49	-215	1,3	-34,58	0,8	5,4
Chive	CF5	-33,41	-225	0,8	-32,16	-216	5,3	21,0	-32,37	-252	1,6	11,6	-36,55	-233	1,5	-34,95	0,0	5,3
Chive	CF6	-33,36	-222	1,0	-31,97	-220	4,5	19,9	-32,81	-266	2,5	12,6	-37,91	-221	1,2	-34,47	2,8	5,2
Chive	CF7	-34,17	-221	0,0	-31,71	-217	3,9	25,6	-32,29	-238	3,3	15,7	-36,69	-230	2,2	-34,48	-0,2	5,5
Chive	CF8	-33,62	-225	1,2	-31,66	-224	5,7	26,6	-32,15	-257	3,5	13,9	-36,10	-227	2,2	-34,59	0,5	5,4
Chive	CF9	-33,92	-226	0,0	-32,31	-252	7,5	21,4	-33,14	-168	3,3	9,6	-36,73	-171	1,4	-34,76	3,5	5,0
Chive	CF10	-34,01	-227	0,1	-32,44	-248	8,8	22,5	-33,06	-164	3,4	8,6	-38,17	-230	2,3	-35,15	3,1	4,9
Onion	OE1	-31,67	-206	2,8	-31,75	-188	7,3	27,5	-31,87	-165	5,6	17,9	-38,61	-200	1,4	-35,42	0,7	5,5
Onion	OE2	-32,20	-221	3,5	-32,67	-215	5,4	23,2	-33,28	-243	5,7	17,1	-39,32	-224	1,3	-36,3	-1,2	5,5
Onion	OE3	-32,60	-249	4,0	-31,70	-241	8,3	23,7	-32,81	-273	6,2	17,9	-38,68	-218	1,2	-36,5	-0,9	6,8
Onion	OE4	-32,57	-246	3,6	-31,88	-253	5,8	23,8	-32,52	-240	8,0	17,5	-38,86	-231	1,4	-36,15	0,0	6,7
Onion	OE5	-32,63	-251	3,7	-31,78	-243	7,2	24,2	-32,67	-223	6,1	17,6	-38,75	-216	1,4	-36,32	-2,1	6,9
Onion	OE6	-32,55	-195	3,6	-32,67	-177	9,6	19,6	-33,57	-167	8,9	14,5	-39,32	-184	1,2	-37,19	1,1	7,1
Onion	OE7	-32,46	-185	5,2	-33,04	-168	10,3	22,0	-33,85	-199	7,0	13,3	-37,92	-182	1,9	-36,17	3,7	6,6
Onion	OE8	-33,34	-188	5,6	-33,18	-164	7,7	19,6	-34,18	-152	7,3	15,6	-38,61	-200	2,4	-36,77	4,3	8,1

Onion	OE9	-34,32	-189	6,4	-34,13	-169	10,6	28,3	-34,95	-164	8,4	16,5	-40,13	-170	2,4	-37,81	2,5	5,5
Onion	OE10	-32,60	-191	7,2	-33,66	-180	10,7	20,5	-33,43	-202	10,2	15,0	-39,15	-162	1,5	-36,5	6,1	6,5
Onion	OE11	-31,68	-172	3,1	-30,00	-172	6,6	14,4	-31,12	-202	7,1	11,4	-35,69	-190	4,6	-34,65	2,2	10,7
Onion	OF1	-32,78	-213	1,2	-32,51	-207	8,0	15,6	-34,25	-235	3,7	10,2	-38,58	-209	1,7	-36,41	-0,7	6,7
Onion	OF2	-32,83	-209	1,5	-32,64	-206	5,1	16,8	-34,09	-242	4,0	9,5	-37,72	-222	2,9	-36,63	-2,3	6,8
DPDS Synthesis		-28.52	-141	-0.8														
DPDS Synthesis		-26.26	-134	-3.0														
DPTS Synthesis		-26.18	-125	2.0														
MPDS Synthesis		-37.17	-105	-3.1														
MPDS Synthesis		-27.6	-145	7.3														
MPTS Synthesis		-28.68	-170	1.6														
DPS Synthesis		-25.58	-153	-2.7														

Table S4. *Univariate Pearson's correlation test of BSIA and CSIA isotope values, and DPDS, DPTS, MPDS, and MPTS relative peak area.*

	$\delta^{13}C_{bulk}$ (‰)	$\delta^{2}H_{bulk}$ (‰)	$\delta^{34}S_{bulk}$(‰)	$\delta^{13}C_{DPDS}$ (‰)	$\delta^{2}H_{DPDS}$ (‰)	$\delta^{34}S_{DPDS}$ (‰)	$\delta^{13}C_{DPTS}$ (‰)	$\delta^{2}H_{DPTS}$ (‰)	$\delta^{34}S_{DPTS}$ (‰)	$\delta^{13}C_{MPDS}$ (‰)	$\delta^{2}H_{MPDS}$ (‰)	$\delta^{13}C_{MPTS}$ (‰)	$\delta^{34}S_{MPTS}$ (‰)	$\%_{DPDS}$	$\%_{DPTS}$	$\%_{MPDS}$	$\%_{MPTS}$
$\delta^{13}C_{bulk}$ (‰)	1																
$\delta^{2}H_{bulk}$ (‰)	0,03	1															
$\delta^{34}S_{bulk}$(‰)	-0,27	0,28	1														
$\delta^{13}C_{DPDS}$ (‰)	0,83	-0,12	-0,37	1													
$\delta^{2}H_{DPDS}$ (‰)	-0,02	0,68	0,67	-0,12	1												
$\delta^{34}S_{DPDS}$ (‰)	-0,49	0,25	0,84	-0,55	0,59	1											
$\delta^{13}C_{DPTS}$ (‰)	0,82	-0,12	-0,47	0,94	-0,23	-0,67	1										
$\delta^{2}H_{DPTS}$ (‰)	-0,05	0,38	0,03	-0,24	0,31	0,26	-0,22	1									
$\delta^{34}S_{DPTS}$ (‰)	-0,22	0,29	0,94	-0,32	0,67	0,84	-0,44	0,15	1								
$\delta^{13}C_{MPDS}$ (‰)	0,53	-0,03	-0,44	0,78	-0,12	-0,50	0,74	-0,23	-0,43	1							
$\delta^{2}H_{MPDS}$ (‰)	0,12	0,57	0,05	-0,05	0,32	0,16	-0,02	0,50	0,14	-0,13	1						
$\delta^{13}C_{MPTS}$ (‰)	0,82	-0,07	-0,59	0,84	-0,23	-0,65	0,86	-0,06	-0,54	0,73	0,12	1					
$\delta^{34}S_{MPTS}$ (‰)	-0,47	0,29	0,65	-0,50	0,45	0,76	-0,57	0,21	0,64	-0,24	0,06	-0,50	1				
$\%_{DPDS}$	-0,74	-0,09	0,52	-0,65	0,08	0,51	-0,60	-0,11	0,43	-0,53	-0,34	-0,85	0,43	1			
$\%_{DPTS}$	0,55	-0,21	0,15	0,40	0,05	-0,18	0,46	-0,09	0,13	0,06	-0,20	0,30	-0,23	-0,05	1		
$\%_{MPDS}$	-0,62	0,19	0,67	-0,50	0,42	0,72	-0,64	0,06	0,63	-0,27	-0,14	-0,68	0,71	0,59	-0,36	1	
$\%_{MPTS}$	0,66	0,13	-0,09	0,53	0,20	-0,18	0,42	0,26	-0,02	0,44	0,09	0,54	-0,10	-0,65	0,36	-0,12	1

Table S5. *Unidimensional test of equality of the means of the classes (Leek, onion, shallot, and chive).*

Variable	Lambda	F	DF1	DF2	p-value
$\delta^{13}C_{bulk}$ (‰)	0,28	33,09	3	38	< 0,0001
$\delta^{2}H_{bulk}$ (‰)	0,84	2,37	3	38	0,086
$\delta^{34}S_{bulk}$(‰)	0,43	17,17	3	38	< 0,0001
$\delta^{13}C_{DPDS}$ (‰)	0,48	13,53	3	38	< 0,0001
$\delta^{2}H_{DPDS}$ (‰)	0,77	3,84	3	38	0,017
$\delta^{34}S_{DPDS}$ (‰)	0,46	14,73	3	38	< 0,0001
$\delta^{13}C_{DPTS}$ (‰)	0,39	19,55	3	38	< 0,0001
$\delta^{2}H_{DPTS}$ (‰)	0,82	2,87	3	38	0,049
$\delta^{34}S_{DPTS}$ (‰)	0,45	15,54	3	38	< 0,0001
$\delta^{13}C_{MPDS}$ (‰)	0,48	13,61	3	38	< 0,0001
$\delta^{2}H_{MPDS}$ (‰)	0,73	4,68	3	38	0,007
$\delta^{13}C_{MPTS}$ (‰)	0,07	159,52	3	38	< 0,0001
$\delta^{34}S_{MPTS}$ (‰)	0,54	10,60	3	38	< 0,0001
$\%_{DPDS}$	0,18	58,98	3	38	< 0,0001
$\%_{DPTS}$	0,78	3,55	3	38	0,023
$\%_{MPDS}$	0,36	22,21	3	38	< 0,0001
$\%_{MPTS}$	0,24	39,35	3	38	< 0,0001

Table S6. *Quality model of the PLS-DA*

Index	Comp1	Comp2	Comp3
Q^2 cum	0,249	0,407	0,564
R^2Y cum	0,275	0,482	0,693
R^2X cum	0,444	0,619	0,698

Multi-element (^{13}C, ^{2}H and ^{34}S) bulk and compound-specific stable isotope analysis for authentication of *Allium* species essential oils.

