



HAL
open science

Développement de méthodes d'analyse pour l'étude de la qualité des matières premières de parfumerie et d'arômes

Esméralda Cicchetti

► **To cite this version:**

Esméralda Cicchetti. Développement de méthodes d'analyse pour l'étude de la qualité des matières premières de parfumerie et d'arômes. Chimie analytique. Montpellier, Ecole nationale supérieure de chimie, 2017. Français. NNT : 2017ENCM0008 . tel-03623596

HAL Id: tel-03623596

<https://theses.hal.science/tel-03623596>

Submitted on 29 Mar 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.



THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur

**Délivré par l'Ecole Nationale Supérieure de
Chimie de Montpellier**

**Préparée au sein de l'école doctorale Sciences
Chimiques Balard (ED459)
Et de l'unité de recherche Institut des
Biomolécules Max Mousseron UMR 5247**

Spécialité : Ingénierie Biomoléculaire

Présentée par Esméralda CICCHETTI

**Développement de méthodes d'analyse pour
l'étude de la qualité des matières premières de
parfumerie et d'arômes.**

Soutenue le 21 juillet 2017 devant le jury composé de

Mme Chantal MENUT, Professeur, Institut des Biomolécules Max Mousseron	Directrice
M. Jean-Jacques FILIPPI, Maître de Conférence-HDR, Université de Nice Sophia Antipolis	Rapporteur
M. Alain MUSELLI, Professeur, Université de Corse	Rapporteur
M. Hugues BREVARD, Directeur du développement analytique, Robertet	Examineur
M. Florian MONNIER, Professeur, Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Montpellier	Président du jury
M. Christophe PERES, Responsable de la recherche analytique du laboratoire Recherche et Analyse Parfums, Chanel SAS	Examineur
M. Jean-Luc PIRAT, Professeur, Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Montpellier	Examineur



« Je suis de ceux qui pensent que la science est d'une grande beauté. Un scientifique dans son laboratoire est non seulement un technicien : il est aussi un enfant placé devant des phénomènes naturels qui l'impressionnent comme des contes de fées. Nous ne devrions pas laisser croire que tout progrès scientifique peut être réduit à des mécanismes, des machines, des rouages, quand bien même de tels mécanismes ont eux aussi leur beauté. Je ne crois pas non plus que l'esprit d'aventure risque de disparaître dans notre monde. Si je vois quelque chose de vital autour de moi, c'est précisément cet esprit d'aventure, qui me paraît indéradicable et s'apparente à la curiosité. Sans la curiosité de l'esprit, que serions-nous ? Telle est bien la beauté et la noblesse de la science : désir sans fin de repousser les frontières du savoir, de traquer les secrets de la matière et de la vie sans idée préconçue des conséquences éventuelles. »

Marie Curie

Remerciements

J'aimerais en premier lieu remercier les professeurs que j'ai rencontrés au cours de ma scolarité au collège, au lycée ou à l'université et qui ont su déceler en moi cette petite étincelle qu'ils ont contribué à faire briller au travers de leur soutien, de leurs encouragements, de leur admiration parfois, pour le travail que je leur rendais en échange du plaisir de recevoir leurs connaissances. J'essaie tous les jours de léguer à mon tour tout ce que je sais à mes collaborateurs, stagiaires et apprentis pour faire que les graines que vous m'avez confiées continuent de germer à travers eux. Un grand merci à toi Pr. Chantal Menut qui m'a recrutée comme étudiante au sein de ta formation à l'université de Montpellier il y a maintenant 16 ans et qui accepte aujourd'hui d'être ma directrice de thèse.

J'aimerais remercier le Dr. Vasseur, responsable de l'école doctorale de chimie de Montpellier, de m'avoir aiguillée dès le début de cette VAE de doctorat. Merci au Dr. Vrancken de l'ENSCM pour tout le travail de coordination de cette démarche de VAE. Merci à Mme Larquetoux pour l'aide apportée à essayer de rendre mon expérience professionnelle suffisamment digeste tout en la mettant en valeur. Un grand merci aux personnes qui ont répondu à mes sollicitations pour améliorer mon manuscrit au travers d'échanges stimulants qui m'ont permis de me tenir à jour des avancées de chacun des domaines que j'ai abordés. Merci donc aux docteurs Nelly Barat, Serge Rudaz et Jean-Marc Roussel, pour les échanges autour des intervalles de confiance, de tolérance et de prédiction, merci au Dr. Serge Akoka pour les discussions sur les avancées de la RMN, et enfin merci au Dr. Jérôme Masson de m'avoir éclairée sur les effets matriciels.

Merci à mes relecteurs, s'il reste des fautes ou des erreurs, elles me sont totalement imputables. Merci au Dr. Nicolas Baldovini d'avoir participé à mon jury d'admissibilité à la VAE. Merci aux docteurs Jean-Jacques Filippi, Christophe Peres et Hugues Brevard et aux professeurs Florian Monnier, Alain Muselli et Jean-Luc Pirat d'avoir accepté de participer au jury de cette thèse.

Etant donné que cette thèse est rédigée comme validation de mes expériences professionnelles, j'aimerais à présent mettre en avant les belles rencontres que j'ai faites dans le monde du travail et qui ont contribué à affiner ce que je suis aujourd'hui.

degussa. *Tout d'abord, merci au Dr. Gérard George de m'avoir acceptée comme stagiaire chez Degussa, en 2003 lorsque j'étais en licence alors que personne dans le bassin grassois n'avait répondu à mes candidatures. Merci Dr. Christine Schippa d'avoir été ma première maitresse de stage et de m'avoir mis le pied à l'étrier de la chimie analytique. A l'époque*

je n'en avais pas conscience mais je ne pouvais pas commencer ma carrière professionnelle sur des bases plus solides compte tenu de l'excellent niveau de ce qui m'a été transmis. J'espère que tu te rends compte du plaisir que j'ai à travailler encore avec toi 14 ans après grâce aux groupes de travail scientifiques auxquels nous participons toutes les deux.



J'aimerais remercier les belles âmes que j'ai rencontrées lors de mon stage de maîtrise au département pilote chez Danisco en Belgique dont Fabian et Nicolas. Tout ce que vous m'avez montré sur la synthèse, sur les montages de verrerie complexe, sur les rectifications d'huiles essentielles me sert encore aujourd'hui même si j'ai choisi de faire de la chimie analytique. Et puis, bien entendu... merci de m'avoir initiée à vos excellentes bières. Je repense à vous à chaque apéritif digne de ce nom !



J'ai à présent une pensée pour mes collègues du laboratoire de recherche analytique de Givaudan à Argenteuil, dont Magali, Aurélio, Hafida et Christine avec qui j'ai effectué mon stage de Master. Promis, je ne laisserai plus la table d'acquisition de la Chemstation ouverte en pleine séquence ! Merci de m'avoir aussi facilement intégrée dans votre équipe, de m'avoir transmis votre rigueur analytique et d'avoir insisté pour que l'on me recrute une fois diplômée. Je suis heureuse d'être toujours en contact avec vous 12 ans après mon départ.



J'aimerais ensuite remercier mes collègues de chez Firmenich à Genève. J'ai travaillé 7 années à vos côtés et cela reste à ce jour la période la plus enrichissante professionnellement parlant tant l'émulation scientifique était grande. Je ne pourrai pas tous vous remercier par manque de place mais disons que je pense très fort à vous chers collègues analystes, organiciens, biotechnologistes, analystes sensoriels, informaticiens, spécialistes réglementaires, experts brevets, parfumeurs, aromaticiens... sur les sites de la Jonction, de Meyrin et de la Plaine mais aussi en France, en Inde, en Chine et aux Etats-Unis. Merci à tous les collègues du bâtiment 105 qui ont su faire améliorer les recettes de mes pâtisseries jusqu'à ce que je puisse en faire un livre. Par la suite des centaines de fans m'ont rejoint sur la blogosphère grâce à vos encouragements à publier mes recettes.

Je vais particulièrement remercier le Dr. Laurent Wunsche responsable du département d'innovation analytique dans lequel j'ai travaillé pour son soutien et sa bienveillance à mon égard à l'époque et encore aujourd'hui. Merci d'avoir cru en moi Laurent.

Merci Dr. Frédéric Begnaud d'avoir été un collègue exceptionnel et d'être devenu par la suite un ami. Merci surtout de m'avoir si souvent rappelé que nous ne sommes pas grand-chose alors que

tant de gens regardent leur nombril en se complaisant dans leur supériorité intellectuelle. J'ai aimé être un grain de sable à tes côtés et tu sais, maintenant, j'essaie de transmettre les mêmes valeurs aux petits grains de sable que je côtoie à présent au soleil.

Merci à toi Dr. Eric Frérot d'avoir accueilli avec tant de bonne volonté ce petit poisson coloré comme tu m'avais appelée à l'époque. Tu es l'un des managers que j'ai le plus apprécié. J'espère t'avoir rendu autant que ce que tu m'as donné. Quel plaisir de travailler auprès d'un passionné aussi compétent et pourtant plein d'autodérision. Merci de m'avoir appris à relâcher de temps en temps ma trop grande rigueur au profit de « manip faites à l'arrach' sur un coin de paillasse ». Tu as raison, parfois ça marche ! Comme tu le sais, c'est le soleil du sud de la France qui me faisait rêver et c'est donc pour ça que je t'ai quitté en laissant j'espère de bons souvenirs dans ton laboratoire.

Merci Philippe Merle pour ta bienveillance lorsque j'en avais besoin. Merci de m'avoir fait confiance en me confiant tes données expérimentales sur les RRF. Pensais-tu que ce travail deviendrait une pratique de quantification recommandée par nos pairs ? Moi je ne m'en serais jamais doutée... comme quoi, j'ai certainement besoin de coaching personnel. Mais je sais que tu es toujours là pour ça ! Je suis heureuse en tout cas de continuer à travailler avec toi au groupe analytique de l'IFRA et maintenant à l'AFNOR et au CEN grâce à ton insistance. Me sentir utile est la plus belle des récompenses.

Merci enfin à mes collègues devenues des copines ; Marie Uijtewaal, Bénédicte Le Calvé, Estelle Delort, Lucie Baroux, Aline Belouin, Elise Sarrazin. Nous avons travaillé ensemble, nous avons beaucoup ri, j'ai parfois pleuré avec vous. Nous sommes toutes devenues mères et je crois qu'il s'agit de notre plus belle contribution à ce monde.



J'aimerais à présent remercier mon directeur actuel M. Yannick Maestro de m'avoir fait confiance en 2013 pour construire le laboratoire d'analyse de la société Cosmo International Ingredients qu'il venait de créer. Merci pour la confiance que tu m'as renouvelée 3 ans plus tard en me confiant également la recherche phytochimique. J'aimerais remercier le Dr. Rémi Laville qui m'a recrutée pour travailler dans son département R&D. Tu as su voir dans mon CV, réalisé sur un coin de table sous NotePad, tout mon potentiel. Merci de juger le fond plutôt que la forme dans ce monde rempli de gens aveuglés par les apparences. Merci pour la liberté que tu m'as laissée ces 3 années à me manager, pour ton écoute et pour ton coaching au quotidien lorsque je perdais ma motivation. D'habitude c'est moi qui pars, cette fois c'est toi qui me laisse... Je te souhaite bon vent dans ta nouvelle carrière professionnelle. J'ai vraiment aimé travailler pour toi. Merci à Béatrice Maumont pour les démarches

administratives auprès de l'OPCADEFI, ce n'était pas facile tous les jours... Merci Lisa Bellone pour ton support sur la réglementation pas toujours très simple à suivre... et enfin, merci Dr. Helène Parent pour les informations que tu m'as fournies sur la naturalité... tu voulais faire ça discrètement ? perdu... tu es officiellement remerciée !



J'aimerais remercier Jean François Goursoot de m'avoir permis de rejoindre le groupe de travail scientifique de PRODAROM. J'ai ainsi pu rencontrer mes homologues locaux qui m'ont aussitôt intégrée.



Je remercie le responsable scientifique de l'IFRA, Dr. Mathias Vey de m'avoir aussi bien accueillie et Dr. Neil Owen de chez Givaudan et chairman du groupe analytique de me montrer à quel point mes contributions peuvent être précieuses au groupe.

Je finirai ces remerciements professionnels avec une pensée très particulière pour toutes les personnes que j'ai eu à manager ces dix dernières années. Merci à mes stagiaires, apprentis et doctorants Jonathan, Marjorie, Xiaoyu, Kevin, Clémence, Mélanie, Asmâa, Lucas, à mes techniciens Marie, Carole, Michel, Laura, Nathalie, Ani, Anne-Lise, Thomas, à mes chargées de recherche Leslie, Erell et Marion d'avoir travaillé ou pour certains de travailler encore aujourd'hui à mes côtés. Quel plaisir de vous transmettre ce que je sais en espérant qu'un jour vous irez encore plus loin que là où j'ai été. Vous m'avez énormément appris sur la nature humaine, sur moi également. J'essaie de m'améliorer à vos côtés, je suis fière de vous et de l'énergie que vous avez toujours dégagée pour que nous soyons une équipe. Vous me dites souvent que vous ne savez pas tout...et bien moi non plus ! Tant mieux, cela veut dire qu'il nous reste encore plein de choses à découvrir. Faites-vous confiance car je crois en vous.

Merci enfin à toutes mes petites étoiles qui éclairent mon chemin lorsque j'en ai besoin.

Sincèrement,

Esméralda

Abréviations

AEDA	<i>Aroma Extract Dilution Analysis</i>
(U)HPLC	Chromatographie liquide (ultra) haute performance
AFNOR	Association française de normalisation
AFSSAPS	Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé
AOAC	<i>Association of Official Agricultural Chemists</i>
APCI	Ionisation chimique à pression atmosphérique (<i>Atmospheric pressure chemical ionization</i>)
ASE	Extraction accélérée par solvant (<i>Accelerated Solvent Extraction</i>)
ASTA	<i>American Spice Trade Organization</i>
AWG	<i>Analytical working group</i>
C18	Greffage de type octadécyle
CAM	Métabolisme acide crassulacéen (<i>Crassulacean Acid Metabolism</i>)
CCM	Chromatographie sur couche mince
CEN	Comité européen de normalisation
CHARM	<i>Combined Hedonic of Aromatic Response Measurement</i>
CST	Commission scientifique et technique
CV, CV _r , CV _R	Coefficient de variation, r : de répétabilité, R : de fidélité intermédiaire
D (1-D, 2-D)	Dimension (1-dimension, 2-dimensions)
DAD	Détecteur à barrette de diodes (<i>Diode array detector</i>)
DFT	Théorie de la fonctionnelle de la densité (<i>Density Functional Theory</i>)
DGCCRF	Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes
DWET	Double WET
EC	Energie de collision
ECN	Nombre effectif de carbone (<i>Effective carbon number</i>)
EDA	<i>Extrapolative dilution approach</i>
EI	Impact électronique
EIC	Effet isotopique cinétique
EIT	Effet isotopique thermodynamique
ERETIC	<i>Electronic Reference To Access In vivo Concentration</i>
ESI	<i>Electrospray</i>
FID	<i>Free induction delay</i>
FID	Détecteur à ionisation de flamme
FINS	Fractionnement isotopique naturel spécifique
FR	Gousse de vanille rouge fendue
FSCM	<i>Finger Span Cross Modality Matching method</i>
GC	Chromatographie en phase gazeuse
GT	Groupe de travail
H	Enthalpie
HPTLC	Chromatographie sur couche mince haute performance
HPTLC	<i>High Performance Thin Layer Chromatography</i>
HR	Haute résolution
IAEA	<i>International Atomic Energy Agency</i>
IC	Intervalle de confiance
ICH	<i>International Conference on Harmonisation</i>
IFRA	<i>International Fragrance Association</i>
IFSCC	<i>International Federation of Societies of Cosmetic Chemists</i>
INRA	Institut National pour la Recherche Agronomique
IOFI	<i>International Organization of the Flavor Industry</i>
IR	Infra rouge
irm	<i>Isotopic ratio monitoring</i>
ISEO	<i>International Symposium on Essential Oils</i>
ISO	<i>International Standardization Organization</i>
ISTD	Etalon interne (<i>Internal Standard</i>)
IT	Intervalle de tolérance
LC	Chromatographie liquide (<i>Liquid Chromatography</i>)
LD	Limite de détection
LQ	Limite de quantification
m/m	poids/poids
m/z	Rapport masse sur charge
MAE	Extraction assistée par micro-ondes (<i>Microwave assisted extraction</i>)

Abréviations

MF	Formule chimique (<i>Molecular formula</i>)
MPLC	Chromatographie liquide moyenne pression
MRF	<i>Molecular Response Factor</i>
MRM	<i>Multiple reaction monitoring</i>
MS	Spectrométrie de masse
MS/MS	Spectrométrie de masse en tandem
NF	Gousse de vanille noire fendue
NFN	Gousse de vanille noire non fendue
NFR	Gousse de vanille rouge non fendue
NIF	<i>Nasal impact frequency</i>
O	Olfactométrie
OGA	<i>Olfactive global analysis</i>
OSME	<i>Odour Specific Magnitude Estimation</i>
PDMS	Diméthylpolysiloxane
PEG	Polyéthylène glycol
pHB	<i>p</i> -hydroxybenzaldéhyde
ppm	Partie par million
PRODAROM	Syndicat des producteurs d'arômes
PSIA	<i>Position-specific isotope analysis</i>
PTFE	Polytétrafluoroéthène
PTV	Injecteur vaporisateur à température programmée (<i>Programmed Temperature Vaporising injector</i>)
Q	Analyseur de masse de type Simple quadripôle
QqQ	Analyseur de masse de type Triple quadripôle
Q-TOF	Couplage entre un analyseur de masse simple quadripôle et un analyseur de masse TOF
Rf	Rapport frontal
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RQSP	Relation quantitative structure propriété
RRF	Facteur de réponse relatif (<i>Relative response factors</i>)
RSD	Déviatoin standard relative (<i>Relative standard deviation</i>)
S/N	Rapport signal sur bruit
Scan	Balayage
SCCNFP	<i>Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-food products</i>
SCCP	<i>Scientific Committee on Consumer Products</i>
SCCS	<i>Scientific Committee on Consumer Safety</i>
SD	Déviatoin standard (<i>Standard deviation</i>)
SFSTP	Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques
SIM	<i>Selected ion monitoring</i>
IRMS	Spectrométrie de masse à rapport isotopique
SNIF	Surface de la fréquence de l'impact nasal (<i>Surface nasal impact frequency</i>) en GC-O ou <i>Specific Natural Isotope fractionation</i> en analyse isotopique
SQ	Semi quantification
SRM	<i>Single reaction monitoring</i>
TOF	Temps de vol (Time of flight)
UAE	Extraction assistée par ultra-sons (<i>Ultrasound assisted extraction</i>)
UV	Ultra-violet
v/v	Volume/volume
VAE	Validation des acquis d'expérience
V-GISP	Etalon secondaire isotopique ; GISP= <i>Greenland Ice Sheet Precipitation</i>
V-PDB	Standard primaire isotopique ; PDB= <i>Vienna Pee Dee Belemnite</i>
V-SLAP	Etalon secondaire isotopique ; SLAP= <i>Standard Light Antarctic Precipitation</i>
V-SMOW	Standard primaire isotopique, SMOW= <i>Vienna Standard Mean Ocean Water</i>
WET	<i>Water suppression enhanced through T1 effects</i>

Sommaire

REMERCIEMENTS.....	IV
ABREVIATIONS	VIII
SOMMAIRE.....	X
LISTE DES TABLEAUX.....	XVII
LISTE DES FIGURES.....	XIX
LISTE DES EQUATIONS	XXV
INTRODUCTION ET ETAT DE L'ART GENERAL.....	1
1 PREAMBULE	2
2 INTRODUCTION SUR LE CONTROLE QUALITE ET LES AROMES ET PARFUMS	2
2.1 Qualité et contrôle qualité	2
2.2 Contrôle de la qualité dans le domaine des arômes et parfums	3
3 POINTS ABORDES DANS CE MANUSCRIT DE THESE	3
4 CHROMATOGRAPHIE	4
4.1 Chromatographie en Phase gazeuse	5
4.1.1 Instrumentation en chromatographie en phase gazeuse	5
4.1.2 Détection en chromatographie en phase gazeuse.....	6
4.2 Chromatographie en phase liquide	15
4.2.1 Chromatographie sur couche mince	15
4.2.2 Chromatographie liquide (ultra) haute performance.....	16
4.2.3 Détecteurs utilisés en chromatographie liquide.....	17
5 EFFET MATRICE.....	19
6 IDENTIFICATION	20
6.1 Identification en chromatographie en phase gazeuse.....	21
6.1.1 Indices de rétention	21
6.1.2 Spectrométrie de masse en chromatographie en phase gazeuse	23
6.2 Identification en chromatographie liquide.....	25
6.2.1 Identification en chromatographie liquide et détection par ultra-violet.....	25
6.2.2 Identification en chromatographie liquide et détection par spectrométrie de masse.....	26
7 QUANTIFICATION	27
7.1 Modes de quantification	28
7.1.1 Normalisation interne.....	28
7.1.2 Calibration externe	28
7.1.3 Etalonnage interne	29
7.1.4 Ajouts dosés	30
7.2 Considérations sur la quantification et les détecteurs	31
8 VALIDATION DE METHODES.....	32
8.1 Spécificité.....	32
8.2 Fidélité	33
8.2.1 Dispersion des résultats	33
8.2.2 Différents niveaux de fidélité.....	34
8.3 Justesse et exactitude	36
8.4 Limite de détection	36

8.5	Limite de quantification	36
8.6	Linéarité	37
8.7	Gamme.....	37
8.8	Robustesse	37
8.9	Profils d'exactitude	38
8.9.1	Intervalle de confiance	38
8.9.2	Intervalle de tolérance.....	39
8.9.1	Intervalle de prédiction.....	41
8.9.2	Intervalle d'acceptabilité.....	42
8.9.3	Détermination des limites de quantification.....	42
CHAPITRE 1 : ANALYSE QUANTITATIVE DES COMPOSES VOLATILS PAR CHROMATOGRAPHIE GAZEUSE ET DETECTEUR A IONISATION DE FLAMME.....		43
PARTIE 1 : INTRODUCTION ET RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES.....		44
1	ANALYSE DES EXTRAITS DE PARFUMERIE	44
2	FACTEURS DE REPONSE POUR CORRIGER LE SIGNAL DU DETECTEUR A IONISATION DE FLAMME	44
3	FACTEURS DE REPONSE PREDITS.....	44
3.1	Similarité de structure.....	44
3.2	Nombre effectif d'atomes de carbone	45
3.3	Autres modèles de prédiction	45
4	OBJECTIFS DE CETTE ETUDE	46
PARTIE 2 : PARTIE EXPERIMENTALE.....		46
1	STANDARDS ET ECHANTILLONS.....	46
2	INSTRUMENTATION.....	47
2.1	Chromatographie gazeuse et détecteur à ionisation de flamme	47
2.2	Chromatographie gazeuse et spectromètre de masse	48
3	PLAN D'EXPERIENCE	48
4	PREDICTION AB INITIO DES ENTHALPIES DE COMBUSTION	48
PARTIE 3 : RESULTATS.....		48
1	COMPARAISON DE LA QUANTIFICATION AVEC LE DETECTEUR A IONISATION DE FLAMME ET AVEC LE SPECTROMETRE DE MASSE....	48
2	MISE EN PLACE D'UNE BASE DE DONNEES DE FACTEURS DE REPONSES RELATIFS	51
2.1	Stabilité dans le temps des facteurs de réponses relatifs.....	51
2.2	Impact des conditions analytiques sur les facteurs de réponses relatifs.....	52
2.2.1	Fournisseur de l'équipement	52
2.2.2	Conditions analytiques	53
2.3	Conclusions sur la création d'une base de données de facteurs de réponses relatifs.....	63
3	PREDICTION DES FACTEURS DE REPONSES RELATIFS A PARTIR DES ENTHALPIES DE COMBUSTION	64
3.1	Justification de la création du modèle de prédiction à partir des enthalpies de combustion	64
3.2	Etapas de la mise en place du modèle	66
3.3	Estimation des valeurs d'enthalpie de combustion.....	67
3.3.1	Estimation de l'enthalpie de combustion avec l'énergie DFT (B3LYP/6-31G**).....	67
3.3.2	Estimation de ΔH_{comb} à partir de la seule composition chimique	69
3.3.3	Comparaison des deux approches prédictives de l'enthalpie de combustion	69
3.4	Vérification de la relation entre enthalpie de combustion et facteurs de réponses relatifs.....	70
3.5	Prédiction des facteurs de réponse moléculaire à partir des enthalpies de combustion	71
3.6	Prédiction des facteurs de réponses relatifs à partir des enthalpies de combustion	72
3.7	Vérification de la justesse du modèle de prédiction	73

3.8	Exemple d'utilisation des facteurs de réponses relatifs prédits : Analyse des composés volatils d'extraits de Timur	75
4	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	76
CHAPITRE 2A : ANALYSE DES FUROCOUMARINES PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE ULTRA HAUTE PERFORMANCE ET SPECTROMETRIE DE MASSE.....		78
PARTIE 1 : INTRODUCTION ET RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES.....		79
1	GENERALITES SUR LES COMPOSES REGLEMENTES EN PARFUMERIE.....	79
2	FUROCOUMARINES	79
2.1	Généralités sur les furocoumarines.....	79
2.2	Présence des furocoumarines dans les matières premières de parfumerie.....	80
2.3	Phototoxicité et réglementation	80
2.4	Analyse des furocoumarines	82
3	OBJECTIFS DE CETTE ETUDE	86
PARTIE 2 : PARTIE EXPERIMENTALE.....		86
1	STANDARDS	86
2	SOLUTIONS STANDARDS.....	87
3	INSTRUMENTATION.....	87
4	TRAITEMENT DES DONNEES.....	89
4.1	Validation de méthodes	89
4.1.1	<i>Limites de détection</i>	<i>89</i>
4.1.2	<i>Exploitation des solutions de calibration et de validation.....</i>	<i>89</i>
PARTIE 3 : RESULTATS.....		92
1	OPTIMISATION DES CONDITIONS DE SEPARATION	92
1.1	Choix de la phase stationnaire	93
1.2	Optimisation des conditions d'élution	94
2	OPTIMISATION DES CONDITIONS DE DETECTION.....	95
2.1	Impact du tampon.....	96
2.2	Tension du capillaire	97
2.3	Paramètres du QqQ	98
2.3.1	<i>Stratégie d'optimisation des paramètres du QqQ</i>	<i>98</i>
2.3.2	<i>Energie de fragmentation.....</i>	<i>98</i>
2.3.3	<i>Energie de collision</i>	<i>99</i>
2.4	Paramètres du Q-TOF.....	99
2.4.1	<i>Le mode MS/MS du Q-TOF</i>	<i>100</i>
2.4.2	<i>Mode All Ion du Q-TOF</i>	<i>102</i>
3	VALIDATION DES METHODES.....	105
3.1	Présentation du plan de validation	105
3.2	Limite de détection	106
3.2.1	<i>Limites de détection pour la méthode QqQ.....</i>	<i>106</i>
3.2.2	<i>Limites de détection pour la méthode Q-TOF All Ion</i>	<i>107</i>
3.2.3	<i>Limites de détection pour la méthode Q-TOF target.....</i>	<i>108</i>
3.2.4	<i>Récapitulatif des limites de détection selon les deux méthodes</i>	<i>109</i>
3.3	Spécificité.....	110
3.4	Fonction de réponse	111
3.4.1	<i>Analyse de la variance dans le cas de la régression linéaire non pondérée</i>	<i>112</i>
3.4.2	<i>Prédiction inverse</i>	<i>113</i>
3.5	Fidélité	116

3.6	Linéarité	117
3.7	Profils d'exactitude	118
3.8	Limite de quantification et gamme des méthodes	120
3.9	Robustesse	122
3.9.1	Impact d'une variation des conditions chromatographiques	122
3.9.2	Impact d'une variation des conditions de détection	123
3.10	Approche de la dilution extrapolative	125
3.11	Comparaison des méthodes	127
4	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	128
	CHAPITRE 2B : ANALYSE DES FUROCOUMARINES PAR HPTLC	130
	PARTIE 1 : INTRODUCTION ET RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES	131
1	ANALYSE DES FUROCOUMARINES PAR HPTLC	131
2	OBJECTIFS DE CETTE ETUDE	132
	PARTIE 2 : PARTIE EXPERIMENTALE	133
1	STANDARDS	133
2	SOLUTIONS STANDARDS	133
3	INSTRUMENTATION	134
4	TRAITEMENT DES DONNEES	134
4.1	LD	134
4.2	Fonction de réponse instrumentale	135
4.3	Profils d'exactitude, limites de quantification et gamme de la méthode	135
	PARTIE 3 : RESULTATS	135
1	MISE EN PLACE DE LA METHODE HPTLC-1D N	135
1.1	Développement des conditions de séparation de la méthode HPTLC-1D N	135
1.2	Spécificité de la méthode HPTLC-1D N	137
1.3	Exemples d'utilisation de la méthode HPTLC-1D N	143
2	QUANTIFICATION DU BERGAPTENE PAR DENSITOMETRIE AVEC LA METHODE HPTLC-1D N	147
3	MISE EN PLACE DE LA METHODE HPTLC-2D N	149
4	METHODE HPTLC 1D-R	152
5	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	154
	CHAPITRE 3 : ETUDES COLLABORATIVES SUR L'ANALYSE DES 26 ALLERGENES DE PARFUMERIE	156
	PARTIE 1 : INTRODUCTION ET RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES	157
1	ETUDES COLLABORATIVES	157
1.1	Généralités sur les études inter-laboratoires	157
1.2	Etudes collaboratives dans le domaine des arômes et parfums	158
2	ALLERGENES VOLATILS DE PARFUMERIE	159
3	ATRANOL ET CHLOROATRANOL	160
4	OBJECTIFS DE CETTE ETUDE	161
	PARTIE 2 : PARTIE EXPERIMENTALE	162
1	LABORATOIRES IMPLIQUES DANS LES ETUDES COLLABORATIVES	162
1.1	Etude sur les 24 allergènes volatils	162
1.2	Etude sur l'atranol et le chloroatranol	162
2	STANDARDS	163
2.1	Etude sur les 24 allergènes volatils	163
2.2	Etudes sur l'atranol et le chloroatranol	163
3	SOLUTIONS STANDARDS	164

3.1	Etude sur les 24 allergènes volatils	164
3.2	Etude sur l'atranol et le chloroatranol	164
4	INSTRUMENTATION.....	165
4.1	Etude sur les 24 allergènes volatils	165
4.2	Etude sur l'atranol et le chloroatranol	167
5	TRAITEMENT DES DONNEES.....	168
5.1	Traitement des données d'études collaboratives	168
5.2	Validation de méthodes	168
5.2.1	<i>Limites de détection</i>	168
5.2.2	<i>Linéarité</i>	168
5.2.3	<i>Fidélité</i>	168
5.2.4	<i>Profils d'exactitude et limites de quantification</i>	168
	PARTIE 3 : RESULTATS	169
1	ALLERGENES VOLATILS.....	169
2	ATRANOL ET CHLOROATRANOL	172
2.1	Etude collaborative en gamme solvant	173
2.1.1	<i>Résultats individuels au sein du laboratoire</i>	173
2.1.2	<i>Résultats de l'étude collaborative en solvant</i>	175
2.2	Etude collaborative en gamme solvant avec EDA et en gamme matrice.....	177
2.2.1	<i>Confirmation de l'effet matrice</i>	177
2.2.2	<i>Effet du tampon</i>	178
2.2.3	<i>Diminution du signal au cours de la séquence</i>	179
2.2.4	<i>Paramètres de validation en gamme matrice</i>	180
2.2.5	<i>Comparaison des résultats en gamme matrice ou en gamme solvant avec EDA</i>	181
3	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	181
3.1	Allergènes volatils	182
3.2	Atranol et le chloroatranol	184
	CHAPITRE 4 : CONTROLE DE L'AUTHEICITE APPLIQUE A LA VANILLE.....	185
	PARTIE 1 : INTRODUCTION ET RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES.....	186
1	NATURALITE	186
2	VANILLE.....	186
2.1	Origines et qualités des gousses de vanille	186
2.2	Composition aromatique de la gousse de vanille	187
2.3	Fraudes possibles concernant la vanille	188
3	EXTRACTION DE LA VANILLE	189
3.1	Macération	189
3.2	Extraction en continu	189
3.3	Extraction accélérée par solvant	189
3.4	Autres types d'extraction	189
4	PURIFICATION	190
5	CONTROLE DE L'AUTHEICITE PAR ETUDE DU PROFIL AROMATIQUE.....	190
5.1	Intérêt du profil aromatique	190
5.2	Chromatographie pour étudier le profil aromatique.....	190
5.3	Résultats quantitatifs	192
6	CONTROLE DE L'AUTHEICITE PAR LES ANALYSES ISOTOPIQUES	193
6.1	Généralités sur les analyses isotopiques	193

6.1.1	<i>Isotopes et isotopomères</i>	193
6.1.2	<i>Grandeurs isotopiques</i>	193
6.1.3	<i>Isotopes comme marqueurs de l'origine botanique ou géographique</i>	196
6.2	Spectrométrie de masse à rapport isotopique.....	197
6.2.1	<i>Principe de la spectrométrie de masse à rapport isotopique</i>	197
6.2.2	<i>Etudes par spectrométrie de masse à rapport isotopique de la vanille</i>	198
6.2.3	<i>Etude du fractionnement isotopique naturel spécifique par IRMS</i>	199
6.3	Résonance Magnétique Nucléaire quantitative.....	200
6.3.1	<i>Résonance magnétique nucléaire isotopique</i>	200
6.3.2	<i>Résonance magnétique nucléaire isotopique appliquée à la vanille</i>	201
7	OBJECTIFS DE CETTE ETUDE	202
PARTIE 2 : PARTIE EXPERIMENTALE		203
1	STANDARDS ET ECHANTILLONS	203
2	PREPARATION DES ECHANTILLONS	203
2.1	Pour le développement de la méthode d'extraction.....	203
2.1.1	<i>Extraction accélérée par solvant</i>	203
2.1.2	<i>Soxhlet</i>	204
2.1.3	<i>Macération</i>	204
2.2	Pour le développement des méthodes de chromatographie liquide (ultra) haute performance.....	204
2.3	Pour la MPLC.....	204
2.4	Pour les analyses isotopiques.....	205
3	CHROMATOGRAPHIES	205
3.1	Chromatographie liquide haute performance.....	205
3.2	Chromatographie liquide ultra haute performance.....	205
3.3	MPLC.....	206
4	ANALYSES ISOTOPIQUES	206
4.1	Spectrométrie de masse à rapport isotopique.....	206
4.2	Résonance magnétique nucléaire.....	206
5	VALIDATION DES METHODES DE CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE	207
6	TRAITEMENT DES DONNEES	207
6.1	Chromatographie.....	207
6.2	Plans d'expérience.....	208
6.3	Résonance magnétique nucléaire.....	208
PARTIE 3 : RESULTATS		209
1	ANALYSE DES EXTRAITS DE VANILLE PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE	209
1.1	Développement des méthodes de chromatographie liquide (ultra) haute performance.....	209
1.1.1	<i>Développement de la méthode de chromatographie liquide haute performance</i>	209
1.1.2	<i>Développement de la méthode de chromatographie liquide ultra haute performance</i>	210
1.2	Validation des méthodes de chromatographie liquide (ultra) haute performance.....	212
1.2.1	<i>Spécificité</i>	212
1.2.2	<i>Limites de détection</i>	213
1.2.3	<i>Linéarité</i>	215
1.2.4	<i>Fidélité</i>	215
1.2.5	<i>Profils d'exactitude, gammes et limites de quantification</i>	216
1.2.6	<i>Robustesse</i>	217
1.3	Comparaison des méthodes de chromatographie liquide (ultra) haute performance.....	219

2	EXTRACTION DES GOUSSES DE VANILLE	220
2.1	Premières considérations sur l'extraction	220
2.2	Optimisation des conditions d'extraction par extraction accélérée par solvant	220
2.3	Modélisation de l'extraction accélérée par solvant.....	222
2.4	Application de la méthode aux produits finis.....	225
2.5	Comparaison des méthodes d'extraction.....	225
2.5.1	<i>Macération</i>	225
2.5.2	<i>Extractions Soxhlet</i>	225
2.5.3	<i>Comparaison des résultats d'extraction</i>	225
2.6	Compatibilité de l'extraction accélérée par solvant avec les analyses isotopiques.....	227
3	PURIFICATION DE LA VANILLINE AVANT ANALYSE ISOTOPIQUE.....	227
3.1	Premières considérations sur la purification.....	227
3.2	Dégraissage des extraits.....	228
3.3	Purification par MPLC.....	228
3.4	Récupération de la vanilline	228
3.5	Mesure isotopique	229
4	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	230
	CONCLUSION GENERALE	232
1	CONCLUSION SUR LES PROJETS PRESENTES DANS CETTE THESE.....	233
2	PROJETS NON PRESENTES DANS CETTE THESE.....	233
2.1	Etude des odeurs par olfactométrie.....	233
2.2	Etude des composés odorants soufrés.....	234
2.3	Etude de composés non volatils.....	236
3	AVENIR DU CONTROLE QUALITE DANS LE DOMAINE DES AROMES ET PARFUMS	237
	REFERENCES	238

Liste des tableaux

Tableau 1 : Biais observés lors de la quantification d'une solution modèle par les méthodes de semi-quantification (SQ) et d'étalonnage interne (ISTD) avec détection FID ou MS.	50
Tableau 2 : Stabilité des RRFs exprimés sous forme de biais par rapport au T0 au bout de 2 mois pour le MS ou 6 mois pour le FID (Agilent-1). Standard interne= octanoate de méthyle	51
Tableau 3 : Comparaison des valeurs de RRF obtenues avec l'octanoate de méthyle comme standard interne sur différents instruments GC-FID sur une colonne de type DB1.	53
Tableau 4 : Plan d'expériences généré par le logiciel NemrodW.	54
Tableau 5 : Energies DFT calculées et corrigées	68
Tableau 6 : Comparaison de performance des modèles de prédiction de ΔH_{comb} selon la méthode DFT ou MF (pour molecular formula en Anglais) pour les 51 composés	70
Tableau 7 : Comparaison des prédictions des MRF à partir des ΔH_{comb} obtenues à partir des DFT ou des MF	72
Tableau 8 : Erreurs observées sur la quantification de composés dans un mélange modèle en fonction du RRF (prédit, base de données, mesuré ou égal à 1)	75
Tableau 9. Présence de furocoumarines dans des matières premières de parfumerie ^[164-167]	80
Tableau 10 : Ions précurseurs et produits reportés dans la littérature pour les composés 1-15	85
Tableau 11 : Conditions d'acquisition des trois méthodes MS pour les composés 1-15 sur la colonne PolarTec	88
Tableau 12 : Temps de rétention des composés 1-15 avec la méthode optimisée sur colonne PolarTec	95
Tableau 13 : Impact de l'ajout de 5mM de formate d'ammonium sur la répartition des adduits $[M+H]^+$ et $[M+Na]^+$ lors de l'analyse des composés 1-15 en ESI ⁺ avec la méthode QqQ	96
Tableau 14 : Ratios quantifiant / qualifiant (187/115) observés pour le psoralène durant trois jours pour différentes concentrations avec la méthode QqQ	107
Tableau 15 : LD en solvant ou en matrice, en ppb, pour les composés 1-15 en fonction du mode de détection	109
Tableau 16 : Estimation de la répétabilité et de la fidélité intermédiaire dans le cas du dosage du psoralène avec la méthode Q-TOF en mode All Ion sur toute la gamme de linéarité de la méthode en gamme matrice, mode de régression linéaire pondéré 1/x	116
Tableau 17 : LQ en solvant ou en matrice, en ppm, pour les composés 1-15 en fonction du mode de détection	121
Tableau 18 : Conditions d'analyse des furocoumarines par CCM/HPTLC reportées dans la littérature	132
Tableau 19 : Rf de 1-15 avec la méthode HPTLC-1D N et couleurs observées à 366nm pour les composés 1-15 en fonction de la substitution	139
Tableau 20 : Rapports frontaux observés en 1 ^{ère} dimension (Rf 1D) et en 2 ^{ème} dimension (Rf 2D) pour les furocoumarines 1-15 avec la méthode HPTLC-2D N	150
Tableau 21 : Rf observés pour les furocoumarines 1-15 en conditions HPTLC-1D R	154
Tableau 22 : Détail des études collaboratives présentées dans ce manuscrit	158
Tableau 23 : Liste des 24 allergènes du SCCNFP ^[158]	159
Tableau 24 : Equipements utilisés lors de l'étude collaborative sur les 24 allergènes	165

Tableau 25 : Ions suivis pour l'analyse en SIM des 24 allergènes volatils	166
Tableau 26 : Equipements utilisés lors des études collaborative sur l'atranol et le chloroatranol	167
Tableau 27 : Conditions d'élution utilisées par le laboratoire 6 pour l'étude collaborative sur l'atranol et le chloroatranol	167
Tableau 28 : Quantification de l'atranol et du chloroatranol dans l'extrait de mousse et dans les échantillons de mousse dopés 1 à 3.	176
Tableau 29 : Paramètres de validation de la méthode de dosage de l'atranol et du chloroatranol par LC/MS en mode SIM en gamme matrice	180
Tableau 30 : Dosage de l'atranol et du chloroatranol dans deux mousses en utilisant une calibration en matrice ou une calibration en solvant avec l'approche EDA.....	181
Tableau 31 : Ratios pour la vanille et les extraits standards de vanille Bourbon ^[313]	192
Tableau 32 : Abondances relatives moyennes des différents isotopes stables ^[317]	194
Tableau 33 : Valeurs de $\delta^{13}C\%$ PDB observées dans la littérature pour la vanilline en fonction de son origine	198
Tableau 34 : Valeurs moyennes observées lors de l'étude collaborative par ² H FINS-RMN de 8 laboratoires dans le cadre du développement de la méthode AOAC 2006.05 ^[339]	202
Tableau 35 : Conditions HPLC testées dans le cadre du développement de la méthode de séparation de la vanilline, du pHB et de leurs acides.....	209
Tableau 36 : Comparaison des conditions de gradient des méthodes HPLC et UHPLC	211
Tableau 37 : Liste des composés analysés pour déterminer la spécificité et temps de rétention en conditions HPLC	212
Tableau 38 : Détermination de la LD de la vanilline pour la méthode UHPLC.....	214
Tableau 39 : LD exprimées en masse injectées sur la colonne pour les quatre analytes en fonction des méthodes d'analyse.....	215
Tableau 40 : Répétabilité et fidélité intermédiaire de la méthode HPLC dans le cas de la vanilline	216
Tableau 41 : LQ exprimées en masse injectées (ng) sur la colonne pour les quatre analytes en fonction des méthodes d'analyse.....	217
Tableau 42 : Comparaison des résolutions obtenues avec les deux méthodes	219
Tableau 43 : Plan d'expérience utilisé pour optimiser les paramètres ASE	221
Tableau 44 : Rendements d'extraction expérimentaux calculés à partir des valeurs théoriques prédites pour les gousses mexicaines NFR	226
Tableau 45 : Ratios de constituants obtenus pour différents extraits dans des gousses malgaches noires fendues et non fendues	227
Tableau 46 : Déviations isotopiques globales (IRMS $\delta^{13}C$) et spécifiques (¹³ C FINS RMN) obtenues dans le cas de la vanilline ex-lignine purifiée de l'extrait modèle (triplicata)	229

Liste des figures

Figure 1 : Représentation schématisée d'un FID (adapté à partir de ^[25])	8
Figure 2 : Illustration de la combustion dans la flamme d'un FID d'après Klee ^[35]	9
Figure 3 : Fonctionnement schématisé d'un MS	11
Figure 4 : Différents modes de détection possibles en fonction des analyseurs Q, TOF, QqQ et Q-TOF	13
Figure 5 : Représentation schématique d'un système de LC	16
Figure 6 : Différents types de chromatographie liquide sur colonne	16
Figure 7 : Domaines d'applications des ionisations de type ESI, APPI et APCI	18
Figure 8 : Tolérances associées aux intensités relatives des ions pris en compte selon l'IOFI ^[50]	27
Figure 9 : Exemple de profil d'exactitude	38
Figure 10 : Composition d'un extrait d'Açaï déterminée par GC-FID (blanc) ou MS (noir) par normalisation interne (les pourcentages au-dessus des barres représentent les différences entre les deux méthodes)	49
Figure 11 : Représentation des RRF mesurés en interne en fonction de ceux publiés par Dietz ^[93] , Jorgensen ^[119] et Kallai. Figure reproduite à partir de ^[139] avec l'accord de Wiley.	52
Figure 12 : Structure du limonène (gauche) et du benzoate de benzyle (droite)	53
Figure 13 : Variations de RRF les plus importantes observées pendant le plan d'expérience ($p < 5\%$). (Standard interne= octanoate de méthyle). Figure reproduite à partir de ^[139] avec l'accord de Wiley.	55
Figure 14 : RRF mesurés pour le limonène et le benzoate de benzyle dans les conditions standard d'analyse, sur trois colonnes différentes (Standard interne= octanoate de méthyle). Figure reproduite à partir de ^[139] avec l'accord de Wiley.	56
Figure 15 : RRF mesurés pour le limonène et le benzoate de benzyle sur colonne de type DB1 et de type DB-WAX en fonction de la température du four (Standard interne = octanoate de méthyle). Figure reproduite à partir de ^[139] avec l'accord de Wiley.	57
Figure 16 : RRF mesurés pour le limonène le benzoate de benzyle sur colonne de type DB-17, en condition standard, en fonction de la température de l'injecteur (Standard interne= octanoate de méthyle). Figure reproduite à partir de ^[139] avec l'accord de Wiley.	59
Figure 17 : RRF mesurés pour le limonène le benzoate de benzyle sur colonne de type DB-17, en condition standard, en fonction du ratio de split (Standard interne= octanoate de méthyle). Figure reproduite à partir de ^[139] avec l'accord de Wiley.	60
Figure 18 : RRF mesurés pour le limonène le benzoate de benzyle sur colonne de type DB-17, en condition standard, en fonction de la température du FID (Standard interne= octanoate de méthyle). Figure reproduite à partir de ^[139] avec l'accord de Wiley.	61
Figure 19 : Valeurs de RRF mesurés sur colonne DB1, en conditions standard pour les esters éthyliques et représentées en fonction de la longueur de la chaîne ester. (Standard interne = octanoate de méthyle)	65

Figure 20 : Représentation du ratio entre la masse molaire (M) et les valeurs de RRF mesurés sur colonne DB-1 (bleu) et DB-WAX (rose), en conditions standard pour les esters éthyliques et représentées en fonction de la longueur de la chaîne ester. (Standard interne = octanoate de méthyle)	65
Figure 21 : Représentation des enthalpies de combustions prédites (kcal/mol) en fonction des enthalpies de combustion expérimentales (kcal/mol) pour les 51 composés du modèle. Figure reproduite à partir de ^[148] avec l'accord d'ACS publications.	68
Figure 22 : Représentation des MRF des 284 composés de la base de données en fonction des enthalpies de combustion calculées à partir du modèle DFT. En vert : aucun cycle aromatique, en rouge : un cycle aromatique et en bleu : deux cycles aromatiques. Figure reproduite à partir de ^[148] avec l'accord d'ACS publications.	71
Figure 23 : Représentation des RRF prédits en fonction des RRF mesurés selon le modèle ex-DFT (gauche) ou ex-MF (droite) pour le jeu de données complet (284+67) et des intervalles de confiance et de prédiction à 90%. Figure reproduite à partir de ^[148] avec l'accord d'ACS publications.	72
Figure 24 : Distribution des erreurs relatives entre un RRF unitaire (blanc) ou les RRF prédits par les deux modèles MF (noir) et DFT (gris) pour 351 composés. Figure reproduite à partir de ^[148] avec l'accord d'ACS publications.	74
Figure 25 : Structures (de gauche à droite) de la coumarine (27), du psoralène (1) et de l'angélicine (16)	79
Figure 26 : Structure de 15 furocoumarines fréquemment rencontrées dans les huiles essentielles ^[172] et faisant l'objet d'une proposition de régulation avec 1=psoralène, 2=bergaptène, 3=xanthotoxine, 4=isopimpinelline, 5=oxypeucedanine, 6=hydrate d'oxypeucedanine, 7=byakangélicol, 8= byakangélicine, 9=héraclénine, 10=8-gérynyloxy-psoralène, 11=bergamottine, 12= impérorine, 13=isoimpérorine, 14=phelloptérine, 15=époxybergamottine	81
Figure 27 : Spectre UV de certaines furocoumarines d'après Frérot et al. ^[175]	82
Figure 28 : Fragments observés pour l'héraclénine (9) et l'oxypeucedanin (5) en ESI ⁺ ^[194]	84
Figure 29 : Chromatogramme à 310nm obtenu en conditions IFRA transférées sur la colonne UHPLC de type C18 pour séparer les furocoumarines 1-15. Ordre de sortie : 6, 8, 1, 3, 4, 2, 9, 7, 5, 12, 14, 13, 15, 10, 11	92
Figure 30 : Chromatogrammes obtenus à 310nm pour l'analyse de 1-15 sur colonne PFP (haut), C18 (milieu), et PolarTec (bas). Les numéros représentent l'ordre de sortie des pics sur la colonne C18 et sont indépendants de la numérotation des analytes. Les ronds rouges représentent les coélutions gênantes pour la MS. Les ronds verts représentent les coélutions non gênantes pour la MS.	93
Figure 31 : Chromatogramme obtenu à 310nm sur la colonne PolarTec dans les conditions optimisées pour la séparation des composés 1-15. Ordre de sortie détaillé dans le tableau 12.	94
Figure 32 : Représentation de l'abondance des ions quantifiants des furocoumarines substituées en position 8 en fonction de la tension du capillaire	97
Figure 33 : Représentation de l'abondance des ions quantifiants des furocoumarines substituées en position 5 en fonction de la tension du capillaire	97
Figure 34 : Représentation de l'abondance des ion m/z 301 $[M+H]$ de la phelloptérine (14) en fonction de l'énergie de fragmentation avec le QqQ	98

<i>Figure 35: Représentation de l'abondance des ion fils 69, 134, 162, 218, 233 provenant de l'ion parent 301 de la phelloptérine (14) en fonction de l'énergie de collision pour une énergie de fragmentation de 120V avec le QqQ en mode MRM</i>	99
<i>Figure 36 : Représentation de l'abondance des ion m/z 301.0998 [M+H] de la phelloptérine (14) en fonction de l'énergie de fragmentation avec le Q-TOF en mode Target</i>	101
<i>Figure 37 : Représentation de l'abondance de l'ion fils 233.0438 provenant de l'ion parent 301.x1067 de la phelloptérine (14) en fonction de l'énergie de collision pour une énergie de fragmentation de 120V avec le Q-TOF en mode Target.</i>	102
<i>Figure 38 : Aire prise en compte pour quantifier en fonction des conditions choisies : quantifiant seul (droite) ou quantifiant + qualifiants (gauche) aux différentes EC de 0, 10, 20, 40V considérées indépendamment ou sommées dans le cas de la phelloptérine avec la méthode Q-TOF All Ion</i>	105
<i>Figure 39 : Schématisation du plan de validation appliqué aux méthodes de dosage des furocoumarines 1-15 par MS</i>	106
<i>Figure 40 : Détermination de la LD du psoralène en matrice avec la méthode Q-TOF All Ion. Concentrations en ppm.</i>	108
<i>Figure 41 : Détermination de la LD du psoralène en matrice avec la méthode Q-TOF target et la stratégie FBF. Concentrations en ppm identiques à celles de la figure 46.</i>	108
<i>Figure 42 : Structures du bergaptol (20), de l'isobergaptène (17), du psora-4 (18) et du 5-(4-phénoxybutoxy)psoralène (19)</i>	110
<i>Figure 43 : Structures de la visnagine (24), du citroptène (25), de l'umbelliférone (26), de la scopolétine (23) et de l'auraptène (22)</i>	111
<i>Figure 44 : Résultats et interprétation de l'ANOVA dans le cas du psoralène, en gamme solvant, analysée avec le Q-TOF en mode All Ion</i>	112
<i>Figure 45 : Vérification de la pertinence du modèle de régression au travers de l'exploitation du profil d'exactitude pour un mode de détection donné</i>	113
<i>Figure 46 : Construction du profil d'exactitude avec un IC à 90% pour le psoralène, obtenu par prédiction inverse sur les solutions de calibration en gamme matrice avec le Q-TOF en mode All Ion et avec une régression linéaire</i>	114
<i>Figure 47 : Profils d'exactitude obtenus par prédiction inverse sur les solutions de calibration avec un IC à 90% pour le psoralène avec le Q-TOF en mode All Ion en gamme matrice et selon les quatre modes de régression testés : linéaire, linéaire pondéré en 1/x, quadratique et quadratique pondéré en 1/x</i>	115
<i>Figure 48 : Profils d'exactitude obtenus par prédiction inverse sur les solutions de calibration avec un IC à 90% pour le psoralène avec le QqQ en mode MRM en gamme matrice et selon les quatre modes de régression testés : linéaire, linéaire pondéré en 1/x, quadratique et quadratique pondéré en 1/x</i>	115
<i>Figure 49 : profil de linéarité obtenu pour le psoralène (1) avec la méthode Q-TOF all Ion avec une régression linéaire pondérée en 1/x en gamme matrice. En bleu sont représentées les limites de l'IT à 90% et en rouge celles de l'intervalle d'acceptabilité à +/-20%</i>	117

<i>Figure 50: Profil d'exactitude pour le psoralène (1) avec la méthode Q-TOF all Ion en utilisation une calibration obtenue par régression linéaire pondérée en 1/x en gamme matrice. Avec un IT à 90% (lignes bleues) et une erreur acceptable à 30% (lignes rouges).</i>	118
<i>Figure 51: Profil d'exactitude pour le psoralène (1) avec la méthode Q-TOF all Ion en utilisation une calibration obtenue par régression linéaire pondérée en 1/x en gamme solvant. Avec un IT à 90% (lignes bleues) et une erreur acceptable à 30% (lignes rouges).</i>	119
<i>Figure 52: Profil d'exactitude pour le psoralène (1) avec la méthode QqQ en utilisation une calibration obtenue par régression linéaire pondérée en 1/x en gamme solvant. Avec un IT à 90% (lignes bleues) et une erreur acceptable à 30% (lignes rouges).</i>	119
<i>Figure 53: Profil d'exactitude pour le psoralène (1) avec la méthode QqQ en mode MRM en utilisation une calibration obtenue par régression linéaire pondérée en 1/x en gamme matrice. Avec un IT à 90% (lignes bleues) et une erreur acceptable à 30% (lignes rouges).</i>	120
<i>Figure 54: Vérification de la continuité du signal obtenu avec le Q-TOF dans le cas du psoralène analysé en mode All Ion et exprimée sous forme de recouvrement d'aire par rapport à la première injection. Entre chaque série d'injections sont passés 11 échantillons.</i>	125
<i>Figure 55: Concentration en époxybergamottin (15) retrouvée en fonction de la dilution de l'échantillon de citron dopé, méthode Q-TOF All Ion, régression linéaire pondérée en 1/x, calibration en solvant.</i>	126
<i>Figure 56: Concentration en oxypeucedanin (5) retrouvée en fonction de la dilution de l'échantillon d'une huile essentielle de la collection interne, méthode Q-TOF All Ion, régression linéaire pondérée en 1/x, calibration en solvant.</i>	127
<i>Figure 57 : Séparation des furocoumarines 1-15 avec la méthode HPTLC-1D N (chloroforme/heptane 95:5 (v/v), plaque silice F254), détection à 366nm. La numérotation de la plaque ne représente pas le n° des analytes mais l'ordre croissant des taches</i>	136
<i>Figure 58 : Impact du rinçage de la plaque sur la séparation des analytes 1-15 dans les conditions de la méthode HPTLC-1D N, détection à 366nm. (1) sans nettoyage de la plaque (2) avec nettoyage de la plaque avec le solvant d'éluion CHCl₃/Heptane 95:5</i>	136
<i>Figure 59 : Séparation des furocoumarines supplémentaires 16-20 avec la méthode HPTLC-1D N (chloroforme/heptane 95:5 (v/v), plaque silice F254), détection à 366nm. Au milieu de la plaque a été déposé le mélange des furocoumarines 1-15 pour comparaison.</i>	137
<i>Figure 60 : Couleurs des taches observées à 366nm pour le psoralène (1) et le bergaptène (2) dans les conditions de la méthode HPTLC-1D N, à différentes concentrations exprimées en mg/kg</i>	138
<i>Figure 61 : Couleurs des taches observées à 366nm pour le byakangélicol (7) et l'héraclénine (9) dans les conditions de la méthode HPTLC-1D N, à différentes concentrations exprimées en mg/kg</i>	138
<i>Figure 62 : Séparation des composés supplémentaires avec la méthode HPTLC-1D N (chloroforme/heptane 95:5 (v/v), plaque silice F254), détection à 366nm (haut) ou 254nm (bas). Au milieu de la plaque a été déposé le mélange des furocoumarines 1-15 pour comparaison.</i>	142
<i>Figure 63 : Spectres UV enregistrés par le densitomètre pour les composés furocoumarines 7,6,9 et les composés 23,24 et 27</i>	143

Figure 64 : Analyse de matières premières de parfumerie avec la méthode HPTLC-1D N (chloroforme/heptane 95:5 (v/v), plaque silice F254), détection à 366nm (haut) ou 254nm (bas). Le mélange des furocoumarines 1-15 et l'angélicine (16) ont été déposés pour comparaison. _____	144
Figure 65 : Suivi d'un procédé de défurocoumarination par distillation moléculaire avec la méthode HPTLC-1D N, détection à 366nm (a) huile essentielle, (b) huile essentielle distillée, (c) mélange des standards 1-15 _____	145
Figure 66: Suivi d'un fractionnement par chromatographie flash avec méthode HPTLC-1D N, détection à 366nm. L'huile essentielle de départ ainsi que le mélange des standards 1-15 ont été déposés au centre de la plaque pour comparaison avec les différentes fractions (F). _____	145
Figure 67 : Détection à 366nm du mélange des standards 1-15 déposé à différentes concentrations et analysé avec la méthode HPTLC-1D N _____	146
Figure 68 : Détection à 254 nm du mélange des standards 1-15 déposé à différentes concentrations et analysé avec la méthode HPTLC-1D N _____	146
Figure 69 : Détection à 366nm (gauche) et 254 nm (droite) de matières premières déposées en même temps que le mélange de 1-15 à 10, 50 et 250ppm après élution selon la méthode HPTLC 1D en phase normale _____	147
Figure 70 : Droites de calibration obtenues pour le bergaptène à 310nm entre 2 et 25mg/kg (gauche) ou 2 et 100mg/kg (droite) et analysé dans les conditions de la méthode HPTLC-1D N. _____	147
Figure 71 : Spectre UV du bergaptène détecté à 310nm par densitométrie en fonction de la concentration et dans les conditions de la méthode HPTLC-1D N. (a)100mg/kg, (b) 2mg/kg, (c) 1mg/kg. _____	148
Figure 72 : Profils d'exactitude obtenus en gamme solvant (a) ou matrice (b) pour le dosage du bergaptène avec la méthode HPTLC-1D N et une détection par densitométrie à 310nm. La justesse est représentée par trait plein tandis que les pointillés représentent l'IT à 80% _____	148
Figure 73 : Chromatogrammes obtenus à 310nm par HPTLC/densitométrie avec la méthode HPTLC-1D N pour la calibration du bergaptène entre 2 et 100ppm et une matière première. _____	149
Figure 74 : Plaque obtenue à 366nm dans le cas de l'analyse des composés 1-15 en condition HPTLC-2D N _____	150
Figure 75 : Plaques obtenues à 366nm dans le cas de l'analyse des composés 1-15 (gauche) ou d'une huile essentielle de limette (droite) avec la méthode HPTLC-2D N _____	151
Figure 76 : Chromatogrammes obtenus à 310nm lors de l'analyse d'une huile essentielle de limette (haut) ou du mélange des furocoumarines 1-15 dans les conditions de la méthode IFRA. ^[180] _____	152
Figure 77 : Séparation des furocoumarines 1-15 avec la méthode HPTLC-1D R. Au milieu de la plaque et à droite a été déposé le mélange des furocoumarines 1-15 pour comparaison. _____	153
Figure 78 : Séparation des furocoumarines supplémentaires avec la méthode HPTLC-1D R. Au milieu de la plaque et à droite a été déposé le mélange des furocoumarines 1-15 pour comparaison. _____	153
Figure 79 : Structure de l'atranol (gauche) et du chloroatranol (droite) _____	160
Figure 80 : Arbre décisionnel à suivre pour décider de la valeur de concentration en allergène à fournir. Figure reproduite à partir de ^[95] avec l'accord d'Elsevier. _____	170
Figure 81 : Profils d'exactitude obtenus pour les 24 allergènes selon la stratégie de l'arbre décisionnel (bleu) ou par traitement automatique (rouge). En pointillé : intervalle de prédiction à 90%. Figure reproduite à partir de ^[95] avec l'accord d'Elsevier. _____	171

Figure 82 : Profils d'exactitude moyens obtenus selon la stratégie de l'arbre décisionnel (bleu) ou par traitement automatique (rouge). En pointillé : intervalle de prédiction à 90%. Figure reproduite à partir de ^[95] avec l'accord d'Elsevier. _____	172
Figure 83 : Droites de calibrations obtenues dans le cas de l'atranol (gauche) et du chloroatranol (droite) _____	173
Figure 84 : Profils de linéarité de la méthode LC/MS pour le laboratoire 6 _____	174
Figure 85 : Concentration en atranol estimée dans la mousse en fonction du facteur de dilution. Les différentes couleurs correspondent à des injections en triplicata. _____	174
Figure 86 : Profils d'exactitude (ligne noire) pour l'atranol (gauche) et le chloroatranol (droite) obtenus avec un intervalle de tolérance à 80% (lignes bleues) dans le cas de l'étude collaborative impliquant 6 laboratoires. Les pointillés rouges représentent l'erreur autorisée _____	175
Figure 87 : Comparaison des droites de calibration obtenues pour l'atranol dans le méthanol (ronds noirs) ou dans la mousse (triangles bleus) _____	178
Figure 88 : Comparaison des droites de calibration obtenues pour l'atranol dans la mousse avec un tampon acide acétique (haut) ou acétate d'ammonium (bas) _____	179
Figure 89 : Superposition des trois gammes de calibration en matrice dans le cas du chloroatranol _____	180
Figure 90 : Structure de la vanilline (A), de l'acide vanillique (B), du p-hydroxybenzaldehyde (C) et de son acide (D) _____	187
Figure 91 : Spectres UV et λ_{max} pour l'acide pHB (A), l'acide vanillique (B), le pHB (C) et la vanilline(D) _____	191
Figure 92 : Numérotation des sites carbonés (soulignés) ou hydrogénés (gras) de la vanilline (gauche) et numérotation des sites hydrogénés du pHB (droite) _____	199
Figure 93 : Transformations possibles de la vanilline pour étude IRMS ciblée _____	200
Figure 94 : Chromatogramme à 260nm d'un extrait de vanille obtenue par ASE (100°C, 1 cycle de 3min) par UHPLC-DAD avec 1 : acide pHB, 2 : acide vanillique, 3 : pHB et 4 : vanilline. Figure reproduite à partir de ^[342] avec l'autorisation de Wiley. _____	211
Figure 95 : Vérification de la spécificité des méthodes UHPLC (haut) et HPLC (bas). Chromatogrammes UV à 260nm obtenus pour l'analyse d'un mélange de composés listés dans le tableau 38. Avec 7=acide pHB, 8 : acide vanillique, 9 : pHB et 10 : vanilline. Numérotation selon ^[342] avec l'autorisation de Wiley. ^[342] _____	213
Figure 96 : Profils d'exactitude obtenus dans le cas de la méthode UHPLC avec la gamme de masse injectée divisée en deux : 0.365-29.5ng (gauche) et 28.5-889ng (droite). Figures reproduites à partir de ^[342] avec l'autorisation de Wiley. _____	216
Figure 97 : Evaluation de la robustesse des méthodes HPLC et UHPLC : impact de la température sur le temps de rétention (A) ou sur l'UV (B), impact du débit (C) et impact du pH (D). Figures reproduites à partir de ^[342] avec l'autorisation de Wiley. _____	218
Figure 98 : Comparaison des teneurs en composés clés dans les extraits ASE de gousses malgaches NF et dosés par UHPLC-DAD. Adapté de ^[345] avec l'autorisation de Wiley. _____	222
Figure 99 : Représentation des données expérimentales obtenues pour les extractions 6 à 18 de gousses NF de Madagascar avec un intervalle de confiance à 95%. Figures reproduites à partir de ^[345] avec l'autorisation de Wiley. _____	224

Liste des équations

Équation 1 : Indice de Kovats (KI).....	6
Équation 2 : Indice de rétention linéaire (LRI) ^[21]	6
Équation 3 : Q-value	25
Équation 4 : Equation d'une droite de calibration linéaire	29
Équation 5 : Facteur de réponse relatif (RRF)	30
Équation 6 : Calcul de la masse d'analyte à partir de son facteur de réponse	30
Équation 7 : Calcul de la teneur en pourcentage par ajout dosé	31
Équation 8 : la moyenne	33
Équation 9: Ecart type	33
Équation 10 : Coefficient de variation CV	34
Équation 11 : Coefficient de variation de répétabilité CVr	35
Équation 12 : Variance de répétabilité pour des essais effectués sur n jours	35
Équation 13 : Variance de fidélité intermédiaire	35
Équation 14 : Variance inter-séries.....	35
Équation 15 : Intervalle de confiance	39
Équation 16 : Intervalle de tolérance d'espérance π	40
Équation 17 : Degrés de liberté dans le cas du calcul de l'intervalle de tolérance d'espérance π	40
Équation 18 : Intervalle de prédiction.....	42
Équation 19 : Calcul de la valeur de l'ECN	45
Équation 20 : Relation entre MRF et RRF	66
Équation 21 : Enthalpie de combustion	67
Équation 22 : Enthalpie de combustion calculée à partir de l'énergie DFT (en Kcal).....	69
Équation 23 : Enthalpie de combustion calculée à partir de la formule chimique (MF pour molecular formula en Anglais).....	69
Équation 24 : Enthalpie effective mesurée par le FID	70
Équation 25 : Relation supposée entre MRF et RRF dans le cas de composés aromatiques	71
Équation 26 : Prédiction des MRF à partir de l'enthalpie de combustion calculée avec le modèle DFT	71
Équation 27 : Prédiction des RRF (dans le cas de l'octanoate de méthyle utilisé comme standard interne) en fonction de ΔH_{comb} et du nombre de noyaux aromatiques	73
Équation 28 : Formule utilisée par le logiciel MassHunter pour déterminer l'EC	102
Équation 29: Déviation isotopique δ^{318}	194
Équation 30 : Fraction molaire de l'isotopomère à la position i. avec S= aire sous le pic correspondant au site moléculaire i.	201
Équation 31: Abondance isotopique spécifique au site i. avec F _i la fraction molaire de l'isotopomère i s'il était uniformément réparti sur tous les n atomes et égal n _i /n	201

Équation 32: Abondance isotopique spécifique au site i . avec m la masse dans le tube RMN, M la masse molaire et p la pureté201

Équation 33 : Résolution entre deux pics (avec T_r = temps de rétention et w =largeur des pics à la base)207

Équation 34 : Capacité de pics (avec t_g le temps de gradient considéré, n le nombre de pics dans ce temps considéré et w la largeur des pics à la base).....208

Équation 35 : Résolution moyenne (avec T_r le temps de rétention, du pic i , w la largeur à mi-hauteur et n le nombre de pics).....208

Équation 36: Calcul de débit Q pour la colonne 2 à partir de celui de la colonne 1 avec d =diamètre208

Équation 37 : Coefficient de partage K entre le solvant (s) et la gousse (g) avec C =concentration.....222

Équation 38 : Quantité d'analyte A_i récupéré à l'étape i avec ρ le rendement d'extraction222

Équation 39 : Relation entre la quantité d'analyte A_i récupérée à chaque étape i , avec ρ le rendement d'extraction, pour n extractions.....223

Introduction et état de l'art général

1 Préambule

Cette thèse est rédigée dans un contexte particulier de validation des acquis d'expérience et concerne des travaux publiés entre 2008 et 2017.

Dans un souci de concision, certains travaux réalisés au cours de cette période ne seront pas présentés. Ceux qui seront détaillés dans ce manuscrit ont été choisis pour illustrer au mieux la complexité du contrôle qualité des matières premières dans le domaine des arômes et parfums. Les parties seront plus ou moins détaillées en fonction de la confidentialité associée au sujet ou bien en fonction de l'implication personnelle dans le projet décrit.

2 Introduction sur le contrôle qualité et les arômes et parfums

2.1 Qualité et contrôle qualité

Le terme de qualité peut être employé soit pour caractériser un attribut (comme un goût, une odeur, une couleur...) soit pour référer à l'acceptabilité d'un produit (conforme/acceptable ou non conforme/non acceptable).^[1]

Selon l'organisation internationale de standardisation (ISO), la qualité est l'aptitude d'un ensemble de caractéristiques intrinsèques, qualitatives ou quantitatives, à satisfaire des exigences implicites ou imposées.^[2]

Le contrôle qualité peut être défini comme un ensemble de techniques physico-chimiques, sensorielles, biotechnologiques et microbiologiques, appliquées pour s'assurer que les exigences attendues pour un produit sont bien atteintes.^[3] Les laboratoires de contrôle qualité du domaine des arômes et parfums peuvent ainsi avoir jusqu'à 500 procédures analytiques définies pour contrôler leurs ingrédients.^[4]

Le contrôle qualité ne peut se faire que si des spécifications ont été définies pour chaque paramètre à contrôler. L'analyste pourra faire appel à des pharmacopées, à des référentiels normatifs comme ceux définis par l'ISO (*International Standard Organisation*), l'AFNOR (Association Française de Normalisation) ..., ou encore à des standards de l'ASTA (American Spice Trade Association).

2.2 Contrôle de la qualité dans le domaine des arômes et parfums

D'après Lösing *et al.*, le contrôle qualité des matières premières (MP) du domaine des arômes et parfums doit permettre de confirmer l'identité de cette MP, de connaître sa pureté, ses contaminants, de vérifier si elle a été adultérée, de quantifier les composés réglementés et de vérifier son authenticité.^[5] Il est possible de compléter cette définition avec la vérification de sa stabilité.

Pour vérifier la qualité de la MP, l'analyste va donc devoir prendre en considération plusieurs critères dont les principaux sont détaillés ci-dessous :

- Les propriétés organoleptiques : le goût et l'arôme pour le domaine des arômes, et l'odeur pour le domaine des parfums ;
- Les propriétés physico-chimiques : aspect, couleur, densité^[6], indice de réfraction^[7], pouvoir rotatoire^[8], point éclair^[9], point de congélation^[10], teneur en résidus ^[11], teneur en eau^[12], miscibilité dans l'éthanol^[13]... ;
- Les indices : indices d'acide^[14], d'ester^[15,16], de carbonyle^[17,18]... ;
- L'indice de peroxyde pour déterminer l'état d'oxydation d'un extrait^[19] ;
- La composition en composés clés de la matière (identification et quantification) ;
- La teneur en composés réglementés naturellement présents dans la MP (allergènes, substances actives, furocoumarines...) ou provenant d'une pollution ou de la conséquence du procédé de transformation (pesticides, hydrocarbures polycycliques aromatiques, solvants résiduels, phtalates, ...) ;
- La vérification de la naturalité et de l'authenticité.

3 Points abordés dans ce manuscrit de thèse

Ce manuscrit n'a pas vocation à présenter tous les aspects du contrôle qualité des MP de parfumerie et d'arôme, des ouvrages spécialisés étant déjà dédiés à ce sujet.^[3,4]

Les aspects physico-chimiques et les études de stabilité ne seront pas abordés au profit des points suivants :

- **La quantification des composés volatils** au travers de la mise en place de bases de données de facteur de réponses du détecteur à ionisation de flamme et de leur prédiction (*Chapitre 1*) ;

- **L'analyse des composés réglementés** illustrée d'une part avec l'étude des furocoumarines par chromatographie liquide (*Chapitres 2a et 2b*) et d'autre part au travers d'études collaboratives pour le dosage des 26 allergènes de parfumerie (*Chapitre 3*);
- **L'authentification** en présentant l'étude de la vanille et de la vanilline (*Chapitre 4*).

Ce manuscrit est constitué de plusieurs chapitres liés par le fil conducteur du contrôle qualité des MP des arômes et parfums. Ils peuvent être lus indépendamment les uns des autres et pour cette raison, ils seront tous construits de la même façon. Tout d'abord une introduction situera le sujet dans le contexte du contrôle qualité des MP. Puis un état de l'art tel qu'il était à l'époque de la réalisation du projet sera présenté. Ensuite, la partie expérimentale précédera les résultats et les conclusions tirées à l'époque du projet. Pour finir, les avancées obtenues depuis la fin de certains projets seront présentées en conclusion du chapitre concerné.

Si chaque chapitre contient son propre état de l'art spécifique, il est possible de présenter un état de l'art général qui s'applique à tout le manuscrit notamment en ce qui concerne les données récurrentes sur les instrumentations, l'identification, la quantification ou encore la validation de méthode. Le but n'est cependant pas d'être exhaustif mais plutôt de rappeler les principes de base et de s'attarder sur certains points clés qui serviront ensuite dans les différents chapitres du manuscrit. Certaines parties de cet état de l'art seront donc abordées de façon très succincte tandis que d'autres, nécessaires à la compréhension des études présentées, seront beaucoup plus détaillées.

4 Chromatographie

La chromatographie est une technique analytique dite séparative car elle permet de séparer des constituants d'un mélange. Les composés analysés sont appelés des analytes. Selon que ces derniers sont volatils ou non volatils, on fera appel à la chromatographie en phase gazeuse (GC) ou en phase liquide (LC).

4.1 Chromatographie en Phase gazeuse

4.1.1 Instrumentation en chromatographie en phase gazeuse

La GC permet d'analyser les composés à l'état gazeux. Le chromatographe en phase gazeuse est constitué d'un système d'injection qui permet l'introduction de l'échantillon dans une colonne située dans un four et connectée à un détecteur à l'extrémité opposée.

4.1.1.1 Injection en chromatographie en phase gazeuse

La température de l'injecteur doit être suffisante pour volatiliser tous les constituants du mélange, sans toutefois les dégrader. Les analytes peuvent être introduits sous forme liquide ou sous forme gazeuse lorsque l'espace de tête dans lequel ils se trouvent, c'est-à-dire l'espace odorant au-dessus d'une matrice les contenant, est prélevé. Différents systèmes peuvent être utilisés pour prélever cet espace de tête, comme par exemple une seringue dite « Headspace » (pour espace de tête en Anglais), une fibre SPME (pour *Solid Phase Micro Extraction* en Anglais) ou plus généralement un support d'adsorption (qui nécessite dans ce cas l'emploi d'un thermo-désorbiteur approprié).

Lorsque la totalité du volume de l'injection est envoyé dans la colonne on parle de mode sans division (ou *splitless* en Anglais). A l'inverse lorsqu'une partie seulement est injectée, on parle de mode division (ou *split* en Anglais), la quantité envoyée dans la colonne étant définie par le ratio de split. Cette division des flux entrant dans la colonne est opérée dans un insert d'injection (ou *liner* en Anglais).

4.1.1.2 Séparation

4.1.1.2.1. Généralités sur la séparation en chromatographie en phase gazeuse

Après injection, les composés à l'état gazeux sont séparés dans une colonne disposée dans un four. Cette séparation repose sur une succession d'équilibres des analytes entre deux phases en contact : la phase stationnaire qui est fixée sur la colonne et la phase mobile gazeuse appelée gaz vecteur. Il existe un gradient de polarité dans les phases stationnaires disponibles sur le marché permettant à l'analyste de séparer au mieux les composés de mélanges complexes.

Pour éluer les analytes au travers de la colonne, il est indispensable d'appliquer une température suffisante. Au cours d'une analyse, la température du four peut être fixe (mode isotherme) ou

peut varier (programme de température). La température maximale dans le four est déterminée par la stabilité thermique de la colonne utilisée.

4.1.1.2.2. Indices de rétention

Le temps de rétention (Tr), temps au bout duquel un analyte éluera de la colonne et sera détecté, va varier en fonction du programme de température appliqué, de l'état ou des dimensions de la colonne, du débit de gaz vecteur... Le Tr n'est donc pas un critère fiable pour caractériser un composé. Il faudra faire appel à des valeurs relatives appelées « indices ».

Dans les années 1950, Kovats a défini un indice (KI) illustrant un ordre de sortie relatif à des standards.^[20] Ces indices sont calculés en mode isotherme par comparaison entre la rétention de l'analyte d'intérêt et celle de standards comme des alcanes (Equation 1).

Equation 1 : Indice de Kovats (KI)

$$KI = 100 \times n + 100 \times \frac{\log Tr_i - \log Tr_n}{\log Tr_{n+1} - \log Tr_n}$$

Avec : i , le composé d'intérêt n , le nombre de carbone de l'alcane antérieur au composé i Tr , le temps de rétention^[20]

Lorsqu'un gradient de température est employé, l'équation 2 permet de calculer l'indice de rétention tel que défini par Van den Dool et Kratz.^[21]

Equation 2 : Indice de rétention linéaire (LRI)^[21]

$$LRI = 100 \times n + 100 \times \frac{Tr_i - Tr_n}{Tr_{n+1} - Tr_n}$$

Avec : i , le composé d'intérêt n , le nombre de carbone de l'alcane antérieur au composé i Tr , le temps de rétention

A noter que certains analystes calculent leurs indices en faisant appel à d'autres standards (esters méthyliques ou éthyliques, alcools, ...) plutôt qu'à des alcanes.

4.1.2 Détection en chromatographie en phase gazeuse

En GC, deux types de détecteurs peuvent être utilisés : les détecteurs sélectifs donnant des informations structurales comme par exemple le spectromètre de masse (MS), le détecteur à émission d'atomes (AED) ou encore le détecteur azote phosphore (NPD), et des détecteurs non sélectifs qui sont utilisés pour la quantification comme par exemple le détecteur à ionisation de

flamme (FID) ou le détecteur à conductivité thermique (TCD). Dans le domaine des arômes et parfum, le FID et le MS sont les plus employés.

4.1.2.1 Détecteur à ionisation de flamme

Le FID est très utilisé de par son faible coût, sa facilité d'utilisation et sa large gamme de linéarité de réponse. C'est avec ce mode de détection que sont données les compositions volatiles typiques des huiles essentielles dans les normes AFNOR. Il s'agit donc du détecteur le plus utilisé dans les laboratoires de contrôle qualité dans le domaine des arômes et parfums. Pour mieux appréhender le premier chapitre de cette thèse, le principe du FID va être approfondi dans cette partie.

4.1.2.1.1. Rappels et principe du détecteur à ionisation de flamme

La détection par ionisation de flamme a été introduite en 1958 par deux groupes de chercheurs indépendants.^[22,23] Le principe du détecteur FID est basé sur la combustion des analytes carbonés qui éluent de la colonne GC jusque dans une flamme d'hydrogène. Lorsque le carbone brûle, il produit des ions. La nature électrique des flammes avait été démontrée au début des années 50 par Calcote *et al.* qui avaient émis l'hypothèse d'une ionisation chimique en se basant sur la forte teneur en ions dans les zones de la flamme.^[24]

Lors de la combustion, les ions produits seront attirés par des électrodes créant un courant électrique proportionnel à la quantité brûlée. Le courant sera enregistré par un électromètre puis numérisé pour générer un signal enregistrable. La combustion de l'hydrogène seul ne produit pas d'ions donc le signal qui est enregistré comme étant la ligne de base du détecteur provient simplement de la combustion des impuretés présentes dans les gaz de la flamme, dans le gaz vecteur ou du relargage de la phase stationnaire de la colonne.

La Figure 1 présente une coupe schématisée d'un détecteur FID.

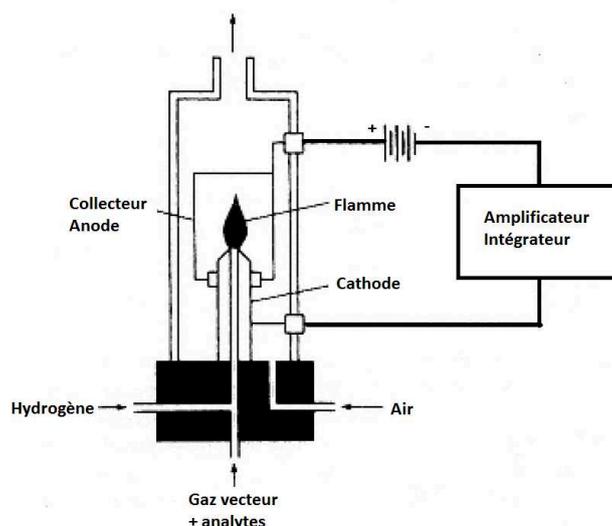


Figure 1 : Représentation schématisée d'un FID (adapté à partir de [25])

4.1.2.1.2. Mécanismes mis en jeu dans la flamme du détecteur à ionisation de flamme

4.1.2.1.2.1. Ionisation chimique dans la flamme

S'il est admis que la réponse du FID est proportionnelle à la quantité d'analytes et au nombre d'unités $-CH_2$ de l'analyte, de nombreux chercheurs ont essayé d'élucider les mécanismes mis en jeu pour expliquer cette observation. [26-31]

Au départ, le mécanisme du FID a été abordé par l'angle de la spectrométrie de masse. Dans les années 60, Calcote^[32] a proposé plusieurs réactions pour la formation des ions dans la flamme lors de l'étape d'ionisation chimique dont celle qui, suite aux travaux de Green *et al.*^[33] ou encore de Gardner *et al.*^[34], est admise comme étant la réaction primaire encore de nos jours :



L'ion CHO^+ est attiré par le collecteur chargé négativement pour générer un courant qui sera proportionnel au nombre d'ions collectés tandis que les électrons seront expulsés en dehors du FID (Figure 2).

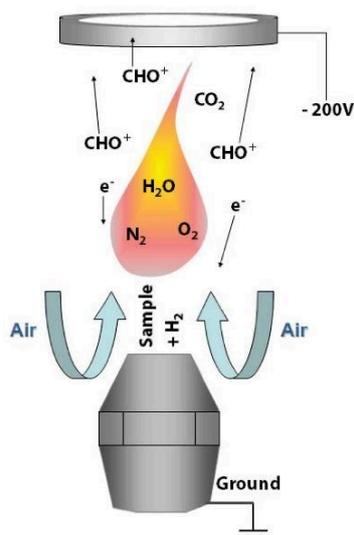


Figure 2 : Illustration de la combustion dans la flamme d'un FID d'après Klee [35]

Cependant, certains auteurs ont remis en question l'existence de cette seule réaction de formation de CHO^+ . C'est le cas de Blades et de son équipe. [26,36–38] Selon eux, la réaction communément rapportée ne s'applique pas à l'acétylène C_2H_2 d'où la proposition de mécanismes alternatifs :



Ils ont également proposé l'existence d'adduits avec le gaz vecteur X ($\text{CHCO} \cdot \text{X}^+$) pour expliquer les différences d'intensité de signal observées en fonction de ce dernier :



CHO^+ peut également réagir et former des produits secondaires dont d'autres ions positifs comme, entre autres, l'ion hydronium H_3O^+ par réaction avec l'eau (mais qui en présence d'électron redonnera de l'eau). [33] Il serait également à l'origine de la présence de C_3H_3^+ à l'avant de la flamme, ou encore de CH_3CO^+ dans la zone violette de la flamme. [39]

4.1.2.1.2.2. Etape de dégradation précombustion

Si l'étape d'ionisation a été facilement élucidée par les chercheurs, il n'a été que récemment expliqué comment les analytes éluant de la colonne se décomposaient avant d'être ionisés. C'est l'étape de dégradation précombustion.

L'équipe de Nicholson a notamment montré dans les années 80 que les hydrocarbures aliphatiques se dégradent en méthane à 1800 °K.^[27,39] Le déplacement de l'équilibre vers sa formation est favorisé par de fortes teneurs en hydrogène dans la flamme. A la fin des années 1990, l'équipe de Holm a confirmé la formation quantitative de méthane dans la flamme lors de la combustion des hydrocarbures selon l'enchaînement réactionnel suivant :^[28-30]



Et ainsi de suite jusqu'à obtenir $(n+2)\text{CH}_4$.

Le méthane pourra alors se dissocier en dihydrogène et unités -CH et ainsi permettre la formation de l'ion formylium CHO^+ selon la réaction proposée par Calcote.

Cependant, la présence de doubles liaisons ou d'hétéroatomes entraîne la formation d'autres espèces. Par exemple, les alcools ou les cétones formeront par hydrogénolyse du méthane, de l'acétylène, de l'éthylène et du monoxyde carbone.

Dans le cas du méthanol on aura :^[30]



Dans le cas des amines, en plus des trois hydrocarbures, du cyanure d'hydrogène sera formé tandis que dans le cas des composés halogénés, il s'agira des halogénures d'hydrogène.

Il en résulte donc que la réponse proportionnelle du FID par rapport au nombre de carbone (*equal per carbon response* en Anglais) n'est valide que dans le cas des hydrocarbures. La réponse d'un atome de carbone lié à un hétéroatome sera moindre que celle d'un carbone lié à un carbone.

On peut donc en conclure que la normalisation interne (voir partie 7.1.1), c'est-à-dire l'utilisation de pourcentages d'aires FID, ne peut pas être appliquée pour caractériser un mélange complexe, et notamment des huiles essentielles, car les analytes répondront différemment dans la flamme en fonction de leur nature chimique. C'est pourquoi certains analystes ont essayé de corriger le signal FID en proposant l'utilisation de facteurs de réponse (Voir *Chapitre 1*).

4.1.2.2 Spectrométrie de masse

4.1.2.2.1. Généralités

Le spectromètre de masse (MS) est le détecteur le plus couramment employé pour l'identification de composés volatils. Lorsqu'une molécule arrive dans un MS, elle va être fragmentée et ionisée. La détection par spectrométrie de masse consiste en la mesure des rapports masse sur charge (m/z) des molécules ionisées et de leurs produits de fragmentation. Le relevé de tous ces rapports m/z constitue le spectre de masse de la molécule en question.

La Figure 3 représente schématiquement le principe de fonctionnement d'un MS.

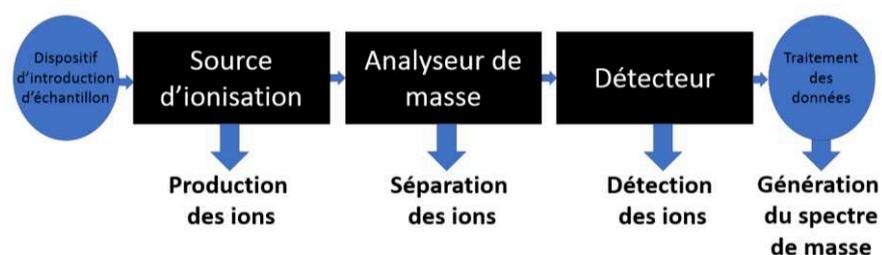


Figure 3 : Fonctionnement schématisé d'un MS

4.1.2.2.2. Source d'ionisation

Il existe différents modes d'ionisation en GC-MS mais le plus répandu dans le domaine des arômes et parfum est l'impact électronique (EI). Ce mode consiste à provoquer une collision entre l'analyte à l'état gazeux et un faisceau d'électrons avec une énergie suffisante pour générer une charge et obtenir un ion moléculaire. En fonction de sa stabilité, ce dernier pourra se fragmenter et des processus de réarrangement pourront s'opérer. Les molécules ionisées seront envoyées vers l'analyseur où elles seront triées avant d'être détectées pour générer un spectre de masse. En général, l'énergie d'ionisation est de 70eV pour des soucis de standardisation des fragmentations afin de permettre la création de bases de données inter-laboratoires. Cette énergie est suffisamment forte pour permettre la fragmentation de la majorité des analytes.

4.1.2.2.3. Analyseur de masse

Une fois ionisées, les molécules arrivent dans l'analyseur de masse. L'analyseur le plus couramment employé dans le domaine des arômes et parfums est l'analyseur quadripolaire (quadripôle, Q) mais l'utilisation de l'analyseur à temps de vol (TOF pour *Time Of Flight* en Anglais) est parfois également rapportée.

4.1.2.2.3.1. Quadripôle

L'analyseur Q est constitué de quatre électrodes cylindriques portées à des potentiels opposés deux à deux. Les ions seront séparés en fonction de leur rapport m/z grâce d'une part à un balayage de la tension permettant la déviation des ions vers les électrodes négatives, et d'autre part à la variation de l'amplitude du voltage qui refocalise les ions vers le centre du Q. Seuls les ions adoptant une trajectoire stable à travers le filtre quadripolaire seront détectés, les autres ions seront collectés par les barres du Q et projetés hors de leur chemin originel. Avec un analyseur Q, l'analyste aura accès à la masse nominale des fragments détectés.

4.1.2.2.3.2. Temps de vol

Comme son nom l'indique, l'analyseur TOF va mesurer le temps de vol des ions, c'est-à-dire le temps qui leur est nécessaire pour parcourir une distance donnée dans le vide. Les ions qui ont pris de la vitesse à l'entrée de l'analyseur grâce à une tension d'accélération vont entrer dans une zone appelée tube de vol où aucune tension n'est appliquée. En fonction de leur rapport m/z , la vitesse acquise sera différente, les entités les plus légères se déplaçant plus vite. La vitesse est censée être la même pour un même rapport m/z néanmoins une refocalisation est nécessaire pour corriger les légers décalages observés. Les ions les plus rapides seront ralentis au niveau d'un miroir électronique, appelé réflectron, dans lequel ils pénétreront davantage que les autres. Les ions refocalisés pourront alors atteindre le détecteur en parcourant une nouvelle fois la distance du tube de vol. Plus le tube est long, plus le chemin parcouru par les ions sera long, et plus la résolution sera grande.

Avec un analyseur TOF haute résolution (HR), l'analyste aura accès à la masse exacte des fragments détectés.

4.1.2.2.3.3. Analyseurs associés en tandem

La spectrométrie de masse en tandem, MS-MS ou MS^2 consiste en l'association de deux analyseurs en série. Lorsque deux filtres quadripolaires sont reliés entre eux par une cellule de collision, on parlera de triple quadripôle (QqQ). Lorsqu'un Q et un TOF sont couplés via une cellule de collision, il s'agira d'un Q-TOF.

4.1.2.3 Différents modes de détection

En spectrométrie de masse, différents modes de détection sont possibles en fonction du type d'analyseur.

La Figure 4 récapitule ces différents modes de détection qui sont détaillés dans la suite du manuscrit.

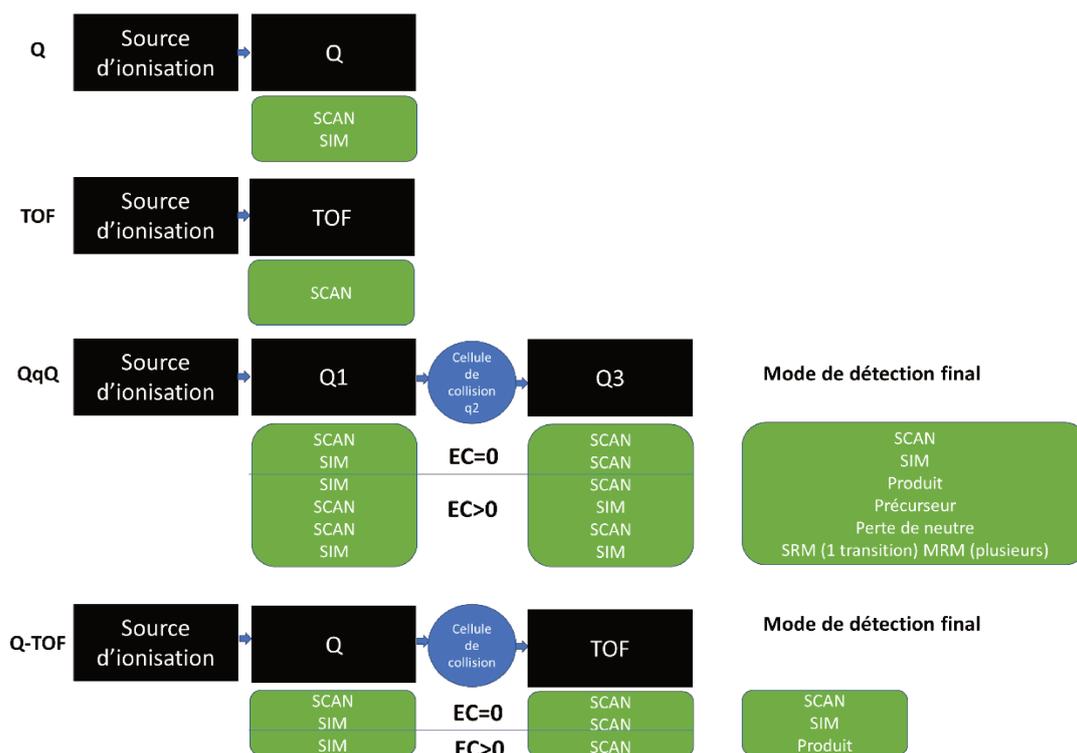


Figure 4 : Différents modes de détection possibles en fonction des analyseurs Q, TOF, QqQ et Q-TOF

4.1.2.3.1. Mode Scan

Le mode Scan consiste à balayer une gamme de masse prédéterminée plus ou moins large. Il est utilisé pour une étude qualitative afin d'obtenir des spectres de masse permettant une identification de l'analyte et est compatible avec tous les types d'analyseur.

4.1.2.3.2. Mode SIM

Le mode de détection de scrutation d'ion spécifique dit « SIM » (pour *Selected Ion Monitoring* en Anglais) consiste à ne cibler que les masses souhaitées. Ce mode qui nécessite de filtrer des masses est possible avec un analyseur de type quadripolaire donc avec un Q, un QqQ ou un Q-TOF. Il n'est cependant pas accessible avec un TOF seul. Le mode SIM est généralement utilisé pour quantifier.

Avec un analyseur de type QqQ et Q-TOF, d'autres modes de détection sont possibles en fonction du mode de paramétrage SIM ou Scan de chacun des deux Q associés.

4.1.2.3.3. Mode produit

Le mode produit permet de sélectionner un ion précurseur (ou parent) en focalisant le premier Q (Q1) sur son rapport m/z (mode SIM). Les ions fils (ou produits) issus de la fragmentation de cet ion parent dans la cellule de collision sont alors analysés en mode Scan dans le second Q (Q3) pour le QqQ ou dans le TOF, dans le cas d'un Q-TOF. C'est un mode qui permet d'obtenir un spectre réellement spécifique à la masse parente d'intérêt. Ce mode n'est toutefois pas parfait car si deux composés de même masse coéluent, le spectre produit obtenu sera un mélange des spectres des deux analytes coélués.

4.1.2.3.4. Mode précurseur

Le mode précurseur, accessible avec un QqQ, permet de choisir un ion fils en faisant travailler Q3 en mode SIM, et de remonter à son ion parent grâce à Q1 qui travaille en mode Scan. Les composés coélués qui ont la même masse parente et le même ion fils ne pourront pas être discriminés avec ce mode.

4.1.2.3.5. Mode perte de neutre

Le mode perte de neutre, accessible avec un QqQ, permet d'obtenir le spectre des ions parents capables de se fragmenter en générant un fragment neutre de masse spécifique. Dans ce cas, les deux analyseurs balayent simultanément une gamme de masse en mode Scan avec un décalage de masse constant équivalent à la perte de neutre que l'on souhaite suivre.

4.1.2.3.6. Modes SRM et MRM

Les modes SRM et MRM (pour *Single* ou *Multiple Reaction Monitoring* en Anglais), accessibles avec un QqQ, sont utilisés généralement à des fins quantitatives. Un ion précurseur est choisi en Q1 (mode SIM) et un (SRM) ou plusieurs (MRM) ions fils formés dans la cellule de collision seront détectés en Q3 de façon spécifique (mode SIM).

4.2 Chromatographie en phase liquide

L'analyse des extraits contenant des composés semi-volatils à non volatils se fera par chromatographie en phase liquide (LC). La LC est divisée en deux catégories à savoir les techniques de surface et les techniques sur colonne.

4.2.1 Chromatographie sur couche mince

La chromatographie sur couche mince (CCM) est un type de chromatographie liquide dite de surface. La phase stationnaire est déposée sur une surface solide plane comme du verre ou de l'aluminium sur laquelle remonte la phase mobile (éluant) par capillarité. Les échantillons sont déposés sous forme de bande ou de point sur l'un des bords de la plaque qui est ensuite placée dans une cuve contenant l'éluant.

Les composés migreront en fonction de leur affinité pour chacune des phases et des successions d'équilibre de partage entre les deux phases.

Le rapport frontal (R_f) est défini comme le rapport de la distance de migration de l'analyte et de celui de l'éluant (front de solvant/éluant). La valeur obtenue est caractéristique d'un composé dans les conditions analytiques appliquées. Les R_f étant très sensibles aux conditions analytiques, des standards sont toujours déposés sur la plaque en même temps que l'échantillon pour permettre l'identification.

Les principales phases stationnaires utilisées en CCM sont le gel de silice, l'alumine ou encore les silices greffées. Les éluants utilisés seront choisis en fonction de la nature de la phase stationnaire et des analytes à séparer.

En fonction des propriétés intrinsèques de chaque analyte (absorption en UV ou fluorescence), des taches colorées seront observées sur la plaque lors de son exposition à différentes longueurs d'onde. En général, les plaques sont observées à la lumière visible, à 254 nm et à 366 nm.

Lorsque les composés n'absorbent ou ne fluorescent pas, il est possible de les révéler soit avec un révélateur général ou spécifiques. En effet, certains révélateurs sont spécifiques de fonctions chimiques données et permettent de ne révéler que les composés porteurs de ce groupement.

Grace à des systèmes automatisés, la CCM devient de « haute performance » (HPTLC). Ils permettent le dépôt de l'échantillon de façon précise, le contrôle des conditions d'analyse et le

sui de l'élu tion. Associée à des détecteurs tels que le densitomètre ou la spectrométrie de masse, par exemple, l'HPTLC peut améliorer les résultats qualitatifs et fournir des données quantitatives.

4.2.2 Chromatographie liquide (ultra) haute performance

4.2.2.1 Généralités sur la chromatographie sur colonne

Parmi les chromatographies liquides sur colonne, il est possible de citer les techniques de purification (Chromatographie Flash, HPLC préparative) ou les techniques analytiques telles que la chromatographie liquide haute performance (HPLC) et ultra haute performance (UHPLC). Le principe de fonctionnement est toujours le même cependant les dimensions des colonnes, le diamètre des particules constituant la phase stationnaire, les volumes d'injection, les débits ou encore la pression nécessaire à l'élu tion des analytes différeront d'une technique à l'autre.

4.2.2.2 Instrumentation en chromatographie (ultra) haute performance

Un système de LC peut être schématiquement représenté selon la figure 5.

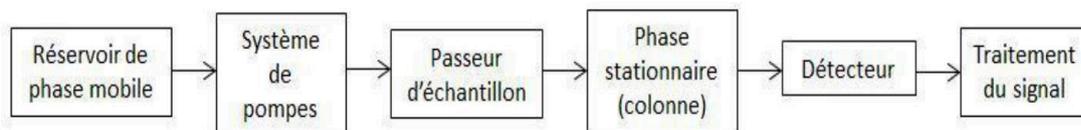


Figure 5 : Représentation schématique d'un système de LC

Contrairement à la GC, les analytes sont analysés en phase liquide. Ils traversent la colonne grâce à la phase mobile, constituée de solvants, à composition fixe (isocratique) ou variable (mode gradient), pompés grâce à un système de pompage associé à l'instrument.

Il existe différents types de chromatographie liquide sur colonne en fonction du mécanisme de séparation mis en jeu (Figure 6).



Figure 6 : Différents types de chromatographie liquide sur colonne

La chromatographie de partage est la plus employée. Elle est dite « normale » lorsque la phase stationnaire est polaire comme une phase silice par exemple et « inverse » lorsque la phase stationnaire est apolaire comme une phase greffée octadécyle (C18) par exemple.

4.2.3 Détecteurs utilisés en chromatographie liquide

Une fois séparés, les analytes seront détectés par des détecteurs plus ou moins spécifiques comme en GC. On distinguera les détecteurs non sélectifs comme le détecteur à diffusion de la lumière (DEDL) par exemple ou les détecteurs spécifiques comme la détection ultra-violet ou la spectrométrie de masse.

4.2.3.1 Détection ultra-violet

La détection ultra-violet (UV) est la plus couramment employée dans les laboratoires d'analyse de routine. Son principe repose sur l'interaction entre le rayonnement électromagnétique et la matière dans le domaine du proche UV s'étendant jusqu'au proche infra-rouge (de 200 nm à 800 nm).

Dans cette gamme de longueur d'onde, l'absorption des rayonnements par les composés est due au passage d'un électron d'un niveau fondamental à un autre niveau électronique d'énergie supérieure (état excité) avec un changement des niveaux de vibration et de rotation, sous l'effet de ce rayonnement. Le spectre UV-visible est obtenu en traçant l'absorbance en fonction de la longueur d'onde.

Une bande d'absorption est caractérisée par sa position appelée longueur d'onde du maximum d'absorption, ou λ_{\max} , et par son intensité.

L'emploi d'un détecteur à barrette de diodes (DAD) va permettre une mesure simultanée sur toute la gamme de longueur d'onde et ainsi l'obtention de spectres tridimensionnels (temps x absorbance x longueur d'onde).

4.2.3.2 Spectrométrie de masse

Tout comme dans le cas de la GC, la MS peut être utilisée en LC comme détecteur et des analyseurs de type Q, TOF ou QqQ et Q-TOF décrits précédemment peuvent également être employés. La principale différence réside en la source d'ionisation qui sera employée pour permettre l'ionisation de composés qui arrivent dans le MS sous forme liquide.

Le choix de la source d'ionisation dépend de la masse molaire et de la polarité des composés à analyser (Figure 7).

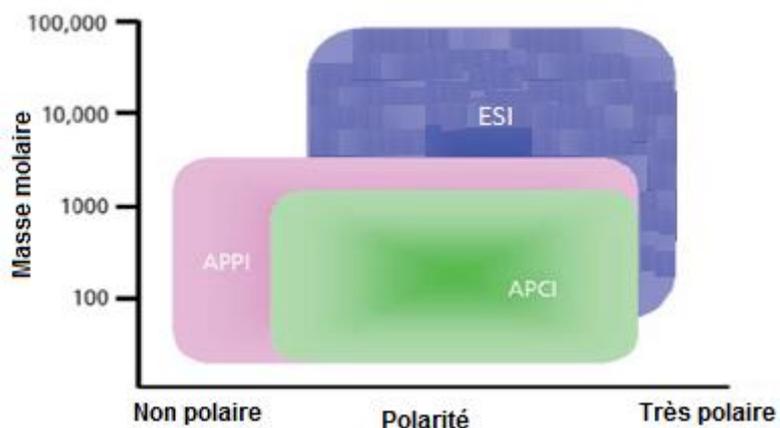


Figure 7 : Domaines d'applications des ionisations de type ESI, APPI et APCI

Compte tenu de la nature des analytes rencontrés dans le domaine des arômes et parfums, la plupart des analyses sont effectuées avec la source d'ionisation électrospray (ESI) ou avec celle d'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI). L'ionisation ESI a été la seule employée dans les études présentées dans ce manuscrit. Pour cette raison, seul le principe de cette dernière sera détaillé.

Le principe de l'ESI est de désolvater progressivement l'analyte ionisé en solution selon les trois étapes principales : production de gouttelettes multichargées, fission de ces gouttelettes en mini-gouttelettes puis formation d'ions en phase gazeuse. Les analytes sont introduits dans la source via un capillaire métallique. Une différence de potentiel est appliquée entre ce capillaire et une contre-électrode pour créer un champ électrique. Ce champ va provoquer une accumulation de charges à la surface du liquide située à l'extrémité du capillaire, et former un cône de Taylor qui va se rompre ensuite en formant de fines gouttelettes hautement chargées. Le solvant sera ensuite évaporé (désolvatation) en diminuant petit à petit la taille des gouttelettes grâce à l'action combinée du gaz séchant, du gaz de nébulisation, de la température et du gradient de pression dans la source.

L'ESI permet la formation d'ions polychargés qui peuvent être obtenus de plusieurs façons :

- Gain ou perte de proton en fonction du mode positif ou négatif de l'ionisation pour obtenir respectivement des ions de type $[M + nH]^{n+}$ ou $[M - nH]^{n-}$;

- Cationisation ou anionisation pour obtenir des ions de type adduits ;
- Perte de contre-anion.

5 Effet matrice

L'effet matrice (EM) correspond à l'augmentation (amplification) ou à la diminution (suppression) du signal observé pour un analyte en fonction des autres composés présents dans le milieu où il se trouve. Si les effets matrices sont rencontrés lors des analyses en GC, principalement lors d'analyse de pesticides,^[40,41] ils sont surtout rapportés dans notre domaine d'activité dans le cas des analyses en LC et en LC/MS plus particulièrement. En ESI, il est courant d'observer un EM important. Dans ce manuscrit, par exemple, les effets matrices ont été observés pour l'atranol et le chloroatranol lorsqu'ils sont solubilisés dans de la mousse de chêne à la place du méthanol (voir *Chapitre 3*).