Supplementary Figures

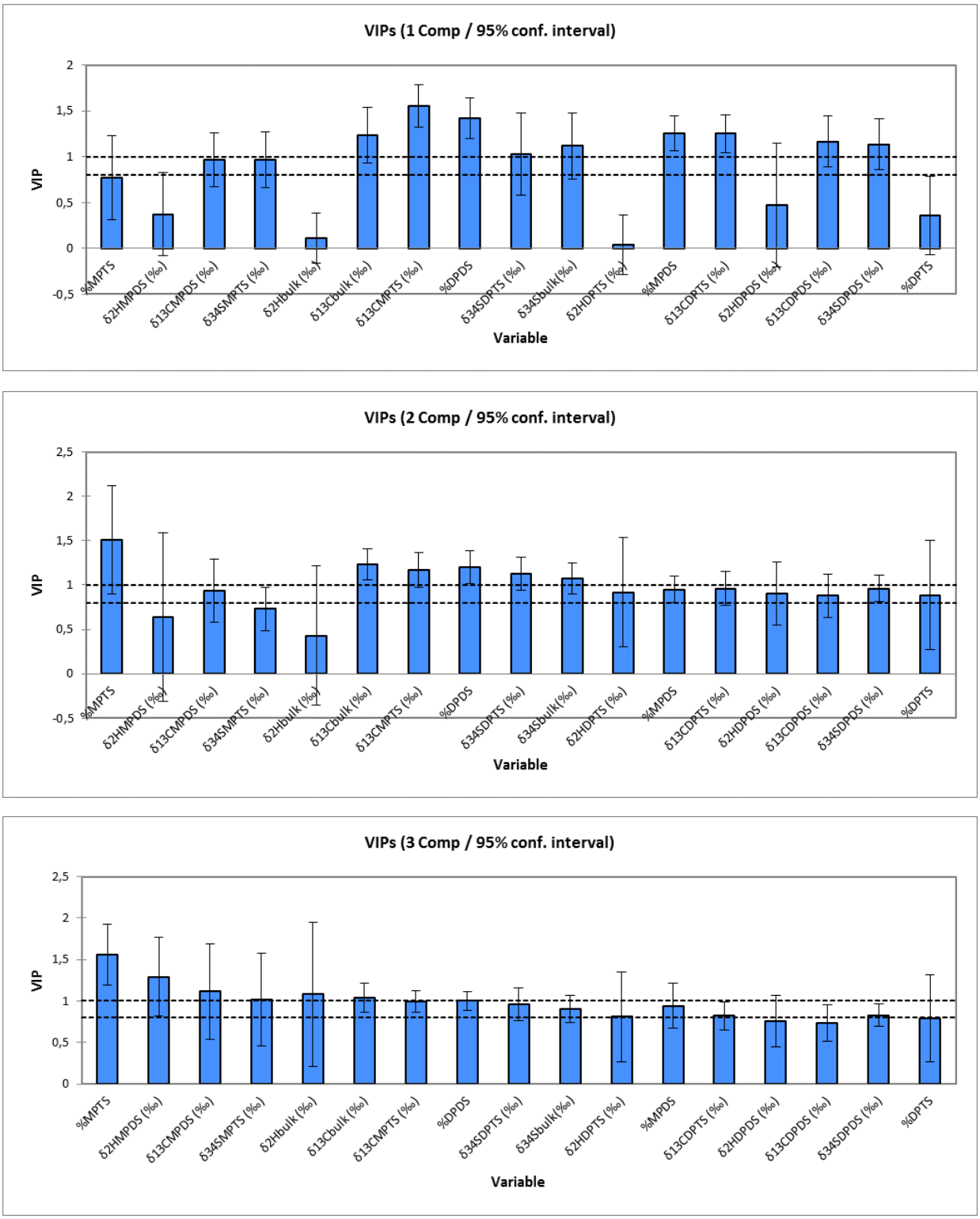

Figure S1. *Variable Importance in the Projection (VIP) of the PLS-DA*

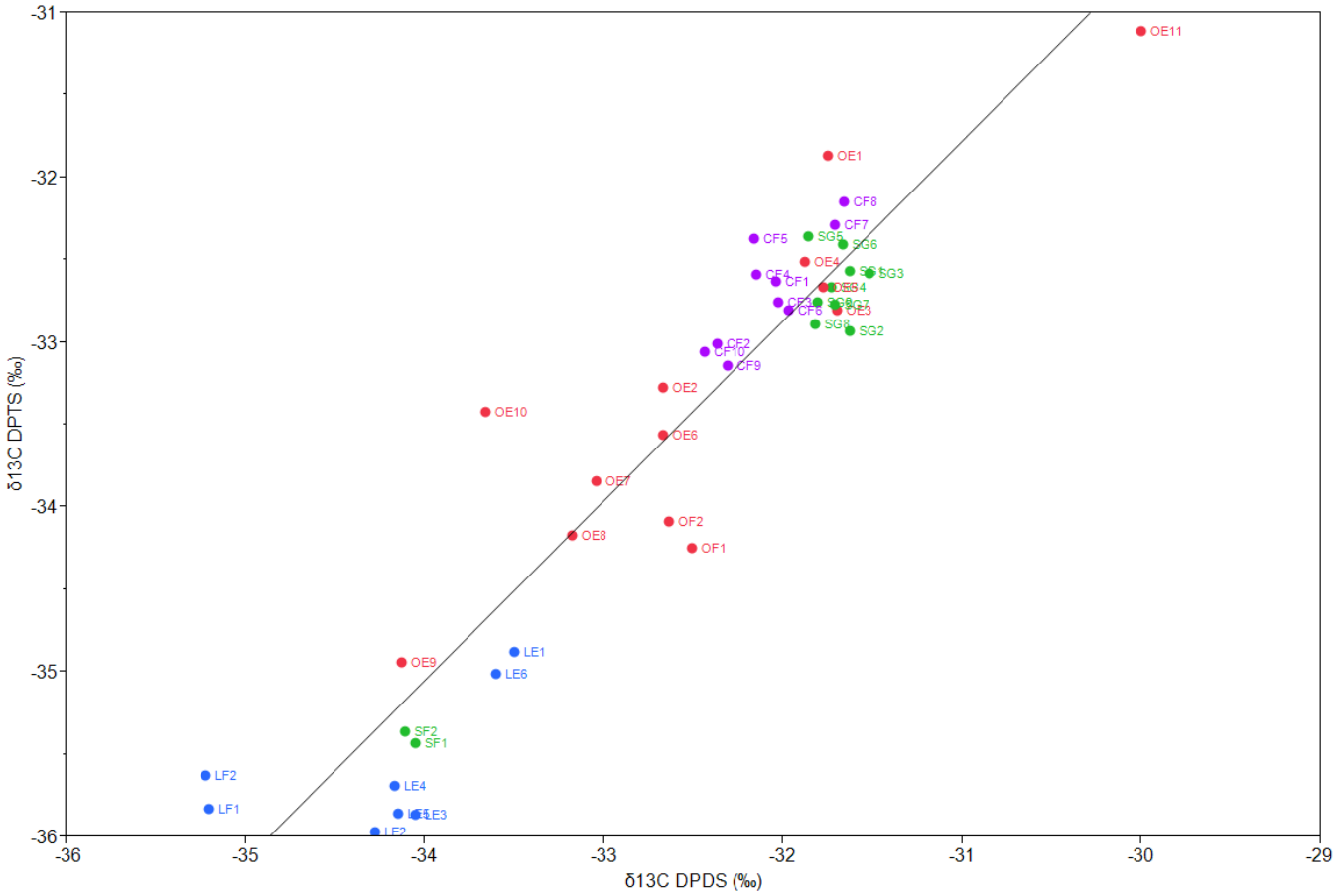

Figure S2. Bivariate fit of $\delta^{13}C_{DPTS}$ (‰) by $\delta^{13}C_{DPDS}$ (‰) measured on 42 essential oils of leek (in blue), shallot (in green), chive (in purple), and onion (in red). Linear regression fit of the data is plotted in black. Determination coefficient: r^2=0.89.