Pour éviter que l'effet matrice ait un impact trop important sur les résultats quantitatifs, il est possible, par exemple, de :

- Optimiser les conditions chromatographiques pour éviter au maximum les coélutions. Cette approche ne permettra cependant pas de résoudre le problème d'effet matriciel si les analytes doivent être quantifiés dans une multitude de matrices différentes, comme dans le domaine des arômes et parfums ;
- Purifier les analytes avant l'analyse pour enlever la matrice et donc les interférents matriciels (SPE, QuEChERS...) au risque de compliquer les futures analyses quantitatives lorsque le rendement n'est pas maîtrisé ;
- Tester un autre mode d'ionisation lorsque cela est possible comme l'APCI à la place de l'ESI. Cette approche utilisée par Corbi *et al.* ^[42] pour analyser les furocoumarines dans les produits finis de parfumerie n'a cependant pas permis d'éliminer totalement l'effet matriciel dans le cas du dosage de l'époxybergamottin ;
- Corriger les réponses obtenues avec des facteurs de corrections liés à cet effet matrice.^[43] Cette approche est celle également appliquée par Corbi *et al.* lors du dosage de certaines furocoumarines par LC/MS haute résolution ;^[42]
- Travailler en ajout dosé ou utiliser un étalonnage interne avec un étalon proche de l'analyte pour que l'effet matriciel soit le même comme dans le cas de l'utilisation

d'étalons marqués lors des analyses par dilution isotopique stable (SIDA pour *Stable Isotopic Dilution Analysis* en Anglais).

- Réaliser les gammes de calibration en matrice pour se rapprocher davantage du milieu réel de l'échantillon à analyser (*voir Chapitres 2a et 2b et Chapitre 3*) ;
- Faire appel à l'approche de dilution extrapolative (EDA pour *Extrapolative Dilution Approach* en Anglais).^[44] Cette approche, appliquée par exemple par Masson *et al.* lors du dosage des furocoumarines par LC/MS TOF^[45] consiste en l'injection de l'échantillon à doser à différentes dilutions et en la représentation des concentrations dosées en fonction de ce facteur de dilution. Sans effet matrice, les concentrations retrouvées seront identiques. En présence d'un effet matrice, une courbe avec une pente ascendante ou descendante sera observée en fonction du type d'effet. L'ordonnée à l'origine de cette droite donnera la concentration théorique réelle (*voir Chapitre 3*) ;
- Traiter le bruit de fond dû à la matrice par des moyens chimiométriques avec des logiciels statistiques adaptés.^[46]

6 Identification

Il existe différents documents normatifs ou autres recommandations qui peuvent être suivis par l'analyste en vue de l'identification d'un composé. La norme ISO 22892 :2006 définit par exemple des critères d'identification pour les analyses en GC/MS basés sur la comparaison des temps de rétention et sur l'interprétation des spectres de masse.^[47] L'IOFI (*International Organization of the Flavor Industry*) propose aussi régulièrement des recommandations aux analystes du domaine des arômes et parfums.^[48-50]

6.1 Identification en chromatographie en phase gazeuse

6.1.1 Indices de rétention

6.1.1.1 Utilisation des indices de rétention

Un analyte sera caractérisé par un indice de rétention sur une phase donnée en GC. Deux analytes peuvent cependant présenter le même indice en cas de coélution sur un type de colonne. Mais la probabilité de retrouver les mêmes indices sur deux colonnes de polarité différentes pour une même substance est très faible. L'identification de l'analyte se fera sur la base d'un couple d'indices de rétention mesurés sur des phases orthogonales^[51] tel que recommandé par l'IOFI.^[49]

Les LRIs apolaires sont généralement mesurés sur des colonnes de type polydiméthylsiloxane (PDMS)^[52] ou sur des colonnes contenant 5% de phényl méthyl siloxane légèrement plus polaires. Dans la majorité des cas, les LRIs polaires sont mesurés sur colonne de type polyéthylène glycol ou FFAP.^[53]

Généralement, une tolérance de plus ou moins cinq unités sur colonne apolaire et plus ou moins 10 unités sur colonne polaire est acceptée par la plupart des analystes pour confirmer (grâce à un spectre de masse concordant) un composé par comparaison avec les indices connus pour le standard.^[54]

6.1.1.2 Stabilité des indices de rétention

De nombreuses études ont déjà été réalisées sur la stabilité, la prédiction ou la mise en place de bases de données de LRI.^[55-57] En 2008, d'Acampora Zellner *et al.* ont publié un article de revue faisant état de plus d'une dizaine d'années de recherche sur les théories autour des LRIs, leur dépendance aux conditions analytiques et leur intégration aux systèmes chromatographiques.^[54]

Les LRIs ne varieraient pas seulement avec le type de phase stationnaire et avec l'épaisseur de la phase mais ils seraient également dépendants des conditions analytiques, bien que dans une moins grande mesure que les temps de rétention. Les LRIs ne semblent pas être influencés ni par le fait de travailler à pression ou débit constant ni par le type de gaz vecteur.^[57-59]

Si les LRIs apolaires semblent relativement stables, dans des conditions analytiques comparables, même avec des colonnes aux diamètres internes différents ou provenant de fournisseurs différents ; ils seraient néanmoins sujets à variation en fonction de la température initiale du four et de la rampe de température.^[59] Dans le cas des colonnes polaires, le diamètre et le fournisseur joueraient également un rôle dans la variation des LRIs.^[59]

Pour pallier à ces variations, certains auteurs préconisent la double indexation, c'est-à-dire, la détermination des LRIs pour une colonne donnée selon deux rampes de température différentes^[60]. Cependant, dans la plupart des cas, les rampes de températures et la température initiale sont assez similaires d'un laboratoire à l'autre dans le domaine des arômes et parfums, avec des valeurs respectives de l'ordre de 3 à 5°C/min ou 40 à 50°C. Dans ces conditions, les variations observées sur les LRIs sont peu importantes et sont donc admises.^[58]

6.1.1.3 Bases de données d'indices de rétention

La relative stabilité des indices de rétention a permis la création de bases de données utilisées à des fins d'identification. La plupart des laboratoires construisent en interne leurs bases de données mais il existe également des bases commerciales ou en libre accès.

Les données peuvent être compilées sous forme de livres comme celui d'Adams listant des LRIs sur colonne de type 5% diphenyl^[61], celui de Jennings et Shibamoto avec des valeurs sur phase de type PEG et méthylsilicone^[62], celui de Sadtler avec des LRI sur trois différentes phases^[63] ou encore celui plus spécifique proposé par Joulain et König pour les sesquiterpènes sur des phases de type PDMS.^[64]

Des milliers de LRIs et/ou KI issus de la littérature scientifique sont également disponibles sur des sites internet comme Flavornet^[65], The Odour and LRI database^[66], Pherobase^[67], MassFinder^[68], The Flavor Database^[69], WebBook de chimie de Nist^[70] ou encore Food Analysis.^[71]

6.1.1.4 Limites de l'utilisation des indices de rétention

Si l'utilisation seule des LRI n'est pas un critère fiable à 100% pour permettre l'identification d'un composé, cela reste un moyen incontournable pour limiter les identifications erronées. L'IOFI rappelle ainsi que: « (...) *results from two entirely different phases are likely to have entirely different numerical values which will then greatly reduce, but not entirely eliminate, the possibility of misidentification.* »^[49]

L'utilisation combinée des LRIs, si possible sur des phases orthogonales, et d'un détecteur spécifique, comme la spectrométrie de masse, permet l'identification sans ambiguïté de la plupart des analytes rencontrés dans le domaine des arômes et parfums. D'ailleurs, l'IOFI rappelle l'utilisation simultanée de données chromatographiques et spectroscopiques pour confirmer l'identification d'un analyte dans un extrait: « *In practice this means that any particular substance must have its identity confirmed by at least two methods, e.g. comparison of chromatographic and spectroscopic data (...)* ».^[48]

6.1.2 Spectrométrie de masse en chromatographie en phase gazeuse

6.1.2.1 Identification en mode Scan

Le fait que l'énergie de collision, utilisée en GC-MS avec ionisation EI, soit la même dans tous les laboratoires (70 eV) a permis l'obtention de spectres de masse suffisamment reproductibles pour permettre la création et l'utilisation de bases de données commerciales. S'il est très courant que les laboratoires créent leurs propres bases de spectres de masse (appelées librairies), les bases commerciales sont très utilisées comme par exemple la « NIST »^[72] ou encore la « Wiley »^[73]. Un analyte pourra être identifié dans un échantillon par comparaison entre son spectre de masse et ceux présents dans les librairies.

La première limitation à l'identification basée sur la similarité des spectres de masse est le risque de coélution de deux analytes qui entraînera l'obtention d'un spectre de masse pollué. Il faudra faire appel à toute l'expertise de l'analyste pour statuer sur la présence ou non d'un analyte. Il sera également possible de faire appel à des logiciels de déconvolution, tels qu'AMDIS^[74], par exemple, qui seront capables d'extraire les spectres nettoyés de composés en coélution pour faciliter l'identification.

Cependant l'identification des composés ne peut pas être simplement basée sur les spectres de masse car certains analytes se fragmentent de façon très proche. Les LRIs permettront la plupart du temps de les discriminer. Par exemple, l' α -thujène et l' α -phellandrène présentent quasiment le même spectre de masse mais une différence de 80 unités sur leurs LRIs respectifs sur phase apolaire de type DB5 permet de les identifier sans ambiguïté.^[54]

Dans certains cas les spectres de masse et les LRI ne sont pas suffisants pour attester de l'identification de certains composés comme par exemple dans le cas de sesquiterpènes pour lesquels l'identification reste une hypothèse sans donnée additionnelle comme la RMN (Résonance magnétique nucléaire) ou l'IR (Infra-Rouge). C'est ce que rappelle l'IOFI : « *However, neither gas chromatography nor mass spectral evidence on its own can be a satisfactory basis for the conclusive identification. Even a combination of the two may still require an additional form of analysis, such as nuclear magnetic resonance or infra-red spectroscopy, in order to ensure absolute certainty* ». ^[49]

Les énantiomères ne sont pas non plus différenciés sur des colonnes non chirales et donneront des spectres de masse et des LRI identiques sur les colonnes classiques.

Si la plupart des logiciels de spectrométrie de masse permettent d'incorporer les LRIs dans les bibliothèques, leurs algorithmes de recherche sont principalement basés sur la similarité des spectres de masse.^[54] Dans la majorité des cas, l'analyste est obligé de faire lui-même la corrélation des LRI observés avec ceux des composés proposés par la bibliothèque de masse. Il est toutefois possible de citer les logiciels « GCMS solution » de Shimadzu^[75], AMDIS développé Steve Stein *et al.* (seul ou associé au programme NIST)^[74], ou encore MassFinder_4^[76] du Dr. Hochmuth, qui prennent en compte les LRI dans leurs algorithmes de recherche.

6.1.2.2 Identification en mode SIM

Lorsque les analyses sont effectuées en GC/MS en mode SIM, les composés ne pourront pas être identifiés sur la base de leur spectre de masse complet sauf lorsque le mode SIM est couplé au mode Scan (mode SIM/Scan). C'est le mode qui est par exemple préconisé pour la méthode IFRA (*International Fragrance Association*) de dosage des allergènes (Voir *Chapitre 3*).

En mode SIM strict, il faudra alors prendre en compte les ratios des ions enregistrés lors de l'analyse, en plus de la rétention de l'analyte (Tr ou LRI). Un analyte sera identifié dans un

échantillon si les ratios observés entre ses ions dits qualifiants sont les mêmes que ceux observés pour le standard. Certains logiciels de traitement de données instrumentales proposent de mesurer la proximité des ratios observés avec ceux attendus. C'est le cas de la Chemstation (Agilent) qui calcule une valeur appelée « Q-Value » (Equation 3). La méthode de dosage des allergènes de l'IFRA fait appel à l'utilisation de la Q-value qui doit être supérieure ou égale à 90 pour valider une identification (voir *Chapitre 3*).

Équation 3 : Q-value

$$Q = 100 - \frac{\sum_{i=1}^{i=n} (100 \times |r_i - r'_i|) (\ln[100r_i + 1])^2}{21.3 \sum_{i=1}^{i=n} r_i}$$

Avec n le nombre d'ions par composé, r_i le ratio d'aire de l'ion quantifiant et de l'ion qualifiant

6.2 Identification en chromatographie liquide

6.2.1 Identification en chromatographie liquide et détection par ultra-violet

Lorsque l'on fait appel à la détection UV, il faudra prendre en compte les interactions entre les analytes et l'éluant qui peuvent modifier le spectre UV-visible. Les solvants polaires auront en effet tendance à stabiliser les formes polarisées tandis que les solvants apolaires favoriseront la forme non polarisée. Cela peut se traduire par une augmentation (effet hyperchrome) ou une diminution (effet hypochrome) de l'intensité d'absorbance, ou par une translation du λ_{\max} vers les courtes longueurs d'onde (effet hypsochrome) ou vers les grandes longueurs d'onde (effet bathochrome).

Lorsque les effets solvants sont maîtrisés, l'enregistrement du spectre UV permettra l'élaboration d'hypothèses d'identification des fonctions présentes dans la molécule. Le spectre UV est suffisamment reproductible pour permettre la création de bases de données.

Si la plupart des laboratoires d'analyse possède des bases de données UV créées en interne, il est toutefois possible d'acheter des bases spectrales commerciales telles que «KnowItAll UV-Vis Spectral Library»^[77] ou «UV/Vis+ Spectra Data Base»^[78] par exemple.

Cependant la détection UV n'est pas jugée suffisante pour différencier deux composés de structure proche comme dans le cas des furocoumarines (voir *Chapitre 2*).^[79,80] Dans ce cas, il faudra faire appel à un détecteur plus spécifique comme la spectrométrie de masse par exemple.

6.2.2 Identification en chromatographie liquide et détection par spectrométrie de masse

6.2.2.1 Identification en mode Scan

La plupart des bases de données de spectres de masse en LC n'est pas adaptée au domaine des arômes et parfums mais plutôt aux domaines biologiques, environnementaux et pharmaceutiques. Il est tout de même possible de citer quelques bases plus exploitables contenant principalement des spectres de masses de type MS/MS, telles que la Metlin^[81] utilisable avec certains logiciels de traitement de données comme MassHunter (Agilent) ou directement en ligne tout comme les bases Mascot^[82] (Matrix science), MassBank^[83] (association d'universités japonaises) ou encore TMS database (Central Drug Research Institute, India).^[84] Ces bases de données seront utilisées pour dégrossir le travail plutôt qu'à de réelles fins d'identification. En effet, en LC, les bases commerciales de spectres de masse ne sont pas autant exploitées qu'en GC car la fragmentation des composés dépend beaucoup trop des conditions analytiques et de l'équipement utilisé.

La création de bases de données intra-laboratoire est en général privilégiée par l'analyste et certaines publications en démontrent la faisabilité.^[85,86] Des essais de mise en place de bases LC/MS inter-laboratoires ont été menées récemment par le centre de données de MS de NIST. Les auteurs proposent une stratégie afin de standardiser les conditions d'analyse pour obtenir des spectres de masse ESI consensuels.^[87] Cependant, l'utilisation routinière de bibliothèques commerciales pour identifier formellement en LC/MS n'est toujours pas d'actualité.

6.2.2.2 Recommandations de l'IOFI sur l'identification en chromatographie liquide et détection par spectrométrie de masse

Comme le rappelle l'IOFI, la LC/MS ne permet pas d'obtenir suffisamment de points d'identification (IP pour *identification point* en Anglais).^[50] Contrairement à la GC, les Tr ne peuvent pas être pris en compte pour valider une identification même si, à minima, ils doivent être conformes à ceux du standard analysé dans les mêmes conditions.

Pour être conforme aux prérequis de quatre IP minimum demandés par la Commission Européenne pour valider une identification, l'IOFI propose plusieurs critères selon les techniques LC/MS employées.^[88]

6.2.2.2.1. Couplage chromatographie liquide et spectrométrie de masse triple quadripôle

L'IOFI préconise à minima d'enregistrer un ion précurseur, deux ions produits et de calculer le ratio entre les ions produits pour obtenir les quatre IP. Les ratios basés sur l'ion quantifiant sont déconseillés en cas de risque de coélution avec un autre précurseur isobarique.

L'IOFI propose également des tolérances différentes en fonction du ratio entre les ions considérés (Figure 8).

Intensité relative (% du pic de base)	Erreur acceptée (%)
>50	+/-20
20-50	+/-25
10-20	+/-30
<10	+/-50

Figure 8 : Tolérances associées aux intensités relatives des ions pris en compte selon l'IOFI^[50]

Ces critères ont été utilisés pour déterminer par exemple les limites de détection des méthodes pour doser les furocoumarines par LC/MS QqQ (voir *Chapitres 2a*).

6.2.2.2.2. Systèmes hybrides de chromatographie liquide avec spectrométrie de masse permettant l'acquisition en haute résolution

L'IOFI préconise l'utilisation de quatre IP au travers du suivi : d'un précurseur en basse résolution, de deux ions produits en haute résolution et d'un ratio.

7 Quantification

Une fois les analytes identifiés, ils pourront être quantifiés. S'ils sont correctement séparés dans la colonne, chaque analyte donnera un pic dans le chromatogramme et pourra être quantifié par normalisation interne, calibration externe, étalonnage interne ou ajout dosé.

7.1 Modes de quantification

7.1.1 Normalisation interne

La normalisation interne consiste en l'expression des résultats quantitatifs sous forme de pourcentage d'aire, autrement dit, la teneur de l'analyte sera obtenue en divisant son aire par la somme des aires de tous les pics détectés.

Dans cette approche il est admis que tous les analytes répondent de la même façon avec le détecteur utilisé et surtout que tous les constituants du mélange sont détectés. En effet, si des composés ne sont pas détectés, comme les composés non volatils en GC, alors la teneur en composés volatils sera surestimée.

Certains journaux scientifiques associés au domaine des arômes et parfums refusent les articles présentant des compositions d'extraits basés sur de la normalisation interne quel que soit le type de détecteur comme par exemple *Flavour and Fragrance Journal* : « *The raw GC percentages (obtained by internal normalization, with all response factors set equal to unity) are no longer accepted to report the composition of an essential oil, an aroma, etc. Authors are requested to provide a true quantification, using a recognized technique (internal or external standardization, internal normalization, addition of standards, multiple headspace extraction, etc.) of major components.* » ^[89]

Dans le cas de l'analyse des huiles essentielles, cette méthode de normalisation interne est cependant largement employée de par l'absence de constituants non volatils et de par sa facilité. Les normes françaises concernant les huiles essentielles rapportent des teneurs en composés clés sous forme de gamme de pourcentages obtenus par normalisation interne des aires obtenues par FID. Etant donné que les données sont publiées sous forme de gammes de concentration assez larges, il n'est alors pas utile de faire appel à des modes de quantification plus précis. Cependant, l'analyste devra garder en tête que les valeurs obtenues sont des valeurs de référence à utiliser pour le contrôle qualité mais ne sont pas forcément le reflet de la composition réelle massique de l'extrait.

7.1.2 Calibration externe

Dans le cas de la calibration externe, plusieurs solutions de l'analyte à quantifier sont préparées à différentes concentrations encadrant celle du composé dans l'extrait à doser. Une courbe

d'étalonnage est ensuite construite en représentant l'aire du pic en fonction de la concentration. Si l'on a travaillé dans la gamme de linéarité de l'instrument, on pourra appliquer une régression linéaire pour obtenir l'équation de la droite de calibration (équation 4).

Équation 4 : Equation d'une droite de calibration linéaire

$$A = a \times C + b$$

Avec A= aire et C=concentration, a=pente et b=ordonnées à l'origine

Selon l'IOFI, un coefficient de détermination (R^2) d'au moins 0.995 est requis pour quantifier en régression linéaire.^[90] Il ne faut pas confondre la linéarité instrumentale et celle de la méthode. En effet, la réponse d'un instrument peut ne pas être linéaire mais donner lieu à une concentration recalculée proportionnelle à la concentration réelle ce qui est le gage d'une méthode linéaire (voir paragraphe 8.6).

D'autres types de régression peuvent être appliqués à la courbe de calibration comme la régression quadratique dans le cas où la gamme de concentration testée est plus grande que la gamme de linéarité instrumentale.

Il faudra cependant s'assurer que cette forme quadratique n'est pas due à un mauvais entretien du système utilisé. Il a déjà été reporté par exemple une allure quadratique des courbes d'étalonnage des allergènes en GC/MS lorsque l'injecteur avait été pollué par des composés non volatils.^[91]

Il est également possible de donner plus de poids aux faibles concentrations en pondérant en $1/x$ c'est-à-dire en divisant par la concentration. Le forçage de la courbe d'étalonnage par zéro est parfois reporté également tout comme l'utilisation d'un seul point de calibration.

Le dosage de l'atranol et du chloroatranol par LC/MS ou des constituants majoritaires de la vanille par CLUHP/DAD a été réalisé par calibration externe (Voir *Chapitres 3 et 4*).

7.1.3 Etalonnage interne

Dans le cas de l'étalonnage interne, deux analyses sont nécessaires pour quantifier un composé. Au cours de la première analyse, une solution comprenant le standard interne et l'analyte dans des quantités connues est analysée.

Grâce aux aires des pics obtenus, on en déduit avec l'équation 5 un facteur de réponse relative de l'analyte par rapport au standard ($K^{[92]}$ ou RRF pour *Relative Response Factor* en Anglais).

Équation 5 : Facteur de réponse relatif (RRF)

$$RRF = \frac{A_{STD}}{A_i} \times \frac{m_i}{m_{STD}}$$

Avec A_i = aire de l'analyte i et m_i = masse de l'analyte i , A_{STD} = aire du standard et m_{STD} = masse du standard

Ensuite une quantité connue d'étalon interne est ajoutée à l'échantillon contenant l'analyte à doser et la solution est analysée. La masse de l'analyte à doser est déduite selon l'équation 6.

Équation 6 : Calcul de la masse d'analyte à partir de son facteur de réponse

$$m_i = RRF \times \frac{A_i}{A_{STD}} \times m_{STD}$$

Avec A_i = aire de l'analyte i et m_i = masse de l'analyte i , A_{STD} = aire du standard et m_{STD} = masse du standard

La concentration en analyte dans le mélange sera obtenue en divisant la masse obtenue par la masse d'extrait initialement analysé.

Il est à noter que certains analystes utilisent le facteur de réponse tel que défini par Dietz (RF_D)^[93] qui est l'inverse du RRF. La masse d'analyte sera donc calculée dans l'équation 6 en divisant par ce facteur de réponse.

Parfois une calibration externe est réalisée avec ajout d'un étalon interne pour normaliser les résultats. C'est le cas par exemple de la méthode de dosage des 24 allergènes volatils de l'IFRA.^[91,94,95] (Voir *Chapitre 3*). Dans ce cas, la courbe d'étalonnage est créée en représentant le ratio d'aires analyte/standard en fonction du ratio de concentration analyte/standard. Cela permet de diminuer la variabilité de la réponse liée à l'instrument.

7.1.4 Ajouts dosés

La méthode des ajouts dosés est utilisée pour quantifier des composés présents à l'état de trace ou bien présents dans des matrices complexes rendant l'identification de l'analyte incertaine.

Dans un premier temps, l'échantillon est analysé et le composé à doser est repéré. Dans un second temps, une quantité donnée de standard, correspondant au composé à doser, est ajoutée à une quantité donnée d'extrait qui est ensuite analysé. L'aire du composé à doser aura

augmenté dans le deuxième chromatogramme permettant sa quantification selon l'équation 7.

[92]

Équation 7 : Calcul de la teneur en pourcentage par ajout dosé

$$C_i = \frac{m_r}{m} \times \frac{r}{r' - r} \times 100$$

Avec m_r = la masse de la substance de référence, m = la masse d'extrait, r = le ratio d'aire entre le composé i à doser et un pic voisin dans le chromatogramme initial, r' le ratio d'aire entre le composé i à doser et un pic voisin dans le chromatogramme obtenu après ajout

7.2 Considérations sur la quantification et les détecteurs

Certains détecteurs sont plus adaptés que d'autres à la quantification. Dans le cas de l'analyse de composés volatils, le FID est généralement considéré comme un détecteur quantitatif. Un chapitre entier de ce manuscrit est dédié à la quantification des composés volatils par GC-FID (*Chapitre 1*). Lorsque des composés sont présents en trace (inférieurs à la centaine de ppm), il faudra faire appel à un détecteur plus sensible comme la spectrométrie de masse par exemple.

L'utilisation de la normalisation interne en MS avec mode Scan n'est pas appropriée car cela revient à faire l'hypothèse que tous les composés ionisent de la même façon ce qui est loin d'être le cas. Ainsi le guide pour les auteurs de *Flavour and Fragrance Journal* rappelle que :

« Methods assuming response factors equal to unity cannot be used with a mass spectrometer and NPD. Only FID and TCD can be suitable for such an approximation. »^[89]

Que l'on soit en GC ou en LC, la quantification des analytes par MS avec un quadripôle, seul ou associé à un autre analyseur, peut se faire en mode SIM. Certaines méthodes officielles dans le domaine des arômes et parfums sont basées sur ce mode de détection comme le dosage des phtalates^[96], celui des allergènes volatils^[95] ou celui de l'atranol et du chloroatranol (Voir *Chapitre 3*).

Lorsqu'un triple quadripôle est utilisé, une meilleure sensibilité et une plus grande sélectivité que celles du mode SIM sont obtenues en travaillant en mode SRM ou MRM. La quantification par MRM a par exemple été appliquée au dosage des furocoumarines dans les huiles essentielles (Voir *Chapitre 2a*).

8 Validation de méthodes

Une fois la méthode développée, il est nécessaire de démontrer sa fiabilité et de connaître ses performances. Cette étude est l'étape de validation. Très courante dans le domaine pharmaceutique, elle tend à se démocratiser dans le domaine des arômes et des parfums avec notamment les études collaboratives initiées par l'IFRA ou l'IOFI pour proposer des méthodes validées à leurs membres et de plus en plus de méthodes validées publiées par les analystes du domaine (*Voir Chapitres 2a, 2b, 3 et 4*).

Pour connaître les limites de la méthode développée il existe plusieurs lignes directrices éditées par les organismes compétents dans chaque secteur d'activité. Aucune directive n'existe dans le domaine des arômes et parfums à ce jour, aussi les laboratoires souhaitant valider leurs méthodes sont libres de suivre le référentiel qu'ils désirent que ce soit en faisant appel à des normes^[43,97-103] ou à des directives telles que celle proposée par l'ICH (*International Conference on Harmonisation*) Q2(R1).^[104] Il s'agit d'un document de référence dans le domaine pharmaceutique qui permet une harmonisation des résultats, de la méthodologie et du vocabulaire. La commission SFSTP (Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques) a proposé en 2003^[105], une harmonisation des démarches de validation, sur la base des documents ISO 5725^[97-102], 17025^[106], ICH Q2A et Q2B (versions précédant le texte Q2-R1)^[104], de la FDA (Guidance for Industry^[107]) et sur la décision 2002/657/CEE (Sanco^[108]) de la Commission européenne.^[108] Le document Q2-R1 de l'ICH et les publications de la SFSTP^[105,109] ont été utilisés pour valider les méthodes présentées dans ce manuscrit.

Selon ces deux référentiels, une méthode quantitative est validée lorsque les points ci-après sont évalués : La spécificité ou sélectivité ; La fidélité ; La justesse ; La limite de détection ; La limite de quantification ; La linéarité ; La gamme de la méthode ; La robustesse.

8.1 Spécificité

La spécificité d'une méthode est la capacité de celle-ci à identifier avec certitude le composé analysé en présence d'autres composés pouvant interférer avec la mesure comme des impuretés ou les composés de la matrice. Elle est vérifiée par injection de composés matriciels, de dégradation ou d'interférant.

En MS QqQ, les modes SRM (ou MRM) permettent d'étudier un ion et un (ou plusieurs) fragment(s) ce qui permet une bonne spécificité sauf dans le cas de composés en coélution générant les mêmes fragments. La mesure de la masse exacte avec un analyseur de type TOF HR permet un gain certain de spécificité également.

Dans le cas de la détection UV, la méthode permettra d'être spécifique entre les composés porteurs ou non de chromophores mais elle ne permettra pas d'être spécifiques dans le cas de composés absorbant à la même longueur d'onde.

8.2 Fidélité

La fidélité représente la dispersion des résultats, d'essais réalisés dans des conditions définies, par rapport à la moyenne.

La moyenne \bar{x} est définie par l'équation 8 comme étant la somme des observations (x_i) divisée par le nombre des observations (N).

Équation 8 : la moyenne

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{N}$$

Avec x_i la valeur mesurée pour l'observation i et N le nombre d'observations.

8.2.1 Dispersion des résultats

Dans le cas d'une distribution des observations répondant à une loi normale, la moyenne se retrouve au centre de la courbe de Gauss qui représentera la fonction de réponse. La dispersion des résultats autour de la moyenne est décomposable en écart type σ (Equation 9).

Équation 9: Ecart type

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

Avec x_i la valeur mesurée pour l'observation i , \bar{x} la moyenne et N le nombre d'observations.

Il n'est pas suffisant de donner un résultat analytique sous forme d'une moyenne car on ne connaît pas la dispersion (largeur de la courbe) autour de cette moyenne.

Il est donc indispensable de définir autour de la moyenne une zone dans laquelle tout porte à croire que la vraie valeur et/ou la valeur prédite vont se trouver (Voir paragraphe 8.9)

8.2.2 Différents niveaux de fidélité

La fidélité d'une méthode se divise en trois niveaux : la répétabilité, la fidélité intermédiaire et la reproductibilité.

Elle est en général exprimée sous la forme d'un coefficient de variation (CV ou RSD pour *Relative Standard Deviation* en Anglais, équation 10).

Équation 10 : Coefficient de variation CV

$$CV = \frac{\sigma \times 100}{\bar{x}}$$

σ = écart type, \bar{x} = moyenne, 100 = facteur pour exprimer en %

8.2.2.1 Répétabilité

La répétabilité se rapporte à des essais effectués dans des conditions aussi stables que possibles et à de courts intervalles. La plupart du temps, des triplicatas d'analyses seront considérés car il s'agit du plus faible nombre de répétitions permettant la génération de données statistiques comme la variance. C'est la stratégie choisie pour toutes les méthodes validées dans ce manuscrit.

D'après les recommandations de l'ICH, la répétabilité sera déterminée :

- Soit avec neuf déterminations au minimum couvrant toute la gamme de la méthode (exemple : trois concentrations avec trois réplicas) ;
- Soit avec un minimum de six déterminations à 100% de la concentration test.

Ce dernier cas est très spécifique au domaine pharmaceutique ou à certains extraits vendus avec une teneur fixe en un principe actif. Dans le cas de dosage d'extraits naturels, dans lesquels la concentration en analyte peut varier, il faudra privilégier la première possibilité.

Si la répétabilité a été évaluée une seule fois, c'est-à-dire le même jour, elle pourra être exprimée sous forme de CV_r (r pour répétabilité) en utilisant directement l'équation 10. Si elle a été évaluée plusieurs fois, par exemple sur trois jours différents, elle pourra être exprimée en

utilisant la variance « intrajour » c'est-à-dire en utilisant la moyenne des variances observées chaque jour. Dans ce cas, CVr sera estimée selon l'équation 11.

Équation 11 : Coefficient de variation de répétabilité CVr

$$CVr = \frac{\sqrt{S_r^2}}{\bar{x}}$$

Avec \bar{x} = moyenne des observations, S_r^2 la variance de répétabilité telle que calculée dans l'équation 12

Avec :

Équation 12 : Variance de répétabilité pour des essais effectués sur n jours

$$S_r^2 = \frac{\sum_i^n S_i^2}{n}$$

Avec n le nombre de jour, S_i^2 la variance observée chaque jour

8.2.2.2 Fidélité intermédiaire

La fidélité intermédiaire représente la variabilité intra-laboratoire.

La variance de la fidélité intermédiaire permet en effet d'évaluer la variabilité des mesures en fonction de la variation d'un ou plusieurs paramètres (jour, instrument, opérateur...).

La variance de fidélité intermédiaire S_R^2 est calculée selon l'équation 13. Le coefficient de variation de la fidélité intermédiaire (CV_R) sera calculé avec l'équation 11 en utilisant S_R^2 .

Équation 13 : Variance de fidélité intermédiaire

$$S_R^2 = \sqrt{S_r^2 + S_B^2}$$

Avec S_r^2 la variance de répétabilité et S_B^2 la variance inter-séries

La variance inter-série S_B^2 est calculée selon l'équation 14.

Équation 14 : Variance inter-séries

$$S_B^2 = S_z^2 - \frac{S_r^2}{n}$$

Avec S_r^2 la variance de répétabilité et S_z^2 la variance des moyennes inter-séries et n le nombre de répétitions

8.2.2.3 Reproductibilité

La reproductibilité représente la variabilité des résultats dans des conditions maximales de changement. Généralement les mesures sont réalisées dans des laboratoires différents, sur des échantillons distincts, théoriquement identiques, prélevés sur le même produit à analyser. Son évaluation consiste en un travail collaboratif de plusieurs laboratoires qui vont réaliser de manière indépendante une mesure sur un même échantillon.

Deux exemples d'étude collaborative seront présentés dans le *Chapitre 3*.

8.3 Justesse et exactitude

La justesse exprime la ressemblance entre la valeur attendue et la valeur obtenue. Elle est estimée soit par le biais (ou l'erreur obtenue) entre la valeur réelle et celle mesurée soit sous forme de recouvrement. Elle donne des indications sur des erreurs systématiques.

L'exactitude correspondant à la notion de justesse à laquelle est ajoutée la fidélité. Elle donne donc une indication sur l'erreur totale décomposée sous forme d'erreur systématique et d'erreur aléatoire.

8.4 Limite de détection

La limite de détection (LD) correspond à la plus petite quantité d'analyte pouvant être irréfutablement identifié sans pouvoir nécessairement être quantifié précisément.

La directive ICH laisse le choix à l'expérimentateur de déterminer la LD selon plusieurs stratégies : Détermination visuelle ; approche du signal sur bruit ; approche basée sur la pente et la déviation standard de la réponse.^[96]

Lors de la validation des méthodes proposées dans ce manuscrit, il a plutôt été fait appel à des paramètres de détection plus tangibles prenant en compte à la fois les outils instrumentaux mais également l'expérience de l'analyste (voir *Chapitres 2, 3 et 4*).

8.5 Limite de quantification

La limite de quantification (LQ) est la plus petite quantité d'analyte pouvant être quantifiée avec une fidélité et une justesse satisfaisante.

Le référentiel ICH Q2-R1 propose d'appliquer les mêmes méthodes de détermination de la LD pour estimer la LQ avec un seuil différent. Si l'on suit les stratégies 2 et 3, la LQ revient à multiplier la LD par 3.33. Cependant, reporter une LQ sans estimer l'exactitude qui y est associée ne semble que peu acceptable. Une bonne alternative à leur détermination est de faire appel aux profils d'exactitude (voir paragraphe 8.9).

8.6 Linéarité

La linéarité d'une méthode est sa capacité à fournir des résultats proportionnels à la concentration de l'analyte. Elle est parfois à tort représentée par la réponse du détecteur en fonction de la concentration (fonction de réponse).

La linéarité se représente comme la concentration (ou masse) calculée par la méthode en fonction de la concentration (ou masse) réelle.

Selon la directive Q2-R1 d'ICH, un minimum de cinq concentrations est requis pour déterminer une linéarité de méthode.^[104]

Lorsque la linéarité a été déterminée dans des conditions de fidélité (répétabilité, fidélité intermédiaire ou reproductibilité), il sera possible de représenter l'intervalle sur le graphe pour représenter une tolérance sur une valeur déjà mesurée ou à prédire (Voir *Chapitre 2a*).

8.7 Gamme

La gamme de la méthode, également appelée intervalle de mesure, est l'intervalle entre la plus petite (LQ basse) et la plus grande concentration (LQ haute) pour lesquelles il a été démontré que la méthode possédait une fidélité, une justesse et une linéarité suffisante. Elle peut être déterminée en utilisant les profils d'exactitude (Voir paragraphe 8.9).

8.8 Robustesse

La robustesse d'une méthode est la capacité de celle-ci à fournir un résultat correct malgré de faibles variations délibérées dans le protocole analytique permettant de juger de la fiabilité des résultats obtenus dans des conditions normales d'application de la méthode. Elle doit être considérée pendant le développement de la méthode.

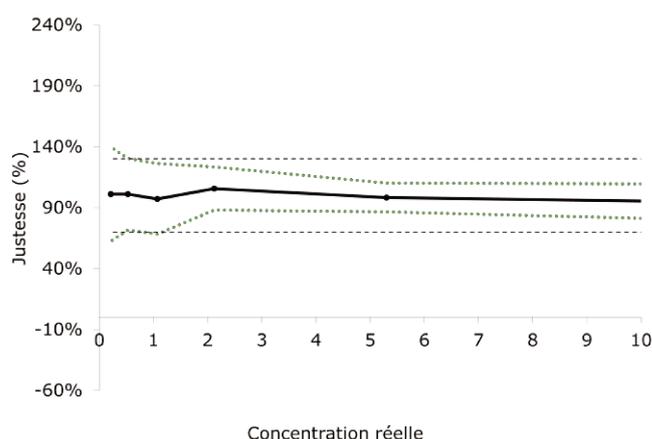
Par exemple en LC, elle pourra être évaluée au travers d'une modification de la température d'analyse, du débit, ou encore du pH de la phase mobile. Des exemples d'études de robustesse sont détaillés dans les *Chapitre 2a et 4*.

8.9 Profils d'exactitude

Les profils d'exactitude permettent de synthétiser les résultats de validation sous la forme d'une représentation visuelle qui prend en compte la fidélité de la méthode et sa justesse.

Le profil d'exactitude est construit en représentant la justesse en fonction de la concentration (ou masse) théorique (Figure 9). Un intervalle est ajouté autour de cette justesse afin de prendre en compte la fidélité de la mesure. Il peut s'agir d'un intervalle de confiance (IC), d'un intervalle de prédiction (IP) ou d'un intervalle de tolérance (IT).

Figure 9 : Exemple de profil d'exactitude



Avec en trait plein la justesse, en vert l'IC, l'IP ou l'IT associé au risque souhaité, en pointillés l'erreur autorisée par l'analyste (intervalle d'acceptabilité).

Note : Ce manuscrit présente des études qui se sont étalées sur plus d'une dizaine d'années. Les profils d'exactitude produits pour ces dernières ont donc suivi les évolutions du domaine de la validation de méthodes notamment dans le choix de l'intervalle associé.

8.9.1 Intervalle de confiance

L'IC (équation 15) est un paramètre statistique qui permet d'établir avec un niveau d'espérance défini (π) un intervalle autour de la moyenne observée dans lequel la valeur vraie a de grandes chances de se trouver. ^[43]

Équation 15 : Intervalle de confiance

$$IC = \bar{z} \pm t_{u,\pi} \times \sigma$$

Avec \bar{z} la concentration retrouvée moyenne, σ l'écart type, $t_{u,\pi}$ le quantile de la distribution de Student pour u degrés de liberté et l'espérance π

Les degrés de libertés sont calculés comme étant égaux au nombre d'injections moins le nombre de répétitions de ces injections.

Un exemple d'utilisation d'IC pour construire le profil d'exactitude est donné dans le *Chapitre 4*.

L'IC a été proposé par la SFSTP pour représenter incertitude d'une méthode sur les profils d'exactitude à partir de 1999^[110] et jusqu'en 2006. Cependant, l'IC a été remis en question par la suite à cause de son manque de justesse statistique car il ne prend pas en compte l'incertitude sur l'estimation du biais et le calcul du nombre de degrés de liberté serait incorrect.^[111]

Il est cependant possible d'utiliser les profils d'exactitude en IC pour comparer des modèles de régression, lors de l'étude de la fonction de réponse instrumentale, puisqu'il s'agit de travailler sur les valeurs théoriquement vraies. C'est ce qui est proposé par certains logiciels de validation^[112] et c'est ce qui a été utilisé dans le *Chapitre 2a*.

8.9.2 Intervalle de tolérance

A partir de 2006, L'IT a donc été proposé par la SFSTP pour remplacer l'IC sur les profils d'exactitude.^[113] En effet, cet intervalle est différent de l'IC puisqu'il permet de prévoir les résultats qui seront obtenus au cours des futures expériences.

En statistique, l'IT correspond à une plage de valeurs susceptible de contenir une certaine proportion de la population avec une probabilité que cette proportion soit effectivement couverte. Cette probabilité correspond au niveau de confiance.

Il existe plusieurs types d'IT dont l'intervalle de tolérance d'espérance π , l'intervalle de contenu garanti β - γ ou encore l'intervalle de dispersion défini par la norme NF ISO 16269-6.^[114]

8.9.2.1 Intervalle de tolérance d'espérance π

L'intervalle de tolérance d'espérance π ^[43] est parfois appelé intervalle de tolérance β (β *expectation interval* en Anglais)^[111]. Il s'agit d'un intervalle de prédiction qui est basé sur l'évaluation de plusieurs séries de mesures. C'est cet intervalle qui est recommandé par la norme NF V03-110 pour la construction des profils d'exactitude.^[43]

Il est calculé selon l'équation 16.

Équation 16 : Intervalle de tolérance d'espérance π

$$IT = \bar{z} \pm t_{u, \frac{1+\pi}{2}} \times \sigma_R \times \sqrt{1 + \frac{1}{n \times r \times \frac{\frac{S_B^2}{2} + 1}{S_r^2} + 1}}$$

Avec \bar{z} la concentration retrouvée moyenne, σ_R l'écart type de fidélité intermédiaire (partie 6.2.2.2), $t_{u, (1+\pi)/2}$ le quantile de la distribution de Student pour u degrés de liberté définis selon l'équation 23, et l'espérance π , n le nombre de séries, r le nombre de répétitions, s_r^2 la variance de répétabilité et s_B^2 la variance inter-séries

Les degrés de libertés sont calculés selon l'équation 17.

Équation 17 : Degrés de liberté dans le cas du calcul de l'intervalle de tolérance d'espérance π

$$v = \frac{\left(\frac{S_B^2}{2} + 1\right)^2}{\frac{\left(\frac{S_B^2}{2} + \frac{1}{r}\right)^2}{n-1} + \frac{1-1/r}{n \times r}}$$

Avec, n le nombre de séries, r le nombre de répétitions, s_r^2 la variance de répétabilité et s_B^2 la variance inter-séries

Compte tenu de la complexité de ce calcul, il est à souligner l'initiative de l'INRA (Institut National pour la Recherche Agronomique) qui a mis à disposition un fichier Excel^[115] permettant de calculer automatiquement les intervalles de tolérance et générer les profils d'exactitudes, aux niveaux d'espérance et d'acceptabilité choisis par l'analyste.

Dans ce manuscrit, l'intervalle de tolérance désignera toujours l'intervalle de tolérance d'espérance π . Il a été appliqué à l'élaboration des profils d'exactitudes produits dans les *Chapitres 2a, 2b et 3 (partie atranol et chloroatranol)*.

8.9.2.2 Intervalle de tolérance de contenu garanti β - γ

L'intervalle de tolérance de contenu garanti β - γ est parfois appelé *β -content γ -confidence* ou simplement *β -content* par son nom en Anglais. D'après Rozet *et al.* ^[111], cet IT peut être utilisé au même titre que celui d'espérance π lors d'une validation de méthode selon le choix de l'analyste. L'IT de tolérance π permettrait en effet de contrôler le risque de prendre une mauvaise décision tandis que l'IT en β - γ -content permettrait de contrôler le risque de conclure à la validité de la méthode en surestimant le risque de non-validité du résultat.^[111] Néanmoins, d'après la norme NF-V03 110, ^[43] l'IT en β - γ -content est surtout utilisé pour construire les cartes de contrôle et serait moins adapté aux validations de méthodes.^[43]

8.9.2.3 Intervalle de dispersion de la norme NF ISO 16269-6

Cet IT permet également de représenter la dispersion autour de la moyenne comprenant une partie de la population spécifiée avec un niveau de confiance donné. La différence est que le calcul est fait en se basant sur une variance globale des recouvrements au lieu de considérer des séries de mesures. Ce type d'IT est considéré depuis septembre 2016 par l'USP (*United States Pharmacopeial convention*).^[116]

8.9.1 Intervalle de prédiction

En statistique, l'IP est une plage de valeurs susceptible de contenir une observation individuelle future à partir des valeurs des prédicteurs en entrée, qui sont prises en compte dans le modèle statistique considéré (régression, ANOVA, plan d'expérience...).

Un IP a été représenté sur les profils d'exactitude produits dans le cas de l'analyse des allergènes volatils par GC/MS en appliquant l'équation 18 (*Chapitre 3*).

Équation 18 : Intervalle de prédiction

$$IP = \bar{z} \pm t \times \bar{\sigma} \times \sqrt{1 + \frac{1}{n}}$$

Avec \bar{z} la concentration retrouvée moyenne, n = nombre de laboratoires, $\bar{\sigma}$ = la variance calculée en utilisant la moyenne obtenue par tous les laboratoires pour tous les analytes et t le t de Student choisi au risque souhaité pour un nombre de degré de liberté de $(n \times \text{analytes}) - 1$

La norme NF ISO 16269-8^[117] propose une façon de calculer l'intervalle de prédiction en se basant sur une variance globale des recouvrements tout comme dans le cas de l'intervalle de dispersion de la norme NF ISO 16269-6.^[114] Cet IP est également conseillé par l'USP depuis Septembre 2016.^[116]

Il est donc primordial lorsqu'une méthode est validée de spécifier le référentiel appliqué puisqu'un même terme (IT, IP ou IC) peut représenter plusieurs stratégies de validation différentes.

8.9.2 Intervalle d'acceptabilité

L'intervalle d'acceptabilité correspond à la spécification sous forme de pourcentage de l'erreur considérée acceptable par l'analyste sur la valeur mesurée. Pour une erreur autorisée de 30%, l'intervalle sera de 70 à 130%.

8.9.3 Détermination des limites de quantification

Le profil d'exactitude pourra être exploité pour déterminer les LQ hautes et basses délimitant la gamme de la méthode comme les concentrations correspondant aux croisements entre l'IC, l'IT ou l'IP et l'intervalle d'acceptabilité. (Figure 9).

**CHAPITRE 1 : Analyse
quantitative des composés
volatils par Chromatographie
gazeuse et détecteur à
ionisation de flamme**

PARTIE 1 : Introduction et rappels bibliographiques

1 Analyse des extraits de parfumerie

Dans les extraits de parfumerie, la plupart des analytes sont volatils, bien que des composés non volatils soient présents dans les absolues, concrètes et résinoïdes. Leur analyse se fait donc en général par GC avec détection FID ou MS.

La présentation du mécanisme de détection du FID a permis de mettre en évidence une différence de réponse dans la détection des composés en fonction de leur structure. Pour corriger cette différence, certains analystes ont proposé l'utilisation de facteurs de réponse.

2 Facteurs de réponse pour corriger le signal du détecteur à ionisation de flamme

Depuis les années 60, des valeurs de facteurs de réponse FID d'une multitude de composés volatils ont été reportées dans la littérature sous la forme de ratio d'aire sur masse injectée^[118] ou de RF_D .^[93,119-123] Les données publiées par exemple par Dietz^[93], Jorgensen^[119], Katritzky^[120] ou encore Musumarra^[121] montrent une certaine stabilité, sur près de 20 ans, puisque la déviation relative standard moyenne observée est inférieure à 6%.

Jusque-là, cependant, une base de données de facteur de réponse n'a jamais été considérée dans la littérature malgré le gain de temps que cette approche permettrait.

Les analystes se sont plutôt attachés à prédire les facteurs de réponse pour s'éviter la tâche fastidieuse de les recalculer à chaque analyse mais également pour pallier aux problèmes de disponibilité commerciale, manque de pureté ou instabilité des standards.

3 Facteurs de réponse prédits

3.1 Similarité de structure

L'approche la plus simple parfois utilisée pour prédire les facteurs de réponse FID est d'estimer que deux composés avec la même fonction chimique auront le même facteur de réponse. Ainsi Costa et *al.* ont déterminé des RRF moyens (avec le nonane comme standard) pour les aldéhydes, les alcools, les esters et les monoterpènes en moyennant les valeurs mesurées en quintuplet de trois à cinq représentants de la famille choisie.^[124]

3.2 Nombre effectif d'atomes de carbone

Le concept de nombre effectif d'atome de carbone (ECN) est le plus exploité pour prédire les facteurs de réponses FID. Dans le début des années 60, Stenberg faisait appel à cette valeur pour comparer la réponse de différents analytes présentant des hétéroatomes par rapport à des hydrocarbures.^[125]

L'ECN est calculable selon l'équation 19.

Équation 19 : Calcul de la valeur de l'ECN

$$ECN_i = n_c \times \frac{A_i}{A_{ref}} \times \frac{m_{ref}}{m_i} \times \frac{M_i}{M_{ref}}$$

Avec i l'analyte, ref le standard, A =aire du pic FID, m =masses pesées, M =masse molaire, n_c le nombre de carbone dans le standard

D'après les travaux de Stenberg, l'ECN d'une substance i est décomposable en ECN partiels, appelés ECN_{inc} (pour *increments* en Anglais) liés aux différentes fonctions et présence d'hétéroatomes dans ladite substance. La somme des ECN_{inc} donne l'ECN global.

L'utilisation de ces valeurs expérimentales de ECN_{inc} permet donc d'estimer la réponse d'un composé à partir du moment où l'on connaît sa structure.^[126–129]

Cependant certains auteurs ont rapporté des déviations importantes entre les ECN prédits et réels notamment dans le cas des composés aromatiques.^[130] Il semblerait également que les conditions expérimentales puissent avoir un impact sur la valeur des ECN.^[131]

3.3 Autres modèles de prédiction

Certains auteurs ont proposé des modèles de prédiction de facteur de réponse FID en faisant appel à la relation quantitative structure propriété (RQSP). En 1989 par exemple, Musumarra *et al.* ont prédit les RF_D de 121 composés aromatiques ou avec des cycles azotés grâce à 17 descripteurs correspondant aux atomes (C, H, O, N, S), aux insaturations (C=C, C=O, C=N, C≡N), au nombre de cycles, et aux différents groupements fonctionnels (COOH, OH/SH, OCOOC, NH₂, COC, CSC) présents.^[121]

En 1994, Katritsky *et al.* ont développé un modèle à partir de 37 paramètres, qui après rationalisation ne contenait plus que six paramètres pour prédire les facteurs de réponse de plus

de 150 composés.^[120] Cependant, parmi les paramètres pertinents du modèle, la valeur du ECN était requise. La même observation est faite pour les travaux de Lucic *et al.* publiés cinq ans plus tard qui reportent un modèle utilisant 6 paramètres (à partir de 296 initiaux) dont les ECN.^[122]

Des modèles encore plus complexes, dont les facteurs clés ne sont pas clairement justifiables, ont également été reportés. On peut citer par exemple les travaux de Cao *et al.* qui ont proposé un modèle basé sur le calcul d'un indice de polarisabilité interne^[132] ou bien ceux de Jalali-Heravi *et al.* basés sur des réseaux de neurones et faisant appel à 58 paramètres.^[123]

Les limites des modèles de prédiction existants sont donc leur complexité, leur jeu de données limité (entre 23 et 150), le manque de variabilité dans les structures considérées ou la nécessité de calculer d'abord les ECN.

D'autre part, aucun des modèles existants ne prend en compte le principe de fonctionnement du FID, à savoir la combustion. Il semblait donc intéressant de vérifier si les facteurs de réponses FID pouvaient être corrélés aux enthalpies de combustion en faisant appel à un jeu de données suffisamment important et représentatif des analytes rencontrés dans le domaine des arômes et parfums.

4 Objectifs de cette étude

Cette étude avait pour but de vérifier si une base de données de facteurs de réponse FID pouvait être créée et si la performance de la quantification avec cette base était équivalente à ce qui est obtenu lorsqu'un véritable étalonnage interne est utilisé.

Le deuxième but de cette étude était de vérifier si les facteurs de réponse du FID pouvaient être liés à l'enthalpie de combustion des analytes afin de proposer un modèle de prédiction réellement basé sur le mécanisme de détection de ce détecteur.

PARTIE 2 : Partie expérimentale

1 Standards et échantillons

L'extrait éthanolique d'Açaï (*Euterpe precatoria* Mart.) a été acheté à la coopérative RECA (Rondônia, Brésil). L'octanoate de méthyle (standard interne), le benzoate de benzyle, le naphthalène et l'heptane (pureté >99%) ont été achetés chez Acros Organic (Geel, Belgique). Tous les autres standards provenaient de la collection interne à la société.

Pour l'étude sur les bases de données, des solutions standard ont été préparées à environ 5 % (m/m) dans l'éthanol, le dichlorométhane ou l'acétonitrile (de qualité analytique) fournis par Carlo Erba (Val de Reuil, France) avec l'octanoate de méthyle comme standard interne.