ANNEXE 2: Article 3 – Supplementary Information

Determination of Enantiomeric and Stable Isotope Ratio Fingerprints of Active Secondary Metabolites of Neroli (*Citrus aurantium* L.) Essential Oils for Geographical and Purity Authentication Control

Supplementary Figures

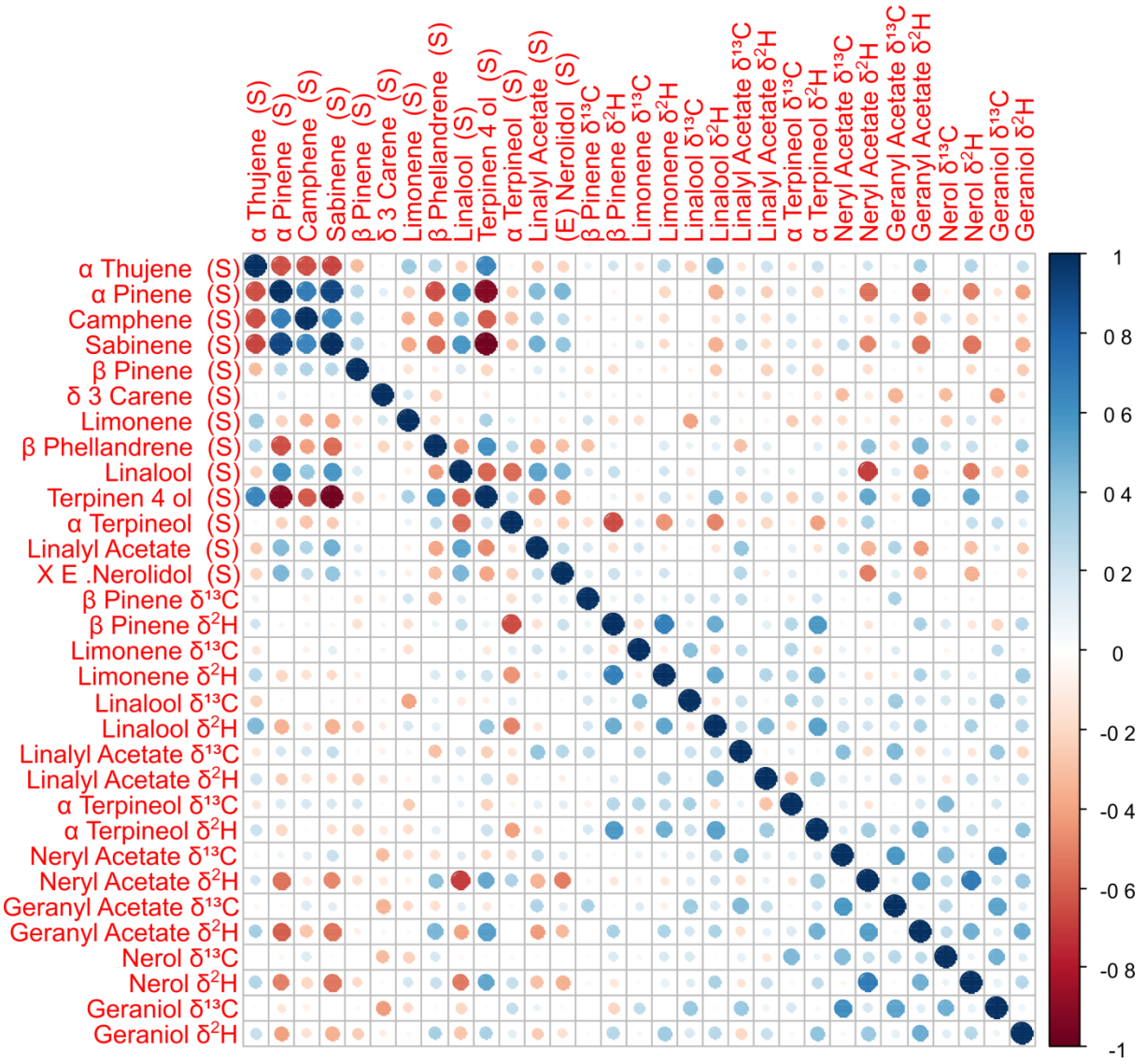

Figure S1. *Univariate Pearson's correlation test of (S) enantiomeric percentages and CSIA isotope values from neroli essential oils.*

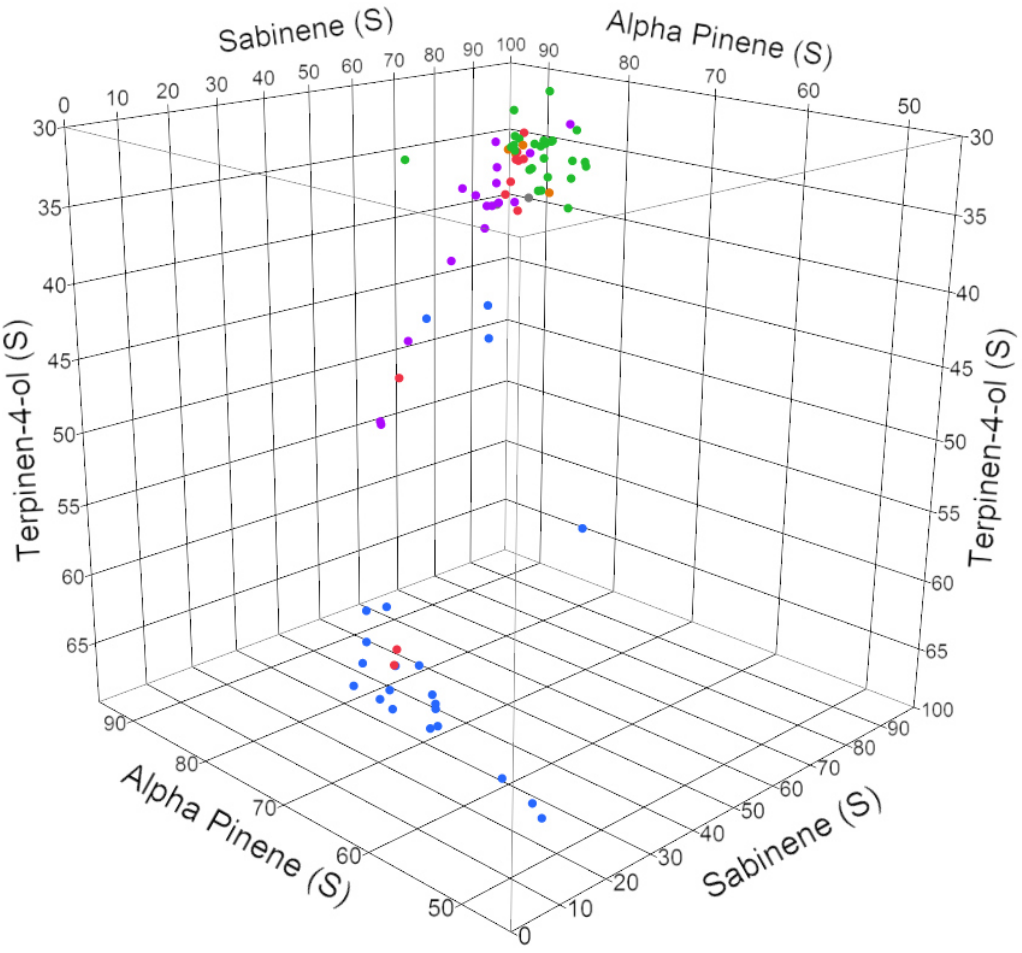

Figure S2. *3D plots of terpinen-4-ol (-), sabinene (-), and α-pinene (-) enantiomeric ratio percentages determined on neroli essential oils from different geographical origins: Morocco (in green), Egypt (in blue), Tunisia (in purple), Lebanon (in orange), and Spain (in red). Samples with unknown geographical origins are represented in grey.*

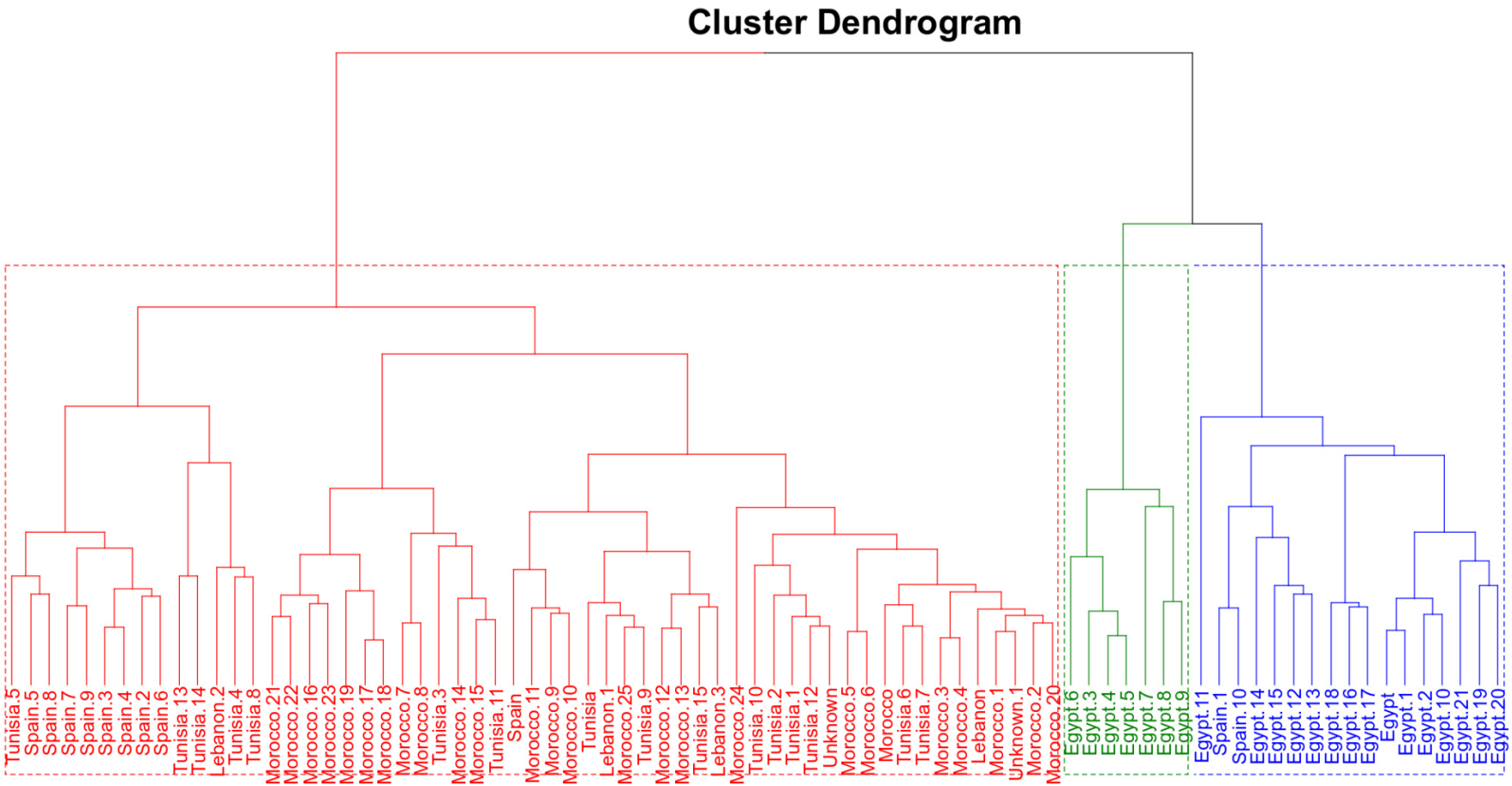

Figure S3. *PCA clusters are represented via dendrogram cluster plot. Cluster 1 (in red) includes Moroccan, Lebanese, Tunisian, and most Spanish samples. Cluster 2 (in green) includes only Egyptian samples. Cluster 3 (in blue) comprises some Egyptian and two Spanish samples.*

Determination of Enantiomeric and Stable Isotope Ratio Fingerprints of Active Secondary Metabolites of Neroli (*Citrus aurantium* L.) Essential Oils for Geographical and Purity Authentication Control

Supplementary Tables

Table S1. *Sample information of the 90-studied neroli and petitgrain essential oils. Information includes species and geographical origin, year of production, harvest details, and extraction process. A specific sample tag was attributed to each sample of the study.*

Sample Tag 1	Sample Tag 2	Species	Geographical origin	Harvest location details	Vegetative stage at time of harvest/gathering	Type of resources	Year of production	Extraction Process
s1	Morocco	Neroli	Morocco	Morocco	Flowering	Cultivated	2016	Hydrodistillation
s2	Morocco.1	Neroli	Morocco	Morocco	Flowering	Cultivated	2017	Hydrodistillation
s3	Morocco.2	Neroli	Morocco	Morocco	Flowering	Cultivated	2017	Hydrodistillation
s4	Morocco.3	Neroli	Morocco	Morocco	Flowering	Cultivated	2018	Hydrodistillation
s5	Morocco.4	Neroli	Morocco	Morocco	Flowering	Cultivated	2018	Hydrodistillation
s6	Morocco.5	Neroli	Morocco	Morocco	Flowering	Cultivated	2018	Hydrodistillation
s7	Morocco.6	Neroli	Morocco	Morocco	Flowering	Cultivated	2018	Hydrodistillation
s8	Morocco.7	Neroli	Morocco	Morocco	Flowering	Cultivated	2019	Hydrodistillation
s9	Morocco.8	Neroli	Morocco	Morocco	Flowering	Cultivated	2019	Hydrodistillation
s10	Morocco.9	Neroli	Morocco	Morocco	Flowering	Cultivated	2019	Hydrodistillation
s11	Morocco.10	Neroli	Morocco	Morocco	Flowering	Cultivated	2019	Hydrodistillation
s12	Morocco.11	Neroli	Morocco	Morocco	Flowering	Cultivated	2019	Hydrodistillation
s13	Morocco.12	Neroli	Morocco	Morocco	Flowering	Cultivated	2019	Hydrodistillation
s14	Morocco.13	Neroli	Morocco	Morocco	Flowering	Cultivated	2019	Hydrodistillation
s15	Morocco.14	Neroli	Morocco	Morocco	Flowering	Cultivated	2020	Hydrodistillation
s16	Morocco.15	Neroli	Morocco	Morocco	Flowering	Cultivated	2020	Hydrodistillation
s17	Morocco.16	Neroli	Morocco	North of Rabat	Flowering	Cultivated	2019	Steam distillation
s18	Morocco.17	Neroli	Morocco	North of Rabat	Flowering	Cultivated	2020	Steam distillation
s19	Morocco.18	Neroli	Morocco	North of Rabat	Flowering	Cultivated	2020	Steam distillation
s20	Morocco.19	Neroli	Morocco	North of Rabat	Flowering	Cultivated	2020	Steam distillation
s21	Morocco.20	Neroli	Morocco	Taounate (East North of Fes)	Flowering	Cultivated	2018	Hydrodistillation
s22	Morocco.21	Neroli	Morocco	Taounate (East North of Fes)	Flowering	Cultivated	2019	Hydrodistillation
s23	Morocco.22	Neroli	Morocco	Taounate (East North of Fes)	Flowering	Cultivated	2019	Hydrodistillation
s24	Morocco.23	Neroli	Morocco	Taounate (East North of Fes)	Flowering	Cultivated	2020	Hydrodistillation
s25	Morocco.24	Neroli	Morocco	Morocco	Flowering	Cultivated	2016	Hydrodistillation
s26	Morocco.25	Neroli	Morocco	Morocco	Flowering	Cultivated	2016	Hydrodistillation

s27	Tunisia	Neroli	Tunisia	Nabeul Region	End of flowering	Wild	2017	Steam distillation
s28	Tunisia.1	Neroli	Tunisia	Nabeul Region	End of flowering	Wild	2018	Steam distillation
s29	Tunisia.2	Neroli	Tunisia	Nabeul Region	End of flowering	Wild	2018	Steam distillation
s30	Tunisia.3	Neroli	Tunisia	Nabeul Region	End of flowering	Wild	2019	Steam distillation
s31	Tunisia.4	Neroli	Tunisia	Nabeul Region	End of flowering	Wild	2019	Steam distillation
s32	Tunisia.5	Neroli	Tunisia	Nabeul Region	End of flowering	Wild	2020	Steam distillation
s33	Tunisia.6	Neroli	Tunisia	Tazerka	Flower buds	Cultivated	2017	Steam distillation
s34	Tunisia.7	Neroli	Tunisia	Tazerka	Flower buds	Cultivated	2018	Steam distillation
s35	Tunisia.8	Neroli	Tunisia	Tazerka	Flower buds	Cultivated	2019	Steam distillation
s36	Tunisia.9	Neroli	Tunisia	Nabeul Region	Flowering	Cultivated	2017	Steam distillation
s37	Tunisia.10	Neroli	Tunisia	Nabeul Region	Flowering	Cultivated	2019	Steam distillation
s38	Tunisia.11	Neroli	Tunisia	Nabeul Region	Flowering	Cultivated	2019	Steam distillation
s39	Tunisia.12	Neroli	Tunisia	Nabeul Region	Flowering	Cultivated	2007	Steam distillation
s40	Tunisia.13	Neroli	Tunisia	Nabeul Region	Flowering	Cultivated	2019	Hydrodistillation
s41	Tunisia.14	Neroli	Tunisia	Nabeul Region	Flowering	Cultivated	2019	Hydrodistillation
s42	Tunisia.15	Neroli	Tunisia	Nabeul Region	Flowering	Cultivated	2019	Hydrodistillation
s43	Lebanon	Neroli	Lebanon	Koura, North Governate	Flowering	Cultivated	2016	Hydrodistillation
s44	Lebanon.1	Neroli	Lebanon	Koura, North Governate	Flowering	Cultivated	2016	Hydrodistillation
s45	Lebanon.2	Neroli	Lebanon	Koura, North Governate	Flowering	Cultivated	2017	Hydrodistillation
s46	Lebanon.3	Neroli	Lebanon	Koura, North Governate	Flowering	Cultivated	2019	Hydrodistillation
s47	Egypt	Neroli	Egypt	Nile Delta Region	Flowering	Cultivated	2017	Steam distillation
s48	Egypt.1	Neroli	Egypt	Nile Delta Region	Flowering	Cultivated	2017	Steam distillation
s49	Egypt.2	Neroli	Egypt	Nile Delta Region	Flowering	Cultivated	2018	Steam distillation
s50	Egypt.3	Neroli	Egypt	Gharbia Governorate	Flower buds	Cultivated	2018	Steam distillation
s51	Egypt.4	Neroli	Egypt	Gharbia Governorate	Flower buds	Cultivated	2018	Steam distillation
s52	Egypt.5	Neroli	Egypt	Gharbia Governorate	Flower buds	Cultivated	2018	Steam distillation
s53	Egypt.6	Neroli	Egypt	Gharbia Governorate	Flower buds	Cultivated	2018	Steam distillation
s54	Egypt.7	Neroli	Egypt	Gharbia Governorate	Flower buds	Cultivated	2018	Steam distillation
s55	Egypt.8	Neroli	Egypt	Gharbia Governorate	Flower buds	Cultivated	2019	Steam distillation
s56	Egypt.9	Neroli	Egypt	Gharbia Governorate	Flower buds	Cultivated	2019	Steam distillation
s57	Egypt.10	Neroli	Egypt	Nile Delta Region	Flowering	Cultivated	2017	Steam distillation
s58	Egypt.11	Neroli	Egypt	Nile Delta Region	Flowering	Cultivated	2018	Steam distillation
s59	Egypt.12	Neroli	Egypt	Nile Delta Region	Flowering	Cultivated	2018	Steam distillation
s60	Egypt.13	Neroli	Egypt	Nile Delta Region	Flowering	Cultivated	2018	Steam distillation
s61	Egypt.14	Neroli	Egypt	Nile Delta Region	Flowering	Cultivated	2018	Steam distillation
s62	Egypt.15	Neroli	Egypt	Nile Delta Region	Flower buds	Cultivated	2018	Steam distillation
s63	Egypt.16	Neroli	Egypt	Nile Delta Region	Flower buds	Cultivated	2019	Steam distillation
s64	Egypt.17	Neroli	Egypt	Nile Delta Region	Flower buds	Cultivated	2019	Steam distillation
s65	Egypt.18	Neroli	Egypt	Nile Delta Region	Flower buds	Cultivated	2019	Steam distillation
s66	Egypt.19	Neroli	Egypt	Nile Delta Region	Flower buds	Cultivated	2019	Steam distillation
s67	Egypt.20	Neroli	Egypt	Nile Delta Region	Flower buds	Cultivated	2019	Steam distillation
s68	Egypt.21	Neroli	Egypt	Nile Delta Region	Flower buds	Cultivated	2019	Steam distillation
s69	Spain	Neroli	Spain	Sevilla	Sorted flowers	Cultivated	2017	Steam distillation
s70	Spain.1	Neroli	Spain	Sevilla	Sorted flowers	Cultivated	2017	Hydrodistillation