Pour l'étude sur la prédiction des RRF, 351 constituants représentant pratiquement toutes les familles chimiques rencontrées dans le domaine des arômes et parfums ont été considérés : hydrocarbures (18), alcools (52), phénols (21), aldéhydes (43), cétones (47), esters (96), lactones (13), éthers (40), composés soufrés (32), composés azotés (29), composés halogénés (3), composés aromatiques (80). Certains composés étaient polyfonctionnels. La liste exacte des composés, tout comme les valeurs de RRF mesurées, sont confidentielles.

2 Instrumentation

2.1 Chromatographie gazeuse et détecteur à ionisation de flamme

Quatre instruments GC-FID différents ont été utilisés à savoir deux modèles 6890 (Agilent, Wilmington, DE, Etats-Unis), un modèle HRGC 5300 Megaserie (Carlo Erba, Italie) et un modèle CP3800 Chrompack (Varian, Walnut Creek, Etats-Unis). Ils étaient soit équipés d'une colonne DB-1 ou DB-1MS (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m) achetées chez J&W Scientific (Agilent). Les températures d'injection et du détecteur étaient fixées à 250°C. Le volume d'injection était de 1 μ l et un ratio de split 1 :100 a été appliqué dans le cas de l'étude des bases de données de RRF. Dans le cas de la prédiction, les valeurs étaient respectivement de 0.2 μ l et 1 :50. Le gaz vecteur était l'hélium et le programme de température était le suivant dans le cas de l'étude de la base de données : 50°C pendant 5 min, puis rampe de température à 5°C/min jusqu'à 250°C maintenus 45 min. Dans le cas de la prédiction des RRF le programme était de 50 °C pendant 5 min puis une montée en température à 3°C/min jusqu'à 120°C puis une seconde rampe de température à 5 °C/min jusqu'à 250 °C maintenus 5 min. Le ratio air/hydrogène dans la flamme du FID était de 10% pour l'étude sur la base de données et de 9% pour l'étude sur la prédiction et le débit d'air fixé à 450ml/min dans les deux cas. Les études de RRF ont été réalisées sur un GC-FID Agilent 6890 avec une colonne DB-1, une colonne DB-WAX ou une colonne DB-17 (Agilent) aux mêmes dimensions (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m).

2.2 Chromatographie gazeuse et spectromètre de masse

Un instrument GC HP 6890 (Agilent) connecté à un spectromètre de masse HP 5973 (Agilent) et équipé d'une source EI a été utilisé pour l'étude. Les températures de l'injecteur et de la source du MS étaient de 250°C et 230°C respectivement. Les acquisitions ont été réalisées en mode scan à 70eV. La colonne (DB1-MS) ainsi que les autres conditions chromatographiques ont été fixées telles que décrites dans la partie GC-FID.

3 Plan d'expérience

Le plan d'expérience a été réalisé en utilisant le logiciel NemrodW version 2000-D (LPRAI, Marseille, France) et les résultats ont été interprétés grâce au logiciel Statistica (Statsoft, Tulsa, Etats-Unis).

4 Prédiction ab initio des enthalpies de combustion

Les enthalpies de combustion ΔH_c ont été calculées en utilisant une méthode basée sur la théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT pour *Density Functional Theory* en Anglais) grâce à la fonctionnelle hybride B3LYP (*Becke three parameters Lee, Yang, Parr*). Ces méthodes ont déjà montré de bons résultats pour prédire les propriétés structurales, électroniques et thermochimiques.^[133,134]

Les énergies DFT (B3LYP/6-31G**) ont été calculées, après minimisation, grâce au logiciel Jaguar (Schrödinger). Tous les calculs d'optimisation et de régression ont ensuite été effectués sous Excel grâce à la fonction « Solver » (MicroSoft, Redmond, WA).

PARTIE 3 : Résultats

1 Comparaison de la quantification avec le détecteur à ionisation de flamme et avec le spectromètre de masse

Il a été vu dans la partie « Introduction et Etat de l'art général » que *Flavour and Fragrance Journal* n'accepte aucune donnée quantitative provenant de normalisation interne lorsque la détection a été opérée avec un MS.^[89] Il y a dix ans cependant, le report de pourcentages bruts FID^[135] ou MS^[136] ou sous forme normalisée avec un RRF unitaire (FID^[137] ou MS^[138]) était accepté sans problème dans ce même journal.

Pourtant, selon que l'on quantifie les composés d'un extrait naturel par normalisation interne en utilisant le FID ou le MS, les résultats ne seront pas équivalents. Cette différence est illustrée en Figure 10 dans le cas d'un extrait d'açai par exemple.

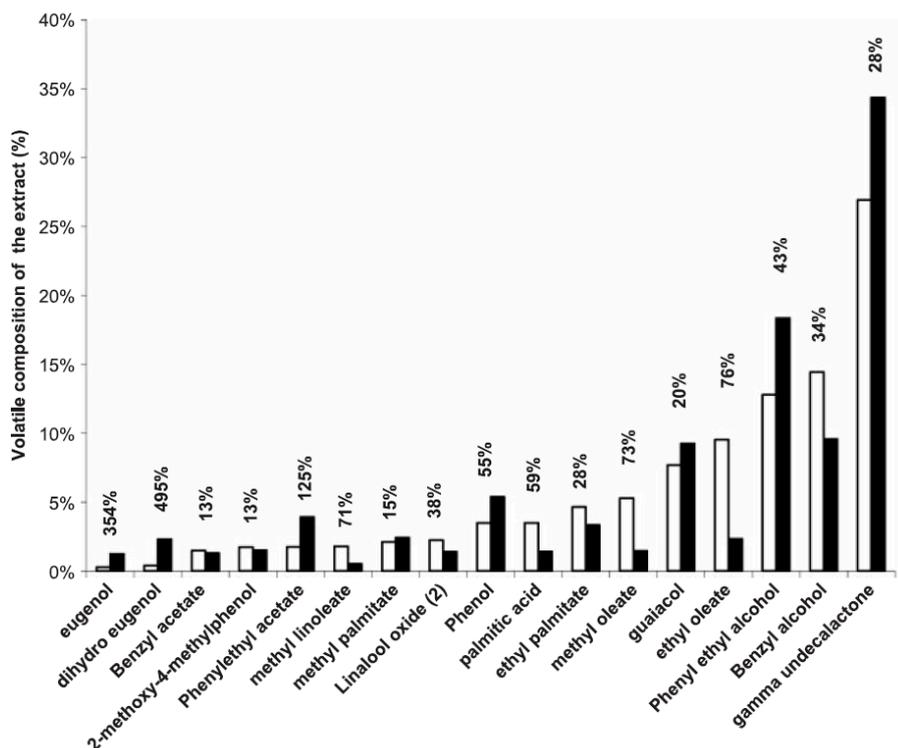


Figure 10 : Composition d'un extrait d'Açaï déterminée par GC-FID (blanc) ou MS (noir) par normalisation interne (les pourcentages au-dessus des barres représentent les différences entre les deux méthodes)

Afin de déterminer quelle méthode quantitative permet d'obtenir les résultats les plus représentatifs de la composition réelle, la semi-quantification et la standardisation interne, avec les deux détecteurs, ont été comparées dans le cas de l'analyse d'une solution modèle (Tableau 1).

La semi-quantification consiste à appliquer un facteur de réponse de 1 pour quantifier les composés afin de s'affranchir de la teneur en composés non-volatils. Dans le cas de la solution modèle étudiée, qui ne contient que des composés volatils, la normalisation interne et la semi-quantification donnent le même résultat. Si des composés non volatils avaient été présents, la normalisation interne aurait entraîné une surestimation de la teneur en volatils.

Tableau 1 : Biais observés lors de la quantification d'une solution modèle par les méthodes de semi-quantification (SQ) et d'étalonnage interne (ISTD) avec détection FID ou MS.

Composés	MS-SQ (%)	FID-SQ (%)	MS-ISTD (%)	FID-ISTD (%)
Acétate d'isoamyle	41.85	19.74	4.02	0.44
Eucalyptol	0.30	8.73	4.78	1.55
Linalol	9.75	12.36	3.06	0.50
4-méthylacétophénone	1.48	11.15	4.14	5.49
Anisaldéhyde	8.08	14.60	1.01	0.90
Citronellol	15.03	7.51	3.16	0.91
Eugénol	17.20	3.90	3.72	1.88
Coumarine	25.52	2.79	4.38	7.34
Décanoate d'éthyle	14.09	0.28	0.51	0.21
β -caryophyllène	41.66	41.79	7.35	4.93
Méthylisoeugénol	23.56	7.48	3.90	1.92
Pentadécane	18.66	29.07	0.22	1.20
Hédione	23.01	12.43	3.30	2.33
<i>Erreur moyenne</i>	<i>6.98</i>	<i>4.88</i>	<i>1.03</i>	<i>0.71</i>

Comme attendu, les résultats obtenus par semi-quantification en MS (MS-SQ, Tableau 1) sont les plus éloignés de la réalité. En effet, en MS, le potentiel d'ionisation diffère d'un composé à l'autre et des conditions expérimentales. Or, les aires des pics MS résultent de la somme des ions provenant de l'ionisation et de la fragmentation des analytes. Pour une même concentration, deux analytes pourront donc donner deux pics aux aires significativement différentes. Normaliser les aires MS ou faire appel à la semi-quantification est donc une aberration. Les résultats obtenus en semi-quantification avec le FID (FID-SQ, Tableau 1) sont un peu meilleurs mais loin d'être satisfaisants avec plus de la moitié des composés quantifiés avec plus de 10% d'erreur dont deux avec 29 et 42% d'erreur. Cela s'explique par le fait que les composés de ce mélange, qui représentent plusieurs familles chimiques, n'ont pas le même facteur de réponse au FID.

A l'inverse, l'étalonnage interne, quel que soit le détecteur (MS-ISTD et FID-ISTD, Tableau 1), a permis de quantifier de façon correcte et comparable la solution modèle. Dans ce cas, les facteurs de réponse ont été déterminés juste avant l'analyse pour chacun des détecteurs. Cependant, dans le cas d'analyse d'extraits plus complexes, et particulièrement dans le cas d'analyse d'huiles essentielles, il ne paraît pas envisageable de déterminer à chaque fois les facteurs de réponse des centaines de composés présents.

La création d'une base de données de de RRF pour le FID et le MS permettrait de résoudre ce problème.

2 Mise en place d'une base de données de facteurs de réponses relatifs

2.1 Stabilité dans le temps des facteurs de réponses relatifs

Le premier critère à vérifier avant de créer une base de données est la stabilité dans le temps des dites données. Il est apparu rapidement que la détection MS ne permettait pas de générer des RRF suffisamment stables puisqu'au bout de deux mois près d'un analyte sur deux voyait sa réponse varier de 15 à 47% lors de mesures sur des solutions fraîches (Tableau 2).

Tableau 2 : Stabilité des RRFs exprimés sous forme de biais par rapport au T0 au bout de 2mois pour le MS ou 6mois pour le FID (Agilent-1). Standard interne= octanoate de méthyle

Composés	Déviations MS (% , 2 mois)	Déviations FID (% , 6 mois)
2-Méthylpyrazine	1.97	0.16
Alcool furfurylique	8.90	-4.22
Heptanal	-30.77	0.11
Limonène	1.02	-1.00
<i>p</i> -Crésol	-0.60	-1.26
Sulfure de diméthyle	-5.65	0.64
4-Méthylacétophénone	-5.64	-6.72
α -Terpinéol	-4.15	-0.76
Hydroxycitronellal	-38.89	-3.59
Formate d'anisyle	-18.59	4.38
Diphénylméthane	-21.62	-1.84
β -Caryophyllène	-15.85	-5.90
Pentadécane	-17.47	-0.42
γ -Undécalactone	-47.68	0.54

Au contraire, au bout de 6mois, les RRF mesurés au FID n'avaient pas dévié de plus de 7%. Cette stabilité dans le temps des RRF au FID a également été démontrée par la bonne corrélation entre les données internes à la société avec celles publiées sur une période de plus de trente ans par divers auteurs (Figure 11).

A cette étape, il a donc été décidé d'écarter l'idée de créer une base de données de RRF en MS et les efforts se sont tournés vers le FID.

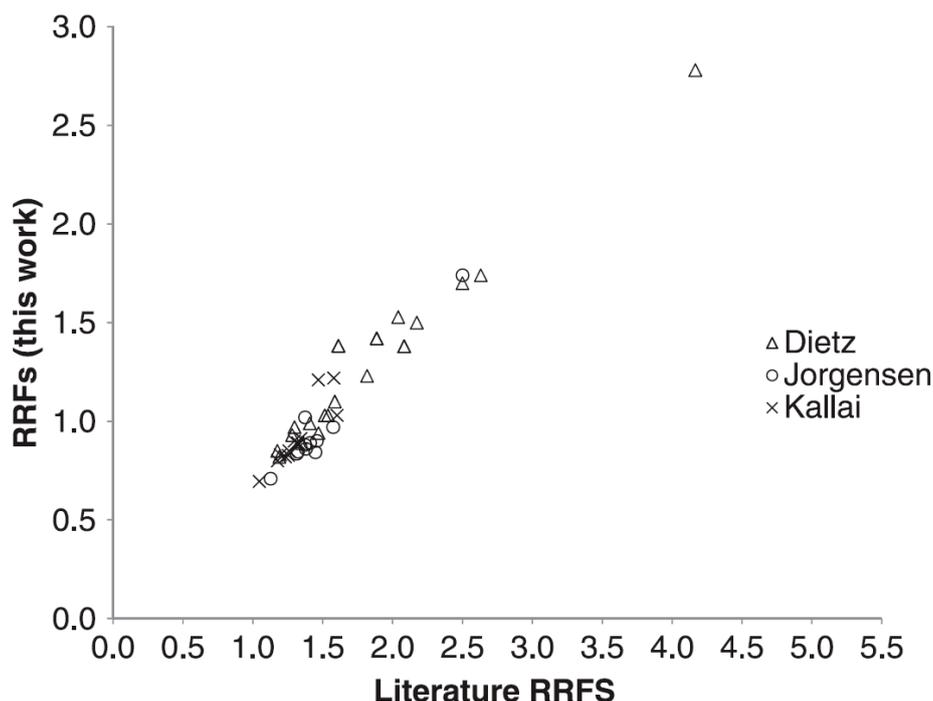


Figure 11 : Représentation des RRF mesurés en interne en fonction de ceux publiés par Dietz^[93], Jorgensen^[119] et Kallai. *Figure reproduite à partir de [139] avec l'accord de Wiley.*

2.2 Impact des conditions analytiques sur les facteurs de réponses relatifs

La réponse du FID peut varier en fonction des conditions analytiques. Selon certaines études, les conditions chromatographiques (gaz vecteur, température de l'injecteur, température du four)^[37,131] ou les conditions du FID (ratio air/hydrogène, débit, température, fournisseur)^[119,125,131,140-142] entraîneraient des variations de réponse.

A notre connaissance, aucune étude exhaustive n'avait été menée pour déterminer l'impact de toutes ces conditions et leur importance relative sur les valeurs de RRF. Avant de créer une base de données de RRF, il est donc apparu comme nécessaire d'estimer quels paramètres pouvaient être limitants.

2.2.1 Fournisseur de l'équipement

Les RRF de plusieurs analytes mesurés dans les conditions standard, sur des équipements différents, se sont montrés assez stables avec des RSD < 10% (Tableau 3). Ce résultat peut paraître surprenant étant donné les différences de géométries de chaque détecteur et de leurs systèmes d'amplification et compte tenu des observations déjà rapportées par Dressler *et al.*^[141] Néanmoins, il semblerait qu'à partir du moment où la linéarité du signal est obtenue, et considérant que les RRF sont des ratios, leur valeur ne dépend plus que des réactions dans la

flamme. Ces conclusions sont cependant à pondérer par le nombre limité d'équipements considérés dans cette étude.

Tableau 3 : Comparaison des valeurs de RRF obtenues avec l'octanoate de méthyle comme standard interne sur différents instruments GC-FID sur une colonne de type DB1.

Composés	Agilent-1	Agilent-2	Carlo Erba	Varian	RSD (%)
2-Méthylpyrazine	1.21	1.08	1.17	1.15	5
Alcool furfurylique	1.34	1.35	1.35	1.34	0
Heptanal	1.01	1.13	1.00	0.98	7
Limonène	0.71	0.69	0.72	0.74	3
<i>p</i> -Crésol	0.85	0.88	0.96	0.77	9
Sulfure de diméthyle	1.57	1.61	1.60	1.50	3
4-Méthylacétophénone	0.77	0.84	0.80	0.76	5
α -Terpinéol	0.86	0.87	0.71	0.79	9
Hydroxycitronellal	1.01	1.16	1.08	0.99	7
Formate d'anisyle	1.32	1.32	1.27	1.14	7
Diphénylméthane	0.67	0.69	0.62	0.61	6
β -Caryophyllène	0.69	0.69	0.70	0.68	1
Pentadécane	0.71	0.71	0.74	0.65	5
γ -Undécalactone	0.93	0.93	1.01	0.87	6

2.2.2 Conditions analytiques

L'impact de 10 paramètres sur les valeurs de RRF a été estimé en faisant appel à un plan d'expériences pour limiter le nombre d'analyses. Les facteurs concernés, ainsi que les niveaux testés, sont détaillés dans le Tableau 4. L'octanoate de méthyle a été choisi comme standard interne pour cette étude car il était déjà employé dans la société pour quantifier par étalonnage interne. Il présente en effet une rétention suffisamment différente de la plupart des composés trouvés au cours des analyses d'arômes et parfums.

Le limonène et le benzoate de benzyle ont été choisis pour mesurer les variations de RRF car ils correspondaient à des ingrédients courants dans le domaine des arômes et parfums et car ils différaient suffisamment de par leur volatilité, leur polarité et leur structure (Figure 12).

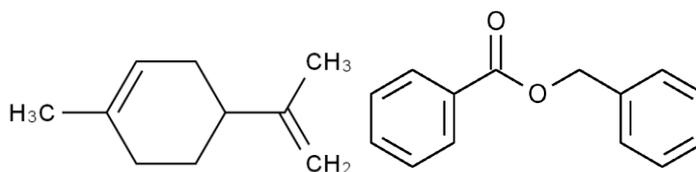


Figure 12 : Structure du limonène (gauche) et du benzoate de benzyle (droite)

Tableau 4 : Plan d'expériences généré par le logiciel NemrodW

Solvant de dilution	T°C du four	T°C inj.	Split	T°C det.	% H2	Q (ml/min)	°C/min	Ratio S/A	Greffage de la colonne
Ethanol	50	200	10	270	8%	300	2	1	DB1 MS
Dichlorométhane	50	200	10	250	8%	500	5	0.5	DB 17 MS
Acétonitrile	50	200	10	270	12%	500	10	2	DB1 MS
Dichlorométhane	50	200	10	250	12%	300	5	0.5	DB 17 MS
Ethanol	50	200	10	270	8%	300	2	1	DB1 MS
Acétonitrile	100	200	100	270	8%	300	2	0.5	DB 17 MS
Dichlorométhane	100	200	100	250	8%	500	2	1	DB1 MS
Ethanol	100	200	100	270	12%	500	5	1	DB 17 MS
Ethanol	100	200	100	250	12%	300	10	0.5	DB1 MS
Dichlorométhane	100	200	100	270	8%	300	5	2	DB1 MS
Ethanol	50	250	100	270	8%	300	5	0.5	DB1 MS
Ethanol	50	250	100	250	8%	500	10	2	DB 17 MS
Dichlorométhane	50	250	100	270	12%	500	2	0.5	DB1 MS
Acétonitrile	50	250	100	250	12%	300	5	1	DB1 MS
Dichlorométhane	50	250	100	270	8%	300	10	1	DB 17 MS
Dichlorométhane	100	250	10	270	8%	300	10	1	DB 17 MS
Acétonitrile	100	250	10	250	8%	500	5	1	DB1 MS
Dichlorométhane	100	250	10	270	12%	500	2	0.5	DB1 MS
Ethanol	100	250	10	250	12%	300	2	2	DB 17 MS
Ethanol	100	250	10	270	8%	300	5	0.5	DB1 MS
Dichlorométhane	50	200	10	270	8%	300	5	2	DB1 MS
Ethanol	50	200	10	250	8%	500	10	0.5	DB1 MS
Ethanol	50	200	10	270	12%	500	5	1	DB 17 MS
Dichlorométhane	50	200	10	250	12%	300	2	1	DB1 MS
Acétonitrile	50	200	10	270	8%	300	2	0.5	DB 17 MS

T°C : Température en °C, inj. : injecteur, det. : détecteur, Q : débit d'air, °C/min : rampe de T°C, Ratio S/A : ratio de concentration entre le standard et l'analyte

Avant de tester les conditions définies dans le plan d'expérience, il a été vérifié que la répétabilité de mesure des RRF pour ces deux analytes était suffisante dans les conditions standard d'analyse. Le limonène présentait en effet un RRF de 0.71 avec une RSD de 0.25% sur la base de trois mesures. Dans le cas du benzoate de benzyle, le RRF mesuré était de 0.88 avec une RSD de 0.43%. Les RRF de ces deux analytes ont ensuite été mesurés dans les conditions du plan d'expérience. Les valeurs moyennes de RRF (0.76 et 0.76), sur 25 expériences, ainsi que les RSD associées (6 et 12%) suggèrent un impact significatif de certaines conditions expérimentales testées.

A partir des graphes de Pareto, et en prenant comme critère de significativité une valeur de $p < 5\%$, les facteurs suivants sont apparus comme importants pour la détermination des RRF (Figure 13) :

- Pour les deux analytes : le type de phase et la température du détecteur ;
- Pour le benzoate de benzyle : la température de l'injecteur et le ratio de split ;

- Pour le limonène : le ratio air/hydrogène et le débit d'air dans la flamme.

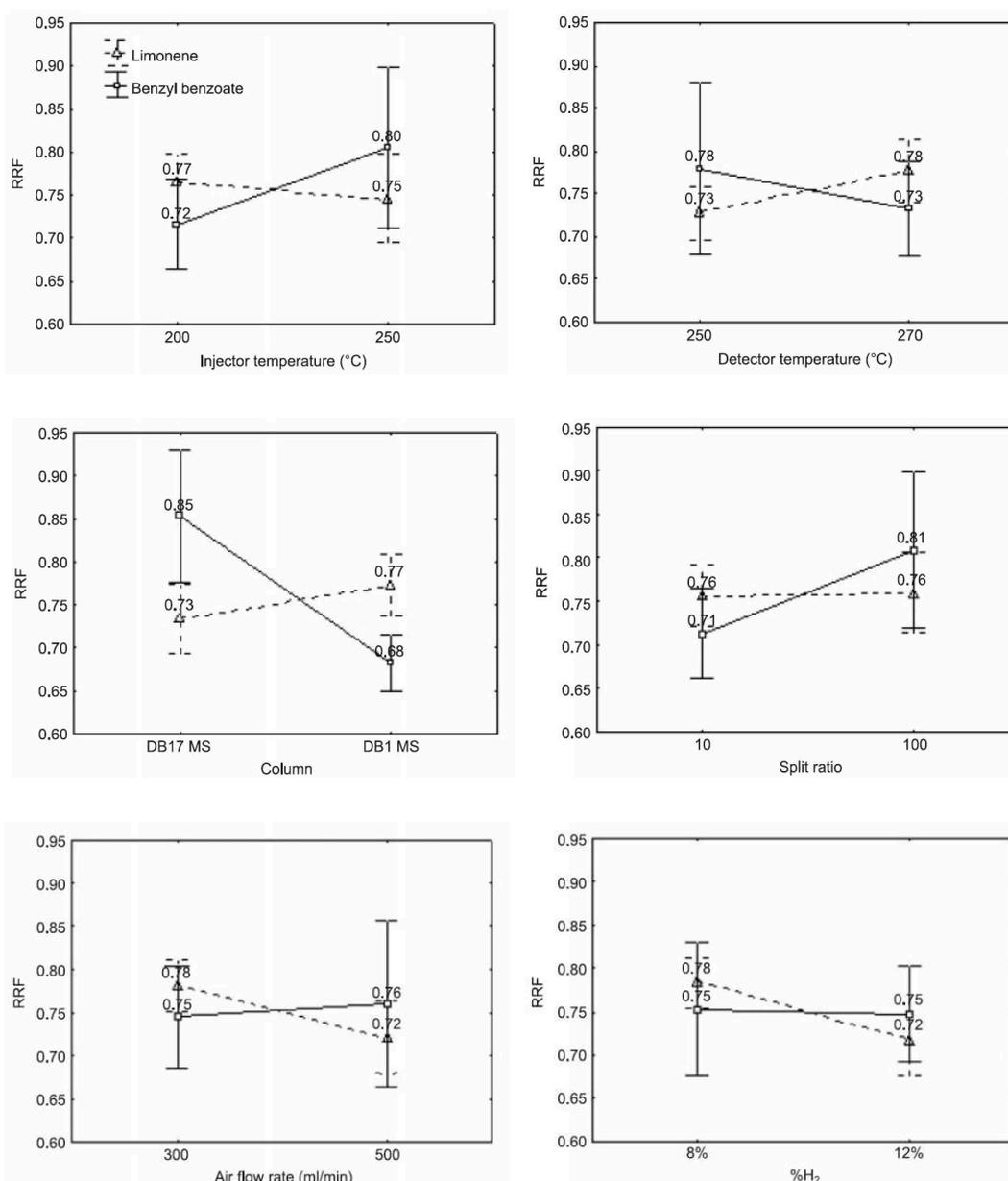


Figure 13 : Variations de RRF les plus importantes observées pendant le plan d'expérience ($p < 5\%$). (Standard interne= octanoate de méthyle). Figure reproduite à partir de [139] avec l'accord de Wiley.

Il est ressorti de cette étude que le solvant d'injection (éthanol ou acétonitrile ou dichlorométhane), la rampe de température pendant l'élution ou le ratio entre les analytes et leur standard interne, n'avaient pas d'impact significatif sur la valeur des RRF des deux analytes. Cependant, ces observations sont à limiter aux conditions testées lors de ce plan d'expérience.

Les facteurs importants mis en avant lors du plan d'expérience ont été évalués de façon individuelle afin de confirmer leur importance et de comprendre en quoi ils pouvaient influencer les valeurs de RRF.

2.2.2.1 Type de phase

Le RRF des deux analytes a été mesuré dans les conditions standard d'analyse en faisant appel à trois colonnes différentes : type DB1, type DB17 et type DB-WAX (Figure 14).

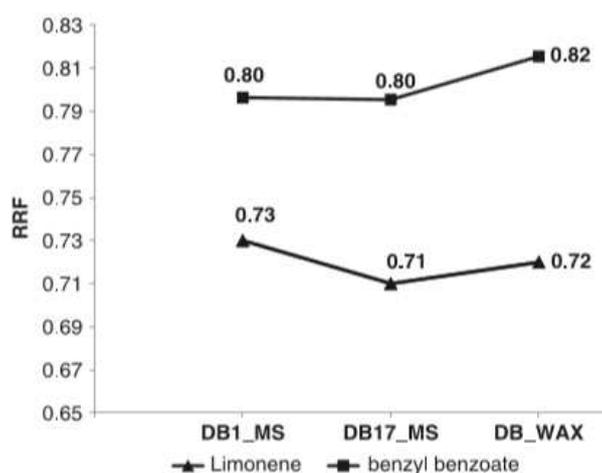


Figure 14 : RRF mesurés pour le limonène et le benzoate de benzyle dans les conditions standard d'analyse, sur trois colonnes différentes (Standard interne= octanoate de méthyle). Figure reproduite à partir de [139] avec l'accord de Wiley.

Dans ces conditions, les RRF semblent assez stables contrairement à ce qui avait été observé lors du plan d'expérience (Figure 13), au cours duquel tous les facteurs variaient simultanément. Mais même dans les conditions standard, les expériences ne sont pas totalement comparables. En effet, sur les trois colonnes, pour un programme de température identique, un même analyte élue à un temps de rétention différent, donc avec une température associée différente. Pour s'affranchir du facteur température, les expériences ont cette fois été réalisées en mode isotherme à différentes températures entre 50°C et 250°C (Figure 15). Il apparaît alors clairement qu'à la fois le type de colonne et la température jouent un rôle sur les valeurs de RRF mesurées.

Sur la colonne de type DB-1, les RRF mesurés, quelle que soit la température du four, sont relativement constants pour les deux analytes. Par contre, lorsque l'on considère les résultats obtenus sur la colonne DB-WAX, une tendance à la hausse est observée lorsque la température du four augmente.

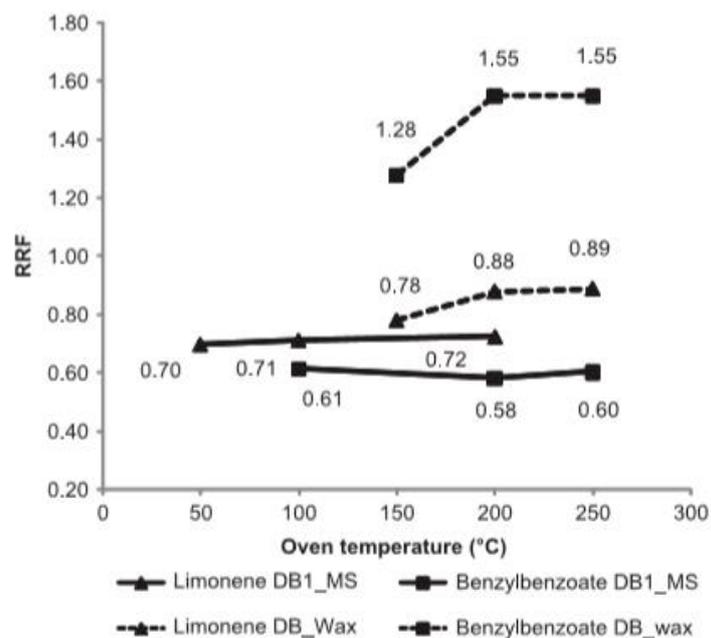


Figure 15 : RRF mesurés pour le limonène et le benzoate de benzyle sur colonne de type DB1 et de type DB-WAX en fonction de la température du four (Standard interne = octanoate de méthyle). Figure reproduite à partir de [139] avec l'accord de Wiley.

Kallai *et al.* avaient déjà rapporté l'influence de la température sur les valeurs des ECN. [131] Le fait d'augmenter la température va rendre les pics chromatographiques plus fins et plus hauts. Le signal sur bruit sera ainsi modifié en fonction de la température et les pics éluant plus tardivement auront une aire plus faible à cause de cet effet de température. Cependant dans le cas de notre étude, les RRF augmentent avec la température surtout entre 150 et 200°C (Figure 15). Or si la température est plus importante, le standard et les deux analytes étudiés élueront plus tôt à 200°C qu'à 150°C et donneront des pics plus fins et des aires théoriquement plus grandes. Le RRF étant un ratio, la seule façon d'expliquer son augmentation est que l'aire du standard augmente plus vite que celle de l'analyte. Les LRI de l'octanoate de méthyle, du limonène et du benzoate de benzyle sont respectivement de 1108, 1017 et 1709 sur colonne de type DB-1 et 1386, 1199 et 2613 sur colonne de type DB-WAX. Il est donc facilement concevable que l'aire du benzoate de benzyle augmente moins vite que celle du standard interne si l'on admet l'hypothèse de Kallai [131] et donc cela explique que le RRF augmente. Cependant dans le cas du limonène, qui élue avant l'octanoate de méthyle, l'explication n'est plus plausible. D'autre part, sur colonne de type DB1, les RRF sont assez stables quelle que soit la température. Il est donc possible que les interactions des analytes avec la phase stationnaire, donc la polarité de l'analyte, rentrent également en jeu. En effet, les interactions entre les deux esters et la phase stationnaire de type DB-WAX sont plus importantes que celle du monoterpène comme

l'attestent les écarts de LRI entre les phases DB-1 et DB-WAX qui sont plus significatifs dans les deux premiers cas (+278 pour l'octanoate de méthyle, +904 pour le benzoate de benzyle, +182 pour le limonène). Il est donc possible d'émettre l'hypothèse que deux composés éluant à un temps de rétention équivalent en mode isotherme (donc à une température donnée), présentent des largeurs de pics différentes selon leur interaction avec la phase stationnaire. L'aire du limonène pourrait donc augmenter plus vite que celle du standard ce qui expliquerait l'augmentation du RRF avec la température.

L'impact de la phase stationnaire seul peut être observé sur la Figure 15 en comparant les RRF obtenus sur les deux colonnes pour une température donnée. Pour les deux analytes, les RRF mesurés sur la colonne DB-WAX sont plus importants que sur la colonne DB-1. Or, la comparaison de près de 400 couples de valeurs de RRF, mesurés sur DB-1 ou DB-WAX dans les conditions standard, a mis en évidence seulement 3.5% d'analytes présentant une différence supérieure à 10% entre les deux valeurs. L'impact de la phase stationnaire pourrait donc être compensé par l'impact de la température mais cela reste une hypothèse non vérifiée.

2.2.2.2 Température de l'injecteur

Lors de l'étude par plan d'expérience, la température de l'injecteur était apparue comme un facteur important (Figure 13). Ces résultats allaient à l'encontre des observations de Kallai *et al.* ^[131] en mode d'injection split. De nouvelles expériences réalisées en augmentant la température de l'injecteur, dans les conditions standard, ont montré que seules les valeurs obtenues pour le benzoate de benzyle étaient impactées (Figure 16). Le RRF du benzoate de benzyle augmente quand la température de l'injecteur augmente, en mode split. Le RRF du limonène reste stable ce qui suggère un même comportement que celui du standard interne utilisé.

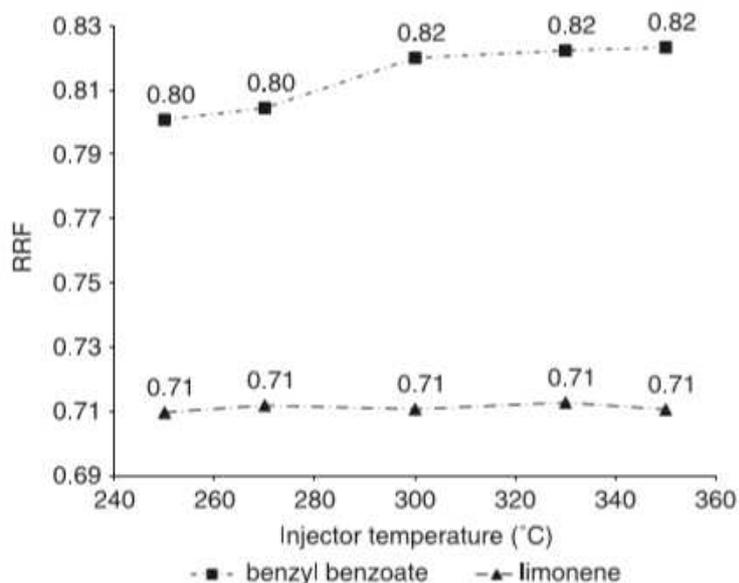


Figure 16 : RRF mesurés pour le limonène le benzoate de benzyle sur colonne de type DB-17, en condition standard, en fonction de la température de l'injecteur (Standard interne= octanoate de méthyle). *Figure reproduite à partir de [139] avec l'accord de Wiley.*

Les mêmes expériences réalisées en mode splitless ont confirmé la valeur stable de RRF pour le limonène mais cette fois une baisse du RRF du benzoate de benzyle de 0.18 unités entre 250 et 350°C. Ces observations de variation de RRF n'affectant que le benzoate de benzyle semblent être en accord avec l'existence d'une discrimination des composés les moins volatils dans l'injecteur reportée par Grob.^[143] Le fait d'augmenter la température permettrait de faire entrer plus d'analyte dans la colonne, en mode splitless, sans totalement empêcher la discrimination. En mode split, il se pourrait que la variation des RRFs du benzoate de benzyle soit due à l'action combinée la température de l'injecteur avec celle du split dans l'injecteur, qui fait l'objet du point suivant de cette étude.

Ces observations pourraient donc limiter l'utilisation de bases de données de RRF à des conditions fixes d'injection en évitant notamment les injecteurs de type PTV (*Programmed Temperature Vaporizator* en Anglais) même si cela n'a pas été vérifié dans cette étude.

2.2.2.3 Ratio de split

Lors du plan d'expérience, seul le RRF du benzoate de benzyle semblait être impacté par le ratio de split (Figure 13). Cela a été confirmé, dans les conditions standard d'analyse (Figure 17).

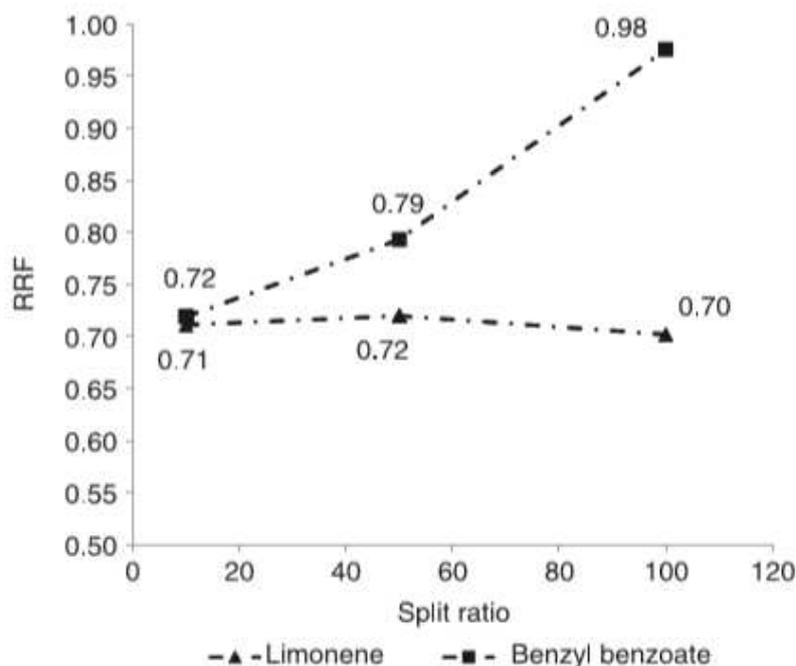


Figure 17 : RRF mesurés pour le limonène le benzoate de benzyle sur colonne de type DB-17, en condition standard, en fonction du ratio de split (Standard interne= octanoate de méthyle). *Figure reproduite à partir de [139] avec l'accord de Wiley.*

Ces observations semblent conforter le rôle du point d'ébullition lorsque ce dernier est plus important que la température de l'injecteur. Le fait que seul le RRF du benzoate de benzyle augmente avec le ratio de split pourrait s'expliquer par le fait que ce dernier demande plus de temps pour s'évaporer que son standard. Dans le cas du limonène et de l'octanoate de méthyle, les volatilités doivent être suffisamment proches pour entraîner un comportement identique dans l'injecteur. Cela suggère qu'un temps d'évaporation important et un large ratio de split favorise le rejet des analytes les moins volatils par la purge du split entraînant une aire FID moins grande pour ces derniers et donc un RRF plus grand. La création d'une base de données de RRF doit donc être faite dans des conditions de split définies qui devront être les mêmes que celles appliquées lors de l'analyse des extraits.

2.2.2.4 Température du détecteur à ionisation de flamme

Lors du plan d'expérience, le RRF des deux analytes cibles était modifié en fonction de la température du détecteur (Figure 13). Les expériences, réalisées en conditions standard, en faisant varier la température du détecteur de 250 à 350°C confirment cette tendance uniquement dans le cas du benzoate de benzyle (Figure 18).

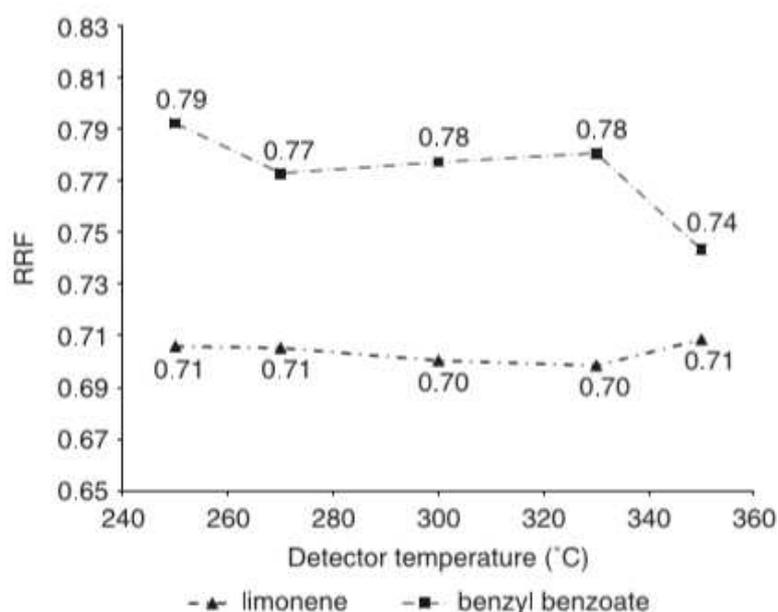


Figure 18 : RRF mesurés pour le limonène le benzoate de benzyle sur colonne de type DB-17, en condition standard, en fonction de la température du FID (Standard interne= octanoate de méthyle). Figure reproduite à partir de ^[139] avec l'accord de Wiley.

Dressler *et al.* avaient déjà reporté un impact significatif de la température du FID sur la réponse absolue et relative des analytes étudiés.^[141] Les auteurs n'avaient cependant proposé aucune explication à leur observation mis à part le possible impact de la géométrie du détecteur. Kallai *et al.* avaient quant à eux postulé une probable condensation partielle de l'analyte dans le détecteur lorsque la température appliquée est inférieure à celle du point d'ébullition du dit analyte.^[131] Dans le cas du benzoate de benzyle, le point d'ébullition est de 320°C. Celui du standard interne, l'octanoate de méthyle, est de 193°C. Selon la théorie de Kallai, en dessous de 320 degrés, la quantité de benzoate de benzyle détectée sera donc inférieure à celle théoriquement injectée. L'aire obtenue sera plus faible que celle théoriquement attendue et elle augmentera en même temps que la température jusqu'à être maximale quand la température dépassera les 320°C. Par contre la réponse du standard interne ne sera pas impactée quelle que soit la température. Il en résulte donc un RRF du benzoate de benzyle qui diminue quand la température du FID augmente. Le limonène, qui a un point d'ébullition de 176°C aura le même comportement que le standard interne et ne verra pas son RRF varier en fonction de la température du FID.

En vue de la création d'une base de données de RRF et de son utilisation pour quantifier des mélanges complexes, la température du FID devra donc être fixée ou à minima bornée.

2.2.2.5 Débit d'air et d'hydrogène

Il est déjà admis que la réponse du détecteur FID est fonction du débit d'air et d'hydrogène dans la flamme. El Naggar a par exemple démontré que la réponse du FID était maximale pour le pentane lorsque le débit d'hydrogène était proche de 40ml/min et celui de l'air proche de 450ml/min.^[140] Cependant, le ratio optimal entre air et hydrogène pourrait varier légèrement d'un composé à un autre. C'est ce que semble démontrer les expériences réalisées dans cette étude (Figure 13). Il ne paraît pas envisageable de régler ce ratio pour chaque analyte lors de l'analyse de mélange complexe. Aussi, il paraît pertinent de trouver le compromis permettant de maximiser le signal de la majorité des analytes. Lors de la présente étude, un débit de 450ml/min d'air et un ratio de 10% avait été appliqué mais il semble qu'un débit de 400ml/min et ratio de 9% donne des résultats équivalents (*étude interne*).

2.2.2.6 Autres paramètres non considérés dans cette étude

2.2.2.6.1. Type de liner

Il est possible de se demander si la géométrie du liner ne pourrait pas avoir un impact sur les RRF si on considère les résultats d'une étude de la société Restek.^[144] En effet certains liners sont optimisés pour limiter la discrimination des composés les moins volatils. Or l'étude sur la mise en place de la base de données de RRF a été faite avec un liner split classique. D'ailleurs, quelques années après cette étude, Tissot *et al.* ont confirmé cette hypothèse dans le cas des « cup liners » non adaptés à l'utilisation des RRF tels que mesurés dans cette étude.^[145]

2.2.2.6.2. Solvant de dilution

Seuls trois solvants de dilution (éthanol, dichlorométhane, acétonitrile) ont été évalués lors du plan d'expérience car il s'agissait des solvants les plus utilisés au sein du laboratoire. Ce facteur n'était pas apparu comme significatif lors de l'étude par rapport aux autres facteurs considérés. Cependant, considérant les discriminations dans l'injecteur en fonction de la volatilité des analytes, il est probable que la volatilité du solvant de dilution et sa propension à la dilatation dans le liner puissent avoir un impact sur les facteurs de réponses de certains analytes en jouant sur leur discrimination dans le liner.

D'ailleurs quelques années après notre étude, Tissot *et al.* ont mesuré les RRF de certains allergènes de parfumerie en fonction du solvant de dilution (dichlorométhane, acétate d'éthyle,

pivalate de méthyle et toluène) et il semblerait qu'un solvant de dilution trop volatil entraîne une diminution des RRF. ^[146]

2.3 Conclusions sur la création d'une base de données de facteurs de réponses relatifs

En conclusion, certaines conditions analytiques semblent avoir un impact sur les RRF. Toutes les observations faites dans cette étude soulignent l'importance de choisir un standard interne assez proche de l'analyte à doser. En effet, dans la majorité des cas, le RRF du limonène était stable, quelle que soit les conditions testées, et ceci peut s'expliquer par le fait que même si sa réponse absolue (aire FID) pouvait être impactée par certains paramètres, celle du standard l'était de la même façon. Par contre, dans le cas du benzoate de benzyle, les RRF étaient fortement impactés probablement parce que le comportement des deux analytes est différent. Il est facile d'expliquer cela par la différence de volatilité des deux analytes mais peut-être que d'autres paramètres, notamment structurels, rentrent en jeu. Cependant, le but de cette étude n'était pas de comprendre tous les mécanismes mis en jeu dans la détection mais de vérifier la possibilité de mettre en place une base de données de RRF. Dans ce contexte, il a été démontré que ce type de base de données n'est pas viable en MS mais qu'elle est possible avec le FID. Dans des conditions analytiques définies en effet, les valeurs de RRF obtenues avec le FID sont suffisamment stables dans le temps et identiques d'un équipement à un autre. Il faudra cependant s'assurer que les conditions d'analyse d'un extrait, en vue de la détermination de sa composition, seront les mêmes que celles utilisées pour créer la base de données. En particulier, les conditions de détection (température du FID, composition de la flamme) devront être fixées mais également celles de l'injection (split, température d'injection, liner, solvant d'injection).

Suite à ces observations, une base de données contenant 300 RRF, créée dans l'un des laboratoires de la société, a pu être partagée avec les autres laboratoires d'analyse en interne. Les analyses quantitatives ont pu dès lors être effectuées de façon standardisée d'un laboratoire à l'autre sans avoir besoin de remesurer les RRF dans chaque laboratoire. Cette base de données a été créée en utilisant l'octanoate de méthyle comme standard interne. Dans le cas où ce dernier est présent dans l'extrait à quantifier, il faudra faire appel à un autre étalon interne. Pour obtenir les nouvelles valeurs de RRF, il suffira de corriger les valeurs pour l'octanoate de méthyle

avec le RRF de l'étalon 2. La validité de cette approche est facilement démontrée en comparant les valeurs « translitées » avec celles directement mesurées.

3 Prédiction des facteurs de réponses relatifs à partir des enthalpies de combustion

3.1 Justification de la création du modèle de prédiction à partir des enthalpies de combustion

La base de RRF créée n'était pas exhaustive, même si elle permettait de doser la majorité des analytes rencontrés dans le domaine des arômes et parfums. Il est arrivé certains cas pour lesquels le RRF n'étaient pas dans la base. Deux stratégies s'offraient alors : mesurer le RRF manquant ou essayer de le prédire. En effet, dans certains cas, la mesure est impossible car l'analyte n'est pas commercial ou sa pureté est insuffisante.

Parmi les stratégies permettant de prédire les facteurs de réponse déjà détaillées, celle basée sur les ECN a été abandonnée car elle nécessitait une mesure des ECN_i ce qui paraissait trop fastidieux.

L'approche basée sur la similarité de structure semblait plus facilement applicable. Cette stratégie appliquée par Costa *et al.* ^[124] propose d'utiliser un facteur de réponse moyen pour une famille chimique donnée. Les limites de cette proposition pourraient cependant venir des différences de réponse du FID en fonction de la volatilité de l'analyte qui a été mise en avant lors du plan d'expériences.

Par exemple, si l'on considère les RRF des esters éthyliques en fonction de la longueur de la chaîne ester, il apparaît clairement que le RRF est plus élevé et qu'il varie énormément pour les courtes chaînes avant de se stabiliser (bien qu'une tendance à la baisse soit suspectée) lorsque la chaîne ester comprend plus de 7 carbones (Figure 19). Le point d'ébullition de l'octanoate de méthyle, utilisé comme standard interne est de 193°C ce qui est assez proche du point d'ébullition de l'heptanoate d'éthyle (188°C). Il y a donc probablement un lien entre la différence de volatilité des esters et du standard sans que nous ne puissions le démontrer formellement.

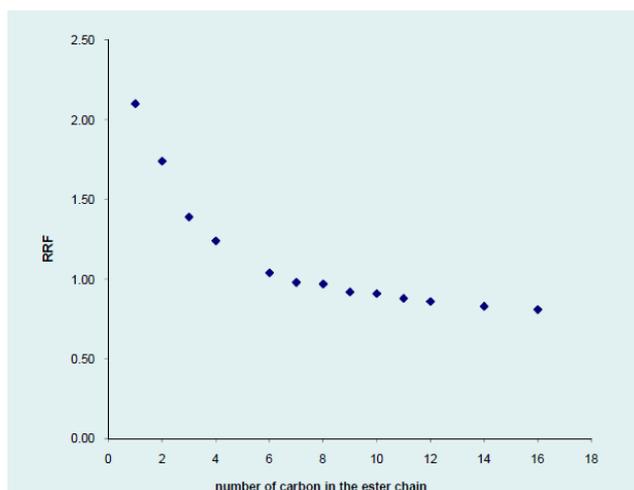


Figure 19 : Valeurs de RRF mesurés sur colonne DB1, en conditions standard pour les esters éthyliques et représentées en fonction de la longueur de la chaîne ester. (Standard interne = octanoate de méthyle)

Si les données sont représentées autrement, c'est-à-dire en corrélant la masse molaire corrigée par le RRF avec le nombre de carbones dans la chaîne ester, il est alors possible de démontrer une relation parfaitement linéaire (Figure 20).

Cette relation pourrait donc être utilisée pour prédire la valeur de RRF d'un ester manquant. L'existence de cette fonction de réponse limite donc l'approche de similarité proposée par Costa *et al.* [124] aux composés présentant un nombre de carbone assez similaire, pour une famille chimique donnée. Ces observations mettent toutefois en avant la possibilité de mettre en place un modèle de prédiction des RRF qui ne soit pas aussi compliqué que ceux déjà détaillés.

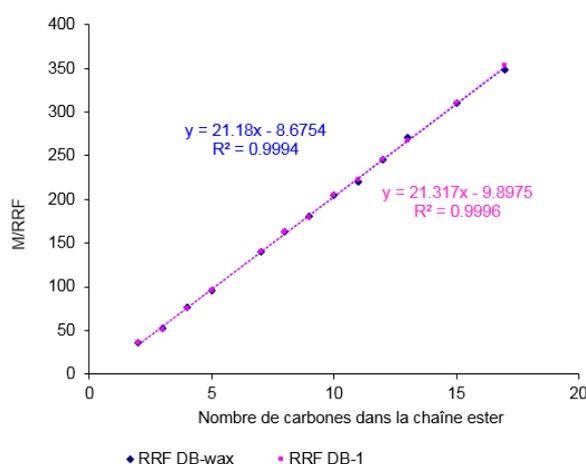


Figure 20 : Représentation du ratio entre la masse molaire (M) et les valeurs de RRF mesurés sur colonne DB-1 (bleu) et DB-WAX (rose), en conditions standard pour les esters éthyliques et représentées en fonction de la longueur de la chaîne ester. (Standard interne = octanoate de méthyle)

Même si le mécanisme exact du détecteur FID n'est pas vraiment élucidé, il n'en reste pas moins que tout est basé sur une combustion dans la flamme. C'est sur ce constat qu'il a été décidé de vérifier si une relation existait entre le facteur de réponse du FID et l'enthalpie de combustion de l'analyte (ΔH_{comb}).

3.2 Etapes de la mise en place du modèle

La mise en place d'un modèle QSPR (*Quantitative Structural Property Relationship* en Anglais) se fait généralement en trois étapes au minimum. D'abord les descripteurs moléculaires sont choisis dans le cas de composés dont les propriétés sont connues. Ensuite une étape de régression est appliquée pour établir une relation linéaire entre la propriété et les descripteurs. Enfin le pouvoir de prédiction du modèle est vérifié au travers d'une étape de validation.