s71	Spain.2	Neroli	Spain	Sevilla	Sorted flowers	Cultivated	2018	Hydrodistillation
s72	Spain.3	Neroli	Spain	Sevilla	Sorted flowers	Cultivated	2018	Hydrodistillation
s73	Spain.4	Neroli	Spain	Sevilla	Sorted flowers	Cultivated	2018	Hydrodistillation
s74	Spain.5	Neroli	Spain	Sevilla	Sorted flowers	Cultivated	2018	Hydrodistillation
s75	Spain.6	Neroli	Spain	Sevilla	Sorted flowers	Cultivated	2018	Steam distillation
s76	Spain.7	Neroli	Spain	Sevilla	Sorted flowers	Cultivated	2018	Steam distillation
s77	Spain.8	Neroli	Spain	Sevilla	Sorted flowers	Cultivated	2018	Steam distillation
s78	Spain.9	Neroli	Spain	Sevilla	Sorted flowers	Cultivated	2018	Steam distillation
s79	Spain.10	Neroli	Spain	Sevilla	Flower buds	Cultivated	2019	Steam distillation
s80	Unknown	Neroli	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown
s81	Unknown.1	Neroli	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown	Unknown
s82	-	Petitgrain	Madagascar	Madagascar	young leaves and twigs	Cultivated	2015	Steam distillation
s83	-	Petitgrain	Madagascar	Madagascar	young leaves and twigs	Cultivated	2016	Steam distillation
s84	-	Petitgrain	Madagascar	Madagascar	young leaves and twigs	Cultivated	2017	Steam distillation
s85	-	Petitgrain	Paraguay	San Pedro, Cordillera y Caaguazú	young leaves and twigs	Cultivated	2015	Steam distillation
s86	-	Petitgrain	Paraguay	San Pedro, Cordillera y Caaguazú	young leaves and twigs	Cultivated	2016	Steam distillation
s87	-	Petitgrain	Paraguay	San Pedro, Cordillera y Caaguazú	young leaves and twigs	Cultivated	2014	Steam distillation
s88	-	Petitgrain	Paraguay	San Pedro, Cordillera y Caaguazú	young leaves and twigs	Cultivated	2018	Steam distillation
s89	-	Petitgrain	Paraguay	San Pedro, Cordillera y Caaguazú	young leaves and twigs	Cultivated	2018	Steam distillation
s90	-	Petitgrain	Paraguay	San Pedro, Cordillera y Caaguazú	young leaves and twigs	Cultivated	2019	Steam distillation

Table S2. *Enantiomeric ratios (in %) of α-thujene, α-pinene, camphene, sabinene, β-pinene, δ-3-carene, limonene, β-phellandrene, linalool, terpinen-4-ol, α-terpineol, linalyl acetate, and (E)-nerolidol molecules, determined with multi-dimensional gas chromatography, of essential oils of neroli and petitgrain.*

Sample Tag 1	Sample Tag 2	α-Thujene	α-Pinene	Camphene	Sabinene	β-Pinene	δ-3-Carene	Limonene	β-Phellandrene	Linalool	Terpinen-4-ol	α-Terpineol	Linalyl acetate	(E)-Nerolidol
		S-(+)	S-(-)	1S, 4R-(-)	S-(-)	S-(-)	1S-(+)	S-(-)	S-(+)	S-(+)	S-(+)	S-(-)	S-(+)	(S)
s1	Morocco	0,0	91,4	100,0	95,2	99,8	0,0	2,6	31,8	28,3	35,1	31,2	1,6	98,5
s2	Morocco.1	0,0	89,7	100,0	94,6	99,8	0,0	2,0	30,6	26,8	37,2	30,3	1,9	99,1
s3	Morocco.2	0,0	88,4	100,0	94,8	99,1	0,0	1,6	29,4	26,7	35,3	30,2	2,6	99,1
s4	Morocco.3	0,0	91,4	97,9	93,7	99,4	0,0	3,1	11,1	28,1	32,9	31,4	2,4	98,4
s5	Morocco.4	0,0	90,4	97,2	91,0	99,4	0,0	4,4	11,1	28,2	35,4	28,0	1,5	98,6
s6	Morocco.5	0,0	89,9	97,5	91,0	99,5	0,0	3,7	13,3	28,5	35,6	33,1	1,8	99,0
s7	Morocco.6	0,0	90,0	97,7	90,9	99,6	0,0	3,7	12,3	28,3	35,2	32,1	1,6	98,9
s8	Morocco.7	0,0	88,5	97,9	60,6	98,2	0,0	1,7	22,0	26,7	34,5	31,8	1,5	98,2
s9	Morocco.8	0,0	84,3	100,0	94,7	99,8	0,0	1,0	36,6	25,0	35,9	29,5	1,6	98,3
s10	Morocco.9	0,0	92,6	98,4	96,5	99,9	0,0	2,9	14,0	26,8	35,1	31,4	2,0	98,3
s11	Morocco.10	0,0	88,7	98,4	95,8	99,8	0,0	1,5	18,2	26,2	38,7	29,5	1,9	98,4
s12	Morocco.11	0,0	87,6	98,1	95,3	90,2	14,7	2,2	22,1	26,6	31,2	35,0	1,6	98,4
s13	Morocco.12	0,0	88,3	98,6	95,4	99,4	0,0	0,9	33,5	26,6	34,9	31,2	1,5	98,3
s14	Morocco.13	0,0	85,2	100,0	96,4	100,0	0,0	0,8	30,3	24,8	37,4	29,7	1,8	98,4
s15	Morocco.14	0,0	87,5	98,0	95,7	99,9	0,0	2,0	57,7	26,4	34,9	31,1	1,6	98,2
s16	Morocco.15	0,0	83,0	97,9	95,6	99,8	0,0	0,1	33,1	22,7	36,2	29,7	1,0	98,1
s17	Morocco.16	0,0	87,3	98,7	93,4	99,9	0,0	0,9	29,3	24,5	36,0	30,5	1,7	98,4
s18	Morocco.17	0,0	87,7	97,9	96,5	98,2	0,0	2,1	23,3	28,1	34,9	31,2	1,9	98,9
s19	Morocco.18	0,0	88,5	97,8	96,3	99,1	0,0	2,3	20,4	27,5	35,2	30,9	1,9	98,8
s20	Morocco.19	0,0	89,1	98,5	94,6	99,9	0,0	1,6	20,8	27,5	35,2	31,0	2,3	97,7
s21	Morocco.20	0,0	85,4	97,3	90,5	99,5	0,0	2,1	21,2	26,3	37,0	30,2	2,1	99,2
s22	Morocco.21	0,0	84,9	100,0	95,1	99,7	0,0	1,0	39,9	26,6	39,5	30,6	1,2	98,6
s23	Morocco.22	0,0	84,0	100,0	97,5	99,9	0,0	0,4	40,8	25,8	36,1	29,8	1,8	98,5
s24	Morocco.23	0,0	84,7	98,2	96,6	99,9	0,0	1,3	26,6	25,7	33,8	30,4	1,9	98,9
s25	Morocco.24	0,0	88,4	100,0	94,3	99,7	0,0	2,1	25,1	27,8	38,6	30,3	5,8	98,1
s26	Morocco.25	0,0	89,6	97,7	95,0	99,4	0,0	1,2	16,8	27,1	37,1	30,1	1,6	99,0
s27	Tunisia	0,0	91,2	97,2	87,7	96,0	0,0	1,8	12,2	20,6	39,7	30,1	0,7	98,5
s28	Tunisia.1	0,0	93,5	98,6	84,4	99,6	0,0	3,5	10,7	23,1	38,5	32,0	0,9	98,5
s29	Tunisia.2	0,0	90,1	96,8	81,2	98,9	0,0	4,5	11,1	23,1	38,4	32,2	1,6	97,9
s30	Tunisia.3	0,0	90,4	98,3	86,9	98,6	0,0	2,3	16,1	22,1	34,8	31,7	0,7	97,7
s31	Tunisia.4	0,0	90,4	98,2	87,3	99,0	34,3	2,7	14,1	22,2	36,7	31,7	1,0	98,6