Dans le cas de cette étude, la propriété à prédire est le RRF et une relation avec ΔH_{comb} est recherchée. Sur les 300 composés présents dans la base de RRF, 284 couples de valeurs mesurées à la fois sur colonnes DB-1 et DB-WAX ont pu être utilisées pour construire le modèle (set d'apprentissage).

Pour l'étude, le paramètre MRF (pour *Molecular Response Factor* en Anglais) a été étudié à la place du RRF. En effet la valeur MRF permet de s'affranchir de la masse molaire de l'analyte et du standard et de ne prendre en compte que les molarités. Les deux paramètres sont liés selon l'équation 20.

Équation 20 : Relation entre MRF et RRF

$$MRF = \frac{1}{RRF} \times \frac{M_{\text{comp}}}{M_{\text{STD}}}$$

Avec comp= l'analyte et STD=standard

Si les valeurs expérimentales de ΔH_{comb} peuvent se trouver dans la littérature, très peu de données sont disponibles pour les composés du domaine des arômes et parfums. Il existe cependant des méthodes (DFT et ab-initio) pour prédire ces ΔH_{comb} à partir des données thermochimiques de l'analyte.^[34] La première étape de cette étude a donc été de calculer les enthalpies de combustion des analytes.

La seconde étape a été de vérifier s'il y avait une corrélation entre ces ΔH_{comb} et les MRF mesurés en faisant appel à une étude de régression pour générer un modèle pour les 284 composés de

la base. La troisième étape a consisté en la prédiction des valeurs de MRF à partir du modèle généré pour une soixantaine de composés non inclus dans la base pour estimer le pouvoir prédictif du modèle. Au cours de la quatrième et dernière étape le modèle a été affiné en réinjectant ces derniers composés dans le modèle avant de proposer une équation finale permettant de prédire les RRF.

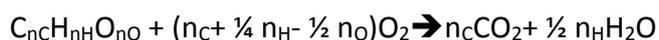
3.3 Estimation des valeurs d'enthalpie de combustion

Deux stratégies différentes ont été appliquées pour prédire les ΔH_{comb} . La première consistait à faire appel aux calculs d'énergies DFT (B3LYP/ 6-31G**) tandis que la deuxième se basait sur la seule composition chimique de la molécule.

3.3.1 Estimation de l'enthalpie de combustion avec l'énergie DFT (B3LYP/ 6-31G**)

Une liste de 51 valeurs de ΔH_{comb} expérimentales liées à des composés présentant des fonctions chimiques différentes a été extraite de la littérature.^[147] Etant donné que les composés sont à l'état gazeux dans le FID, seul cet état a été considéré pour les calculs. L'enthalpie de combustion correspond à la différence d'énergie DFT (B3LYP/ 6-31G**) entre les produits de départ et ceux qui sont formés.

Dans le cas d'un composé de type $C_nH_nO_n$ qui brûlerait selon la réaction suivante :



On aurait donc une enthalpie de combustion calculable selon l'équation 21.

Équation 21 : Enthalpie de combustion

$$H_{comb} = E_{comp} - n_C E_{CO_2} - \frac{n_H}{2} E_{H_2O} + (n_C + \frac{n_H}{4} - \frac{n_O}{2}) E_{O_2}$$

Avec E les énergies et n le nombre d'atomes impliqués dans la réaction de combustion

Lorsque les valeurs prédites avec l'équation 21, pour les 51 composés, ont été comparées aux valeurs réelles, il est apparu une sous-estimation systématique. Il a été supposé que cela était dû au manque de précision du calcul de l'énergie des petites molécules avec cette méthode. Pour cette raison, les énergies du réactant O_2 mais également des produits de combustion ont

été optimisées en minimisant la différence au carré des données expérimentales versus théoriques (Tableau 5).

Tableau 5 : Energies DFT calculées et corrigées

	DFT energy	corrected energy
H ₂ O(g)	-76.41971	-76.43597
CO ₂	-188.58093	-188.58299
O ₂ triplet	-150.31613	-150.31202
N ₂	-109.52411	-109.53234
SO ₂	-548.58753	-548.62274
HF	-100.42745	-100.44751
HCl	-460.80080	-460.80705
Br ₂	-26.30981	-26.31501
I ₂	-22.77042	-22.78512

Les énergies sont exprimées en Hartree avec 1 Hartree=627.5kcal/mol. Reproduit à partir de ^[148] avec l'accord d'ACS publications.

Grâce à cette correction qui semble mineure, puisque n'affectant que la troisième décimale, une excellente corrélation a ensuite été obtenue entre les 51 valeurs de ΔH_{comb} expérimentales et théoriques (Figure 21). Pour le reste de l'étude, ces valeurs corrigées ont donc été utilisées.

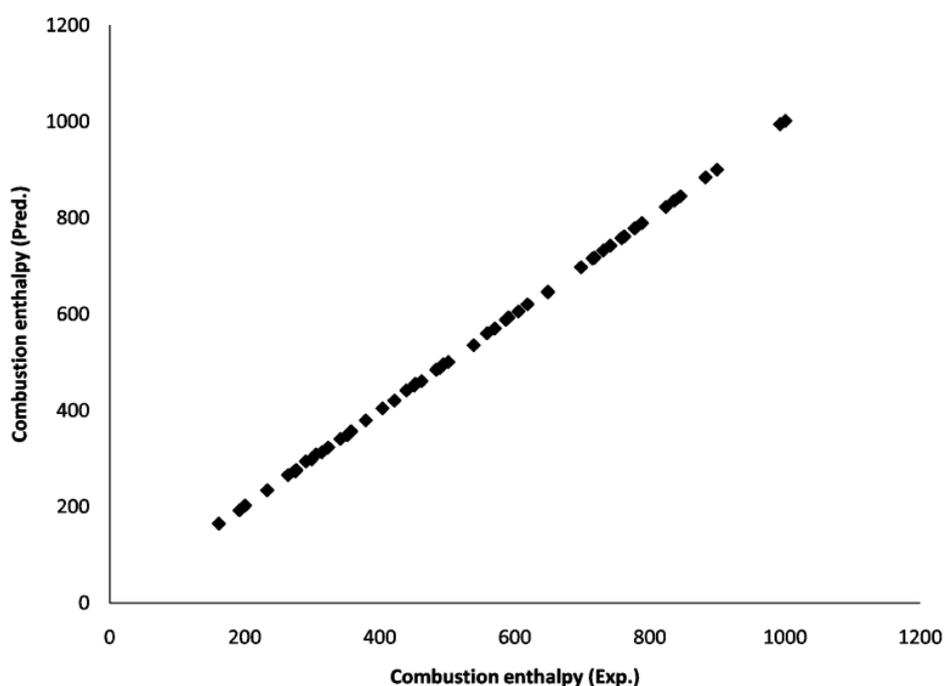


Figure 21 : Représentation des enthalpies de combustions prédites (kcal/mol) en fonction des enthalpies de combustion expérimentales (kcal/mol) pour les 51 composés du modèle. Figure reproduite à partir de ^[148] avec l'accord d'ACS publications.

A partir de la corrélation entre les 51 valeurs théoriquement reportées, l'énergie DFT (B3LYP/ 6-31G**) et les atomes présents, une nouvelle équation de prédiction de ΔH_{comb} a ainsi pu être proposée (Equation 22).

Équation 22 : Enthalpie de combustion calculée à partir de l'énergie DFT (en Kcal)

$$\begin{aligned} \Delta H_{comb}^{DFT} = & 627.5E_{comp} + 24015.0(n_C) + 401.6(n_H) + 47160.4(n_O) + 34365.8(n_N) \\ & + 249940.0(n_S) + 62629.2(n_F) + 288754.8(n_{Cl}) + 8256.3(n_{Br}) \\ & + 7148.8(n_I) \end{aligned}$$

Avec E l'énergie DFT et n les nombres d'atomes concernés

3.3.2 Estimation de ΔH_{comb} à partir de la seule composition chimique

L'équation 28 fait appel aux énergies DFT au travers du paramètre « E ». Or les calculs d'énergie DFT (B3LYP/ 6-31G**) ne sont pas forcément facilement accessibles dans tous les laboratoires. C'est pourquoi une estimation alternative de ΔH_{comb} a été proposée. Le terme « E » a donc été retiré de l'équation 22 et l'équation 23 a été finalement obtenue après optimisation pour minimiser les différences au carré observées entre les valeurs prédites et expérimentales pour les 51 composés.

Équation 23 : Enthalpie de combustion calculée à partir de la formule chimique (MF pour *molecular formula* en Anglais)

$$\begin{aligned} \Delta H_{comb}^{MF} = & 11.06 + 103.57(n_C) + 21.85(n_H) - 48.18(n_O) + 7.46(n_N) + 74.67(n_S) \\ & - 23.57(n_F) - 27.44(n_{Cl}) - 11.90(n_{Br}) - 2.04(n_I) \end{aligned}$$

Avec n les nombres d'atomes concernés

3.3.3 Comparaison des deux approches prédictives de l'enthalpie de combustion

Le modèle de prédiction des ΔH_{comb} à partir de la formule chimique présente une plus grande variance que celle obtenue avec le modèle DFT (Tableau 6). Ces résultats étaient attendus car le modèle MF est une simplification du modèle DFT. Cependant les performances des deux modèles de prédiction des ΔH_{comb} sont jugées suffisantes puisqu'une différence de 6 Kcal/mol est considérée comme négligeable en comparaison avec l'énergie de combustion d'une molécule généralement de l'ordre de 1000 kcal/ mol. C'est pourquoi ils ont tous les deux été pris en compte pour l'élaboration du modèle de prédiction des RRF.

Tableau 6 : Comparaison de performance des modèles de prédiction de ΔH_{comb} selon la méthode DFT ou MF (pour *molecular formula* en Anglais) pour les 51 composés

	Modèle DFT	Modèle MF
Coefficient de détermination	0.999	0.999
Variance (Kcal/mol)	1.66	6.68

3.4 Vérification de la relation entre enthalpie de combustion et facteurs de réponses relatifs

Lorsque les valeurs des 284 MRF de la base de données ont été représentées en fonction de des ΔH_{comb} , calculées selon les deux modèles, une très bonne corrélation a été obtenue (Figure 22). Mais il a également été mis en évidence que les composés porteurs d'un noyau aromatique présentaient des valeurs décalées par rapport à ceux n'en portant pas.

Cette différence pourrait venir du fait que les dérivés aromatiques n'ont pas le même comportement dans la flamme que les autres composés.

Si l'on part du principe que l'ion primaire qui est détecté dans le FID est bien HCO^+ , alors l'enthalpie effective (ΔH_{eff}), mesurée par le détecteur sera obtenue selon l'équation 24 dans le cas d'une combustion incomplète.

Équation 24 : Enthalpie effective mesurée par le FID

$$\Delta H_{\text{Eff}} = \Delta H_{\text{Comb}} - n_{\text{C}} \Delta H_{\text{HCO}^+ \rightarrow \text{CO}_2}$$

Avec n_{c} le nombre de carbones de l'analyte, ΔH_{comb} l'enthalpie de combustion de l'analyte, $\Delta H_{\text{HCO}^+ \rightarrow \text{CO}_2}$ l'enthalpie de combustion de HCO^+ selon la réaction $\text{HCO}^+ + 5/4 \text{O}_2 + \text{e}^- \rightarrow \text{CO}_2 + 1/2 \text{H}_2\text{O}$

L'ion CHO^+ n'est peut-être pas l'espèce majoritaire dans le cas des composés aromatiques. Nicholson *et al.* avaient déjà rapporté que dans le cas de la combustion du benzène, les ions cyclopropyles étaient majoritaires dans certaines régions de la flamme du FID.^[39] Dans ce cas l'équation 30 ne serait plus valable au profit de l'équation 25.

Équation 25 : Relation supposée entre MRF et RRF dans le cas de composés aromatiques

$$\Delta H_{\text{Eff}} = \Delta H_{\text{Comb}} - n_{\text{C}} \Delta H_{1/3\text{C}_3\text{H}_3^+ \rightarrow \text{CO}_2}$$

C'est pour cette raison qu'il a été décidé de prendre en compte le nombre de noyau aromatiques dans la formule liant les MRF aux ΔH_{comb} .

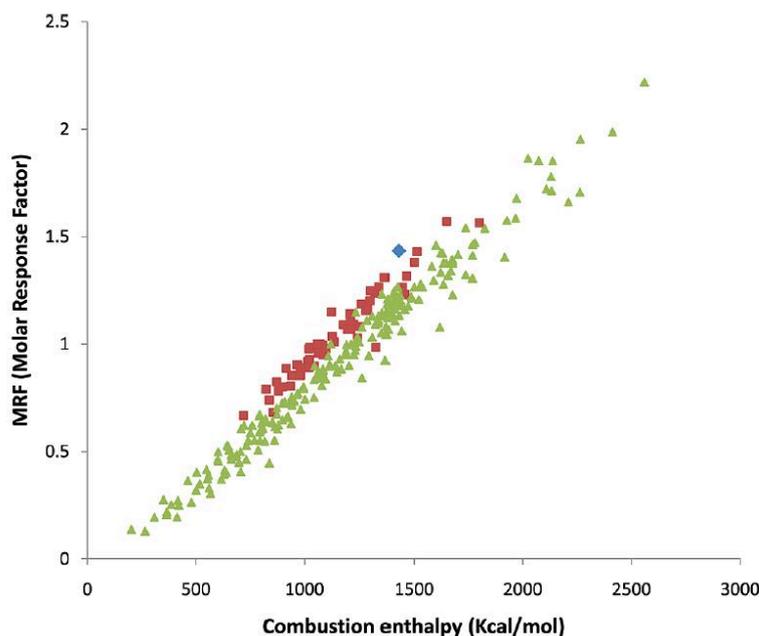


Figure 22 : Représentation des MRF des 284 composés de la base de données en fonction des enthalpies de combustion calculées à partir du modèle DFT. En vert : aucun cycle aromatique, en rouge : un cycle aromatique et en bleu : deux cycles aromatiques. Figure reproduite à partir de [148] avec l'accord d'ACS publications.

3.5 Prédiction des facteurs de réponse moléculaire à partir des enthalpies de combustion

L'équation de prédiction des MRF à partir des ΔH_{comb} , a été obtenue en minimisant l'erreur entre les 284 valeurs prédites et les valeurs mesurées. Dans le cas des ΔH_{comb} provenant du modèle DFT (équation 22), l'équation 26 a été par exemple obtenue.

Équation 26 : Prédiction des MRF à partir de l'enthalpie de combustion calculée avec le modèle DFT

$$\text{MRF} = -0.071 + 8.57 \times 10^{-4} \Delta H_{\text{Comb}}^{\text{DFT}} + 0.127 n_{\text{benz}}$$

Avec n_{benz} le nombre de noyaux aromatiques

La validité de prédiction des MRF à partir de l'équation 26 (mais également de celle obtenue dans le cas des ΔH_{comb} provenant de l'approche MF, *confidentiel*) a été vérifiée en corrélant les

valeurs prédites et mesurées du set utilisé pour construire le modèle (284 composés) mais également d'un nouveau set de 67 composés qui n'étaient pas inclus dans le jeu de données initial. Les coefficients de détermination et les déviations standard observées sont comparables et suffisants pour prouver que la relation supposée entre le facteur de réponse FID et l'enthalpie de combustion existe bien (Tableau 7).

Tableau 7 : Comparaison des prédictions des MRF à parti des ΔH_{comb} obtenues à partir des DFT ou des MF

	from $\Delta H_{\text{Comb}}^{\text{DFT}}$		from $\Delta H_{\text{Comb}}^{\text{MF}}$	
	R	SD	R	SD
MRF (training set)	0.986	0.063	0.987	0.061
MRF (test set)	0.981	0.099	0.982	0.095

Avec training set : 284 composés pour construire le modèle et test set : 67 composés pour valider le modèle. Reproduit à partir de [148] avec l'accord d'ACS publications.

3.6 Prédiction des facteurs de réponses relatifs à partir des enthalpies de combustion

Les RRF du jeu de données complet (284+67 composés) ont été calculés à partir des MRF prédits selon l'équation 26 pour les deux modèles (Figure 23).

Lorsque le modèle DFT est appliqué, le coefficient de détermination est de 0.925 contre 0.936 avec le modèle MF. Les déviations standards sont respectivement de 0.125 et 0.116. En plus de sa meilleure performance, le modèle MF est le plus facilement exploitable dans tous les laboratoires, car il ne nécessite pas de calcul DFT. C'est donc ce dernier qui a été choisi.

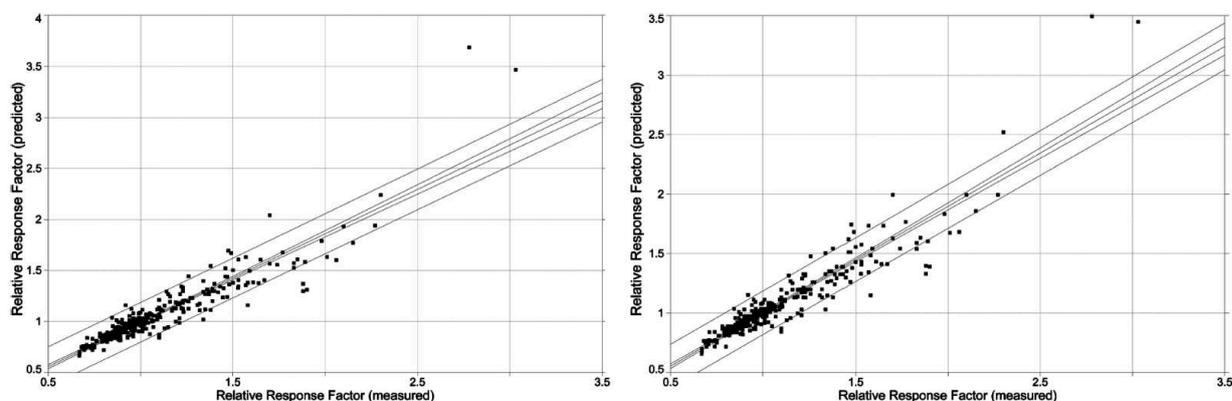


Figure 23 : Représentation des RRF prédits en fonction des RRF mesurés selon le modèle ex-DFT (gauche) ou ex-MF (droite) pour le jeu de données complet (284+67) et des intervalles de confiance et de prédiction à 90%. Figure reproduite à partir de [148] avec l'accord d'ACS publications.

Seulement deux valeurs aberrantes ont été mises en évidence (Figure 25). Elles correspondent à l'acide acétique et au bromure d'éthyle qui sont des composés polaires à courte chaîne. Cependant, les autres composés présentant les mêmes caractéristiques ont été correctement prédits par le modèle.

Lorsque l'équation de prédiction des MRF à partir des ΔH_{comb} (*Non publiée*) et celle de prédiction des ΔH_{comb} à partir de la formule chimique (Equation 23) sont combinées, il est possible d'obtenir l'équation 27 pour prédire les RRF. Dans cette équation interviennent la masse molaire de l'analyte, le nombre d'atomes de carbone, d'hydrogène, d'oxygène, d'azote, de soufre, de fluor, de chlore, d'iode et le nombre de noyaux aromatiques.

Équation 27 : Prédiction des RRF (dans le cas de l'octanoate de méthyle utilisé comme standard interne) en fonction de ΔH_{comb} et du nombre de noyaux aromatiques

$$RRF_i = 10^3 \left(\frac{M_i}{M_{STD}} \right) (-61.5 + 88.8n_C + 18.7n_H - 41.3n_O + 3.8n_N + 64.0n_S - 20.2n_F - 23.5n_{Cl} - 10.2n_{Br} - 1.07n_I + 127n_{benz})^{-1}$$

Avec i l'analyte, STD l'octanoate de méthyle, n le nombre de chaque atome ou de noyau aromatique (benz) dans la formule chimique de i

3.7 Vérification de la justesse du modèle de prédiction

Si la linéarité du modèle a été démontrée dans la figure 25, il est nécessaire d'estimer la justesse de la prédiction des RRF. C'est pourquoi le biais entre les valeurs prédites avec l'équation 33 et les valeurs expérimentales a été calculé pour tout le jeu de données. Comme illustré dans la figure 24, pratiquement 60% des valeurs de RRF ont été prédites avec moins de 5% d'erreur. Ce chiffre passe à 80% si l'on s'autorise 10% d'erreur ce qui est bien meilleur que les 37% obtenus en faisant l'approximation que tous les composés répondent de la même manière au FID, c'est-à-dire si l'on estime un RRF unitaire (normalisation interne).

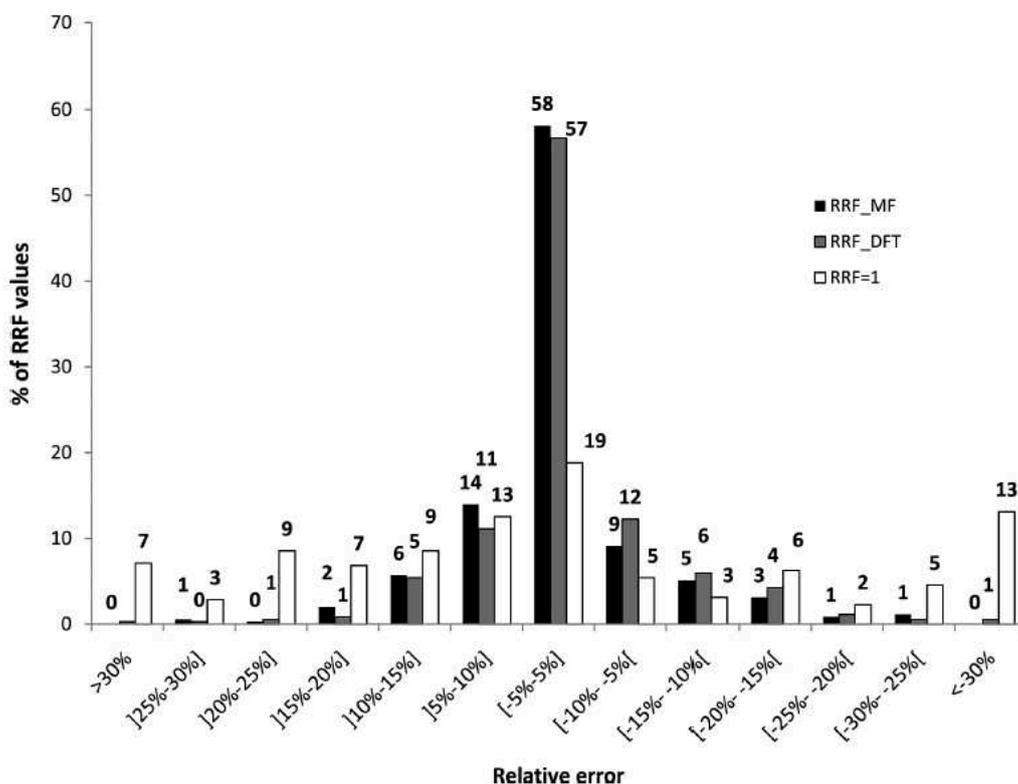


Figure 24 : Distribution des erreurs relatives entre un RRF unitaire (blanc) ou les RRF prédits par les deux modèles MF (noir) et DFT (gris) pour 351 composés. Figure reproduite à partir de ^[148] avec l'accord d'ACS publications.

La performance des RRF prédits pour quantifier des composés dans un mélange modèle a été comparée à la normalisation interne (RRF=1), à l'utilisation des RRF de la base, et à l'utilisation de RRF mesurés (Tableau 8).

La performance globale des deux modèles de prédiction est assez équivalente (biais moyen d'environ 1.6% dans les deux cas) mais moins bonne que l'utilisation de RRF fraîchement mesurés (biais moyen : 0.5%) ou provenant de la base de données (biais moyen : 0.7%). Cependant la performance de la quantification avec les RRF prédits est bien meilleure que celle obtenue avec la normalisation interne (biais moyen : 4.9%).

Ces valeurs moyennes semblent faibles mais si les biais individuels sont comparés, il apparaît qu'avec les RRF prédits, l'erreur maximale observée est d'environ 8% contre plus de 40% dans le cas de la normalisation interne. Ceci est à mettre en balance avec l'erreur maximale de 5% obtenue avec les RRF fraîchement mesurés ou de 7% avec la base de données de RRF.

Tableau 8 : Erreurs observées sur la quantification de composés dans un mélange modèle en fonction du RRF (prédit, base de données, mesuré ou égal à 1)

Composés	RRF mesurés (%)	RRF de la base (%)	RRF prédits (MF) (%)	RRF prédits (DFT), (%)	RRF=1 (%)
Acétate d'isoamyle	0.82	0.44	0.76	2.73	19.74
Eucalyptol	0.01	1.55	5.07	2.05	8.73
Linalol	0.24	0.50	6.08	5.46	12.36
4-Méthylacétophénone	1.70	5.49	6.18	3.13	11.15
Anisaldéhyde	0.63	0.90	5.15	6.03	14.60
Citronellol	1.27	0.91	0.31	1.41	7.51
Eugénol	1.18	1.88	1.79	1.50	3.90
Coumarine	2.34	7.34	7.97	4.87	2.79
Décanoate d'éthyle	0.46	0.21	3.02	1.02	0.28
β -Caryophyllène	5.16	4.93	5.55	2.52	41.79
Méthylisoeugénol	2.59	1.92	7.51	8.17	7.48
Pentadécane	0.13	1.20	1.79	0.26	29.07
Hédione	1.01	2.33	0.19	1.75	12.43
<i>Erreur moyenne</i>	<i>0.50</i>	<i>0.71</i>	<i>1.61</i>	<i>1.63</i>	<i>4.88</i>

La quantification à l'aide de RRF prédits, quel que soit le modèle proposé, semble donc totalement répondre aux attentes formulées en début de cette étude, à savoir fournir des résultats plus justes que la normalisation interne.

3.8 Exemple d'utilisation des facteurs de réponses relatifs prédits : Analyse des composés volatils d'extraits de Timur

Compte tenu des bonnes performances démontrées de quantification avec les RRF prédits, ces derniers peuvent être utilisés en routine pour caractériser la composition d'ingrédients de parfumerie comme le timur (*Zanthoxylum alatum*) par exemple.

Dans cette étude, il s'agissait d'analyser des huiles essentielles (HE) mais également des extraits CO₂ obtenus à partir de baies de Timur provenant de différentes régions du Népal et récoltées sur plusieurs années.^[382,392] Dans le cas des extraits CO₂, la présence de composés non-volatils a bien été mise en évidence lors de la quantification puisque, contrairement à ce qui avait été obtenu pour les HE, le pourcentage total de composés volatils était inférieur à 100% (79% dans l'extrait CO₂, 99% dans la HE).

Etant donnée la configuration du système GC-FID employé, avec deux colonnes de polarité orthogonale, il est possible que cette teneur ait été légèrement sous-évaluée car la température

du four ne pouvait pas être augmentée au-dessus de 250°C pour des questions de stabilité de la colonne de type PEG mais ces résultats illustrent bien l'intérêt de faire appel à l'étalonnage interne pour quantifier.

4 Conclusions et perspectives

La composition en composés volatils des extraits de parfumerie est dans la majorité des cas déterminée par GC-FID. Dans cette étude, il a été démontré que la normalisation interne n'était pas adaptée à la caractérisation précise d'un extrait complexe comme une huile essentielle de par la différence de réponse FID observée selon les composés. L'étalonnage interne permet d'obtenir des résultats quantitatifs réellement représentatifs de la réalité mais ce mode de quantification n'est pas applicable en routine pour analyser des extraits aussi complexes que les huiles essentielles contenant des centaines d'analytes. Dans ce contexte, il a été vérifié la possibilité de créer une base de données de RRF. Il est apparu que certains paramètres analytiques devaient être fixés pour permettre la création d'une base à savoir : la température de l'injecteur, le ratio de split, la température du détecteur, la composition et le débit de gaz dans la flamme. Lorsque ces paramètres sont fixés, les RRF sont très stables dans le temps et ils sont identiques d'un équipement à un autre. Ces observations ont permis la création d'une base de données de plus de 300 RRF qui ont par la suite servi à créer un modèle de prédiction de ces derniers.

Cette étude a en effet démontré la relation entre les RRFs et l'enthalpie de combustion. Deux modèles ont été créés pour prédire les RRF selon que l'enthalpie de combustion a été obtenue à partir des énergies DFT ou de la formule chimique. Dans les deux cas, l'utilisation des RRF prédits pour quantifier un mélange modèle a donné des résultats bien meilleurs que ceux obtenus par normalisation interne.

Les RRFs prédits sont à présent utilisés en routine pour quantifier les composés volatils des nouveaux ingrédients de parfumerie dans plusieurs sociétés du domaine des arômes et parfums avec un exemple évoqué dans ce chapitre.

Ce travail a donné lieu à la production d'un poster présenté en 2008 au congrès ISEO et deux publications. [139,148, 383]

Depuis ces travaux, l'IOFI a publié une recommandation concernant la quantification des composés volatils par GC pour rappeler les différents modes de quantification mais également les points sensibles à vérifier avant la quantification (solvant, standards, système chromatographique).^[90]

En 2015, le modèle de prédiction des RRFs a été optimisé pour y inclure notamment les composés silylés qui n'étaient pas représentés dans le jeu de données initial.^[146]

L'utilisation de RRFs prédits a depuis été rapportée dans la littérature aussi bien dans le domaine des arômes et parfums que dans d'autres domaines.^[145,149-156]

Enfin, en 2016, l'IOFI a recommandé l'utilisation des RRFs prédits suite à une étude collaborative.^[157]

L'utilisation du FID pour quantifier est cependant limitée aux concentrations proches de la centaine de ppm. Dans le cas de composés réglementés, il est souvent nécessaire de faire appel à des modes de détection plus sensibles comme la spectrométrie de masse. C'est ce qui va être décrit dans le chapitre suivant concernant les furocoumarines.

**CHAPITRE 2a : Analyse des
furocoumarines par
chromatographie liquide ultra
haute performance et
spectrométrie de masse**

PARTIE 1 : Introduction et rappels bibliographiques

1 Généralités sur les composés réglementés en parfumerie

Depuis le début des années 2000, le domaine des arômes et parfums est très impacté par la législation. La liste des composés « réglementés », c'est-à-dire qui doivent être présents en dessous d'une concentration donnée dans les matières premières ou les produits finis ne cesse d'augmenter. En 1999, les substances volatiles suspectées allergènes ont été mises en avant^[158] puis ce fût le tour de l'atranol et du chloroatranol en 2004^[159], des furocoumarines l'année suivante^[160] ou encore d'une dizaine de substances actives naturellement présentes dans les arômes (β -asarone, camphre, coumarine, isoeugénol, menthofurane, estragole, méthyleugénol, pulégone, safrole, α -thujone) en 2008.^[161]

Parmi les composés réglementés dans notre domaine d'activité, ce chapitre s'intéressera aux furocoumarines et à leur analyse par UHPLC/MS (Chapitre 2a) et par HPTLC (Chapitre 2b). L'analyse des 26 composés suspectés allergènes (24 volatils + atranol et chloroatranol) sera détaillée dans le chapitre suivant concernant les études collaboratives (Chapitre 3).

2 Furocoumarines

2.1 Généralités sur les furocoumarines

Les furocoumarines, parfois appelées psoralènes, se divisent en 2 groupes selon leur structure linéaire (psoralène) ou angulaire (angélicine) (Figure 25).^[162]

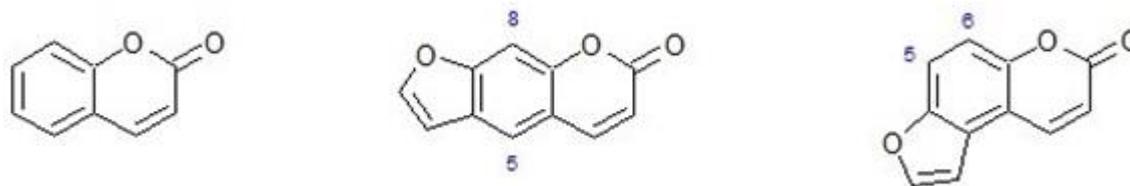


Figure 25 : Structures (de gauche à droite) de la coumarine (27), du psoralène (1) et de l'angélicine (16)

Elles sont généralement substituées par des groupements méthoxy-ou alkoxy en C₅ et C₈ pour les linéaires ou C₆ pour les angulaires et occasionnellement en C₃.

2.2 Présence des furocoumarines dans les matières premières de parfumerie

Les furocoumarines sont des métabolites secondaires produits pas les plantes de la famille des Rutacées, Umbellifères, Légumineuses, Moracées et Orchidées.^[162,163]

Le tableau 9 liste par exemple la présence de furocoumarines dans certaines matières premières utilisées en parfumerie.

Tableau 9. Présence de furocoumarines dans des matières premières de parfumerie^[164-167]

n°	Composé	Occurrence naturelle
1	Psoralène	Orange amère, rue, bergamote
2	Bergaptène	Orange amère, citron, orange, bergamote, limette, rue, pamplemousse
3	Xanthotoxine	Limette, rue
4	Isopimpinelline	Orange amère, citron, bergamote, limette, pamplemousse
5	Oxypeucedanin	Citron, bergamote, limette
6	Hydrate d'oxypeucedanin	Citron, bergamote, limette
7	Byakangélicol	Citron, limette
8	Byakangélicine	Citron, limette
9	Héraclénine	Citron, limette
10	8-Geranyloxypsoralène	Orange amère citron, orange, bergamote, limette, pamplemousse
11	Bergamottin	Orange amère, citron, orange, bergamote, limette, mandarine, pamplemousse
12	Impératorine	Citron, limette
13	Isoimpératorine	Citron, bergamote, limette
14	Phelloptérine	Orange amère, citron, limette
15	Epoxybergamottin	Orange amère, citron, orange, bergamote, limette, pamplemousse
16	Angélicine	Angélique

Avec les structures des furocoumarines 1-15 données dans la figure 26 et de la furocoumarine 16 en figure 25

2.3 Phototoxicité et réglementation

Les furocoumarines présentent des propriétés phototoxiques.^[162] L'agence internationale pour la recherche sur le cancer (IARC) a classé respectivement le bergaptène^[168] et la xanthotoxine^[169] dans les groupes 2A « probablement cancérigène pour les humains » et 1 « cancérigène pour les humains ».

Les teneurs en furocoumarines sont contrôlées dans les produits cosmétiques depuis les années 90.^[170] La quantité de furocoumarines dans les produits solaires doit être inférieure à 1mg/kg.^[171,172] Pour limiter l'impact de cette directive de l'industrie cosmétique sur l'industrie du parfum, l'IFRA a d'abord préconisé de s'autoréguler en 2001 et de limiter à 15 ppm la teneur du bergaptène^[173] dans les produits finis non rincés. L'utilisation de 11 huiles essentielles a été limitée comme dans le cas de l'huile essentielle de bergamote, l'huile de lime exprimée ou de rue.^[174]

Le comité scientifique sur la sécurité du consommateur (SCCS) a proposé en 2005 d'étendre la limitation de 1 ppm à 15 dérivés (**1-15**, Figure 26) les plus représentés dans les matières naturelles et cela dans tous les produits cosmétiques.^[172]

En 2008 l'IFRA a proposé de limiter la teneur à 5 ppm dans les produits non rincés et 50 ppm dans les produits rincés de 6 furocoumarines : le bergaptène (**2**), la bergamottine (**11**), le byacangélicol (**7**), l'époxybergamottine (**15**), l'isopimpinelline (**4**) et l'oxypeucedanine (**5**) car ce serait les dérivés les plus phototoxiques parmi les 15 furocoumarines les plus courantes.^[173]

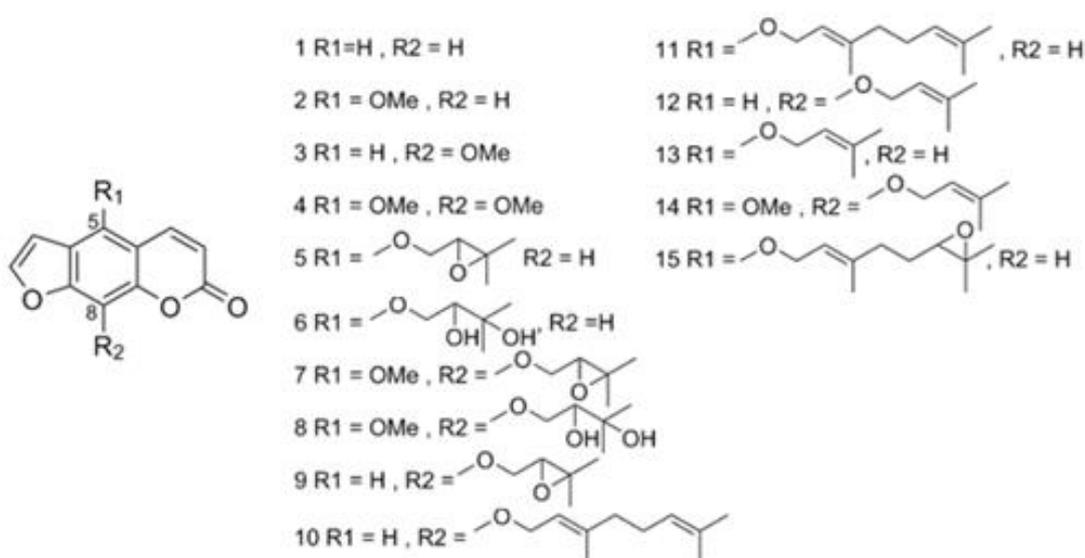


Figure 26: Structure de 15 furocoumarines fréquemment rencontrées dans les huiles essentielles^[172] et faisant l'objet d'une proposition de régulation avec 1=psoralène, 2=bergaptène, 3=xanthotoxine, 4=isopimpinelline, 5=oxypeucedanine, 6=hydrate d'oxypeucedanine, 7=byakangélicol, 8= byakangélicine, 9=héraclénine, 10=8-géranoloxypsoralène, 11=bergamottine, 12= impérorine, 13=isoimpérorine, 14=phelloptérine, 15=époxybergamottine

A la vue de toutes ces contraintes réglementaires, le recours aux méthodes analytiques permettant le dosage des furocoumarines est indispensable dans le domaine de la parfumerie.

2.4 Analyse des furocoumarines

Les furocoumarines sont des composés non volatils. Elles sont donc analysées en chromatographie liquide de sa version la plus simple sur CCM (Voir *Chapitre 2b*), à une version plus évoluée telle que l'UHPLC.

Frérot *et al.* de la société Firmenich ont par exemple proposé en 2004 une méthode HPLC permettant l'analyse des furocoumarines **1-15** en une quarantaine de minutes, sur colonne de silice greffée C18.^[175] Des temps d'analyses plus courts ont par la suite été rapportés grâce à l'emploi de colonne aux diamètres de particules inférieurs à 2.1µm notamment. En 2010, les analystes de la société Robertet ont en effet fait appel à l'UHPLC pour séparer les furocoumarines en une vingtaine de minutes.^[176]

La plupart du temps les furocoumarines sont détectées en UV.^[175,177-179] Dans la méthode proposée par Frérot *et al.* la détection se fait à 310nm qui est l'un des λ_{\max} des analytes ciblés (Figure 27).^[175]

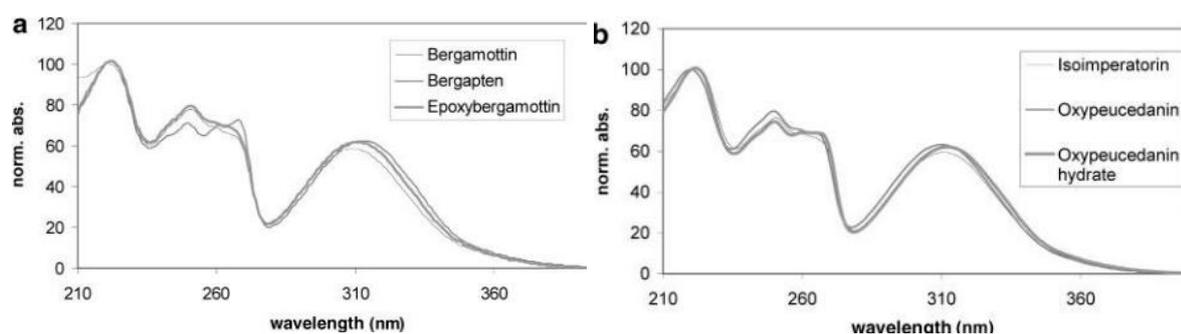


Figure 27 : Spectre UV de certaines furocoumarines d'après Frérot *et al.*^[175]

Le groupe de travail analytique de l'IFRA (AWG) a validé cette méthode au travers d'une étude collaborative en déterminant une linéarité entre 10 et 250 mg/kg et des LD et LQ de 2.5mg/kg et 10mg/kg dans le cas d'une matrice citrus reconstituée.^[180] Sa performance en condition réelle n'a cependant pas été évaluée. Or la détection UV n'est pas suffisamment spécifique pour identifier les furocoumarines (Figure 27). Cela avait déjà été souligné par Frérot *et al.* qui avait fait appel à la fluorimétrie et la spectrométrie de masse pour confirmer les identifications.^[175] En matrice complexe, toute coélution avec les analytes d'intérêt risque donc de fausser le résultat de quantification.

Dans ces conditions, certains analystes ont proposé de détecter les furocoumarines par spectrométrie de masse afin de gagner en spécificité. La plupart du temps, une source ESI a été utilisée^[181–189] bien que l'utilisation d'une source APCI ait parfois été rapportée. ^[42,175,189]

L'ionisation des furocoumarines se fait en mode positif car ce sont des composés aromatiques ne possédant pas de proton acide ce qui rend l'obtention d'ion négatif type $[M-H]^-$ moins favorable que celle d'un ion positif $[M+H]^+$. En plus des ions pseudomoléculaires, des adduits ont souvent été observés pour les furocoumarines comme $[M+Na]^+$, $[M+NH_4]^+$ ou encore $[M+K]^+$. ^[182,184,185,190]

L'utilisation d'un MS en mode SIM a déjà été proposée pour quantifier 27 dérivés coumarines et furocoumarines avec des LD allant de 0,007 (bergaptène, Byakangélicol) à 1.96 ppm (byakangélicine) avec des justesses inférieures à 20% pour la plupart des composés. ^[191]

Cependant, ces dernières années, des analyses de MS en tandem (MS^2) ou par MS^n ont plus souvent été rapportées aussi bien dans un but d'élucidation structurale que de quantification. ^{[182] [192]}

Dans les méthodes les plus récemment publiées, les furocoumarines sont quantifiées à l'aide d'un MS triple quadripôle (QqQ) en mode SRM (*Single Reaction Monitoring*) ou MRM (*Multiple Reaction Monitoring*). En 2010, des analystes de la société Robertet ont en effet proposé une méthode de dosage de 10 furocoumarines (**1-5,9,11-13** et angélicine **16**) par UHPLC/MS QqQ en mode MRM avec source ESI dans les MP et les parfums.^[176] Les limites de leur méthode ont été estimées entre 0.01 et 0.05 ppm pour la LD et entre 0.02 et 0.08 ppm pour la LQ. Dans le poster qui avait été présenté lors d'un congrès ISEO (*International Symposium on Essential Oils*), les transitions MRM ainsi que les conditions exactes d'analyse n'ont cependant pas été détaillées.

Yan-xu Chang *et al.* ont quantifié 5 furocoumarines présentes dans un extrait de *Radix angelicae pubescentis* par MS QqQ en mode SRM avec des justesses allant de 90 à 111% pour des teneurs de l'ordre de 1 à 200ppm.^[181]

En 2012, des analystes de la société IFF ont publié une méthode de dosage, également par MS QqQ en mode MRM avec source ESI, pour quantifier cette fois 14 furocoumarines (**1-8, 10-13, 15, et 16**).^[193] L'utilisation d'un MS QqQ leur a permis d'augmenter grandement la sensibilité de la méthode leur permettant de travailler dans une gamme allant de 1 à 1000ppm. Ils ont

démontré une justesse de l'ordre de 88 à 108% lors de l'ajout dosé de différentes concentrations (2 à 500ppm) des furocoumarines dans une huile essentielle d'orange douce. Cependant, cette étude ne rapporte pas toutes les furocoumarines initialement concernées par la méthode IFRA en UV car **14** et **9** n'ont pas été considérées. Or **9** est isomère de **5** qui est un des six marqueurs furocoumarines proposés par l'IFRA et qui présente des ions précurseurs et des fragments caractéristiques de même rapport m/z comme le montre la Figure 28.

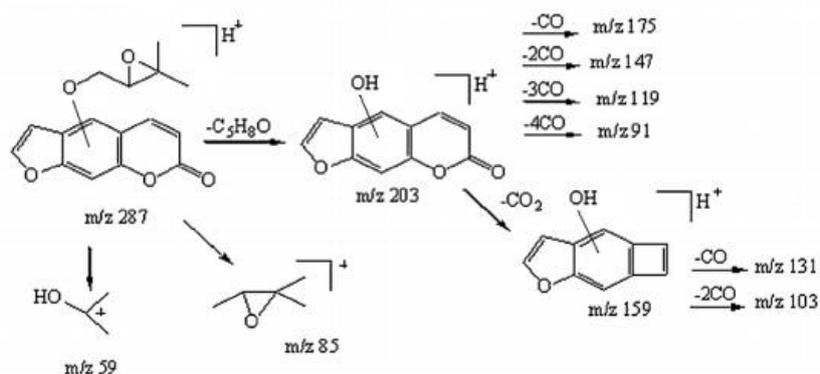


Figure 28 : Fragments observés pour l'héraclénine (**9**) et l'oxypeucedanin (**5**) en ESI⁺[194]

D'autre part, la validation de méthode a été faite dans l'acétonitrile et la performance dans la matrice n'a pas été effectuée sur toute la gamme de la méthode. Or, des effets matrices importants ont été reportés lors de l'analyse des furocoumarines par certains analystes. Par exemple, Corbi *et al.*, de la société Chanel, ont dû corriger la réponse de leur spectromètre de masse dans le cas de **15** dont la concentration était systématiquement sous-évaluée.^[195] Masson *et al.*, de la société Robertet, ont quant à eux observé un important effet matrice pour toutes les furocoumarines qu'ils ont étudiées.^[196] Ils ont donc appliqué la stratégie de dilution EDA^[44] lors des dosages de matières premières pour ajuster leurs résultats.

Corbi *et al.* ont dosé les furocoumarines **2-5,7,11** et **15** avec un MS Q-Orbitrap, muni d'une source APCI, en utilisant le mode t-SIM (pour *targeted SIM* en Anglais).^[42] Ce mode permet de filtrer l'ion quantifiant en faisant travailler le quadropôle en mode SIM. Sur la base des profils d'exactitude avec un risque à 90% et une erreur autorisée de +/-25%, leur méthode permet le dosage des analytes cibles dans les parfums à des concentrations comprises entre 5 ppb et 5 ppm. Cependant certains des composés analysés dans cette étude possèdent des isomères non considérés comme **9** ou **10**.

A l'époque où nous avons finalisé le travail présenté dans ce manuscrit, Masson *et al.* ont publié des travaux faisant appel à une ionisation ESI et une détection avec un analyseur TOF pour authentifier des huiles essentielles commerciales de Citrus en dosant notamment les furocoumarines **1-16**.^[196] Même s'il ne s'agissait pas du but premier de l'étude, quelques données de performance de la méthode ont été fournies dans la publication. Les LD rapportées par Masson *et al.* étaient de 10 ppb pour la majorité des analytes et 50 ppb pour **5, 7, 9, 10** et **15**. Les LQ reportées selon les composés étaient comprises entre 50ppb et 1ppm. Ces valeurs, assez comparables avec celles reportées par Corbi *et al.*, ont cependant été reportées en dehors de la gamme de linéarité instrumentale renseignée par l'auteur.^[196] Les LQ ont en effet été déterminées en se basant sur les valeurs de déviation standard. La linéarité de la méthode n'a pas quant à elle pas été évaluée dans cette étude.

Le tableau 10 récapitule les fragments reportés dans la littérature par les analystes du domaine des arômes et parfums pour quantifier les furocoumarines **1-16**. En général, les mêmes ions précurseurs ont été rapportés dans les études. Cependant, les analystes de la société IFF ont proposé le précurseur m/z 305 pour l'oxypeucedanin (**5**) tandis que ceux de Chanel et Robertet ont utilisé m/z 287. Le choix des ions fils varie globalement d'une publication à l'autre même si certains fragments clés ont à chaque fois été considérés (m/z 202, 203, 233, 174, 147).

Tableau 10 : Ions précurseurs et produits reportés dans la littérature pour les composés 1-15

N° analyte	[42]		[193]		[196]	
	Ion parent	Ions fils	Ion parent	Ions fils	Ion parent	Ions fils
1	-	-	187	131,77	187.0317	131.0502,115.055
2	217.0498	202.0259*,174.1**	217	202,89	217.0501	202.0267,174.0318
3	217.0498	202.0259*,174.1**	217	161,89	217.0501	202.0266,174.0317
4	247.0604	232.0364*,217.1**	247	217,95	247.0606	232.0378,217.0127
5	287.0918	203.0339*,203.2**	305	203,147	287.0919	203.0349,147.0461
6	-	-	305	203,147	305.1025	203.0349,147.048
7	317.1023	203.0335*,231.1**	317	233,231	317.1025	233.0445,231.0289
8	-	-	335	233,231	335.1131	233.0449,231.0294
9	-	-	-	-	287.0919	203.0334,147.043
10	-	-	339	203,147	339.1596	203.0342,147.0439
11	339.1595	203.0338*, 203.3**	339	203,147	339.1596	203.0352,147.0449
12	-	-	271	203,147	271.097	203.0344,147.0461
13	-	-	271	203,147	271.097	203.0344,147.0461
14	-	-	-	-	301.1076	233.0444,218.0211
15	355.1544	-	355	203,147	355.1545	203.0342,153.1291
16	-	-	187	131,77	187.0317	131.0491,115.0545

N° selon tableau 9, *=t-MS², **=MRM mode

3 Objectifs de cette étude

Lorsqu'un ingrédient de parfumerie est analysé pour la première fois, des méthodes d'analyse spécifiques et sensibles doivent être utilisées. Il est en effet primordial d'identifier tous les composés réglementés et leurs teneurs respectives dans toute nouvelle matière afin de générer les documents techniques associés. C'est pourquoi une méthode de dosage des furocoumarines par UHPLC/MS a été développée et validée. A l'époque de l'étude présentée dans ce manuscrit, il n'existait aucune méthode d'analyse validée complètement pour doser les furocoumarines **1-15** par UHPLC/MS. Il avait donc été décidé de développer une méthode de dosage par UHPLC/MS et de la valider en gamme solvant mais également en gamme matrice et d'estimer l'intérêt de l'approche EDA déjà utilisée par Masson *et al.* ^[196] La méthode a d'abord été développée et validée avec un détecteur QqQ en 2014 puis ré-évaluée dans le cas d'un détecteur Q-TOF en 2016. Les résultats obtenus dans les deux cas seront donc présentés et discutés dans la suite du manuscrit. Etant donné l'absence de document de référence de validation dans le domaine des arômes et parfums, cette étude sera également l'occasion de détailler les étapes d'une validation de méthode d'une manière didactique.

PARTIE 2 : Partie expérimentale

1 Standards

Le mélange des furocoumarines **1-15** à 1000mg/kg a été acheté chez ChromaDex (Irvine, USA) ainsi que l'angélicine (**16**, 96.6%), l'isobergaptène (**17**, 99.1%), l'hydrate d'oxypeucedanine (**6**, 98.7%), la bykangélicine (**8**, 93.7%), l'héraclénine (**9**, 99.2 %), le bykangélicol (**7**, 98.6%), l'époxybergamottin (**15**, 90.2%), l'oxypeucedanine (**5**, 92.9%), l'isopimpinelline (**4**, 98.3%), et la phelloptérine (**14**, 97.0%), le psoralène (**1**, 99.1%), l'isoimpératorine (**13**, 98.8%), le bergamottin (**11**, 96.9%). Le bergaptène (**2**, 99.0%) a été fourni par Extrasynthèse (Genay, France). Le Psora-4 (**18**, 98.0%), le 5-(4-phenoxybutoxy)psoralène (**19**, 98.0%), le bergaptol (**20**, 98.5%), le 8-geranyloxypsoralen (**10**), l'impératorine (**12**, 98.0%), la xanthotoxine (**3**, 98.0%), la coumarine (**21**, 99%), l'auraptène (**22**), la scopolétine (**23**, 98.5%), la visnagine (**24**) et le citroptène (**25**) ont été fournis par Sigma-Aldrich. L'umbelliférone (**26**) a été achetée chez Molekula.

L'acide formique, 99% a été acheté chez Fluka. Les solvants de qualité MS (eau, acétonitrile, méthanol) ainsi que le dichlorométhane qualité HPLC, l'heptane technique et l'acétate d'éthyle

ont été commandés chez VWR Chemicals (Fontenay sous-bois, France). Les solvants de qualité HPLC (méthanol, acide acétique) ont été fournis par Fisher.

Les matières premières naturelles étudiées provenaient de la collection interne de la société.

2 Solutions standards

A partir de la solution des furocoumarines **1-15** à 1g/l, dix solutions ont été préparées aux concentrations suivantes : 0.01, 0.02, 0.03, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2 et 5 mg/l. Les solutions 0.01 à 0.25mg/l ont été utilisées pour déterminer les LD et les solutions 0.1 à 5mg/l ont été utilisées comme solutions de calibration et de validations. La gamme solvant a été réalisée dans l'acétonitrile. La gamme matrice a été réalisée dans une solution d'huile essentielle de citron diluée à 10% dans l'acétonitrile.

Au total, chaque solution (calibration en solvant, calibration en matrice, validation en matrice) a été préparée en triplicat chaque jour et pendant trois jours consécutifs.

3 Instrumentation

Les analyses ont été réalisées sur un système UHPLC 1290 Infinity (Agilent Technologies) couplé soit à un MS-QqQ 6420 soit à un Q-TOF 6530 Accurate mass (Agilent Technologies) équipés d'une source ESI. Le système était piloté par l'intermédiaire du logiciel MassHunter.

Méthode standard pour comparer les colonnes

Les différentes colonnes testées lors du développement de la méthode UHPLC étaient :

- Zorbax Eclipse Plus C18 50mm x 2.1; 1.8 μ m (Agilent) ;
- EC 50/2 Nucleodur PFP 50mm x 2.0; 1,8 μ m (Machery Nagel);
- EC 50/2 Nucleodur PolarTec 50mm x 2.0; 1.8 μ m (Machery Nagel).

Cette méthode a été utilisée pour comparer l'ordre d'élution des furocoumarines selon les phases stationnaires avec le détecteur MS QqQ, le programme d'élution suivant a été utilisé : Phase mobile (A) eau et (B) méthanol. Débit : 0,500 mL/min. Température 30°C. V_{inj} : 1 μ L. Gradient : 0min 5%B ; 0-7min 25%B ; 13min 100%B. Les conditions MS étaient les suivantes : Fragmenteur : 135V, tension de capillaire : \pm 3500V, température du gaz séchant fixée à 300°C, avec un débit de 12mL/min. Les spectres UV ont été enregistrés à 254, 310 et 366nm.

Méthode optimisée UHPLC-MS

La colonne EC 50/2 Nucleodur PolarTec 50mm x2.0 ; 1.8 μ m (Macherey Nagel) a été utilisée.

Phase mobile (A) eau+0,1% HCOOH+5mM formate d'ammonium et (B) méthanol. Débit : 0,700 mL/min.

Température 40°C. V_{inj} : 1 μ L. Gradient : 0min 5%B ; 2min 20%B ; 7min 40%B ; 10min 100%B

Conditions QqQ : source dual ESI, mode positif, T° gaz séchant : 300°C, débit de gaz séchant : 10mL/min, tension de capillaire : 3500V. Les autres conditions sont listées dans le tableau 12.

Conditions TOF et Q-TOF : source dual ESI, mode positif, T° gaz séchant : 300°C, débit de gaz séchant : 10mL/min, Skimmer : 65V, tension de capillaire : 3500V. En mode *All Ion*, l'EC est de 0, 10, 20 ou 40V et le Fragmenteur de 120, 130, 140 et 150V. L'acquisition se fait en mode Scan et la quantification se fait en extrayant l'ion parent correspondant à la méthode *target* (tableau 12) sur la somme des 4 traces obtenues. En mode *Target*, une pseudo transition MRM est extraite du spectre de masse de type produit pour quantifier. L'énergie de fragmentation est toujours de 120V et les EC appliquées sont listées dans le tableau 11.

Tableau 11 : Conditions d'acquisition des trois méthodes MS pour les composés 1-15 sur la colonne PolarTec

Tr (min)	N°	Méthode QqQ				Q-TOF target		
		Ion précurseur	Frag (V)	Ions produits	EC (V)	Ion précurseur	Ions produits*	EC (V)
3,527	6	305	105	203	20	305.1020	203.0349	35
				147	40		147.0665	
	8	335	105	233	15	335.1125	233.0449	10
				231	12		231.1741	
3,747	1	187	105	131	25	187.0390	131.0727	10
				115	25		115.0318	
3,993	3	217	110	202	20	217.0459	202.1072	10
				174	30		174.0905	
4,713	4	247	105	232	15	247.0610	232.0862	10
				217	15		217.0476	
4,813	2	217	110	202	20	217.0495	202.0529	20
				174	30		174.0905	
5	9	287	105	203	5	287.0917	203.0345	
				147	35		147.0664	
5,653	7	317	80	233	10	317.1020	233.0440	5
				231	15		231.0228	
5,773	5	287	105	203	15	287.0917	203.0331	15
				147	15		147.0761	
7,38	12	271	70	203	10	271.0965	203.0334	15
				147	35		147.066	

Tr (min)	N°	Méthode QqQ				Q-TOF <i>target</i>		
		Ion précurseur	Frag (V)	Ions produits	EC (V)	Ion précurseur	Ions produits*	EC (V)
7,7	14	301	100	233	5	301.1071	233.0443	10
				218	25		218.0682	
7,947	13	271	70	203	5	271.0965	203.0334	15
				147	35		147.066	
8,02	15	355	100	203	15	355.1540	203.0334	20
				153	0		153.1267	
8,707	10	339	105	147	5	339.1591	203.0334	20
				203	5		147.0459	
8,967	11	339	105	203	5	339.1591	203.0334	15
				147	40		147.066	

N° selon tableau 9, * en gras : ion fils choisis pour quantifier dans la pseudo transition MRM

4 Traitement des données

4.1 Validation de méthodes

Toutes les méthodes présentées dans ce chapitre et dans le suivant (3b) ont été validées en utilisant la même stratégie et d'après les recommandations de l'ICH.^[197] Seule la reproductibilité n'a pas été évaluée de par l'impossibilité de tester les méthodes dans un autre laboratoire.

4.1.1 Limites de détection

Les limites de détection ont été définies expérimentalement en fonction de critères spécifiques à chaque mode de détection employé. Les ratios d'ions qualifiants ont été employés avec comme critère les tolérances définies par l'IOFI^[50] pour les méthodes QqQ et Q-TOF *target*. Deux transitions sont suivies lors des acquisitions mais les LD ont toujours été déterminées sur le ratio le plus limitant. Dans le cas de la méthode Q-TOF *all ion*, la LD a été définie comme la plus petite concentration permettant une identification certaine de l'analyte sur la base de la comparaison des spectres de masse (+/-10ppm sur la masse, +/- 0.350min sur le temps de rétention, prise en compte de la fragmentation). Un score d'identification est calculé par le logiciel en pondérant chaque critère de la façon suivante : masse exacte 100, abondance isotopique 60, espacement isotopique 50, temps de rétention 100.

4.1.2 Exploitation des solutions de calibration et de validation

Lors de la validation de méthodes, deux types de solutions ont toujours été considérées : les solutions de calibration d'un côté et les solutions de validation de l'autre. Elles ont chacune été utilisées dans des buts précis détaillés ci-dessous.

4.1.2.1 Solutions de calibration

4.1.2.1.1. Types de solutions de calibration

Deux types de solutions de calibration ont été préparées lors de chaque validation à savoir en gamme solvant (acétonitrile) ou en gamme matrice (HE de citron diluée) afin de déterminer lesquelles permettraient de quantifier au mieux les analytes présents dans les solutions de validation. La quantification des analytes a pu être envisagée selon trois approches : gamme de calibration en solvant, gamme de calibration en solvant avec EDA^[44] et gamme de calibration en matrice.

4.1.2.1.2. Fonction de réponse instrumentale

Les solutions de calibration ont été utilisées pour tracer une fonction de réponse de l'instrument en représentant la réponse du détecteur (aire du quantifiant pour les analyses UHPLC/MS Q-TOF *All Ion*, transition MRM pour le QqQ, ou équivalent pour Q-TOF *target*) en fonction de la concentration. Différents modes de régression ont été testés dans ce chapitre : linéaire, linéaire pondéré en $1/x$, quadratique, quadratique pondéré en $1/x$.

La pertinence des modèles de régression a été estimée grâce à une analyse de la variance (ANOVA) sous Excel ou en utilisant les profils d'exactitude avec un IC à 90% et un intervalle d'acceptabilité de 30%.

4.1.2.2 Solutions de validation

4.1.2.2.1. Détermination de la justesse et de la fidélité

Les solutions de validation ont été uniquement préparées en matrice pour mimer un extrait naturel réel. Une HE de citron diluée à 10%, dans laquelle **1-15** n'étaient pas détectés par MS, a été dopée avec les analytes d'intérêt à différentes concentrations correspondant à la gamme de calibration. La teneur en matrice (HE de citron) est la même à chaque niveau de dopage. Les composés **1-15** des solutions de validation ont été dosés en faisant appel aux équations obtenues à partir des solutions de calibration. La justesse a été estimée en comparant les valeurs de concentration retrouvées dans les solutions de validation par rapport aux concentrations théoriques.

Afin d'évaluer la fidélité des méthodes, les solutions de validation ont été réalisées fraîchement pendant trois jours consécutifs (fidélité intermédiaire) et en triplicata (répétabilité) chaque jour. Il s'agissait de triplicata de pesées et non de triplicata d'injections. En effet, dans le second cas, seule la répétabilité du système (injection, détection...) est considérée tandis que dans le cas de solutions indépendantes, les variations dues à l'opérateur, à la balance, à la filtration, etc... sont également prises en compte. Les analytes ont été quantifiés dans chacune de ces solutions de validation avec une calibration (solvant et matrice) réalisée le jour même à partir de solutions fraîches.

4.1.2.2.2. Détermination de la linéarité de la méthode

Les moyennes des valeurs de concentrations calculées pour les solutions de validation ont ensuite été représentées en fonction des valeurs de concentrations théoriques pour construire les profils de linéarité. Un IT (équation 16) à 90% a été rajouté autour de chaque profil. C'est au travers de l'interprétation de ces profils que les méthodes ont été jugées linéaires ($R^2 > 0.994^{[90]}$) ou non et que les gammes de linéarité ont été définies.

4.1.2.2.3. Profils d'exactitude, LQ et gamme de la méthode

Les valeurs de justesse, ainsi que de fidélité, ont quant à elles été utilisées pour construire les profils d'exactitude avec IT à 90% selon la norme NF V03-110.^[43] Pour faciliter le traitement des données, les profils d'exactitude ont été construits en utilisant le fichier Excel mis à disposition par l'INRA.^[115]

Les profils d'exactitude ont ensuite été exploités pour déterminer les LQ dans chaque cas pour une erreur autorisée de +/-30% sur le résultat. Théoriquement la LQ est déterminée au moment où l'IT coupe les limites autorisées représentées sur le profil. Cependant cela présuppose qu'entre deux points de concentration la tendance sera linéaire ce qui est loin d'être toujours le cas. Nous avons donc décidé, dans toutes les validations de méthodes détaillées, que la LQ serait la concentration réellement mesurée immédiatement supérieure au point de croisement sur le profil pour la LQ basse ou immédiatement inférieure pour la LQ haute. Si cette concentration est vraiment trop éloignée du point de croisement, il paraît préférable de rajouter un point de gamme au profil afin de se rapprocher de la LQ estimée sur le graphe.

La gamme de la méthode est ensuite déduite de ce profil d'exactitude comme étant comprise entre les LQ (basses et hautes).

PARTIE 3 : Résultats

1 Optimisation des conditions de séparation

La méthode proposée par l'IFRA pour analyser les furocoumarines **1-15** par HPLC/UV nécessite une quarantaine de minutes par échantillon.^[180] Pour réduire le temps nécessaire par analyse, une colonne plus courte avec diamètres de particules $<2.1\mu\text{m}$ a été choisie. Les conditions HPLC de la méthode IFRA ont été transformées en conditions UHPLC grâce à la feuille Excel « HPLC_Calculator_3 ».^[198] La figure 29 présente le chromatogramme obtenu dans ces conditions à 310 nm.

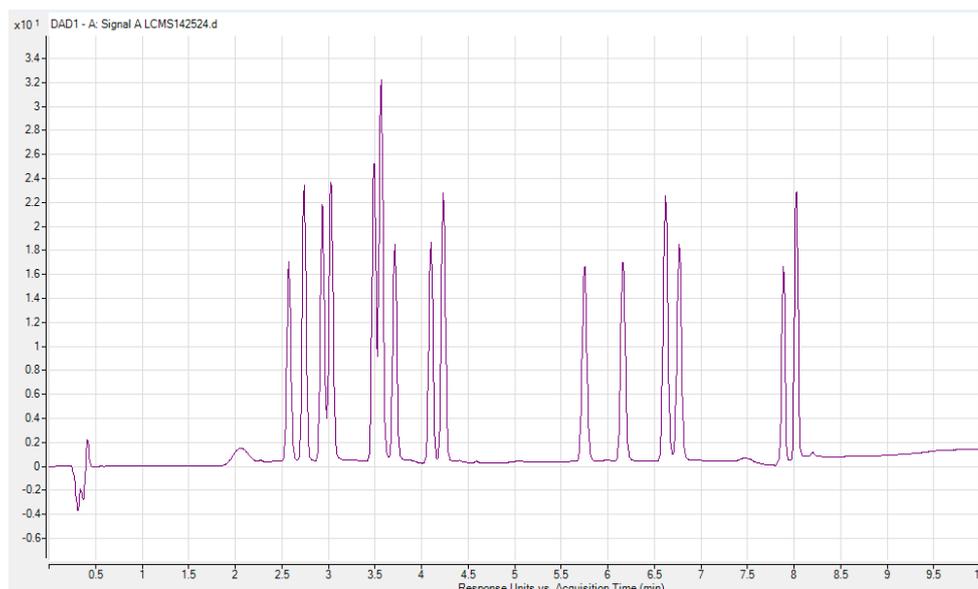


Figure 29 : Chromatogramme à 310nm obtenu en conditions IFRA transférées sur la colonne UHPLC de type C18 pour séparer les furocoumarines 1-15. Ordre de sortie : 6, 8, 1, 3, 4, 2, 9, 7, 5, 12, 14, 13, 15, 10, 11

Le système de solvant proposé dans la méthode IFRA doit être préparé en massique et est constitué d'eau-acétonitrile-THF (85:10:5) et d'acétonitrile-méthanol-THF (65:30:5). Les éluants ont été simplifiés en optant pour de l'eau acidifiée et du méthanol. L'acétonitrile, de par sa moins grande viscosité, permettrait une ionisation plus efficace en ESI que le méthanol car il serait plus favorable à la création de fines gouttelettes.^[199] Cependant, lors d'études préliminaires au sein du laboratoire, aucune baisse de signal due à l'emploi de méthanol n'a été observée. D'autre part, l'acétonitrile fait régulièrement l'objet de pénuries car il est dépendant du marché de

l'acrylonitrile utilisé par l'industrie du plastique et des fibres dont la production a chuté ces dernières années. Pour ces raisons, le méthanol a été préféré dans notre étude.

L'optimisation chromatographique a été effectuée en deux temps puisqu'il a d'abord été vérifié si l'utilisation d'une colonne avec un greffage différent de celui préconisé par l'IFRA, à savoir l'octadécyle (C18), ne permettait pas d'améliorer la séparation des furocoumarines **1-15**. Ensuite les conditions d'élution ont été optimisées pour la colonne choisie.

1.1 Choix de la phase stationnaire

Des conditions d'élution simplifiées et non optimisées ont été appliquées pour séparer les furocoumarines **1-15** sur trois colonnes avec des phases stationnaires différentes. Une colonne de type C18, une colonne pentafluorophényle (PFP) et une colonne C18 modifiée avec un groupement polaire (PolarTec) ont été testées. Les chromatogrammes obtenus à 310 nm sont représentés en Figure 30.

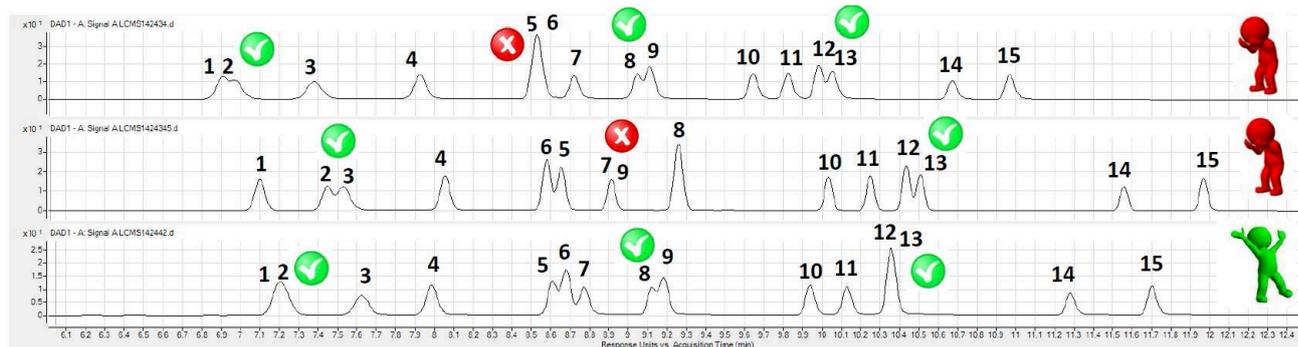


Figure 30 : Chromatogrammes obtenus à 310nm pour l'analyse de 1-15 sur colonne PFP (haut), C18 (milieu), et PolarTec (bas). Les numéros représentent l'ordre de sortie des pics sur la colonne C18 et sont indépendants de la numérotation des analytes. Les ronds rouges représentent les coélutions gênantes pour la MS. Les ronds verts représentent les coélutions non gênantes pour la MS.

Dans les trois cas, des coélutions sont observées mais elles sont différentes. Si les coélutions posent problème avec la détection UV, elles sont contournables en spectrométrie de masse à partir du moment où les analytes présentent des spectres de masse différents.

Les coélutions des pics 5, 6 sur la colonne PFP et 7, 9 sur la colonne C18 (Figure 30) sont problématiques car elles concernent des isomères bergaptène/xanthotoxine et héraclénine/oxypeucedanin non discriminables par MS (**2/3** et **5/9** Tableau 11). Les coélutions observées sur la colonne PolarTec entre les composés **6** et **8** (pics 1 et 2, Figure 30) ou **2, 4, 9**

(pics 5,6,7, Figure 30) ou **5** et **7** (pics 8 et 9, Figure 30) ou **13** et **15** (pics 12 et 13, Figure 30) ne posent pas de problème car les fragments suivis sont différents (Tableau 11). Cette phase stationnaire a été choisie pour la suite de l'étude.

1.2 Optimisation des conditions d'élution

Différents gradients d'élution ont été testés pour optimiser la séparation des furocoumarines **1-15** sur la colonne PolarTec en faisant notamment varier les proportions des éluants mais également les gradients.

Le chromatogramme obtenu dans les conditions optimales décrites en partie expérimentale est représenté en Figure 31. Les composés **1-15** sont séparés en une dizaine de minutes.

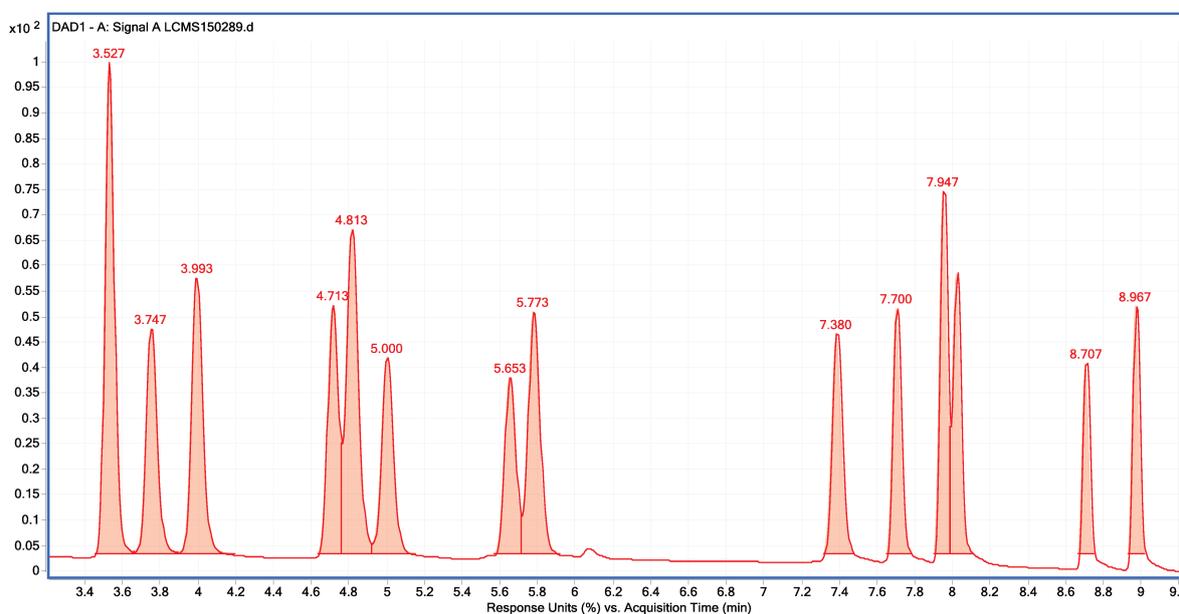


Figure 31 : Chromatogramme obtenu à 310nm sur la colonne PolarTec dans les conditions optimisées pour la séparation des composés 1-15. Ordre de sortie détaillé dans le tableau 12.

Dans ces conditions, aucune coélution gênante pour la détection par spectrométrie de masse n'existe entre les composés **1-15**. L'ordre de rétention observé est détaillé dans le tableau 12.

Tableau 12 : Temps de rétention des composés 1-15 avec la méthode optimisée sur colonne PolarTec

N° du pic*	Tr (min)	Furocoumarine**
1	3.52	6 + 8
2	3.75	1
3	3.99	3
4	4.71	4
5	4.81	2
6	5.00	9
7	5.65	7
8	5.77	5
9	7.38	12
10	7.70	14
11	7.95	13
12	8.02	15
13	8.71	10
14	8.97	11

* : ordre de sortie des analystes selon la Figure 31

** : n° de la furocoumarine d'après le Tableau 9

2 Optimisation des conditions de détection

Les furocoumarines sont des dérivés du psoralène, de ce fait elles possèdent pour la plupart des fragments communs dans leurs spectres de masse. Les ions quantifiants et qualifiants reportés dans la littérature sont donc globalement toujours identiques (Tableau 10). Les mêmes ions ont été suivis pour cette étude (Tableau 11). Dans le cas des analyses avec le QqQ, les masses nominales ont été ciblées tandis que les masses exactes ont été enregistrées avec le Q-TOF.

Trois méthodes ont été considérées dans cette étude en fonction des deux spectromètres de masse du laboratoire :

- Avec le QqQ : méthode MRM ;
- Avec le Q-TOF :
 - Méthode MS/MS de type « produit » (SIM + EC non nulle + Scan) ;
 - Méthode combinant les modes MS (Scan, EC nulle, Scan) et MS/MS Scan (Scan + EC non nulle + Scan).

Les conditions d'analyse ont été optimisées en fonction des particularités de chacune des trois méthodes même si l'impact du tampon n'a été évaluée que lors du développement initial avec le détecteur QqQ.

2.1 Impact du tampon

L'utilisation d'un tampon dans la phase mobile peut avoir un impact sur l'ionisation des analytes, sur la présence d'adduits et sur l'effet matriciel (Voir *Chapitre 3*). Les spectres de masse obtenus pour **1-15** au cours du développement chromatographique ont montré une très forte proportion d'adduit sodium $[M+Na]^+$ en l'absence de tampon dans la phase mobile.

L'acidification de la phase mobile avec de l'acide formique a permis une légère amélioration de la séparation chromatographique tout en augmentant la proportion des ions pseudo-moléculaires par rapport aux adduits. Malgré cela, les adduits sodium restaient assez importants. L'ajout d'un tampon formate d'ammonium a finalement permis de favoriser les ions $[M+H]^+$ pour tous les dérivés en dehors de l'isopimpinelline (**4**) dont les ratios $[M+H]^+ / [M+Na]^+$ sont restés identiques (Tableau 13). Ce tampon a donc été conservé pour le reste de l'étude.

Tableau 13 : Impact de l'ajout de 5mM de formate d'ammonium sur la répartition des adduits $[M+H]^+$ et $[M+Na]^+$ lors de l'analyse des composés 1-15 en ESI⁺ avec la méthode QqQ

Furocoumarine	0.1% HCOOH + 5mM ammonium formate		0.1% HCOOH	
	M+H	M+NA	M+H	M+NA
6	81%	19%	75%	25%
8	70%	30%	39%	61%
1	100%	0%	90%	10%
3	100%	0%	90%	10%
2	100%	0%	89%	11%
4	83%	17%	83%	17%
9	97%	3%	88%	12%
5	95%	5%	88%	13%
7	98%	2%	90%	10%
12	98%	2%	92%	8%
13	98%	2%	88%	12%
14	98%	2%	92%	8%
15	71%	29%	42%	58%
10	94%	6%	64%	36%
11	95%	5%	93%	7%

2.2 Tension du capillaire

L'impact de la tension de capillaire sur l'abondance des ions quantifiants des furocoumarines **1-15** a été vérifié en premier lieu avec le détecteur QqQ. Deux comportements distincts ont été observés en fonction de la position de la substitution. Comme illustré dans la figure 32, les furocoumarines substituées en position 8 répondent toutes mieux avec une tension de capillaire faible tandis que celles substituées en position 5 sont au contraire mieux détectées avec une tension élevée (Figure 33). Le comportement observé semble indépendant de la nature de la substitution et la substitution en position 5 semble avoir plus d'importance que celle en position 8 puisque les furocoumarines doublement substituées en 5 et en 8 présentent le même comportement que celles uniquement substituées en 5.

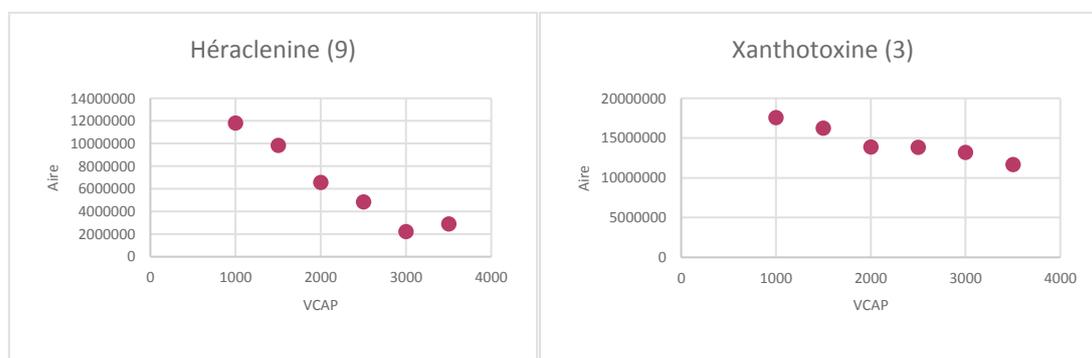


Figure 32 : Représentation de l'abondance des ions quantifiants des furocoumarines substituées en position 8 en fonction de la tension du capillaire

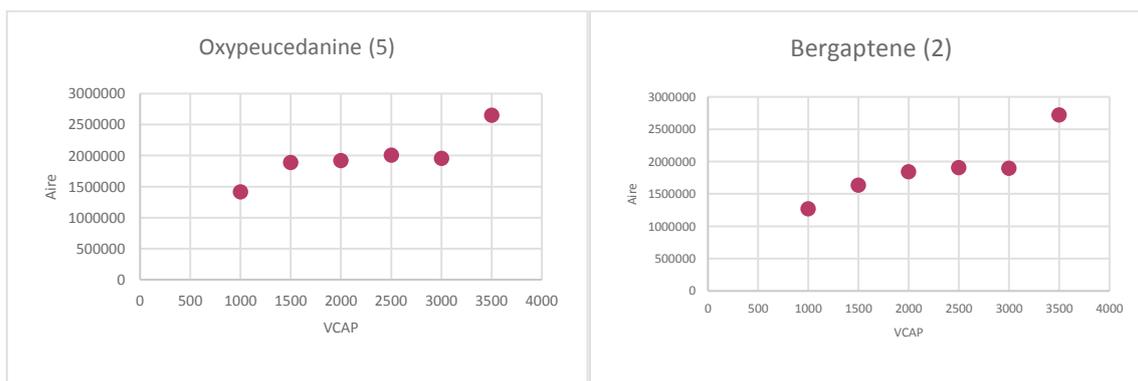


Figure 33 : Représentation de l'abondance des ions quantifiants des furocoumarines substituées en position 5 en fonction de la tension du capillaire

Etant donné que la majorité des furocoumarines analysées dans cette étude répond mieux avec la tension de capillaire à 3500 V. Cette tension a été sélectionnée pour la suite de l'étude.

2.3 Paramètres du QqQ

2.3.1 Stratégie d'optimisation des paramètres du QqQ

Dans le mode MRM, il apparaît clairement deux étapes d'optimisation à savoir dans un premier temps la maximisation de l'ion parent qui arrive dans le premier quadripôle où il sera filtré (énergie de fragmentation) puis dans un second temps la maximisation des ions fils qui seront filtrés dans le second quadripôle (EC). Les ions fils seront en effet considérés pour valider l'identité de l'analyte au travers des ratios d'aires avec l'ion précurseur.

Le logiciel « Optimizer » (Agilent) permet automatiquement de déterminer les conditions de fragmentation optimales pour le mode MRM. La cohérence des valeurs obtenues pour l'énergie de fragmentation et l'EC a été vérifiée en réalisant quelques expériences manuellement pour les composés **1-15**. Dans un souci de concision, seuls les résultats obtenus dans le cas la phelloptérine (**14**) sont détaillés dans la suite du manuscrit.

2.3.2 Energie de fragmentation

Pour maximiser la réponse obtenue en MRM, il faut tout d'abord favoriser la présence de l'ion parent à l'entrée du premier quadripôle où il sera filtré. Il est donc nécessaire d'optimiser l'énergie de fragmentation afin de trouver l'optimum permettant de désolvater ou casser les adduits sans induire de fragmentation trop importante de l'ion parent.

L'abondance de l'ion parent m/z 301 de la phelloptérine (**14**) a été suivie en fonction de l'énergie de fragmentation appliquée entre 10 et 160V (Figure 34). L'abondance maximale semble être atteinte entre 70 et 110 V ce qui est conforme aux 100 V préconisés par le logiciel Optimizer.

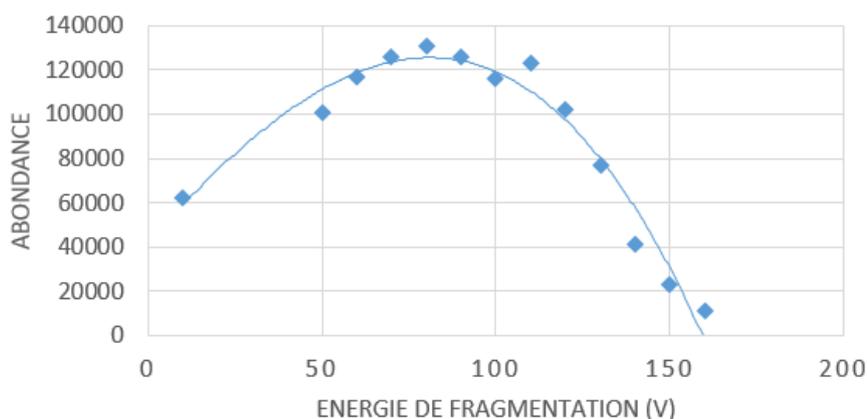


Figure 34 : Représentation de l'abondance des ion m/z 301 [M+H] de la phelloptérine (**14**) en fonction de l'énergie de fragmentation avec le QqQ

2.3.3 Energie de collision

Une fois les conditions optimisées pour maximiser l'ion parent dans le premier quadripôle, il est nécessaire de favoriser la formation des ions fils en choisissant la meilleure EC afin d'optimiser la réponse qui sera enregistrée par le second quadripôle.

Dans la Figure 35 sont représentées les abondances de plusieurs ions fils provenant de l'ion parent m/z 301 dans le cas de la phelloptérine (**14**) pour des EC comprises entre 0 et 50 V. Les ions m/z 233 et 218 sont ceux qui ont été choisis pour les transitions MRM. Pour favoriser la présence de m/z 233, il faudra appliquer une EC de 5V contre 20-30V dans le cas de m/z 218. Le logiciel Optimizer avait proposé 5V et 25V respectivement ce qui est cohérent avec nos observations.

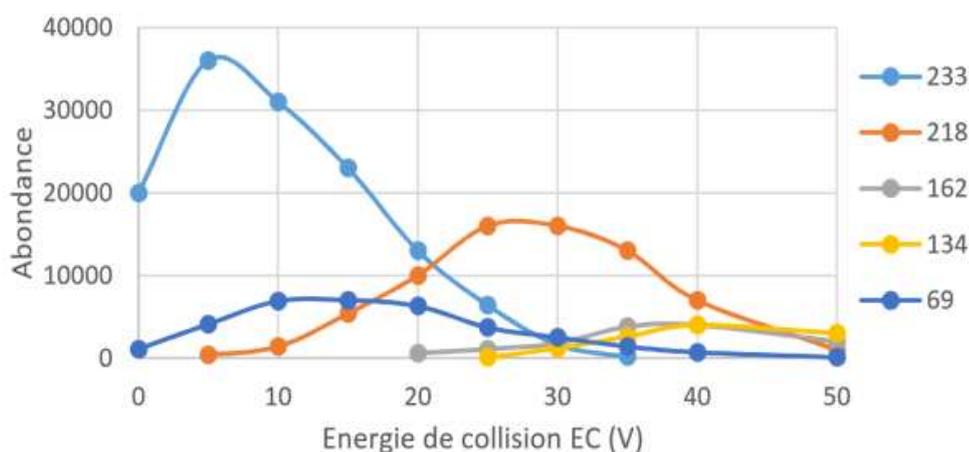


Figure 35: Représentation de l'abondance des ion fils 69, 134, 162, 218, 233 provenant de l'ion parent 301 de la phelloptérine (**14**) en fonction de l'énergie de collision pour une énergie de fragmentation de 120V avec le QqQ en mode MRM

Les conditions de fragmentation (énergie de fragmentation et de collision) définies par le logiciel Optimizer semblent donc valides. Les mêmes conclusions ont été observées pour les autres furocoumarines étudiées. Ces conditions ont donc été choisies pour le reste de cette étude et sont compilées dans le Tableau 12. Les EC appliquées sont soit du même ordre de grandeur que celles reportées par Hiserodt *et al.* ^[193], soit elles répondent aux mêmes tendances (une EC plus importante pour l'une des deux transitions).

2.4 Paramètres du Q-TOF

L'optimisation des paramètres du Q-TOF est différente de celle du QqQ de par les différences de détection. Dans le cas du Q-TOF d'Agilent, les acquisitions peuvent se faire selon deux stratégies à savoir un mode MS/MS dans lequel le quadripôle travaille en mode SIM tandis

qu'une EC variable peut être appliquée avant le TOF (Mode *MS/MS*) ou un mode MS combiné au mode MS/MS dans lequel le quadripôle est passant mais pour lequel une EC variable peut être appliquée (MS/MS) ou non (MS) avant le TOF (Mode *All Ion*).

2.4.1 Le mode MS/MS du Q-TOF

2.4.1.1 Généralités sur le mode MS/MS

Dans le mode MS/MS, le quadripôle du Q-TOF travaille en mode SIM et ne laisse passer que les ions d'intérêt vers la cellule de collision où ils seront fragmentés avant d'être détectés dans le TOF qui travaille toujours en mode Scan. Lorsqu'une EC nulle est appliquée, ce mode s'apparente à une acquisition SIM, bien qu'une fragmentation puisse tout de même être observée dans le cas d'ions fragiles entraînant l'obtention d'un spectre de masse « pollué » par des ions différents de celui filtré initialement par le quadripôle. Lorsque l'EC appliquée est non nulle, l'ion parent sélectionné dans le quadripôle sera fragmenté en ions fils qui seront détectés dans le TOF. Les spectres de masse obtenus s'apparenteront donc à ceux générés dans le cas du mode Produit d'un QqQ.

Il est possible de choisir l'option MS/MS automatique (*Auto MS/MS*) ou dirigée (*Target MS/MS*) lors de l'acquisition. Dans le premier cas, le choix du précurseur est effectué par l'instrument en se basant sur l'abondance maximale observée pour le n^{ème} fragment laissant à l'opérateur le choix de « n », et d'exclure des masses si besoin. Dans le second cas, l'opérateur définit lui-même les ions précurseurs. C'est le mode *target* qui est donc adapté à l'analyse de **1-15** puisque les ions quantifiants sont déjà connus.

2.4.1.2 Différentes étapes du mode MS/MS

Dans le mode *Target* du Q-TOF, la stratégie de quantification est assez similaire à celle du mode MRM du QqQ. La quantité d'ion parent, qui est filtré au niveau du quadripôle, devra être maximisée en ajustant l'énergie de fragmentation. L'énergie de collision devra être ajustée afin de maximiser les ions fils qui seront formés à partir de l'ion parent puis détectés par le TOF pour générer le spectre de masse produit. Contrairement au mode MRM du QqQ qui correspond à du SIM-SIM, le mode *Target* du Q-TOF est un mode SIM-Scan. Une transition quantifiant → qualifiant sera artificiellement recréée par le logiciel de traitement de donnée par l'extraction de l'aire de

l'ion fils qualifiant dans le spectre de masse produit provenant du précurseur filtré dans le quadripôle.

2.4.1.3 Optimisation du mode MS/MS

L'optimisation du mode *Target* du Q-TOF est assez similaire à celle du mode MRM du QqQ puisqu'il va falloir maximiser la transition quantifiant → qualifiant. Cependant, le logiciel « Optimizer » n'existe pas pour les équipements TOF. L'optimisation a donc été totalement effectuée manuellement.

2.4.1.3.1. Optimisation de l'énergie de fragmentation

La première étape du mode MS/MS du Q-TOF correspond à la sélection de l'ion parent dans le quadripôle comme dans le cas du mode MRM du QqQ. Il est donc nécessaire de maximiser l'abondance de ce dernier en définissant au mieux l'énergie de fragmentation appliquée.

La Figure 36 reporte l'abondance de l'ion parent m/z 301.0998 de la phelloptérine (**14**) en fonction de l'énergie de fragmentation appliquée entre 20 et 150V.

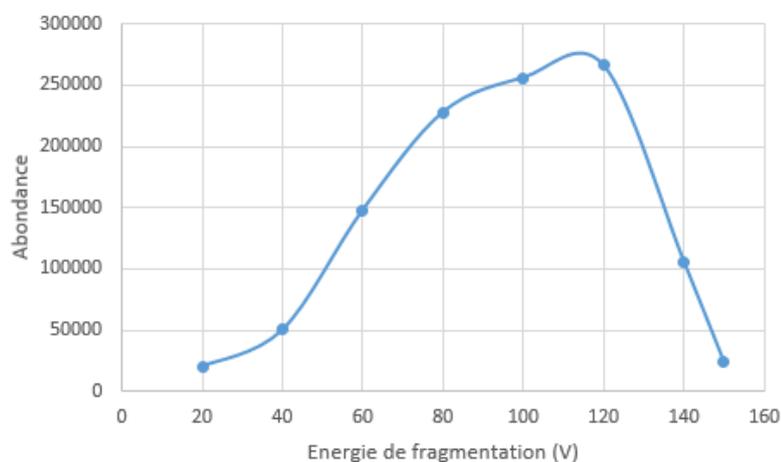


Figure 36 : Représentation de l'abondance des ion m/z 301.0998 [M+H] de la phelloptérine (**14**) en fonction de l'énergie de fragmentation avec le Q-TOF en mode Target

Dans les conditions de cette étude, un fragmenteur à 120V a permis d'obtenir une abondance optimale des ions pseudomoléculaires pour tous les composés **1-15**.

2.4.1.3.2. Optimisation de l'énergie de collision

La seconde étape du mode MS/MS consiste en la fragmentation des ions filtrés dans le quadripôle grâce à l'énergie appliquée dans la cellule de collision.

L'EC à appliquer peut directement être calculée par le logiciel d'acquisition grâce à une formule prenant en compte la masse du précurseur, la taille plus ou moins grosse de la molécule et son état de charge (Equation 28).

Équation 28 : Formule utilisée par le logiciel MassHunter pour déterminer l'EC

$$EC = \frac{\text{pente} \times \text{masse du précurseur}}{100} + \text{constante}$$

Avec pente=3V en général pour les petites molécules et les peptides et constante=8V en général pour les petites molécules ou 2V pour les peptides^[200]

L'EC peut également être définie par l'opérateur.

Les abondances optimales en ion fils m/z 233.0438 pour la phelloptérine (**14**) sont ainsi obtenues dans les conditions avec une EC de 10V comme illustré dans la Figure 37.

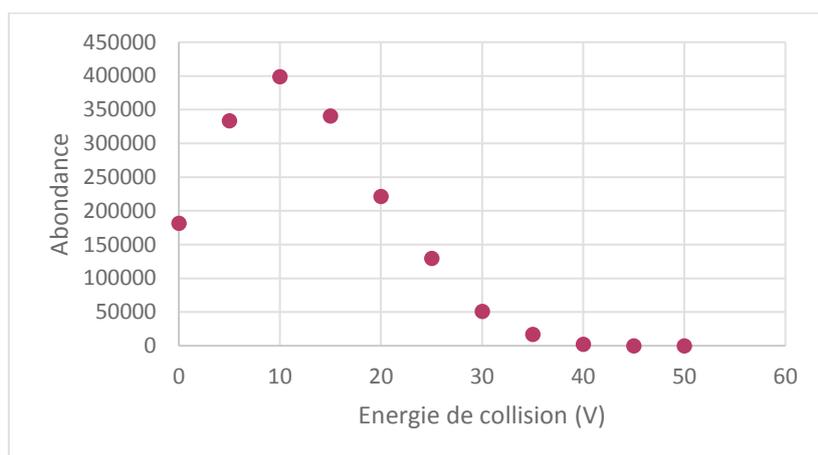


Figure 37 : Représentation de l'abondance de l'ion fils 233.0438 provenant de l'ion parent 301.x1067 de la phelloptérine (**14**) en fonction de l'énergie de collision pour une énergie de fragmentation de 120V avec le Q-TOF en mode *Target*.

L'EC optimale pour l'ion fils le plus abondant de chaque analyte **1-15** a été déterminée de la même façon et les conditions finales de fragmentation pour la méthode Q-TOF *target* sont détaillées dans la partie expérimentale (Tableau 11).

2.4.2 Mode *All Ion* du Q-TOF

2.4.2.1 Généralités sur le mode *All Ion*

Avec le mode *All Ion*, le quadripôle ne filtre aucun ion provenant de la source. Ces derniers arrivent dans la cellule de collision où une EC nulle ou non aura été appliquée ce qui pourra induire une nouvelle fragmentation. Les ions iront ensuite dans le TOF où ils seront détectés.

Dans le mode *All Ion*, plusieurs énergies de collision sont en effet appliquées au cours de la même acquisition. Cela permet d'obtenir des spectres de masses différents pour un même composé et donc de gagner en spécificité par la suite lors des identifications par comparaison avec des bases de données. En général, les EC sont de 0 (« *Low energy channel* »), 20 ou 40V (« *high energy channels*») car il s'agit des valeurs classiquement utilisées pour générer les bibliothèques commerciales de spectres de masse. Les spectres de masse obtenus dans le cas d'une EC nulle seront de type MS. Lorsqu'une EC non nulle est appliquée, les spectres de masse obtenus seront de type MS/MS.

Ce mode est particulièrement adapté à l'identification de composés dans un contexte d'étude phytochimique puisqu'il permet d'obtenir des empreintes spectrales comparables aux données déjà compilées en bibliothèque. La quantification est faite en extrayant l'aire de l'ion quantifiant dans la trace MS ou MS/MS selon le choix de l'analyste.

2.4.2.2 Différentes étapes du mode *All Ion*

Dans le mode *All Ion*, la stratégie de quantification est assez différente des modes considérés précédemment. Pour être quantifiés, les composés doivent avoir été identifiés dans un premier temps dans le logiciel qualitatif (MassHunter Qual.). Pour se faire les spectres de masse MS et MS/MS obtenus aux différentes EC, dans le cas de l'analyse d'un échantillon inconnu, seront comparés à ceux présents dans une bibliothèque de masse créée par l'analyste en mode *Target* à différentes EC. Les composés identifiés seront ensuite exportés dans le logiciel quantitatif (MassHunter Quant.) où ils pourront être quantifiés. La quantification se fait en utilisant l'aire de l'ion quantifiant qui est extraite du spectre de masse correspondant à l'EC choisie par l'analyste dans le logiciel de traitement.

2.4.2.3 Optimisation du mode *All Ion*

La partie identification du mode *All Ion* ne doit pas être optimisée car elle est volontairement standardisée pour permettre une recherche en bibliothèque.

L'optimisation du mode *All Ion* se fait donc uniquement au travers de la maximisation de l'ion quantifiant.

2.4.2.3.1. Optimisation de l'énergie de fragmentation

Etant donné que l'instrumentation était identique, l'énergie de fragmentation déterminée dans le cas de la méthode *Target* du Q-TOF, à savoir 120V, a été choisie pour le mode *All Ion* sans aucune expérience supplémentaire.

2.4.2.3.2. Optimisation de l'EC

Dans le mode *All Ion*, les EC 0, 20 et 40 V sont appliquées lors de l'acquisition. Il suffit donc de déterminer laquelle des trois conditions permet de maximiser l'aire de l'ion quantifiant sachant que la somme des trois conditions peut également être considérée par le logiciel de retraitement. Différentes expériences ont donc été réalisées en fixant l'énergie du fragmenteur à 120 V et en faisant varier l'EC. Cependant, malgré les consignes renseignées dans le logiciel d'acquisition, les deux paramètres variaient simultanément avec, semblerait-il, une même incrémentation. Malgré une consigne d'énergie de fragmentation fixe de 120V pour des EC de 0, 20 et 40V, les spectres de masse obtenus correspondent à des énergies de fragmentation différentes de 120V pour l'EC de 20V, 140V pour celle à 20V et de 160V pour celle à 40V.

Cette incohérence a été rapportée à la société Agilent qui devrait résoudre le problème dans la version 8 du logiciel MassHunter qui sera mise à disposition courant 2017. A l'heure actuelle, la seule façon de dissocier l'impact de la variation seule de l'EC sur le type de fragmentation est de donner une consigne d'énergie de fragmentation volontairement plus basse dans la méthode d'acquisition pour que celle utilisée réellement soit celle souhaitée en réalisant chaque expérience indépendamment. Cela a été jugé trop fastidieux pour être appliqué au sein du laboratoire et il a été décidé d'évaluer la performance de ce mode avec les conditions par défaut correspondant aux couples énergie de fragmentation/EC de 120/0V, 140/20V et 150/40V.

La quantification en Mode *all Ion* se fait à partir de l'aire de l'ion quantifiant qui est extrait des traces MS (EC 0) ou MS/MS (EC non nulles) selon le choix de l'opérateur. Il est possible également de prendre en compte l'aire des ions qualifiants qui seront ajoutées à celle du quantifiant. Dans le cas de la phelloptérine, la Figure 38 illustre par exemple la réponse prise en compte selon l'EC (0, 10, 20, 40 V ou somme des 4 EC) avec et sans considération des ions qualifiants.

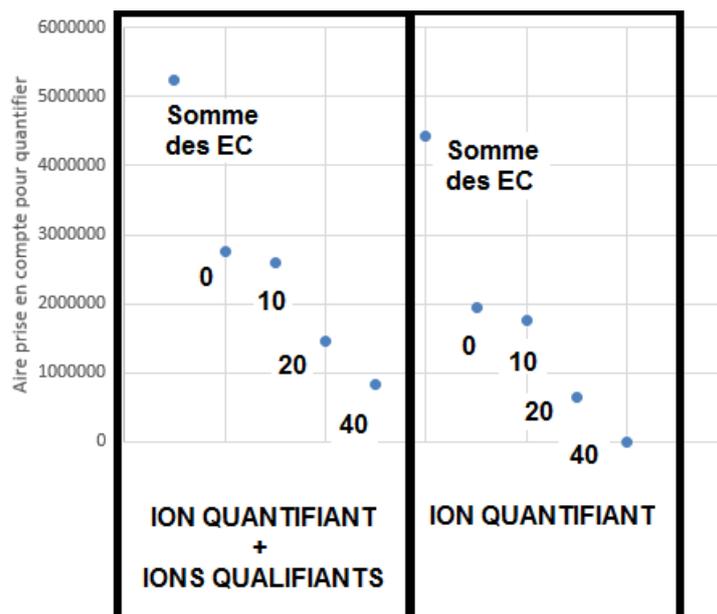


Figure 38 : Aire prise en compte pour quantifier en fonction des conditions choisies : quantifiant seul (droite) ou quantifiant + qualifiants (gauche) aux différentes EC de 0, 10, 20, 40V considérées indépendamment ou sommées dans le cas de la phelloptérine avec la méthode Q-TOF All Ion

Il en ressort que l'aire provenant du chromatogramme correspondant à la somme des EC semble être la plus adaptée car elle est maximale. Le fait de considérer les ions qualifiants ne semble pas prépondérant dans l'augmentation de la réponse (+18% dans le cas de la somme des EC). Etant donné que cette option n'est pas proposée par défaut dans le logiciel de traitement de données, il a été décidé de ne prendre en compte que l'aire de l'ion quantifiant.

Les mêmes conclusions ont pu être tirées pour les furocoumarines **1-15**, ainsi pour le reste de l'étude, l'aire de l'ion quantifiant obtenue à partir de la somme des acquisitions aux différentes EC (et donc énergie de fragmentation) sera prise en compte pour quantifier.

3 Validation des méthodes

Les trois méthodes optimisées ont ensuite été validées selon le même plan de validation afin de pouvoir comparer leurs performances respectives.

3.1 Présentation du plan de validation

La validation a été faite pour les trois méthodes considérées selon le plan de validation illustré en Figure 39.

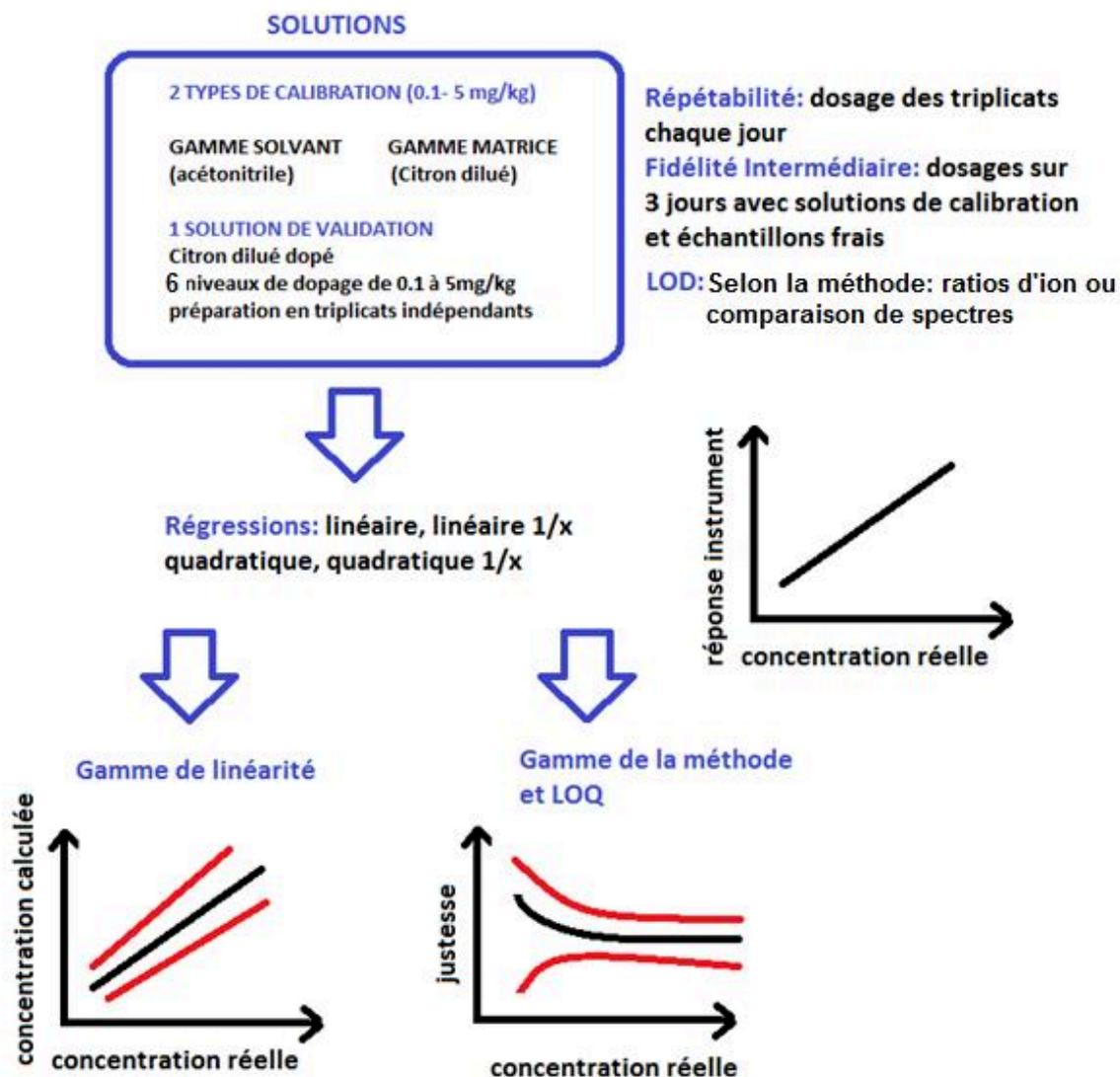


Figure 39 : Schématisation du plan de validation appliqué aux méthodes de dosage des furocoumarines 1-15 par MS

Le travail de validation étant le même pour tous les composés, et, étant donné le nombre incalculable de données générées lors de cette validation, seuls les résultats du psoralène seront détaillés dans ce manuscrit et un récapitulatif pour les furocoumarines **1-15** sera donné en fin de discussion.