s32	Tunisia.5	0,0	89,9	98,2	95,1	99,9	0,0	1,9	62,1	23,1	36,0	31,6	0,9	98,9
s33	Tunisia.6	0,0	90,3	100,0	84,5	99,8	0,0	2,2	24,5	22,6	39,4	32,5	1,6	98,2
s34	Tunisia.7	0,0	88,4	97,6	71,7	99,4	8,4	2,8	19,7	24,3	42,4	32,9	1,6	98,1
s35	Tunisia.8	2,4	88,9	97,3	84,8	98,9	51,0	3,1	14,0	24,3	39,0	31,5	1,7	97,8
s36	Tunisia.9	0,0	90,5	97,1	84,4	99,7	0,0	1,5	15,2	22,0	41,1	31,3	1,0	97,7
s37	Tunisia.10	12,8	87,4	97,5	59,1	98,8	0,0	3,1	19,8	23,3	47,2	32,5	1,3	98,0
s38	Tunisia.11	0,0	84,8	100,0	95,0	99,8	0,0	1,0	38,2	21,4	33,3	32,3	1,3	98,1
s39	Tunisia.12	0,0	91,8	100,0	90,0	99,8	0,0	3,2	25,5	24,9	38,2	34,0	2,0	97,7
s40	Tunisia.13	18,5	82,8	95,4	44,0	99,6	29,4	3,3	25,3	25,0	50,9	31,0	0,8	98,6
s41	Tunisia.14	19,5	82,7	96,2	44,0	99,6	30,1	3,2	25,4	24,0	51,1	31,3	1,5	98,7
s42	Tunisia.15	0,0	90,1	98,5	91,5	97,9	0,0	1,3	44,5	21,8	39,5	31,7	1,0	97,7
s43	Lebanon	0,0	92,4	100,0	96,3	99,8	0,0	1,8	19,5	19,5	36,4	30,3	2,0	98,8
s44	Lebanon.1	0,0	87,1	100,0	94,6	99,7	0,0	1,4	50,1	20,1	38,6	30,5	1,2	98,9
s45	Lebanon.2	0,0	90,8	100,0	95,0	99,7	45,3	2,1	20,4	22,3	35,5	29,7	1,3	99,1
s46	Lebanon.3	0,0	93,0	100,0	95,5	99,9	0,0	1,4	19,1	20,6	36,1	29,6	1,0	98,6
s47	Egypt	0,0	84,0	100,0	72,7	99,7	0,0	1,2	28,1	22,0	47,5	28,3	0,8	98,2
s48	Egypt.1	11,8	84,5	100,0	73,4	98,8	0,0	2,2	34,8	19,7	45,2	28,4	0,8	97,6
s49	Egypt.2	0,0	77,6	100,0	45,2	98,5	0,0	2,2	30,7	20,3	42,9	28,7	0,3	98,8
s50	Egypt.3	0,0	60,5	100,0	13,7	97,7	0,0	2,3	55,5	13,2	63,3	37,8	0,7	95,9
s51	Egypt.4	0,0	60,2	100,0	14,7	97,6	0,0	2,4	51,3	13,3	63,2	37,6	0,8	96,2
s52	Egypt.5	0,0	61,6	100,0	16,2	97,0	0,0	3,2	50,5	12,7	61,7	39,7	1,0	95,7
s53	Egypt.6	60,7	61,4	85,2	16,5	96,5	1,5	3,1	53,8	12,7	62,3	39,6	0,6	96,0
s54	Egypt.7	0,0	61,7	87,8	17,1	98,1	0,0	1,6	100,0	13,4	62,8	38,4	0,6	96,2
s55	Egypt.8	0,0	63,6	88,1	11,6	98,3	0,0	1,8	67,3	13,6	62,6	45,6	0,7	98,5
s56	Egypt.9	51,2	63,7	87,6	11,2	98,2	0,0	2,9	54,7	13,5	61,3	46,9	0,7	98,5
s57	Egypt.10	0,0	71,0	100,0	70,5	99,0	0,0	2,2	56,5	24,7	58,9	28,6	0,8	98,8
s58	Egypt.11	56,6	60,4	88,9	3,3	17,2	0,0	3,2	43,1	19,3	59,9	28,2	0,8	97,8
s59	Egypt.12	0,0	49,1	87,6	12,6	96,2	0,7	3,0	58,9	19,5	64,6	27,5	0,7	97,6
s60	Egypt.13	72,7	47,9	83,0	12,1	95,8	0,0	2,9	59,4	19,6	65,1	28,1	0,7	98,1
s61	Egypt.14	66,6	53,1	88,3	14,4	96,6	0,0	3,0	56,4	19,3	64,5	28,6	0,7	92,6
s62	Egypt.15	38,9	73,5	94,5	23,9	98,8	0,0	3,2	38,2	19,5	60,1	28,7	0,6	98,5
s63	Egypt.16	40,9	69,3	100,0	20,8	99,0	0,0	2,7	46,7	22,2	58,4	29,0	0,7	97,9
s64	Egypt.17	31,0	73,3	94,5	23,5	99,0	0,0	3,1	38,7	22,4	62,2	29,9	0,9	98,3
s65	Egypt.18	41,6	65,7	100,0	21,1	100,0	5,0	3,1	44,3	22,6	61,5	28,7	1,0	98,2
s66	Egypt.19	41,8	69,5	100,0	14,0	99,4	0,0	1,7	54,0	22,1	63,0	28,4	0,7	98,5
s67	Egypt.20	0,0	69,3	95,9	22,6	99,4	0,0	1,5	100,0	22,1	62,7	28,7	0,7	98,5
s68	Egypt.21	0,0	69,3	93,1	15,6	99,2	0,0	3,3	44,2	22,1	61,6	28,9	0,8	98,5
s69	Spain	0,0	86,2	94,8	84,3	99,6	0,0	3,1	25,4	30,8	39,2	29,6	1,8	99,2
s70	Spain.1	62,5	67,3	90,2	18,7	97,8	0,0	2,7	44,2	31,7	61,6	28,4	1,9	99,5
s71	Spain.2	0,0	91,0	100,0	90,8	98,8	0,0	1,5	28,3	25,2	39,0	28,8	1,1	98,8
s72	Spain.3	0,0	93,0	100,0	96,3	99,9	0,0	1,9	18,3	24,2	38,6	28,8	1,3	98,1
s73	Spain.4	0,0	92,1	100,0	96,5	99,9	0,0	1,8	13,0	27,5	36,9	29,4	1,4	98,6
s74	Spain.5	0,0	91,9	98,7	97,5	100,0	0,0	2,0	64,8	22,2	36,8	37,0	1,3	99,4
s75	Spain.6	0,0	91,8	100,0	95,2	100,0	0,0	1,7	37,2	29,3	36,7	29,2	1,3	96,7

s76	Spain.7	0,0	92,0	100,0	95,9	99,9	0,0	1,6	47,1	29,3	36,2	29,3	1,2	96,9
s77	Spain.8	0,0	91,8	98,8	97,3	100,0	0,0	2,1	72,9	29,3	34,8	29,5	1,1	98,7
s78	Spain.9	0,0	86,1	100,0	54,5	99,9	0,0	1,7	43,0	33,8	49,3	28,7	1,6	97,4
s79	Spain.10	69,5	68,3	92,8	21,1	98,4	0,0	3,9	45,3	26,7	61,1	28,5	1,4	99,1
s80	Unknown	0,0	90,9	100,0	88,4	99,7	0,0	3,4	15,4	22,6	39,6	30,0	1,7	98,3
s81	Unknown.1	0,0	90,1	100,0	95,3	99,8	0,0	1,9	20,3	28,1	39,4	30,9	1,6	98,7
s82	-	0,0	89,5	100,0	91,3	98,5	0,0	8,5	11,1	28,6	38,6	28,9	0,0	76,3
s83	-	0,0	95,3	100,0	92,3	97,2	0,0	12,3	6,5	24,6	31,1	26,8	0,6	79,7
s84	-	0,0	93,4	100,0	92,4	99,0	0,0	6,8	37,4	19,9	23,1	27,0	0,4	87,1
s85	-	10,1	84,4	100,0	88,3	99,1	1,1	24,4	53,0	32,2	44,8	26,7	0,4	67,5
s86	-	10,1	82,8	100,0	83,9	98,6	0,7	22,7	44,8	31,6	21,6	26,8	0,4	71,5
s87	-	12,7	84,0	100,0	87,2	98,9	0,0	20,1	54,7	29,5	47,7	26,8	0,7	83,6
s88	-	0,0	79,5	100,0	84,3	98,3	0,7	25,3	57,3	25,2	46,4	27,3	0,3	78,8
s89	-	0,0	72,7	100,0	81,9	97,5	2,3	25,4	58,6	25,2	47,0	27,0	0,3	78,9
s90	-	0,0	82,8	100,0	17,5	98,3	0,8	26,2	52,5	25,1	46,6	27,1	0,3	81,9
90% s20 + 10% s89	-	0,0	89,1	98,7	95,0	99,9	0,0	1,7	29,8	27,3	35,8	30,5	1,2	97,6
80% s20 + 20% s89	-	0,0	89,1	98,4	95,1	99,9	0,0	1,8	24,8	27,1	36,2	29,9	0,8	97,6
50% s20 + 50% s89	-	0,0	89,2	98,7	96,0	99,9	0,0	2,6	32,5	26,5	38,3	28,7	0,6	97,6

Table S3. *Compound-specific isotope ratios $\delta^{13}C$ and $\delta^{2}H$ (in ‰) of β-pinene, limonene, linalool, linalyl acetate, neryl acetate, geranyl acetate, nerol, geraniol, and (E)-nerolidol molecules, determined with GC-C/P-IRMS, of essential oils of neroli and petitgrain.*

Sample Tag 1	Compound-specific isotopic values (in ‰), determined in GC-C/P-IRMS																			
	β-Pinene		Limonene		Linalool		Linalyl acetate		α-Terpineol		Neryl acetate		Geranyl acetate		Nerol		Geraniol		(E)-Nerolidol	
	δ13C	δ2H	δ13C	δ2H	δ13C	δ2H	δ13C	δ2H	δ13C	δ2H	δ13C	δ2H	δ13C	δ2H	δ13C	δ2H	δ13C	δ2H	δ13C	δ2H
s1	-26,88	-218	-27,46	-221	-26,18	-205	-25,16	-234	-28,14	-249	-30,46	-224	-27,84	-206	-27,16	-206	-27,39	-206	-28,29	-108
s2	-26,51	-212	-27,25	-221	-26,36	-206	-23,95	-235	-27,77	-222	-28,02	-208	-27,18	-193	-26,86	-195	-27,01	-204	-29,47	-97
s3	-25,99	-222	-26,48	-228	-26,07	-203	-23,48	-225	-27,65	-242	-28,04	-219	-26,95	-216	-26,97	-190	-27,15	-205	-29,44	-103
s4	-26,00	-227	-27,24	-233	-26,52	-210	-24,20	-239	-28,00	-229	-28,41	-211	-27,13	-202	-27,14	-192	-27,27	-212	-29,35	-102
s5	-25,67	-228	-26,98	-229	-26,60	-208	-24,15	-237	-27,71	-225	-28,13	-208	-27,03	-197	-26,85	-195	-26,80	-216	-29,05	-107
s6	-26,23	-230	-27,22	-235	-27,15	-215	-24,05	-248	-28,13	-233	-28,29	-221	-27,76	-224	-27,45	-213	-27,63	-224	-29,93	-110
s7	-26,20	-238	-27,05	-244	-26,82	-216	-22,98	-253	-28,29	-255	-28,89	-240	-27,50	-228	-27,71	-214	-27,48	-215	-29,99	-116
s8	-27,49	-202	-29,87	-210	-24,12	-207	-26,67	-236	-23,46	-216	-28,26	-202	-26,14	-203	-24,99	-184	-25,25	-198	-34,3	-88
s9	-26,2	-199	-29,83	-203	-24,30	-201	-25,06	-227	-23,12	-207	-28,24	-201	-26,48	-194	-24,83	-175	-26,06	-181	-36,02	-83
s10	-27,96	-208	-27,50	-220	-25,61	-204	-26,12	-177	-27,73	-230	-27,84	-214	-26,81	-210	-26,62	-197	-26,34	-206	-31,12	-112
s11	-27,76	-209	-27,15	-207	-25,77	-205	-26,17	-154	-27,98	-212	-29,17	-208	-27,05	-206	-27,95	-175	-27,48	-198	-28,59	-96
s12	-25,86	-207	-26,86	-209	-25,46	-204	-25,87	-173	-27,61	-222	-28,62	-210	-26,59	-217	-26,64	-187	-26,87	-183	-29,59	-108
s13	-26,17	-208	-27,20	-212	-25,80	-204	-25,35	-214	-28,04	-223	-28,01	-217	-27,44	-217	-26,14	-205	-27,21	-192	-30,64	-115
s14	-27,51	-201	-27,13	-219	-25,80	-202	-27,16	-204	-28,12	-212	-28,15	-208	-27,1	-196	-27,2	-201	-27,03	-186	-29,19	-104
s15	-26,73	-202	-26,38	-215	-25,56	-225	-27,31	-234	-23,25	-219	-27,54	-203	-28	-187	-23,72	-208	-26,12	-197	-28,48	-97
s16	-27,86	-190	-25,95	-206	-25,86	-218	-26,72	-232	-22,97	-224	-27,97	-206	-29,05	-184	-26,71	-204	-26,09	-199	-32,49	-92
s17	-27,61	-202	-25,2	-213	-23,83	-216	-23,91	-226	-23,19	-218	-27,28	-218	-24,99	-199	-26,83	-186	-26,57	-198	-30,64	-93
s18	-26,66	-203	-26,08	-213	-24,95	-223	-25,65	-234	-27,15	-220	-28,52	-207	-26,2	-185	-26,54	-193	-26,76	-191	-28,38	-106
s19	-23,93	-206	-26,01	-215	-24,89	-217	-25,55	-230	-27,19	-215	-27,41	-204	-25,89	-182	-26,56	-192	-26,6	-191	-27,77	-98
s20	-24,96	-230	-26,29	-250	-24,18	-208	-25,99	-200	-26,6	-205	-27,23	-200	-25,65	-178	-26,73	-186	-26,6	-199	-28,00	-100
s21	-25,13	-228	-25,71	-233	-25,44	-216	-24,53	-225	-27,38	-224	-27,85	-216	-26,53	-212	-26,01	-206	-26,05	-211	-26,41	-105
s22	-25,81	-211	-25,01	-227	-24,08	-216	-24,6	-232	-25,81	-220	-26,03	-200	-24,89	-198	-24,08	-186	-24,72	-200	-28,48	-90
s23	-25,78	-214	-25,29	-225	-24,14	-216	-24,39	-201	-25,87	-238	-27,15	-205	-24,92	-215	-24,05	-213	-25,66	-199	-28,08	-103
s24	-25,59	-201	-24,97	-212	-24,67	-211	-25,33	-249	-25,48	-230	-26,14	-213	-27,36	-190	-25,75	-200	-24,99	-206	-27,77	-99
s25	-25,84	-220	-26,53	-224	-26,32	-205	-23,62	-238	-26,81	-218	-27,51	-203	-26,36	-222	-26,44	-199	-26,90	-199	-29,53	-105
s26	-25,89	-225	-27,48	-233	-25,71	-202	-24,05	-231	-29,19	-224	-27,88	-203	-27,27	-218	-27,24	-188	-27,03	-220	-29,60	-105
s27	-26,09	-216	-28,09	-226	-25,95	-202	-26,68	-208	-29,79	-203	-28,92	-186	-28,21	-210	-27,54	-166	-27,62	-227	-29,74	-111
s28	-26,93	-229	-28,54	-238	-26,10	-208	-27,26	-217	-30,41	-220	-28,87	-204	-27,99	-215	-27,48	-192	-27,51	-206	-29,38	-115
s29	-25,76	-236	-26,85	-234	-26,46	-211	-27,06	-217	-27,53	-252	-28,41	-221	-28,21	-219	-27,28	-195	-27,10	-195	-28,81	-109
s30	-25,23	-202	-26,39	-214	-24,73	-214	-26,17	-264	-24,19	-202	-29,37	-195	-29,68	-191	-27,49	-182	-26,74	-161	-32,12	-92
s31	-29,86	-208	-26,1	-215	-25,86	-215	-27,17	-274	-24,92	-230	-28,64	-222	-30,26	-200	-27,58	-188	-27,32	-202	-31,35	-96
s32	-31,37	-216	-27,73	-225	-26,06	-219	-27,05	-239	-25,14	-238	-29,39	-210	-31,13	-199	-27,44	-192	-29,85	-205	-37,72	-116
s33	-26,88	-215	-27,63	-219	-26,20	-196	-23,16	-245	-27,66	-242	-27,37	-215	-26,86	-199	-26,65	-197	-26,83	-192	-28,99	-112