3.2 Limite de détection

Deux stratégies ont été employées pour déterminer la LD en fonction du type de méthode.

3.2.1 Limites de détection pour la méthode QqQ

Dans le cas de la méthode QqQ, la LD est basée sur l'étude des ions parents et produits en se basant sur les tolérances définies par l'IOFI. ^[50]

Les chromatogrammes (calibration et validation) ont tous été réintégrés manuellement car les intégrations automatiques n'étaient parfois pas satisfaisantes, même après ajustement des paramètres d'intégration.

Dans le cas du psoralène, la LD a été déterminée par la mesure des ratios entre l'ion quantifiant 187 et l'ion qualifiant 115. Si l'on considère la méthode MRM avec le QqQ, en gamme matrice, le ratio quantifiant / qualifiant est de 59% en milieu de gamme (2ppm) pour la transition m/z 187 → 115. La tolérance associée à ce ratio est de 20% selon l'IOFI. ^[50] Tant que le ratio reste compris entre 47 et 71%, le psoralène sera considéré comme identifié. D'après le tableau 14, les ratios sont toujours compris dans la gamme acceptable jusqu'à une concentration de 111ppb. En dessous de cette concentration, au moins l'un des ratios obtenus sur les trois différents jours est hors tolérance. La LD du psoralène, en gamme matrice, et avec le QqQ en mode MRM est donc de 111ppb.

La même stratégie a été appliquée pour les composés **1-15** avec les méthodes QqQ en gamme matrice et en gamme solvant. Les LD sont récapitulées dans la partie 3.2.4. du manuscrit.

Tableau 14 : Ratios quantifiant / qualifiant (187/115) observés pour le psoralène durant trois jours pour différentes concentrations avec la méthode QqQ

Concentration	J1	J2	J3	moyenne
0,0244	42	31	33	36
0,037	56	58	80	64
0,074	52	55	120	76
0,111	61	57	52	57
0,184	60	61	62	61
0,283	61	55	64	60
2,187	59	57	57	58

3.2.2 Limites de détection pour la méthode Q-TOF All Ion

Dans le cas de la méthode TOF *All Ion*, la LD a été déterminée comme étant la plus petite concentration permettant une identification positive de l'analyte par le logiciel de traitement de données selon la stratégie « *Find Compounds by Formula* » (FBF). Les critères définis dans cette recherche sont détaillés dans la partie expérimentale.

Le psoralène, par exemple, est identifié par FBF jusqu'à une concentration de 40 ppb en matrice (Figure 40). Sachant que le minimum pour valider l'identification est de 70% mais que la confirmation de fragment est activée, un score >70% peut ne pas induire de validation

d'identification (*Qualified*) comme illustré dans la figure 46 avec des scores de 78.49 et 89.48% obtenus aux concentrations de 15 et 6 ppb (*Not qualified*).

Label	ID Techniques Applied	RT Diff (Tgt)	Algorithm	Score (Tgt)	Flags (Tgt)	Flag Severity (Tgt)	Concentration
Cpd 1: <Psoralen>	FBF		Find By Formula		no EIC peaks	Error	0.00039
Cpd 1: <Psoralen>	FBF		Find By Formula		no EIC peaks	Error	0.00097
Cpd 1: <Psoralen>	FBF		Find By Formula		no EIC peaks	Error	0.00241
Cpd 1: <Psoralen>	FBF-FragConfirm	0.065	Find By Formula	78.49	Not qualified	Error	0.00603
Cpd 1: <Psoralen>	FBF-FragConfirm	0.065	Find By Formula	89.48	Not qualified	Error	0.01508
Cpd 1: Psoralen	FBF-FragConfirm	0.07	Find By Formula	78.04	Qualified	Pass	0.03770
Cpd 1: Psoralen	FBF-FragConfirm	0.062	Find By Formula	91.23	Qualified	Pass	0.09424
Cpd 1: Psoralen	FBF-FragConfirm	0.065	Find By Formula	90.45	Qualified	Pass	0.50
Cpd 1: Psoralen	FBF-FragConfirm	0.051	Find By Formula	94.13	Qualified	Pass	0.99

Figure 40 : Détermination de la LD du psoralène en matrice avec la méthode Q-TOF *All Ion*. Concentrations en ppm.

3.2.3 Limites de détection pour la méthode Q-TOF *target*

Etant donné que l'acquisition en mode MS/MS du Q-TOF permet de traiter des acquisitions de type produit pour en sortir des pseudo-transitions MRM, la stratégie théorique de détermination des LD est la même que celle appliquée pour la méthode QqQ. Cependant au moment de traiter les données, il s'est avéré que la majorité des furocoumarines n'était pas détectée comme si les conditions optimales définies lors du développement de la méthode n'étaient plus les bonnes et qu'elles ne favorisaient plus l'apparition de l'ion fils recherché. Lorsque les données étaient traitées dans le logiciel qualitatif, selon le même algorithme de recherche FBF que celui décrit pour le Q-TOF *All Ion*, alors un peu plus de furocoumarines étaient identifiées mais il y avait encore beaucoup trop de faux négatifs (Figure 44). Ces faux négatifs étaient aléatoirement distribués dans la gamme, quelle que soit la concentration. A cause de ce problème, les acquisitions n'étaient donc pas exploitables ni pour déterminer une LD ni pour valider la méthode de manière générale. La méthode Q-TOF *target* a donc été abandonnée pour la suite de l'étude au profit de la méthode Q-TOF *All Ion*.

Label	ID Techniques Applied	Score (Tgt)	RT Diff (Tgt)	File	Algorithm	Flags (Tgt)	Flag Severity (Tgt)
Cpd 1: <Psoralen>	FBF			LCMS170652.d	Find By Formula	no EIC peaks	Error
Cpd 1: <Psoralen>	FBF			LCMS170653.d	Find By Formula	no EIC peaks	Error
Cpd 1: <Psoralen>	FBF	34.07	0.094	LCMS170654.d	Find By Formula	m/z tolerance	Error
Cpd 1: Psoralen	FBF	75.8	0.105	LCMS170656.d	Find By Formula		Pass
Cpd 1: Psoralen	FBF	71.68	0.091	LCMS170657.d	Find By Formula	low score	Warning
Cpd 1: Psoralen	FBF	83.52	0.092	LCMS170658.d	Find By Formula		Pass
Cpd 1: Psoralen	FBF	84.1	0.093	LCMS170659.d	Find By Formula	m/z tolerance	Error
Cpd 1: Psoralen	FBF	83.44	0.096	LCMS170660.d	Find By Formula		Pass
Cpd 1: Psoralen	FBF	81.37	0.106	LCMS170661.d	Find By Formula		Pass

Figure 41 : Détermination de la LD du psoralène en matrice avec la méthode Q-TOF *target* et la stratégie FBF. Concentrations en ppm identiques à celles de la figure 46.

3.2.4 Récapitulatif des limites de détection selon les deux méthodes

Les LD des 15 furocoumarines avec les méthodes QqQ et Q-TOF *All Ion* sont compilées dans le tableau 15.

Tableau 15 : LD en solvant ou en matrice, en ppb, pour les composés 1-15 en fonction du mode de détection

N°	QqQ		Q-TOF	
	MRM, solvant	MRM, matrice	All Ion, solvant	All Ion, matrice
10	40	160	95	40
11	40	22	92	40
2	100	70	95	40
8	110	200	95	15
7	75	20	38	15
15	280	200	40	5
9	75	70	40	40
12	180	170	40	15
13	110	80	15	15
4	25	20	40	40
5	40	100	95	95
6	110	100	95	95
14	25	70	40	95
1	110	200	40	40
3	100	70	15	40

N° de la furocoumarine selon Tableau 9

Il apparaît que les LD obtenues avec le Q-TOF, en mode *All Ion*, sont plus faibles que celles obtenues avec le QqQ en mode MRM. Cela peut s'expliquer, au-delà des différences instrumentales, par le fait que les LD n'ont pas été évaluées de la même façon et que la stratégie utilisée avec le mode *All Ion* est certainement moins restrictive que celle employée avec le QqQ. L'avantage clair de la méthode Q-TOF *All Ion* est de pouvoir profiter pleinement de la masse haute résolution mais également des spectres de masse de type produit qui permettent une identification facilitée des analytes. En l'absence de spectre de type Scan avec le QqQ en mode MRM, seuls les ratios d'ions et le temps de rétention permettent de valider l'identité d'un analyte et la tolérance sur ces critères, d'autant plus en absence de haute résolution, ne peut pas être aussi grande.

Les LD obtenues avec la méthode Q-TOF *All Ion* sont, pour la plupart des analytes, plus élevées que celles déjà publiées par Masson *et al.* obtenues par UHPLC/TOF. En effet, tous les composés présentaient des LD proches de 10ppb sauf **5,7,9,10** et **15** qui étaient détectés à partir de 50ppb en utilisant la même stratégie de ratio d'ions de l'IOFI.^[50]

3.3 Spécificité

La spécificité de la méthode a été vérifiée en analysant des composés potentiellement présents dans les mêmes extraits naturels que ceux contenant les analytes **1-15**.

Les furocoumarines additionnelles considérées sont l'angélicine (**16**, Figure 25), le bergaptol (**20**, Figure 42) et l'isobergaptène (**17**, Figure 42) présents naturellement dans *Angelica archangelica*^[201], *Angelica genuflexa*^[202] ou dans les huiles de citron et de bergamote^[203] et les espèces d'*Heracleum*.^[204–206] Deux autres furocoumarines ont également été incluses dans l'étude pour vérifier la spécificité de la méthode même si aucune occurrence naturelle n'avait été rapportée à savoir le Psora-4 (**18**, Figure 42) et le 5-(4-phénoxybutoxy)psoralène (**19**, Figure 42).

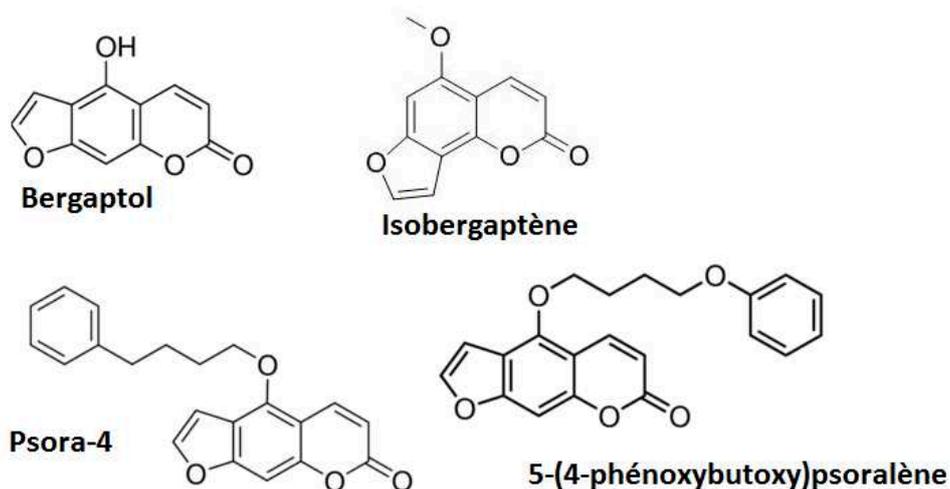


Figure 42 : Structures du bergaptol (**20**), de l'isobergaptène (**17**), du psora-4 (**18**) et du 5-(4-phénoxybutoxy)psoralène (**19**)

Les structures des coumarines et composés analogues inclus dans cette étude, à savoir, la coumarine (**21**), la visnagine (**24**), le citroptène (**25**), l'umbelliférone (**26**), la scopolétine (**23**) et l'auraptène (**22**) sont représentées dans la Figure 43.

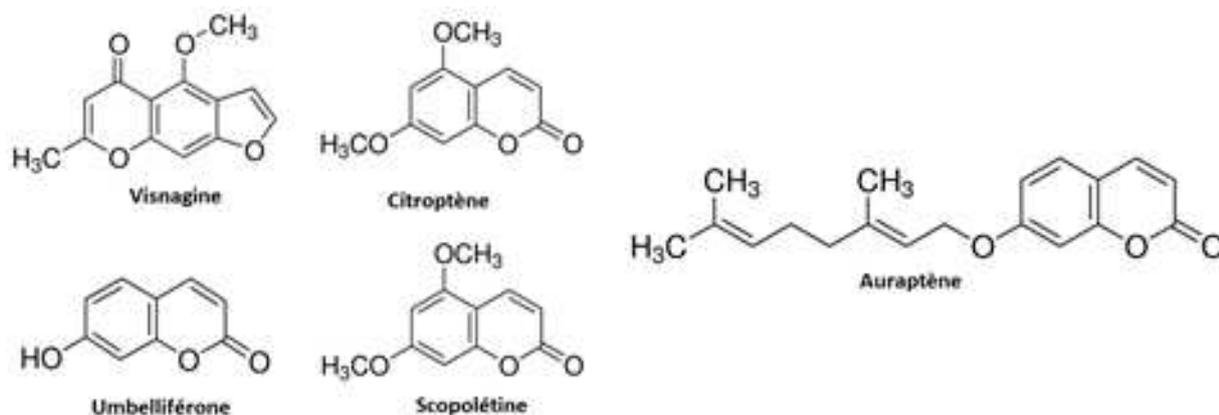


Figure 43 : Structures de la visnagine (24), du citroptène (25), de l'umbelliférone (26), de la scopolétine (23) et de l'auraptène (22)

Aucune coélution n'a été observée dans les conditions de séparation considérées. D'autre part, compte tenu du fait que la détection est opérée par spectrométrie de masse, les coélutions auraient eu un impact limité puisque les analytes n'ont pas les mêmes masses molaires.

Cette étude de spécificité est cependant loin d'être exhaustive et s'explique par le manque de disponibilité de standards commerciaux ou leur coût trop élevé. Une attention particulière sera donc apportée lors de l'analyse de nouvelles matières premières afin de vérifier l'absence de coélution gênante.

L'absence d'effet de contamination croisée (ou *Cross Talk* en Anglais) a également été vérifiée pour valider la spécificité de la méthode.

3.4 Fonction de réponse

La première étape de validation des méthodes a été de définir les fonctions de réponse (modèles d'étalonnage). Au total, 72 chromatogrammes ont été obtenus lors de l'analyse des solutions de calibration : 6 points de concentration x 3 jours x 2 gammes (matrice et solvant) x 2 modes de détection (QqQ, Q-TOF *All ion*).

Plusieurs fonctions de réponse ont été testées pour générer les équations de calibration en représentant la réponse correspondant à chaque méthode (aire de l'ion quantifiant ou transition MRM) en fonction de la concentration. Au départ, seule la régression linéaire non pondérée avait été considérée et sa pertinence a été vérifiée au travers d'une analyse de la variance de type ANOVA. Puis d'autres modes de régressions ont été testés (linéaire pondéré en $1/x$, quadratique et quadratique pondéré en $1/x$) afin de vérifier s'il n'était pas possible d'améliorer les résultats,

notamment pour les plus petites concentrations, au travers de l'étude de la prédiction inverse, en faisant appel aux profils d'exactitude.

3.4.1 Analyse de la variance dans le cas de la régression linéaire non pondérée

Pour vérifier la pertinence du modèle de calibration par régression linéaire non pondérée, une ANOVA a été réalisée sous Excel. Les résultats obtenus et leur interprétation, dans le cas du psoralène, avec le Q-TOF en mode *All Ion* sont représentés dans la figure 44.

Statistiques de la régression	
Coefficient de détermination multiple	0.999289225
Coefficient de détermination R²	0.998578955
Coefficient de détermination R ² aj.	0.998223693
Erreur-type	0.077778278
Observations	6

Le modèle donne un R² proche de 1, il est donc bon

ANALYSE DE VARIANCE

	Degré de liberté	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Valeur critique de F
Régression	1	17.00400216	17.00400216	2810.829521	0.000076%
Résidus	4	0.024197842	0.00604946		
Total	5	17.0282			

la variable explicative apporte donc une quantité d'information significative au modèle

	Coefficients	Erreur-type	Statistique t	Probabilité	Limite inférieure pour seuil de confiance = 95%	Limite supérieure pour seuil de confiance = 95%
ordonnée à l'origine	0.0556	0.0414	1.3450	24.98269%	-0.059192606	0.17042593
Pente	0.0000	0.0000	53.0173	0.00008%	1.52759E-06	1.6964E-06

si la proba est > 5%, alors le coef est égal à 0
 si la proba est < 5%, alors le coef existe
 ici la pente existe mais pas l'ordonnée à l'origine

Valeurs limites du profil : 95% des valeurs se trouvent entre les bornes
 Si les bornes incluent le zéro, le coefficient n'existe pas et vice versa
 ici la pente existe mais pas l'ordonnées à l'origine

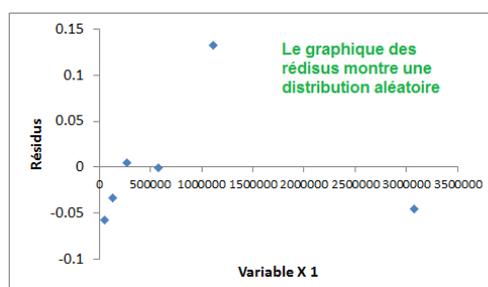


Figure 44 : Résultats et interprétation de l'ANOVA dans le cas du psoralène, en gamme solvant, analysée avec le Q-TOF en mode *All Ion*

Grâce à l'ANOVA (Figure 44), il est permis de conclure que la régression linéaire est pertinente pour cette calibration mais que l'ordonnée à l'origine pourrait être considérée comme nulle.

Le modèle de calibration linéaire, pour toutes les furocoumarines **1-15**, quelle que soit la matrice (solvant ou matrice) ou la détection (QqQ, Q-TOF *All Ion*) considérée, a été validé par l'étude ANOVA. Dans certains cas, comme dans le cas du psoralène, l'ordonnée à l'origine n'était pas pertinente. Mais compte tenu du nombre d'analyte à étudier, il a été décidé de ne pas alourdir le traitement de données en forçant certaines équations par zéro.

3.4.2 Prédiction inverse

Les profils d'exactitude ont également été utilisés pour vérifier la pertinence des modèles de régression. Ils sont particulièrement intéressants dans le cas des fonctions non linéaires, car il n'existe pas de solution analytique pour maximaliser la fonction de ressemblance.^[109] Ils permettent donc de comparer les performances de plusieurs modes de régression à la fois.

Huit profils d'exactitudes ont été construits pour chaque analyte **1-15** et pour chaque mode de détection (donc 16 au total), à partir de prédiction inverse, c'est-à-dire à partir de concentrations calculées en retour pour les solutions de calibration en utilisant les équations de calibration (Figure 45). Dans ce cas précis, il s'agit de considérer une valeur vraie. Les profils d'exactitude ont donc été construits en prenant en compte les IC avec un risque de 90%.

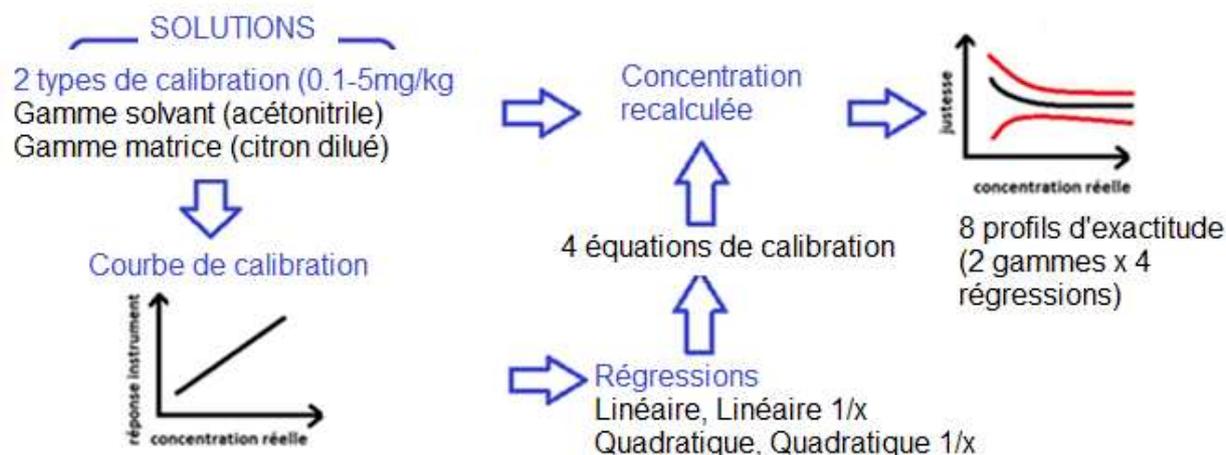


Figure 45 : Vérification de la pertinence du modèle de régression au travers de l'exploitation du profil d'exactitude pour un mode de détection donné

Les étapes de la construction d'un profil d'exactitude avec IC à 90% sont détaillées dans la figure 46 dans le cas du psoralène en détection Q-TOF *All Ion*, gamme matrice et régression linéaire.

- 1) Calculs de:
 - la justesse des 3 jours
 - la variance sur 3 jours
 - l'IC à 90% sur 3 jours

concentration (mg/kg)						Justesse			Var	IC (90%)
réelle			retrouvée			J1	J2	J3		
0.100	0.100	0.100	0.112	0.110	0.122	=C5/705	110%	122%	0.0039	8%
0.250	0.240	0.250	0.278	0.248	0.252	111%	103%	101%	0.0029	7%
0.500	0.490	0.500	0.546	0.495	0.494	109%	101%	99%	=VAR((7:K7))	7%
1.000	0.970	0.990	1.009	1.022	1.025	101%	105%	104%	0.0005	3%
1.990	1.950	1.990	1.846	1.955	1.939	93%	100%	97%	0.0014	5%
4.980	4.870	4.970	5.030	4.990	4.555	101%	102%	92%	0.0034	=LOI.STUDENT.INVERSE(0.2,15)*RACINE(M10)

15 degrés de liberté car 18 essais sur 3 jours
 0.2 car validation à 90%

- la moyenne des justesses
 - les points hauts et bas de l'intervalle (justesse moyenne +/- IC à 90%)

Justesse moyenne	limite basse	limite haute
115%	106%	123%
105%	98%	112%
103%	96%	110%
103%	100%	106%
97%	92%	102%
98%	91%	106%

- 2) représentation graphique:
 - justesse moyenne en fonction de concentration théorique
 - limites hautes et basses à 90% en fonction de concentration théorique
 - erreur acceptée sur la mesure (+/- 30%)

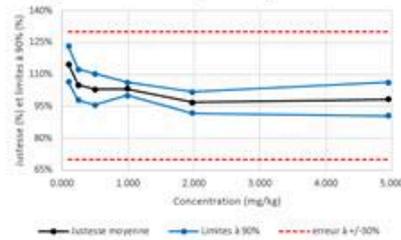


Figure 46 : Construction du profil d'exactitude avec un IC à 90% pour le psoralène, obtenu par prédiction inverse sur les solutions de calibration en gamme matrice avec le Q-TOF en mode *All Ion* et avec une régression linéaire

Il apparaît que la régression linéaire est adaptée dans le cas du psoralène, en gamme solvant, avec le détecteur Q-TOF en mode *All Ion* puisqu'il n'y a jamais croisement entre l'IC à 90% (lignes bleues, Figure 46) et l'intervalle d'acceptabilité de 30% (pointillés rouges, Figure 46).

Les figures 47 et 58 récapitulent les profils d'exactitude obtenus pour le psoralène avec les calibrations matrices avec les quatre types de régression et les deux modes de détection. Les résultats obtenus en gamme solvant sont globalement similaires, et les mêmes conclusions peuvent être tirées de leur exploitation. Par souci de concision ils ne seront donc pas reportés ici.

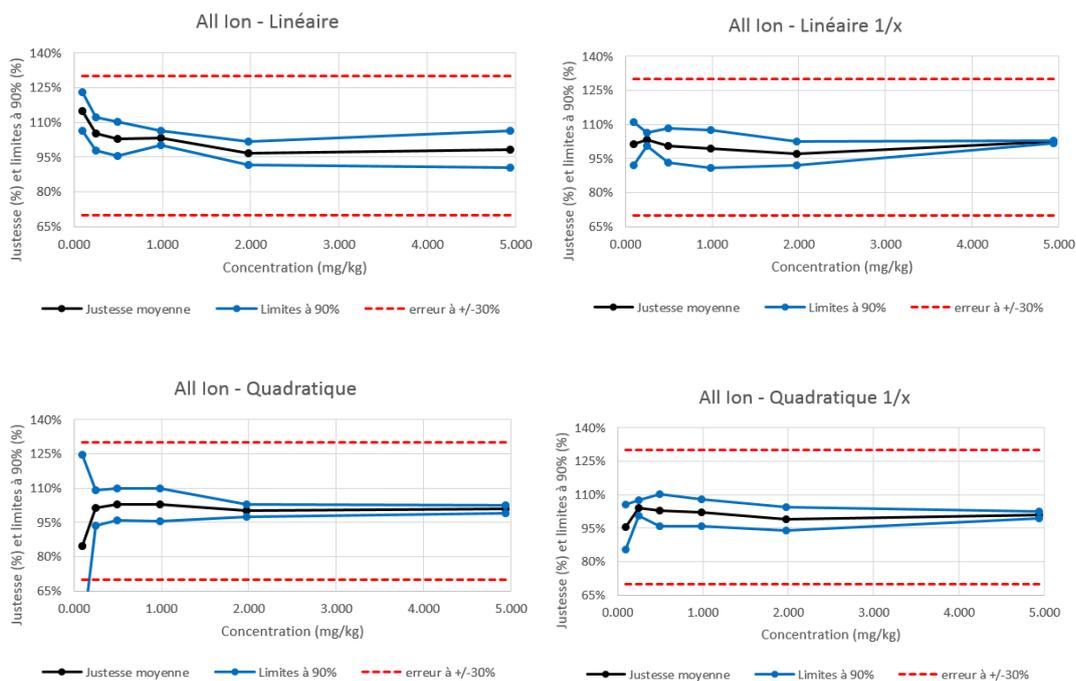


Figure 47 : Profils d'exactitude obtenus par prédiction inverse sur les solutions de calibration avec un IC à 90% pour le psoralène avec le Q-TOF en mode *All Ion* en gamme matrice et selon les quatre modes de régression testés : linéaire, linéaire pondéré en 1/x, quadratique et quadratique pondéré en 1/x

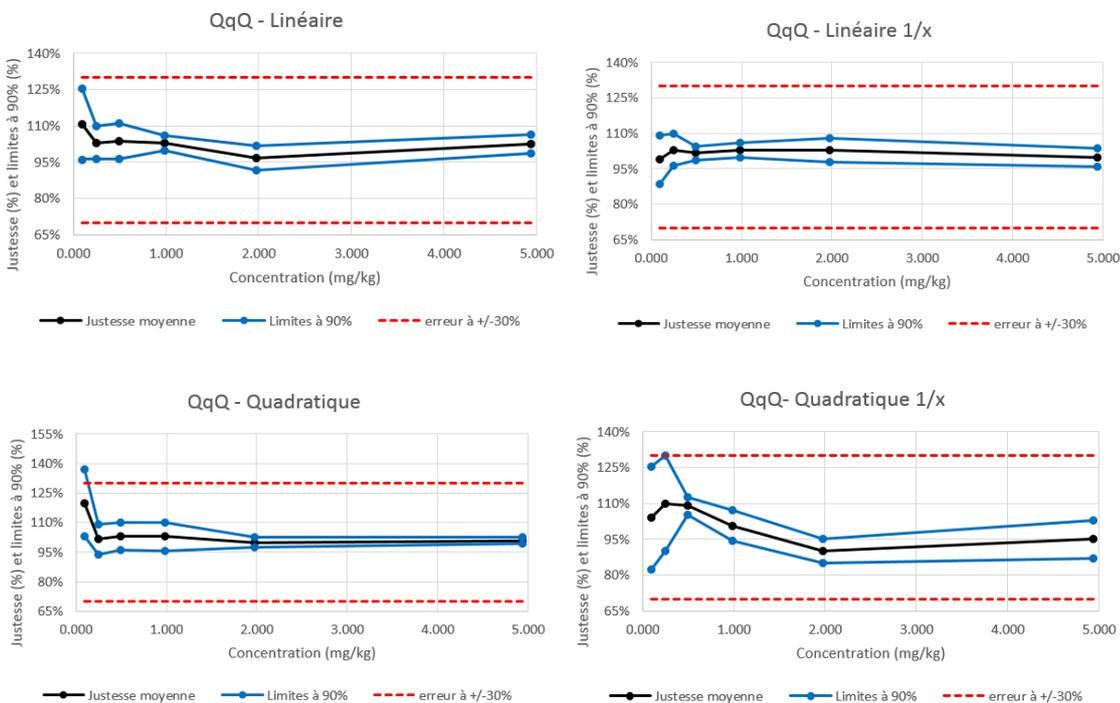


Figure 48 : Profils d'exactitude obtenus par prédiction inverse sur les solutions de calibration avec un IC à 90% pour le psoralène avec le QqQ en mode MRM en gamme matrice et selon les quatre modes de régression testés : linéaire, linéaire pondéré en 1/x, quadratique et quadratique pondéré en 1/x

Le traitement des profils d'exactitude permet de tirer plusieurs conclusions sur le mode de régression le plus adapté. Le fait de pondérer en $1/x$, pour les modèles linéaires et quadratiques, semble améliorer la justesse sur les plus petites concentrations. Les modèles linéaires semblent également entraîner une meilleure prédiction des valeurs que les modèles quadratiques. Il en résulte que le modèle linéaire pondéré en $1/x$ a été choisi pour la suite de l'étude.

Les mêmes conclusions ont été tirées pour les analytes **1-15**, pour les deux modes de détection. Le reste de cette étude présentera donc la validation des méthodes, en gamme matrice et en gamme solvant avec une calibration réalisée grâce à un modèle linéaire pondéré en $1/x$.

Ce mode de régression est également celui qui avait été reporté par Corbi *et al.*^[42]

3.5 Fidélité

La fidélité des quatre méthodes (deux modes de détection, en gamme solvant ou matrice) a été estimée au travers des composantes répétabilité et fidélité intermédiaire.

Il en résulte que 54 chromatogrammes ont été obtenus pour les solutions de validation par type de méthode (6 points de concentration x 3 injections x 3 jours). Les chromatogrammes ont également tous été réintégrés manuellement comme dans le cas des solutions de calibration et les analytes **1-15** ont été quantifiés grâce aux deux gammes de calibration (solvant et matrice) avec le modèle linéaire pondéré en $1/x$. Les valeurs de justesse ont été utilisées pour estimer la fidélité de chaque méthode à chaque niveau de concentration.

Dans le cas du psoralène avec calibration matrice et détection Q-TOF *All Ion*, les valeurs de fidélité intermédiaires et de répétabilité sont compilées dans le tableau 16 pour chaque niveau de concentration estimé.

Tableau 16 : Estimation de la répétabilité et de la fidélité intermédiaire dans le cas du dosage du psoralène avec la méthode Q-TOF en mode *All Ion* sur toute la gamme de linéarité de la méthode en gamme matrice, mode de régression linéaire pondéré $1/x$

Concentration (mg/kg)	s^2_r	s^2_R	CV_r	CV_R
0.09	0.0096	0.0749	6.34%	17.71%
0.23	0.0090	0.0163	7.94%	10.72%
0.49	0.0082	0.0190	7.75%	11.80%
0.99	0.0035	0.0052	5.51%	6.65%
1.97	0.0008	0.0008	2.72%	2.69%
4.93	0.0016	0.0017	3.77%	3.79%

Les coefficients de variation sont tout à fait acceptables dans un contexte de dosage à de si faibles concentrations. Globalement les mêmes tendances ont été observées pour les furocoumarines **1-15** dans tous les essais évalués.

Les méthodes testées se sont donc toutes montrées fidèles avec des $CV_r < 8\%$ et des $CV_R < 20\%$ au maximum pour les plus petites concentrations. Etant donné le nombre incalculable de valeurs obtenues, il ne paraît pas pertinent de les reproduire dans ce manuscrit. Cependant ces valeurs ont été exploitées au travers des profils de linéarité et d'exactitude qui ont été générés. En effet, les valeurs de répétabilité et de fidélité intermédiaire rentrent en jeu dans la détermination des IT de ces profils.

3.6 Linéarité

Au total 90 profils de linéarité ont été générés pour les 15 analytes, trois modes de détection et deux solvants de dilution.

La figure 49 présente par exemple le profil de linéarité obtenu pour le psoralène avec une calibration en gamme matrice avec le Q-TOF en mode *All Ion* avec un IT de 90% et une erreur autorisée de +/- 30%. Le coefficient de détermination est supérieur à 0.994, critère de linéarité de la méthode selon l'IOFI.^[90] La méthode est donc jugée linéaire sur la gamme de concentration 0.1-5mg/kg.

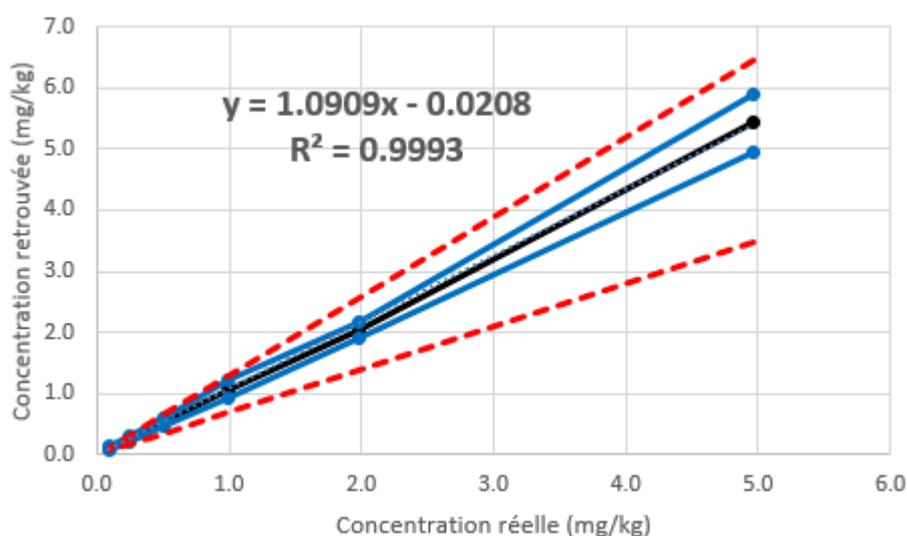


Figure 49 : profil de linéarité obtenu pour le psoralène (1) avec la méthode Q-TOF *all Ion* avec une régression linéaire pondérée en $1/x$ en gamme matrice. En bleu sont représentées les limites de l'IT à 90% et en rouge celles de l'intervalle d'acceptabilité à +/-20%

Les autres profils de linéarité obtenus pour les autres analytes, bien que différant dans l'équation et la largeur des bornes, ont permis de démontrer que toutes les méthodes QqQ, et Q-TOF *All Ion*, en gamme solvant ou matrice, étaient linéaires dans toute la gamme de concentration testée.

Cependant les profils de linéarité ne rendent pas compte de la justesse de la méthode. En effet, sur les profils de linéarités sont représentables les IT et les intervalles d'acceptabilité mais leur exploitation n'est pas aisée car il est nécessaire de zoomer sur les plus petites concentrations. La représentation des mêmes données, sous une forme relative et non pas absolue, est plus propice à cette interprétation. La justesse des méthodes a donc été considérée au travers des profils d'exactitude.

3.7 Profils d'exactitude

Les profils d'exactitude avec IT à 90% et intervalle d'acceptabilité à 30% ont été générés pour les furocoumarines **1-15**, pour les deux modes de détection et les deux solvants de calibration. Les 60 profils obtenus ont été ensuite exploités pour déterminer les LQ et les gammes de chaque méthode.

Le profil d'exactitude en IT pour le psoralène, avec calibration en matrice et détection Q-TOF *All Ion* est représenté en figure 50. Cette dernière représente les mêmes données que la figure 49 mais en valeurs relatives.

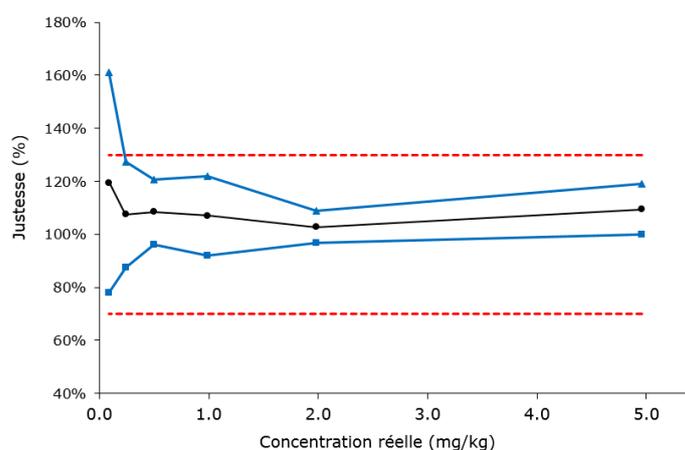


Figure 50: Profil d'exactitude pour le psoralène (1) avec la méthode Q-TOF *all Ion* en utilisation une calibration obtenue par régression linéaire pondérée en $1/x$ en gamme matrice. Avec un IT à 90% (lignes bleues) et une erreur acceptable à 30% (lignes rouges).

Cette représentation permet d'appréhender directement les performances de la méthode. Dans le cas du psoralène, la méthode avec calibration en matrice et détection Q-TOF *All Ion* semble donner des résultats acceptables pour tous les niveaux de concentrations testés sauf celui correspondant à la plus petite concentration (0.1 mg/kg) qui est donc en dessous de la LQ (Voir paragraphe 3.8.)

Les figures 51 à 53 représentent les trois autres profils d'exactitude en IT obtenus, en gamme matrice et en gamme solvant, pour les deux modes de détection, dans le cas du psoralène.

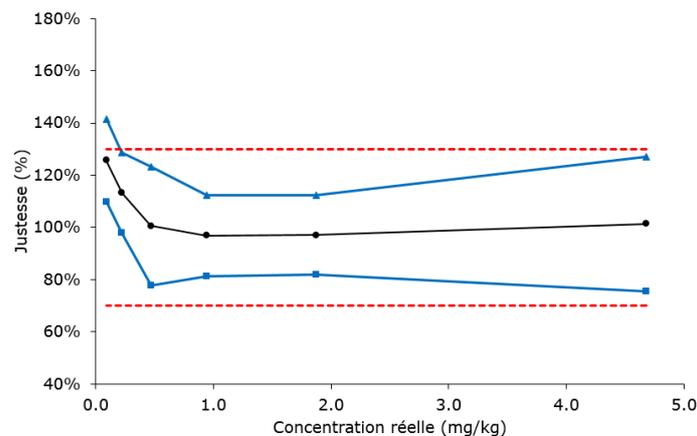


Figure 51: Profil d'exactitude pour le psoralène (1) avec la méthode Q-TOF *all Ion* en utilisation une calibration obtenue par régression linéaire pondérée en $1/x$ en gamme solvant. Avec un IT à 90% (lignes bleues) et une erreur acceptable à 30% (lignes rouges).

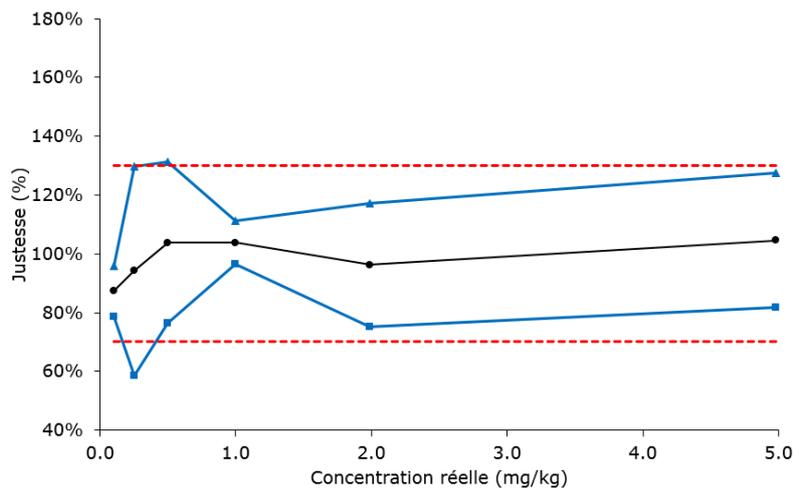


Figure 52: Profil d'exactitude pour le psoralène (1) avec la méthode QqQ en utilisation une calibration obtenue par régression linéaire pondérée en $1/x$ en gamme solvant. Avec un IT à 90% (lignes bleues) et une erreur acceptable à 30% (lignes rouges).

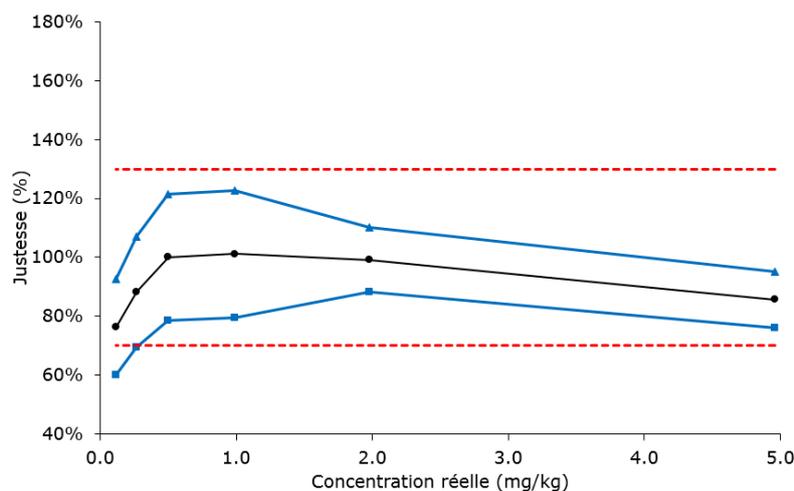


Figure 53: Profil d'exactitude pour le psoralène (1) avec la méthode QqQ en mode MRM en utilisant une calibration obtenue par régression linéaire pondérée en $1/x$ en gamme matrice. Avec un IT à 90% (lignes bleues) et une erreur acceptable à 30% (lignes rouges).

Les quatre profils d'exactitude ont ainsi été générés pour les furocoumarines **1-15** et ils ont été exploités pour déterminer les LQ et les gammes des méthodes.

3.8 Limite de quantification et gamme des méthodes

Les LQ ont été déterminées à partir des profils d'exactitude. Dans le cas du psoralène, avec calibration en matrice et détection Q-TOF *All Ion*, par exemple, la LQ est de 0.24mg/kg. Il en résulte que la gamme de la méthode est de 0.24-5mg/kg dans ce cas précis.

Les 60 profils d'exactitude en IT (15 analytes x 2 méthodes x 2 calibrations) ont été exploités pour déterminer les LQ et donc les gammes de méthodes correspondantes (Tableau 17).

Les gammes des méthodes ont ensuite été déduites à partir des LQ et du point haut de la gamme de linéarité qui est de 5ppm pour toutes les furocoumarines.

Tableau 17 : LQ en solvant ou en matrice, en ppm, pour les composés 1-15 en fonction du mode de détection

N°	QqQ		Q-TOF	
	MRM, solvant	MRM, matrice	All Ion, solvant	All Ion, matrice
10	0.3	0.3	0.2	0.2
11	0.3	0.3	0.9	0.5
2	0.3	0.2	0.5	0.1
8	5	0.3	0.2	0.2
7	5	0.3	0.5	0.1
15	2	0.2	0.2	0.2
9	0.2	0.2	0.5	0.1
12	2	0.3	0.2	0.1
13	2	0.3	0.5	0.2
4	0.3	0.2	0.2	0.1
5	2	0.2	0.2	0.1
6	0.3	0.2	0.2	0.2
14	5	0.2	0.2	0.2
1	0.2	0.2	0.2	0.2
3	2	0.3	0.2	0.1

N° de la furocoumarine selon Tableau 9

Les meilleures LQ, ou les gammes de méthodes les plus larges, ont été obtenues lorsque la calibration était réalisée en gamme matrice plutôt qu'en gamme solvant.

Cela s'explique facilement par l'effet matrice déjà reporté par Corbi *et al.*^[42] et Masson *et al.*^[45] En effet, les effets matriciels potentiellement présents dans les solutions de validation étaient à priori les mêmes que dans les solutions de calibration en matrice. L'erreur faite en quantifiant avec une droite de calibration en gamme solvant est donc plus grande car cet effet matriciel n'a pas été pris en compte.

Ces écarts de LQ entre gamme matrice et gamme solvants sont beaucoup plus importants avec la méthode QqQ MRM qu'avec la méthode Q-TOF *All Ion*. Cela s'explique par la spécificité apportée par la haute résolution de la dernière méthode. La méthode QqQ MRM serait donc beaucoup plus sensible aux effets matrice que la seconde méthode.

D'ailleurs, pour certains analytes (**7,8,14** et **15**), en gamme solvant, la méthode QqQ MRM n'est d'ailleurs validée que pour le point haut de concentration à 5ppm alors qu'avec le Q-TOF la LQ obtenue est correcte.

Ces observations sont cependant à pondérer car la même matrice a été utilisée dans les solutions de validations et de calibration. Il est probable qu'avec une matrice différente dans les deux cas, les LQ auraient été différentes, aussi bien en gamme matrice que solvant. Il ne s'agit donc pas de considérer ces valeurs de LQ comme absolues mais plutôt comme indicatrices de la performance de la méthode à répondre aux exigences législatives, c'est-à-dire à quantifier avec une erreur limitée et définie à des concentrations suffisamment basses pour pouvoir fournir un résultat conforme aux demandes réglementaires ce qui est le cas avec les méthodes présentées dans ce manuscrit.

Enfin les LQ obtenues avec la méthode Q-TOF *All Ion* sont globalement plus basses que celles obtenues avec le QqQ en mode MRM lorsque la gamme solvant est considérée mais lorsqu'il s'agit d'une calibration en matrice, les limites des deux méthodes sont assez comparables. Ces LQ sont globalement plus importantes que celles reportées par Masson *et al.*, avec sa méthode TOF, comprises entre 0.05 et 0.1ppm.^[45] Cependant ces dernières n'ont pas été déterminées selon la stratégie des profils d'exactitude telle que présentée dans ce manuscrit. Les LQ reportées par Corbi *et al.*^[42] sont encore plus faibles (0.01 à 0.1 mg/l) mais le mode d'ionisation, de détection et la matrice analyses étant différents, il est difficile de comparer ces données. Hiserodt *et al.* n'ont pas publié de LQ à proprement parlé mais la plus petite concentration incluse dans leur calibration en mode MRM avec le QqQ était de 1ppm.^[193]

3.9 Robustesse

La robustesse de la méthode a été évaluée en considérant les paramètres de séparation mais également de détection.

3.9.1 Impact d'une variation des conditions chromatographiques

Lorsque les variations de débit ou de température sont trop importantes, les profils chromatographiques obtenus ne sont plus compatibles avec les méthodes QqQ et Q-TOF car des fenêtres de temps sont paramétrées pour filtrer l'ion parent au niveau du quadripôle. Si les temps de rétention varient trop, les analytes ne seront plus détectés.

Il a été ainsi observé qu'au-delà d'une variation individuelle de +/- 10% du débit et de +/- 5°C de la température, les analytes ne seront plus correctement détectés avec ces deux modes.

Dans le cas de la méthode Q-TOF *All Ion*, il y aura un impact très limité sur les performances de la méthode car l'acquisition est effectuée en mode Scan. Même si une tolérance sur le temps de rétention est utilisée dans l'algorithme d'identification du logiciel de traitement, l'analyste est alerté par le logiciel de traitement de données de la possible détection du composé avec une erreur sur le temps de rétention (message : *RT tolerance*). L'analyste pourra vérifier si un problème a eu lieu lors de l'acquisition et tout de même considérer l'identification comme valide.

L'impact du tampon dans la phase mobile a déjà été discuté précédemment et ne sera pas rediscuté dans cette partie.

3.9.2 Impact d'une variation des conditions de détection

3.9.2.1 Impact de la variation de l'énergie de fragmentation

L'impact de la variation des paramètres de fragmentation n'a pas été évaluée directement. Cependant, il a été montré que l'acquisition en mode *All Ion* du Q-TOF présentait un dysfonctionnement avec une énergie de fragmentation variable qui est incrémentée à partir de la valeur initialement renseignée (120V) lorsque l'EC varie. Or l'étape d'identification des composés à partir des acquisitions en mode *All Ion* se fait par comparaison des spectres MS et MS/MS avec ceux enregistrés en mode MS/MS *Target* avec cette fois la bonne énergie de fragmentation. Il s'avère que l'identification des analytes **1-15** n'a pas été influencée par cette variation pouvant aller jusqu'à +40V. Une variation raisonnable de l'énergie de fragmentation ne devrait donc induire aucun impact sur la reconnaissance des analytes avec les méthode Q-TOF *All Ion*.

D'autre part lors de l'optimisation des conditions de fragmentation des modes QqQ MRM et Q-TOF *Target*, il a été observé un palier dans la réponse de chaque détecteur sur environ une trentaine de volts ce qui englobe une variation minime de l'énergie de fragmentation qui pourrait potentiellement se produire en cas de dysfonctionnement.

3.9.2.2 Impact de la variation de l'énergie de collision

De la même façon, l'impact d'une variation de l'énergie de collision n'a pas été vérifiée directement. Cependant, lors de l'optimisation des conditions de détection du QqQ en mode MRM et du Q-TOF *Target*, il a été observé qu'une variation de +/- 5V pouvait avoir un impact significatif sur la réponse enregistrée. Il n'a pas été vérifié quelle variation d'EC serait acceptable

car cela dépend de chaque fragment étudié et de chaque analyte et cela aurait nécessité beaucoup trop de temps. Il est donc pris comme postulat, pour accepter la validité des méthodes proposées, que si l'EC appliquée par l'instrument n'est pas celle réellement renseignée dans la méthode, cette dernière sera quand même identique pour tous les échantillons analysés, calibration incluse ce qui corrigera artificiellement la déviation observée. Pour vérifier ce postulat, des échantillons de type « QC » sont insérés aléatoirement tout au long de la séquence d'acquisition pour vérifier la déviation limitée de la réponse (RSD<5%).

3.9.2.3 Impact de la durée de l'acquisition

Il a parfois été observé, notamment lors de l'analyse de l'atranol et du chloroatranol par LC/MS (voir *Chapitre 3*), une baisse du signal MS avec le temps lors de longues séquences.

Dans le cas de cette étude, aucune diminution significative de réponse n'a été observée comme illustré par la figure 54 dans le cas de l'analyse de solutions identiques de psoralène avec la méthode Q-TOF *All Ion*. Pour chaque concentration considérée, l'aire obtenue lors de la première injection a été considérée comme aire de référence. Les aires obtenues lors des injections suivantes, espacées par l'analyse de 11 autres échantillons à chaque fois, ont été comparées à l'aire de référence. Entre la première série et la quatrième série, une quarantaine d'injections ont donc eu lieu. Les variations observées semblent faibles (+/- 11% au maximum) et aléatoires car indépendantes de l'ordre d'injection d'une part et d'autre part, elles vont dans les deux sens (augmentation ou diminution de réponse).

Cette méthode peut donc être utilisée pour analyser des longues séquences d'au moins une quarantaine d'échantillons soit une journée de travail sans dérive significative du signal.