s34	-25,76	-221	-27,19	-222	-25,89	-203	-25,38	-244	-26,94	-246	-27,59	-217	-27,27	-213	-27,57	-189	-27,08	-200	-29,14	-114
s35	-30,65	-206	-28,55	-221	-26,08	-212	-25,36	-227	-28,73	-225	-29,34	-200	-30,69	-199	-28,48	-183	-30,64	-198	-34,07	-101
s36	-26,35	-222	-28,21	-231	-26,12	-204	-25,34	-226	-29,67	-217	-28,25	-195	-27,57	-207	-27,25	-181	-27,15	-209	-29,71	-108
s37	-28,1	-213	-27,35	-229	-27,03	-215	-25,99	-240	-23,99	-242	-29,84	-222	-29,88	-217	-26,49	-197	-25,85	-227	-31,88	-107
s38	-29,57	-195	-25,79	-210	-26,2	-210	-25,63	-236	-23,34	-221	-29,11	-200	-28,26	-185	-24,81	-187	-24,84	-199	-31,41	-99
s39	-26,36	-230	-27,91	-232	-26,33	-211	-26,73	-242	-27,80	-225	-27,78	-200	-27,64	-212	-26,88	-196	-28,08	-218	-29,82	-105
s40	-23,28	-206	-25,93	-220	-25,97	-216	-27,38	-245	-26,68	-239	-30,5	-216	-30,08	-214	-29,9	-182	-32,88	-214	-28,35	-104
s41	-24,16	-195	-26,21	-213	-25,79	-215	-27,74	-236	-26,39	-220	-36,17	-220	-29,56	-192	-30,11	-191	-33,03	-204	-28,61	-96
s42	-25,45	-208	-28,88	-219	-25,67	-208	-24,37	-238	-28,63	-221	-29,18	-210	-28,66	-195	-25,29	-208	-26,86	-207	-29,35	-114
s43	-26,26	-221	-27,24	-227	-26,68	-206	-25,43	-230	-26,13	-227	-28,12	-194	-26,94	-220	-27,34	-193	-27,60	-204	-29,03	-103
s44	-26,95	-216	-28,59	-236	-26,67	-203	-25,23	-226	-30,25	-218	-29,04	-197	-28,26	-210	-27,70	-192	-27,83	-210	-30,24	-108
s45	-26,21	-221	-27,40	-229	-26,74	-208	-25,44	-224	-28,09	-226	-28,21	-204	-27,24	-195	-27,20	-205	-27,21	-205	-28,81	-99
s46	-28,53	-214	-28,08	-224	-25,39	-218	-26,04	-228	-27,91	-218	-28,27	-211	-27,09	-185	-26,48	-203	-26,13	-201	-29,69	-100
s47	-25,63	-195	-26,28	-206	-25,99	-181	-26,10	-201	-27,21	-198	-27,86	-177	-27,05	-178	-26,49	-182	-26,75	-189	-29,14	-94
s48	-25,57	-191	-26,72	-202	-26,14	-182	-24,16	-198	-27,73	-203	-28,07	-182	-27,39	-197	-26,68	-173	-26,99	-184	-29,08	-80
s49	-26,45	-203	-27,20	-216	-26,33	-187	-26,39	-206	-27,12	-227	-28,12	-209	-27,19	-188	-27,06	-185	-27,03	-179	-29,01	-79
s50	-27,66	-237	-27,29	-237	-25,13	-210	-26,88	-214	-30,33	-223	-29,18	-161	-27,43	-186	-26,09	-161	-26,21	-174	-28,91	-86
s51	-28,95	-261	-27,59	-237	-26,36	-213	-26,93	-221	-28,60	-231	-29,01	-158	-27,55	-182	-27,01	-158	-26,42	-197	-28,84	-86
s52	-26,76	-266	-27,53	-237	-26,03	-219	-26,51	-222	-28,42	-238	-28,80	-157	-27,40	-178	-26,84	-142	-25,95	-193	-28,72	-84
s53	-26,56	-266	-27,64	-238	-26,15	-218	-27,05	-223	-28,94	-240	-28,93	-164	-27,55	-178	-26,79	-154	-25,87	-199	-28,81	-82
s54	-27,48	-248	-24,31	-233	-24,94	-226	-28,12	-236	-24,79	-242	-31,11	-186	-31,2	-190	-24,43	-171	-27,45	-206	-30,51	-94
s55	-28,27	-240	-27,74	-227	-25,39	-228	-27,04	-240	-28,39	-233	-28,86	-205	-27,07	-202	-27,17	-198	-24,94	-190	-29,4	-98
s56	-26,93	-243	-27,09	-248	-25,76	-227	-26,98	-238	-28,89	-231	-28,91	-190	-26,87	-189	-26,79	-190	-25,17	-170	-29,44	-98
s57	-26,56	-192	-27,23	-204	-26,22	-185	-26,56	-199	-28,38	-205	-28,23	-196	-27,70	-185	-27,01	-181	-27,30	-188	-28,63	-81
s58	-25,17	-182	-26,91	-211	-25,57	-181	-26,13	-189	-29,77	-200	-28,54	-184	-27,84	-190	-26,69	-171	-26,89	-171	-29,85	-68
s59	-26,67	-190	-27,73	-204	-26,58	-190	-26,66	-206	-29,00	-207	-28,26	-193	-27,51	-175	-27,71	-191	-27,78	-183	-28,44	-73
s60	-26,91	-192	-28,03	-215	-26,82	-193	-26,88	-207	-29,17	-227	-28,62	-202	-28,07	-182	-28,31	-186	-27,93	-188	-29,02	-78
s61	-26,57	-194	-27,70	-213	-26,51	-185	-26,61	-205	-29,09	-206	-28,44	-193	-27,57	-171	-27,83	-188	-27,95	-198	-28,60	-66
s62	-27,95	-189	-27,68	-199	-27,08	-197	-25,91	-217	-27,76	-214	-27,40	-208	-27,28	-185	-27,41	-195	-26,47	-195	-28,02	-99
s63	-28,72	-181	-28,7	-205	-27,15	-193	-26,46	-234	-25,32	-218	-28,28	-182	-27,83	-182	-23,47	-173	-29,19	-188	-29,22	-83
s64	-25,79	-168	-29,82	-194	-26,59	-192	-26,36	-247	-24,42	-220	-27,93	-204	-27,29	-165	-22,41	-177	-27,83	-194	-29,7	-75
s65	-24,7	-181	-30,55	-199	-27,20	-189	-26,46	-228	-26,24	-201	-28,09	-175	-28,17	-165	-22,48	-162	-27,83	-179	-30,67	-69
s66	-26,42	-186	-27,16	-233	-24,88	-192	-25,17	-220	-27,82	-205	-29,52	-186	-27,23	-175	-27,96	-187	-27,41	-191	-27,66	-78
s67	-29,52	-183	-27,58	-201	-24,27	-196	-25,19	-219	-28,39	-209	-29,3	-195	-28,59	-183	-27,18	-191	-27,35	-197	-28,03	-89
s68	-22,29	-184	-27,34	-195	-24,13	-197	-25,23	-214	-27,55	-205	-29,42	-203	-27,01	-174	-28,19	-183	-27,67	-186	-28,9	-103
s69	-26,57	-222	-27,29	-179	-26,61	-208	-25,84	-189	-28,19	-219	-28,04	-224	-29,42	-187	-26,34	-190	-26,68	-185	-28,94	-81
s70	-26,49	-209	-27,12	-173	-26,45	-187	-26,89	-182	-29,16	-218	-28,35	-223	-27,99	-209	-26,93	-178	-25,97	-203	-28,62	-89
s71	-27,21	-199	-29,55	-222	-26,74	-234	-27,18	-228	-28,47	-230	-29,4	-223	-28,84	-225	-26,22	-232	-28,76	-209	-28,52	-114
s72	-26,69	-212	-28,36	-232	-26,21	-218	-28,74	-256	-29,27	-228	-29,41	-204	-28,48	-215	-26,84	-183	-28,55	-190	-28,19	-103
s73	-25,95	-214	-29,61	-218	-26,95	-217	-28,11	-256	-29,1	-228	-29,00	-214	-29,22	-210	-27,59	-200	-29,03	-205	-28,18	-101
s74	-27,93	-206	-27,26	-212	-27,13	-210	-26,95	-231	-27,24	-221	-29,03	-193	-28,02	-195	-26,63	-189	-29,81	-175	-28,90	-92
s75	-27,79	-213	-28,75	-224	-27,32	-219	-28,43	-258	-28,69	-224	-29,89	-204	-28,6	-212	-27,37	-229	-30,10	-185	-27,72	-106
s76	-27,54	-212	-29,50	-223	-27,11	-223	-27,77	-178	-28,03	-228	-29,53	-229	-28,53	-215	-29,02	-203	-30,28	-195	-25,76	-121
s77	-28,58	-205	-28,23	-225	-26,6	-208	-29,16	-248	-28,41	-224	-28,92	-208	-27,37	-200	-26,62	-195	-29,06	-203	-28,16	-112

s78	-28,59	-217	-27,98	-234	-27,16	-209	-28,63	-193	-28,60	-226	-29,68	-213	-28,27	-190	-27,77	-191	-29,82	-196	-25,78	-115
s79	-26,82	-216	-27,74	-191	-27,11	-176	-25,29	-198	-27,09	-205	-27,60	-221	-27,84	-202	-27,51	-189	-26,92	-190	-29,06	-79
s80	-26,01	-215	-27,96	-225	-26,48	-214	-27,32	-238	-28	-225	-28,48	-216	-27,36	-200	-26,48	-187	-26,38	-205	-28,63	-110
s81	-26,86	-223	-27,35	-233	-26,96	-215	-25,01	-234	-27,66	-231	-27,48	-213	-26,35	-205	-25,52	-197	-25,68	-206	-29,12	-103
s82	-27,04	-217,00	-35,24	-213,00	-29,59	-214,00	-29,12	-206,00	-28,39	-236,00	-34,47	-218,00	-32,79	-229,00	-31,52	-263,00	-30,59	-219,00		
s83	-27,50	-224,00	-36,21	-219,00	-29,63	-224,00	-29,33	-214,00	-28,30	-240,00	-32,49	-220,00	-34,32	-227,00	-26,09	-287,00	-31,30	-220,00		
s84	-29,50	-196,00	-35,11	-219,00	-29,97	-218,00	-29,83	-217,00	-28,24	-241,00	-34,45	-224,00	-33,04	-230,00	-26,34	-262,00	-30,42	-221,00		
s85	-33,15	-210,00	-33,67	-246,00	-29,63	-237,00	-28,73	-241,00	-26,97	-257,00	-34,69	-236,00	-32,41	-236,00	-29,51	-283,00	-32,21	-211,00		
s86	-34,37	-205,00	-28,75	-236,00	-29,86	-243,00	-28,98	-240,00	-27,94	-255,00	-34,64	-237,00	-32,58	-244,00	-30,33	-296,00	-32,30	-214,00		
s87	-33,00	-209,00	-35,67	-242,00	-29,41	-241,00	-28,35	-235,00	-25,66	-263,00	-34,30	-239,00	-31,67	-244,00	-26,41	-313,00	-29,81	-244,00		
s88	-32,89	-205,00	-34,17	-227,00	-29,22	-242,00	-28,45	-250,00	-29,88	-254,00	-34,37	-246,00	-34,05	-246,00	-29,20	-290,00	-33,31	-240,00		
s89	-27,41	-200,00	-35,60	-229,00	-29,43	-239,00	-28,58	-244,00	-29,81	-251,00	-33,81	-245,00	-33,52	-239,00	-28,12	-282,00	-32,26	-253,00		
s90	-28,21	-201,00	-37,37	-253,00	-29,32	-230,00	-27,32	-228,00	-28,99	-251,00	-33,37	-234,00	-33,09	-237,00	-28,16	-284,00	-32,06	-229,00		
-	-24,15	-203,00	-26,88	-224,00	-24,97	-209,00	-29,13	-223,00	-27,40	-211,00	-27,83	-200,00	-26,36	-173,00	-27,14	-215,00	-27,06	-241,00		
-	-24,77	-233,00	-26,77	-250,00	-25,65	-218,00	-30,09	-225,00	-27,91	-219,00	-28,45	-211,00	-26,61	-174,00	-27,65	-199,00	-27,57	-213,00		
-	-25,14	-231,00	-26,97	-249,00	-26,50	-221,00	-30,40	-234,00	-29,71	-229,00	-30,11	-221,00	-28,36	-177,00	-28,98	-234,00	-28,77	-211,00		