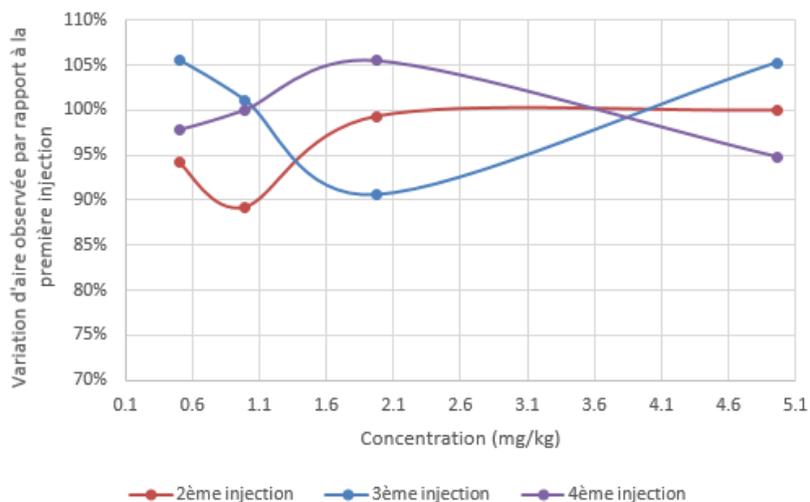


Figure 54: Vérification de la continuité du signal obtenu avec le Q-TOF dans le cas du psoralène analysé en mode *All Ion* et exprimée sous forme de recouvrement d'aire par rapport à la première injection. Entre chaque série d'injections sont passés 11 échantillons.

3.10 Approche de la dilution extrapolative

Nous avons émis l'hypothèse que la meilleure performance des méthodes en gamme de calibration matrice était dû à l'effet matrice mais avons souligné les limites de ce plan de validation qui se limitait à un seul type de matrice. Un autre inconvénient de la réalisation de calibration en gamme matrice est de pouvoir trouver de façon systématique une matrice suffisamment peu riche, voire exempte, des analytes à doser. La calibration en gamme solvant est donc plus avantageuse de ce point de vue. Pour pallier au fait que cette dernière ne corrige pas l'effet matrice, l'approche de dilution extrapolative a donc été considérée.^[44]

L'exemple de l'époxybergamottin (**15**) a été choisi pour illustrer cette étude car il s'agit du composé qui a été reporté comme particulièrement problématique par Corbi *et al.*^[42] La solution de validation mère, qui correspond à 4.81 mg/kg dans la matrice dans le cas de **15**, a été considérée comme étant une dilution à 10% de l'échantillon à doser car 10% d'HE de citron avait été utilisé pour la préparer. L'échantillon correspond donc théoriquement à une HE de citron dopée avec 48.1 mg/kg de **15**.

Cette solution de validation mère a été diluée dans l'acétonitrile de façon à diminuer la teneur en matrice initialement présente et donc d'atténuer le potentiel effet matrice. Le composé **15** a été quantifié dans les différentes solutions en utilisant la gamme de calibration obtenue en solvant. Les concentrations ainsi calculées ont ensuite été ramenées à la teneur estimée dans

l'échantillon de départ puis représentées en fonction du facteur de dilution (Figure 55). Dans le cas de **15**, quantifié avec la méthode Q-TOF *All Ion*, avec régression linéaire pondérée en $1/x$, un effet matrice suppresseur est visible puisque les concentrations retrouvées dans l'échantillon sont d'autant plus importante que l'échantillon est dilué. Dans l'approche de dilution extrapolative, la concentration théorique dans l'échantillon est celle qui correspond à l'ordonnée à l'origine de l'équation obtenue. Dans l'exemple considéré, la concentration estimée de **15** dans l'HE de citron dopé est donc de 48.8 mg/kg ce qui est extrêmement proche de la valeur théorique avec un biais d'1% environ. Cette excellente performance est cependant à relativiser avec la bonne performance déjà obtenue même avec la moins grande dilution considérée (4% de matrice). En effet, sans avoir recours à l'EDA, la teneur estimée était de 45.6 mg/kg ce qui correspond à un biais absolu d'environ 5% qui est très faible compte tenu de la forte teneur en matrice de l'échantillon analysé. Il est possible que l'HE de citron utilisée n'apporte pas suffisamment d'effet matrice et nous aurions pu réitérer l'expérience avec d'autres HE. Cependant nous ne disposons pas d'autres matrices contenant suffisamment peu d'analytes au moment de notre étude. Cette expérience a tout de même souligné l'effet matriciel, même mineur qui peut avoir lieu dans le cas du dosage des furocoumarines par MS et l'intérêt de considérer l'approche EDA pour les doser.

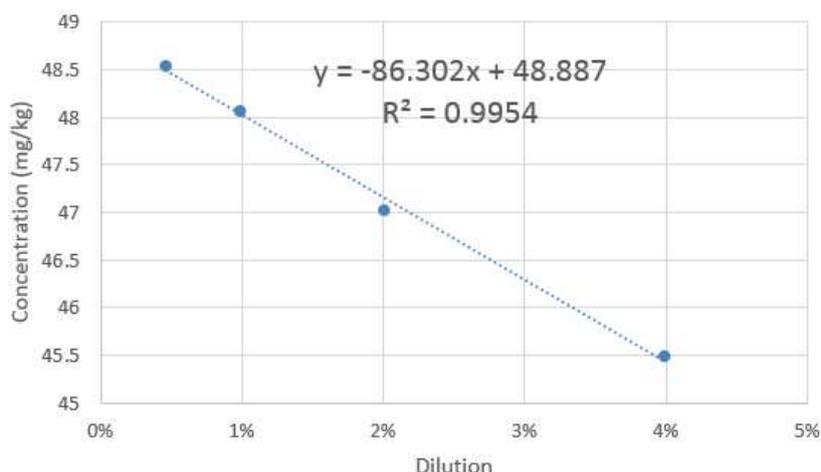


Figure 55: Concentration en époxybergamottin (**15**) retrouvée en fonction de la dilution de l'échantillon de citron dopé, méthode Q-TOF *All Ion*, régression linéaire pondérée en $1/x$, calibration en solvant.

Pour vérifier l'applicabilité de cette approche dans un cas réel, les analytes, présents dans une matière première de la collection interne ont été dosés, en utilisant l'approche EDA avec la gamme solvant ou en utilisant la calibration en gamme matrice. Dans le cas de la calibration en

matrice, seule une dilution d'échantillon est considérée. Nous avons choisi une dilution de la matière première à 1mg/g comme employée par les analystes d'IFF lors de leur dosage par UHPLC/MS QqQ.^[193] La méthode officielle de l'IFRA par HPLC/UV^[79] a également été employée pour effectuer le dosage.

La figure 56 représente les résultats obtenus par EDA dans le cas de l'oxypeucedanin (5). Un effet matrice de suppression est observé.

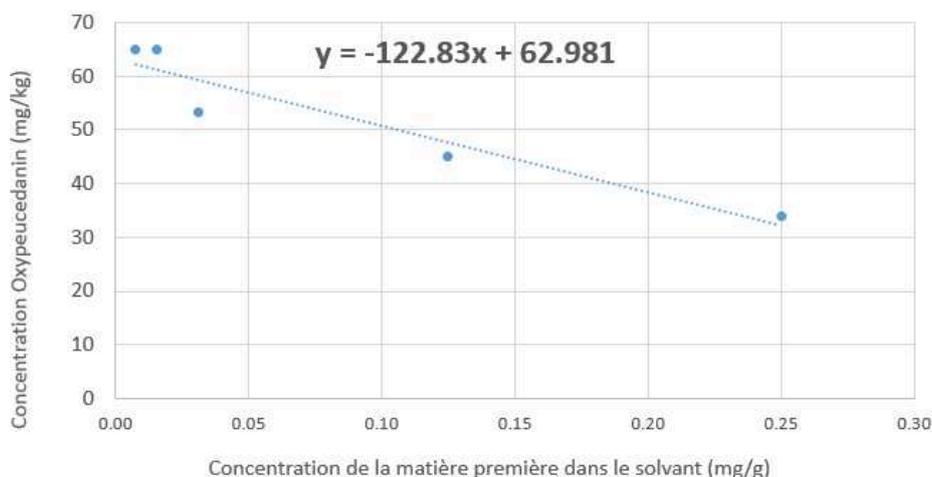


Figure 56: Concentration en oxypeucedanin (5) retrouvée en fonction de la dilution de l'échantillon d'une huile essentielle de la collection interne, méthode Q-TOF All Ion, régression linéaire pondérée en $1/x$, calibration en solvant.

Considérant l'équation obtenue, il en résulte que la matière première contiendrait 63ppm de cet analyte. Le dosage en gamme matrice a quant à lui conduit à une valeur de 41ppm soit presque 35% de moins que la valeur obtenue par EDA en gamme solvant. La valeur réellement attendue est inconnue mais le dosage de cet analyte dans la même matière première en faisant appel à la méthode officielle de l'IFRA a permis d'obtenir une valeur de 72ppm ce qui est du même ordre de grandeur (+14%) que la valeur obtenue par EDA.

L'EDA semble donc adaptée au dosage des furocoumarines dans les matières premières de parfumerie.

3.11 Comparaison des méthodes

Quatre méthodes ont été validées pour doser les furocoumarines **1-15** dans les matières premières de parfumerie par UHPLC couplée à la spectrométrie de masse : méthode QqQ en

mode MRM et méthode Q-TOF *All Ion*, à chaque fois avec une gamme de calibration en matrice ou en solvant.

Toutes les méthodes ont permis d'obtenir des limites compatibles avec la réglementation concernant les furocoumarines bien que de meilleures performances semblent obtenues en gamme matrice.

Cependant il est assez compliqué de trouver une matrice suffisamment représentative du futur échantillon à analyser et également exempte des analytes à doser. En ce sens, la calibration en solvant avec EDA semble plus adaptée et c'est cette approche qui a été choisie pour être appliquée en routine au sein du laboratoire.

D'un point de vue spécificité, la méthode Q-TOF *All Ion* semble préférable à la méthode QqQ MRM de par l'accès au spectre de masse produit de l'analyte. Cette dernière méthode est également plus robuste que la première si l'on considère la nécessité de définir des segments de temps lors de l'acquisition en mode MRM.

4 Conclusions et perspectives

Trois méthodes UHPLC/MS ont été comparées pour quantifier les furocoumarines **1-15** dans les matières premières naturelles. La séparation chromatographique, commune aux trois méthodes, a été préalablement optimisée pour minimiser les coélutions gênantes entre analytes d'intérêt mais également avec d'autres interférents naturels potentiellement présents dans les extraits à analyser. La méthode permet en effet la séparation des 15 analytes d'intérêt de l'angélicine (**16**) et d'autres furocoumarines et coumarines considérées dans l'étude (**17-26**).

Une colonne de type C18 modifiée avec un groupement polaire a ainsi été préférée à la colonne C18 classique initialement proposée par l'IFRA.^[79] Le système de solvant proposé a été simplifié par rapport à la méthode officielle et optimisé pour favoriser la détection des ions $[M+H]^+$ d'intérêt. Enfin le recours à une colonne plus courte avec des diamètres de particules plus faibles a permis de diminuer le temps d'analyse d'un facteur quatre.

Les trois modes de détection considérés étaient le mode MRM avec le détecteur QqQ, et les modes *All Ion* et *Target* avec le détecteur Q-TOF. Les paramètres de masse (EC et énergie de fragmentation) ont été optimisés afin de favoriser la meilleure réponse du spectromètre en vue de la validation des méthodes. Le mode *Target* du Q-TOF a rapidement été abandonné au profit

du mode *All Ion* qui permettait une meilleure détection des analytes. La validation de méthodes a permis de mettre en évidence qu'une calibration linéaire pondérée en $1/x$ était adaptée. Deux types de calibration ont été testés à savoir en matrice ou en solvant. Les deux permettent d'obtenir des paramètres de validation satisfaisants. Compte tenu de la possibilité de faire appel à l'EDA, c'est la gamme solvant qui a été préférée au sein du laboratoire.

En mai 2017, la version 8 du logiciel MassHunter, corrigeant le bug lié aux variations incontrôlées de l'énergie de fragmentation, a été installée au sein du laboratoire.

Une partie de ce travail a fait l'objet de d'un poster présenté au congrès ISEO 2016, à Nice, en Septembre 2016.^[384]

Malgré les performances des méthodes de dosage de furocoumarines par LC/MS observées dans cette étude ou encore reportées dans la littérature, l'IFRA préconise toujours à l'heure actuelle l'analyse des furocoumarines **1-15** par HPLC avec détection UV.^[79] Pourtant, l'AWG de l'IFRA a réalisé une étude collaborative en 2015 pour leur dosage par LC/MS-MS mais aucune note n'a été publiée sur les résultats. Quelques profils d'exactitude obtenus lors de cette étude ont cependant été publiés récemment par Begnaud *et al.*^[207]

Dans le contexte d'une analyse de contrôle qualité, ou de suivi de procédé, les analyses doivent être réalisées dans un temps très court pour ne pas retarder la vente ou la production. Le recours aux analyses HPTLC peut alors être considéré (Voir *Chapitre 2b*).

CHAPITRE 2b : Analyse des furocoumarines par HPTLC

PARTIE 1 : Introduction et rappels bibliographiques

1 Analyse des furocoumarines par HPTLC

Le Chapitre 2a a rapporté l'analyse des furocoumarines par UHPLC/MS. La spectrométrie de masse peut être appliquée dans le cas de la caractérisation de nouveaux ingrédients ou dans le cas du dosage à l'état de trace, mais elle n'est pas forcément nécessaire et/ou utilisable en routine, dans le cas du contrôle qualité par exemple. La détection UV utilisée dans la méthode officielle de l'IFRA^[79] est suffisante dans le cas de l'analyse en routine d'extraits connus. Cependant, cette méthode d'analyse par HPLC est assez longue puisqu'elle nécessite près de 40 min par échantillon. Une journée d'analyse peut donc être requise lors d'un dosage si l'on tient compte du temps nécessaire pour réaliser la calibration externe. Dans ce contexte, il apparaissait intéressant de pouvoir proposer une méthode d'analyse plus rapide applicable dans un laboratoire de contrôle qualité en faisant par exemple appel à l'HPTLC.

La CCM/HPTLC, méthode simple, rapide et peu coûteuse permettant d'analyser plusieurs échantillons à la fois, a déjà été employée pour analyser des furocoumarines principalement en phase normale (Tableau 18).

La technique a parfois été utilisée en deux dimensions (2D) ^[208-212], c'est-à-dire qu'après une première élution sur la plaque, une seconde élution était effectuée après avoir tourné la plaque à 90°. Il n'est alors possible d'analyser qu'un échantillon à la fois mais les taches coéluees en première dimension peuvent être séparées en seconde dimension.

Les furocoumarines sont généralement détectées sous UV à 366nm sans aucune révélation.^[213,214] L'utilisation d'un densitomètre a été rapportée par Rawat *et al.* pour quantifier le psoralène (**1**) (1 to 5 µg.spot⁻¹) et l'héraclenol (1 to 4 µg.spot⁻¹)^[214] ou encore par Kushboo *et al.* pour quantifier également le psoralène (10 to 100 ng.spot⁻¹) avec des limites de détection et de quantification de 8.65 ng et 26.2 ng.^[215]

A notre connaissance, les furocoumarines **1-15** (Figure 26, Chapitre 2a) ou même les six composés réglementés (**2,4,5,7,11,15**) n'ont jamais été analysés en même temps par CCM/HPTLC.

Il a donc été décidé dans ce contexte de proposer une méthode HPTLC permettant leur séparation rapide et d'évaluer les performances de la densitométrie pour quantifier le bergaptène (2).

Tableau 18 : Conditions d'analyse des furocoumarines par CCM/HPTLC reportées dans la littérature

Furocoumarine*	Plante	Plaque	Phase mobile	Références
2,8,12,13	<i>Angelica sylvestris</i>	SiO ₂ (prep.)	Hex/EtOAc 80:20 (v/v)	[216]
2-4,7-9,12,14,16	<i>Heracleum sibiricum</i>	CN-Silica	1D: H ₂ O/ACN 70:30 (v/v) triple élution 2D: Hept/EtOAc 65:35 (v/v) double élution	[209]
		Diol-Silica	1D: 10 % MeOH/H ₂ O + 1% Acide formique 2D: 100% iPr ₂ O	
2, 4,	<i>Heracleum sphondylium</i>	SiO ₂	EtOAc/CHCl ₃ /Et ₂ O/Hex 8.8:17.6:17.6:56 (v/v)	[217]
2-5, 12-14	<i>Heracleum genus fruits</i>	SiO ₂	DCM/Hept 7:3 + 5% Diisopropyl ether (v/v)	[214]
		Florisil	5% EtOAc dans le DCM	
1	<i>Heracleum candicans</i>	SiO ₂	Toluène/Et ₂ O/Acide acétique 6:4:1 (v/v/v)	[218]
1	<i>Psoralea corylifolia</i>	SiO ₂	Toluène/EtOAc 75:25 (v/v)	[215]
3	<i>Diplolaena mollis</i>	SiO ₂ (prep.)	Hex/EtOAc 8:2 (v/v) or DCM/MeOH 9:1 (v/v)	[219]
5	<i>Harbouria trachypleura</i>	SiO ₂ (prep.)	Hex/EtOAc 3:2 (v/v) or DCM/Me ₂ CO 97:3 (v/v)	[220]
5,6,13	<i>Peucedanum ostruthium</i>	SiO ₂ (prep.)	CHCl ₃ /MeOH/H ₂ O 80:20:21 (v/v)	[221]

*=numérotation selon tableau 9

Prep. = préparative, SiO₂= silice, CN= cyano, Florisil = silicate de magnésium, Hex= hexane, EtOAc= acétate d'éthyle, ACN= acétonitrile, Hept= heptane, MeOH= méthanol, CHCl₃= chloroforme, Et₂O= éther diéthylique, DCM= dichlorométhane, Me₂CO= acétone, H₂O= eau.

2 Objectifs de cette étude

Dans le contexte d'une analyse de contrôle qualité, ou de suivi de procédé, les analyses doivent être réalisées dans un temps très court pour ne pas retarder la vente ou la production. Les ingrédients analysés sont déjà connus et la composition en composés réglementés déjà déclarée dans les documents techniques associés. Il est donc possible de faire appel à des analyses qualitatives ou semi-quantitatives pour vérifier l'absence ou la présence de certains composés en dessous d'une valeur seuil déclarée. C'est dans ce contexte que l'analyse par HPTLC a été considérée.

L'HPTLC paraissait prometteuse pour se substituer à l'analyse par HPLC/UV au sein du laboratoire d'analyse dans les cas suivants :

- Première étude rapide de nouveaux ingrédients pour déterminer l'intérêt de faire un dosage HPLC ;
- Vérification de la conformité d'un ingrédient par rapport à des spécifications par comparaison entre l'ingrédient et des standards déposés aux concentrations limites ;
- Suivi des étapes d'un procédé de purification ayant pour but d'éliminer les furocoumarines.

D'autre part, grâce à un prêt de la part de la société Chromacim, la détection par densitométrie a pu être testée pour quantifier le bergaptène (**2**) afin d'en comparer les performances par rapport à un dosage obtenu par HPLC/UV.

Ce chapitre présentera, le développement de plusieurs méthodes HPTLC, en 1 ou 2 dimensions et en phase normale et inverse, permettant de rapidement estimer la teneur en furocoumarines **1-15** et la validation d'une méthode de dosage du bergaptène (**2**) par HPTLC/densitométrie.

PARTIE 2 : Partie expérimentale

1 Standards

Les solvants, les matières premières et les standards de furocoumarines et coumarines sont les mêmes que ceux utilisés lors du développement des méthodes d'analyse par MS (*Chapitre 2a*).

2 Solutions standards

Toutes les solutions ont été préparées en dilution massique dans l'acétonitrile ou le tétrahydrofurane. La solution des furocoumarines **1-15** a été diluée deux fois pour obtenir une solution mère à 500mg/kg. Les solutions de furocoumarines et coumarines individuelles ont été préparées à 200mg/kg dans l'acétonitrile.

Pour la validation de méthode, des solutions en solvant (acétonitrile) ou en matrice (huile essentielle de citron à 25% dans l'acétonitrile) ont été préparées avec des concentrations allant de 2 à 100 mg/kg. Une solution de calibration et trois solutions de validation ont été préparées de façon identique dans les deux cas pendant trois jours différents.

3 Instrumentation

Le système HPTLC utilisé était de marque Camag (Muttens, Switzerland) et était constitué d'un passeur d'échantillon *Automatic TLC Sampler 4* (ATS4), d'une chambre de développement *Automatic Developing Chamber 2* (ADC2), et d'une chambre de visualisation *Camag TLC Visualizer* ou d'un scanner densitomètre *Camag TLC scanner 4*. Le système était piloté par le logiciel winCATS (version 1.4.8.2031). Les plaques en verre recouvertes de gel de silice F₂₅₄ 20×10cm provenaient de chez Merck (Darmstadt, Germany) tandis que les plaques de mêmes dimensions et RP18W/UV254 ont été fournies par Macherey Nagel. Les plaques étaient rincées une première fois avec le solvant d'élution avant de déposer les ingrédients à analyser. 10µl de chaque solution ont été déposés avec une largeur de bande de 6mm. L'élution a été réalisée dans une chambre double (Camag) préalablement saturée en vapeur de phase mobile pendant 20min à 25°C avec une humidité contrôlée de 40%.

Conditions d'élution

Lors des analyses classiques (1D) en phase normale, le solvant d'élution était composé d'un mélange chloroforme/heptane 95:5 (v/v). Ce système a été utilisé pour la première dimension des analyses 2D en phase normale. La seconde élution a été réalisée avec un mélange dichlorométhane/éther diéthylique 100:3 (v/v) après rotation de la plaque de 90°. Lors des analyses 1D en phase inverse, l'éluant était constitué de H₂O/MeOH 30:70 (v/v) + 0.1% HCOOH. La distance de migration a été fixée à 85mm. Après élution, les plaques ont été séchées à l'air chaud.

Détection

Dans le cas des analyses qualitatives, la détection a été effectuée à 366nm dans la chambre de visualisation. Dans le cas des analyses quantitatives, la détection a été obtenue avec le densitomètre selon les paramètres suivants : largeur de détection 4×0.30mm, vitesse de détection : 20mm/s en mode scan absorption/réflexion à 310nm (lampe deutérium).

4 Traitement des données

4.1 LD

La LD a été définie comme la plus petite concentration permettant une identification certaine de l'analyte sur la base de la comparaison du rapport frontal et du spectre UV de la tache.

4.2 Fonction de réponse instrumentale

L'aire UV à 310nm a été prise en compte pour obtenir les équations de calibration. Les modèles linéaire et quadratique non pondérés ont été considérés dans cette étude.

4.3 Profils d'exactitude, limites de quantification et gamme de la méthode

Les LQ et gammes de méthode ont été obtenues en exploitant les profils d'exactitude en IT construits avec un risque à 80% selon la norme NF V03-110^[43] comme détaillé dans le *Chapitre 2a*.

PARTIE 3 : Résultats

Plusieurs méthodes HPTLC ont été développées lors de cette étude. Pour faciliter la lecture, des noms ont été attribués aux méthodes tout au long de ce manuscrit :

- Méthode HPTLC en une dimension sur phase normale : HPTLC-1D N
- Méthode HPTLC en deux dimensions sur phase normale : HPTLC-2D N
- Méthode HPTLC en une dimension sur phase inverse : HPTLC-1D R

1 Mise en place de la méthode HPTLC-1D N

1.1 Développement des conditions de séparation de la méthode HPTLC-1D N

Les différents systèmes d'élution CCM/HPTLC trouvés dans la littérature (Tableau 19) ont été testés pour séparer dans un premier temps les furocoumarines **1-15** sur plaque de silice.

Le système d'élution le plus prometteur était celui proposé par Wawrzynowicz *et al.* constitué d'un mélange dichlorométhane/heptane 7:3 + 3% éther diisopropylique.^[214] Ce système a tout d'abord été modifié en remplaçant l'éther diisopropylique par 5% d'éther diéthylique car il s'agissait d'un solvant plus couramment utilisé au sein du laboratoire. Les R_f obtenus dans ces conditions pour les 15 furocoumarines n'étaient pas satisfaisants puisque compris entre 0 et 0.6. D'autre part, seuls neuf taches étaient visibles ce qui signifiait un trop grand nombre de coélutions. L'éther diéthylique a donc été éliminé de la phase mobile pour obtenir un simple mélange de dichlorométhane et d'heptane 7:3. Les proportions de dichlorométhane ont été augmentées ce qui a permis de faire éluer davantage les standards mais sans atteindre des R_f satisfaisants. Le dichlorométhane a donc été remplacé par du chloroforme qui a permis d'obtenir une meilleure résolution entre les taches liées aux composés les plus polaires (**6** et **8**) tout en

étalant les Rf de 0.03 à 0.74. La meilleure séparation a été obtenue avec le système chloroforme/heptane 95:5 (v/v) (Figure 57).

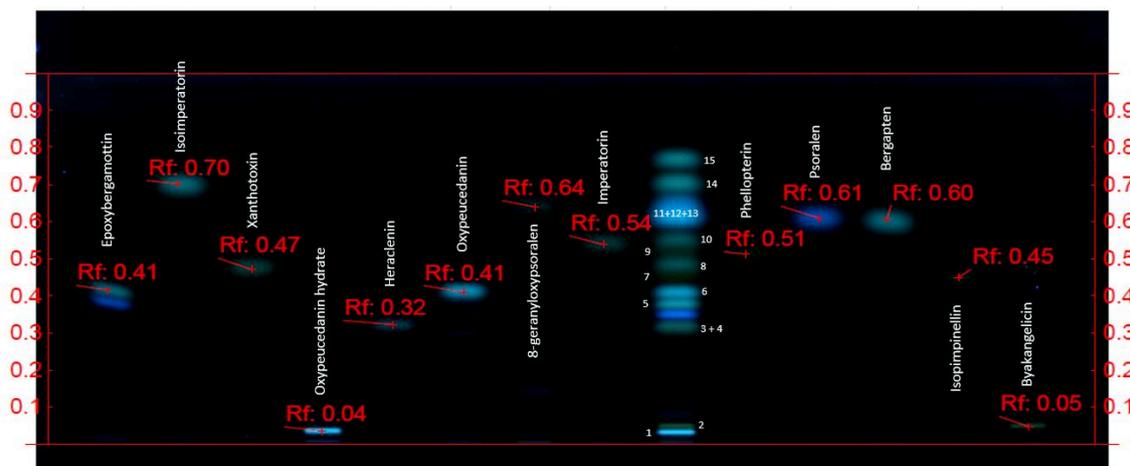


Figure 57 : Séparation des furocoumarines 1-15 avec la méthode HPTLC-1D N (chloroforme/heptane 95:5 (v/v), plaque silice F254), détection à 366nm. La numérotation de la plaque ne représente pas le n° des analytes mais l'ordre croissant des taches

Il a déjà été rapporté que le nettoyage de la plaque CCM avant analyse permettait d'éliminer les impuretés résiduelles afin d'obtenir une meilleure ligne de base et un meilleur rapport signal sur bruit lors de la détection par densitométrie.^[222] Si le méthanol a parfois été employé^[223], la phase mobile peut tout aussi bien être utilisée.^[222] Chacune des plaques a donc été rincée avec la phase mobile avant chaque analyse. Le rinçage a permis d'obtenir des taches mieux résolues tout en entraînant une meilleure rétention des analytes (Figure 58).

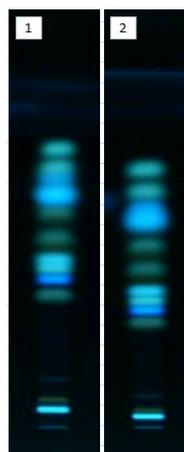


Figure 58 : Impact du rinçage de la plaque sur la séparation des analytes 1-15 dans les conditions de la méthode HPTLC-1D N, détection à 366nm. (1) sans nettoyage de la plaque (2) avec nettoyage de la plaque avec le solvant d'élution CHCl₃/Heptane 95:5

1.2 Spécificité de la méthode HPTLC-1D N

En plus de la séparation des composés **1-15**, des furocoumarines supplémentaires ont été analysées, tout comme dans le cas de l'étude par UHPLC (voir *Chapitre 2a*) à savoir l'angélicine (**16**, Figure 42, *Chapitre 2a*), le bergaptol (**20**, Figure 42, *Chapitre 2a*) et l'isobergaptène (**17**, Figure 42, *Chapitre 2a*), le Psora-4 (**18**, Figure 42, *Chapitre 2a*) et le 5-(4-phénoxybutoxy)psoralène (**19**, Figure 42, *Chapitre 2a*) (Figure 59).

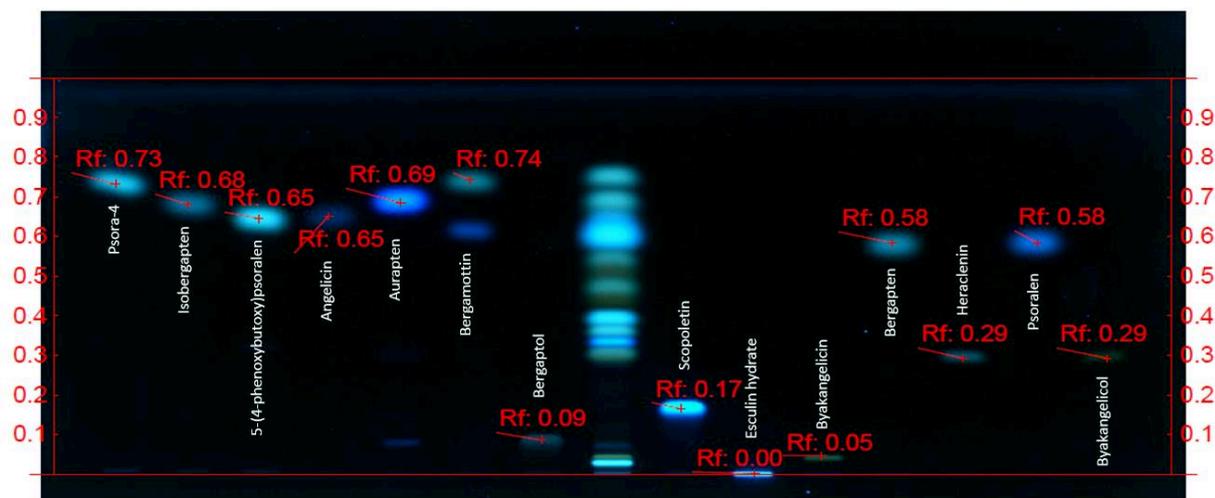


Figure 59 : Séparation des furocoumarines supplémentaires 16-20 avec la méthode HPTLC-1D N (chloroforme/heptane 95:5 (v/v), plaque silice F254), détection à 366nm. Au milieu de la plaque a été déposé le mélange des furocoumarines 1-15 pour comparaison.

Les composés présentant un groupement hydroxyle libre sont les plus retenus sur la plaque (**6**, **8** et **20**) et présenteront donc les Rf les plus faibles. Les composés de type époxyde éluent davantage sur la plaque (**5**, **7**, **9** et **15**). Si la furocoumarine **1** est prise comme référence puisqu'elle n'est porteuse d'aucune substitution, il n'est pas évident de conclure clairement sur l'impact des substitutions (nature et position) sur la rétention des furocoumarines dans les conditions de l'analyse (Tableau 19). En effet, les composés **3-9,12,14,15** seront plus retenus, et **11** et **13** seront moins retenus. Il est cependant possible d'émettre l'hypothèse que la substitution en position 8 a plus d'impact que celle en position 5 sur la rétention des analytes.

En effet, les composés substitués en position 8 sont plus retenus que leurs isomères substitués en position 5 (**3** vs. **2**, **9** vs. **5**, **10** vs. **11**, **12** vs. **13**) car ils présentent systématiquement des Rf plus faibles.

Il semblerait que la configuration angulaire ou linéaire de la furocoumarine n'influe pas sur la rétention puisque **1** et **16** ont des Rf équivalents (0.61 vs. 0.65).

Les conditions d'élution proposées ne permettent pas de séparer **1/2**, **7/9** et **10/16/19**. Les deux premiers couples de furocoumarines coélucées diffèrent par la présence ou non d'un groupement méthoxy sur leur cycle en position 5. Il semblerait donc que cette substitution n'influe pas sur la rétention des analytes sur la plaque. Cependant ces analytes, s'ils ne sont pas présents en même temps dans une même matière première, pourraient être identifiés grâce à la couleur de leur tache qui diffère, quelle que soit la concentration. (Figures 60 et 61).

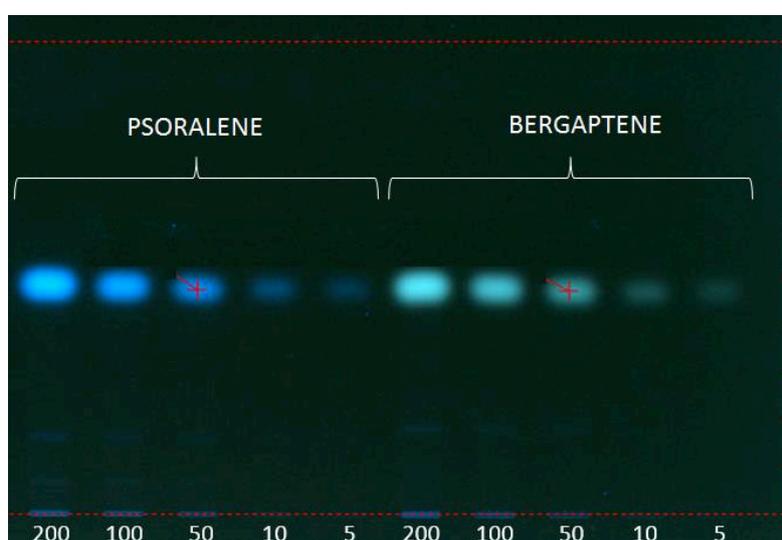


Figure 60 : Couleurs des taches observées à 366nm pour le psoralène (1) et le bergaptène (2) dans les conditions de la méthode HPTLC-1D N, à différentes concentrations exprimées en mg/kg

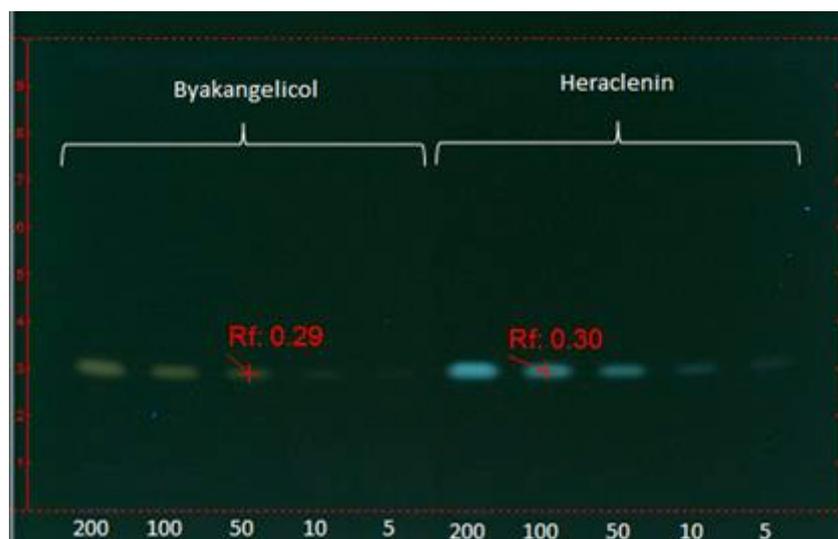
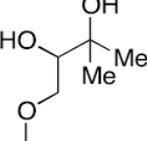
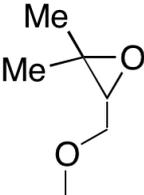
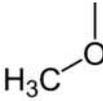
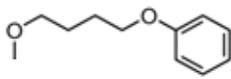
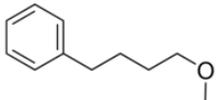
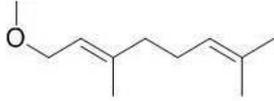
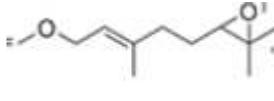
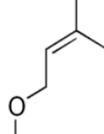
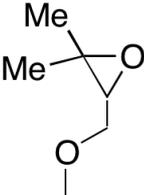
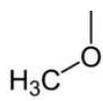
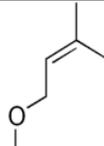
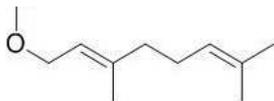


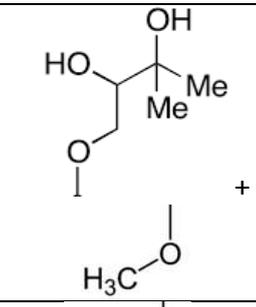
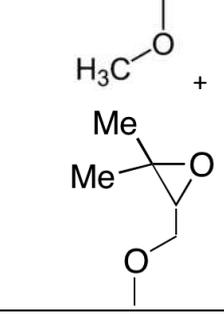
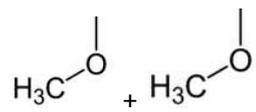
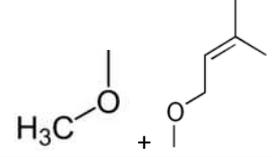
Figure 61 : Couleurs des taches observées à 366nm pour le byakangélicol (7) et l'héraclénine (9) dans les conditions de la méthode HPTLC-1D N, à différentes concentrations exprimées en mg/kg

Il semblerait en effet, qu'une corrélation existe entre les couleurs des taches observées à 366nm avec la position des substitutions sur le cycle (Tableau 19). Les furocoumarines linéaires non substituées donneront des taches bleu foncé, celles substituées en position 5 des taches bleu turquoise, ou bleu-vert, celles en position 8 des taches vertes et celles en position 5 et 8 des taches rouge-orange. La nature de la substitution ne semble cependant pas impacter la couleur de la tache. Sah *et al.* ont déjà rapporté des différences de couleur en fonction des formes angulaires ou linéaires des furocoumarines.^[224] Selon les auteurs, **1** donnerait une tache bleue tandis qu'une tache violette serait observée pour **16**. Dans cette étude, les deux composés concernés donnent des taches de la même couleur bleu foncé. Les composés **2** (linéaire) et **17** (angulaire), substitués par un groupement méthoxy en position 5 donnent respectivement des taches bleu turquoise et bleu foncé. Sans autres couples de furocoumarines linéaires/angulaires, il est donc difficile de conclure si les furocoumarines angulaires donneront toujours une tache bleu foncé, qu'elles soient substituées ou non, ou bien si la substitution par un groupement méthoxy sur la position 5 n'est pas suffisante pour induire un changement de couleur qui, par ailleurs, est observé dans le cas des furocoumarines linéaires.

Tableau 19 : Rf de 1-15 avec la méthode HPTLC-1D N et couleurs observées à 366nm pour les composés 1-15 en fonction de la substitution

Furo.*	Rf	Couleur (366 nm)	Position de la substitution	Substitution	Configuration
1	0.61		-	-	Linéaire
16	0.65		-	-	Angulaire
17	0.68		5		Angulaire
6	0.03		5		Linéaire

Furo.*	Rf	Couleur (366 nm)	Position de la substitution	Substitution	Configuration
5	0.41		5		Linéaire
2	0.6		5		Linéaire
19	0.65		5		Linéaire
18	0.73		5		Linéaire
11	0.74		5		Linéaire
15	0.38		5		Linéaire
13	0.7		5		Linéaire
9	0.31		8		Linéaire
3	0.47		8		Linéaire
12	0.54		8		Linéaire
10	0.62		8		Linéaire

Furo.*	Rf	Couleur (366 nm)	Position de la substitution	Substitution	Configuration
8	0.05		5 + 8		Linéaire
7	0.31		5 + 8		Linéaire
4	0.45		5 + 8		Linéaire
14	0.52		5 + 8		Linéaire

* n° de la furocoumarine selon Tableau 9

La spécificité de la méthode a également été évaluée au travers de l'étude des coumarines et composés analogues déjà analysés par UHPLC (*Chapitre 2a*) à savoir la coumarine (**21**, Figure 43, *Chapitre 2a*), la visnagine (**24**, Figure 43, *Chapitre 2a*), le citroptène (**25**, Figure 43, *Chapitre 2a*), l'umbelliférone (**26**, Figure 43, *Chapitre 2a*), la scopolétine (**23**, Figure 43, *Chapitre 2a*) et l'auraptène (**22**, Figure 43, *Chapitre 2a*) (Figure 61).

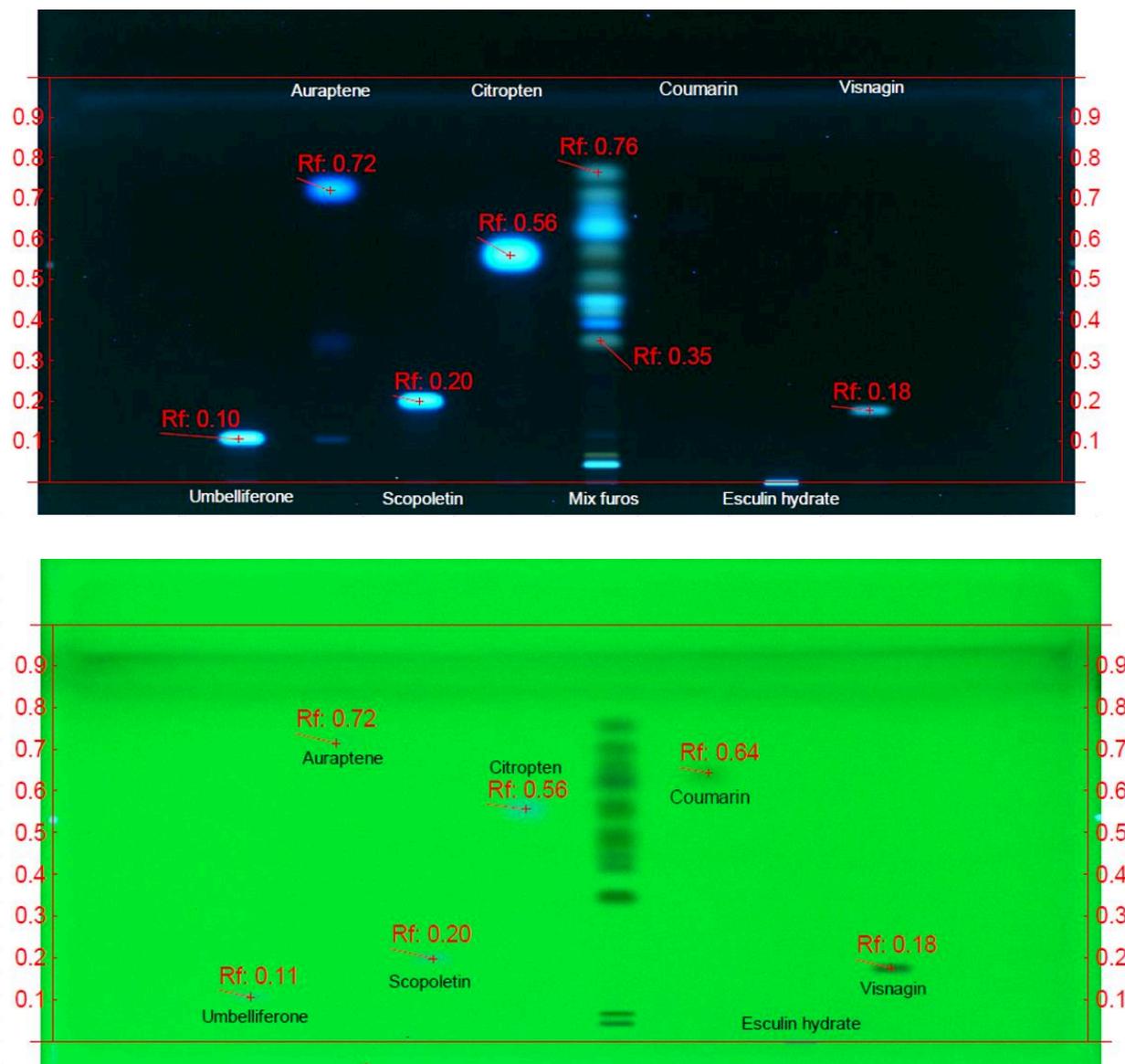


Figure 62 : Séparation des composés supplémentaires avec la méthode HPTLC-1D N (chloroforme/heptane 95:5 (v/v), plaque silice F254), détection à 366nm (haut) ou 254nm (bas). Au milieu de la plaque a été déposé le mélange des furocoumarines 1-15 pour comparaison.

Dans les conditions d'analyse proposées, les coumarines et les furocoumarines présentent des Rf similaires (entre 0.1 et 0.85) et ne seront donc pas différenciables sur ce seul critère. Cependant l'étude de spectres UV permet facilement de les discriminer (Figure 63) ce qui nécessite un densitomètre.

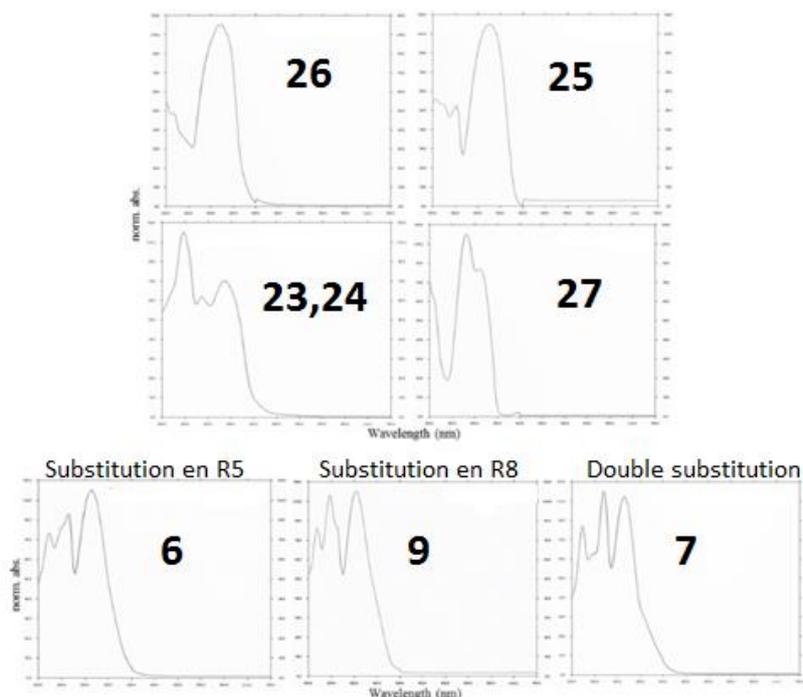


Figure 63 : Spectres UV enregistrés par le densitomètre pour les composés furocoumarines 7,6,9 et les composés 23,24 et 27

La couleur des taches à 254nm et 266nm peut cependant être exploitée à des fins d'identification. Le composé **27**, par exemple, est uniquement détecté à 254nm. Les composés **23-26** quant à eux donnent des taches bleues à 254nm tandis que les furocoumarines donneront des taches noires à cette longueur d'onde.

1.3 Exemples d'utilisation de la méthode HPTLC-1D N

La méthode HPTLC-1D N proposée ne permet donc pas de séparer les furocoumarines **1-16** totalement mais elle paraît suffisante pour pouvoir être utilisée en première approche, avant de faire appel à des analyses plus longues en HPLC, pour savoir si un ingrédient contient des furocoumarines. En une seule analyse, des dizaines d'ingrédients peuvent en effet ainsi être contrôlés (Figure 64).

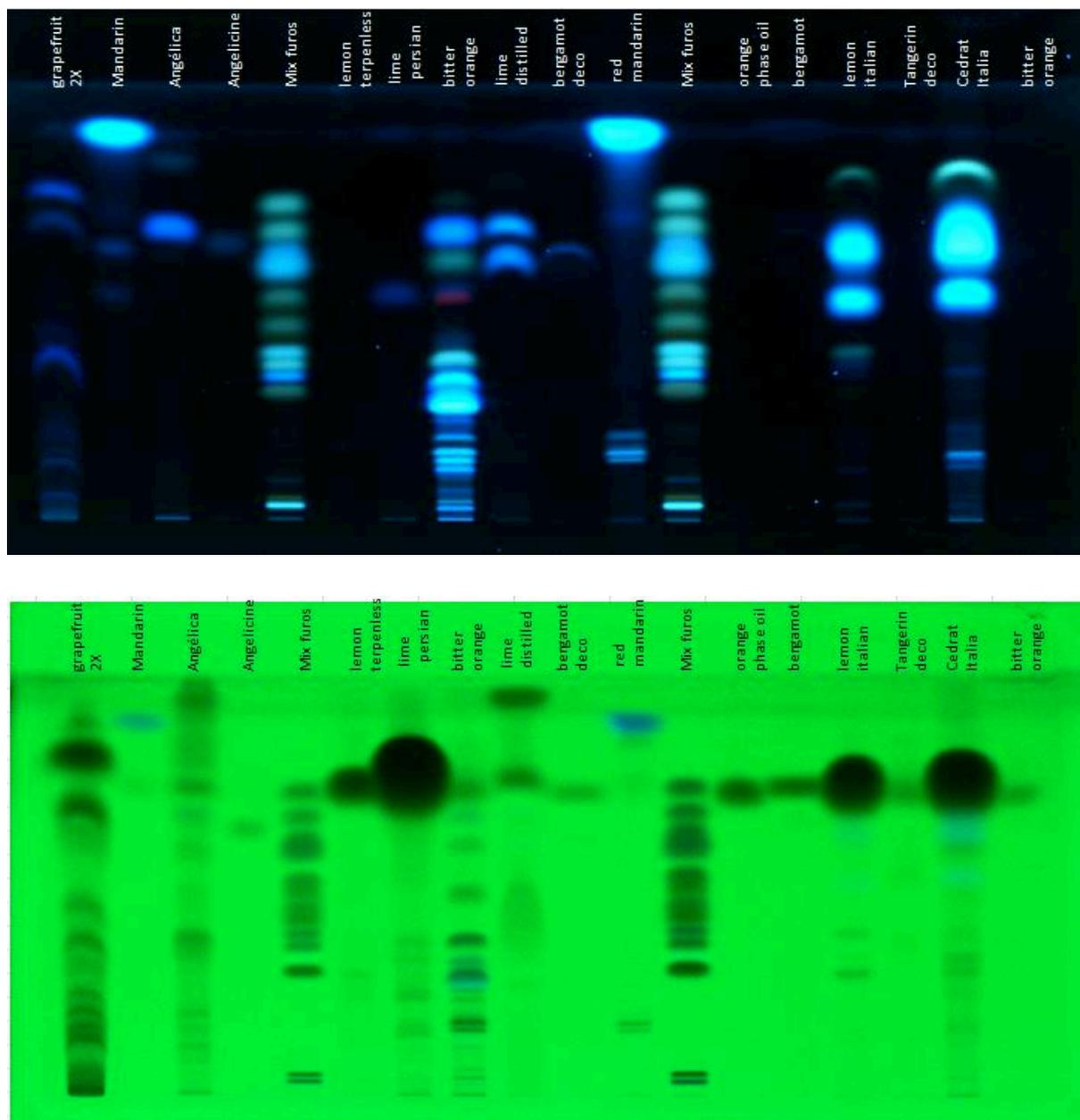


Figure 64 : Analyse de matières premières de parfumerie avec la méthode HPTLC-1D N (chloroforme/heptane 95:5 (v/v), plaque silice F254), détection à 366nm (haut) ou 254nm (bas). Le mélange des furocoumarines 1-15 et l'angélicine (16) ont été déposés pour comparaison.

La méthode HPTLC peut également être appliquée au suivi d'un procédé visant à éliminer les furocoumarines d'une matière première (Figure 65) ou encore pour suivre des essais de purification par chromatographie Flash (Figure 66).

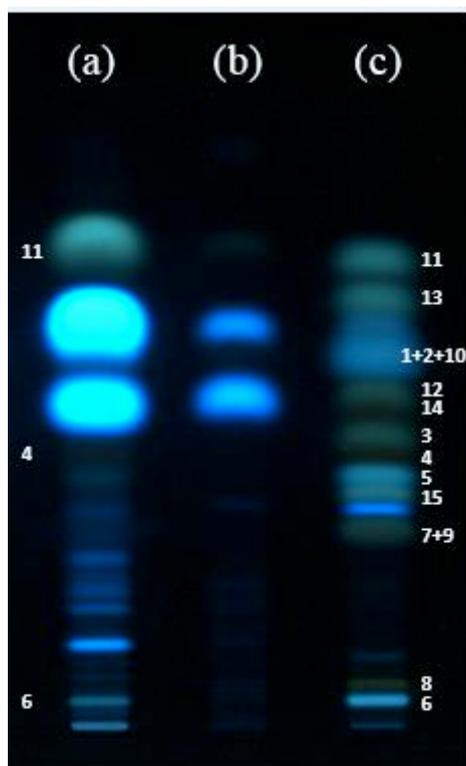


Figure 65 : Suivi d'un procédé de défurocoumarination par distillation moléculaire avec la méthode HPTLC-1D N, détection à 366nm (a) huile essentielle, (b) huile essentielle distillée, (c) mélange des standards 1-15

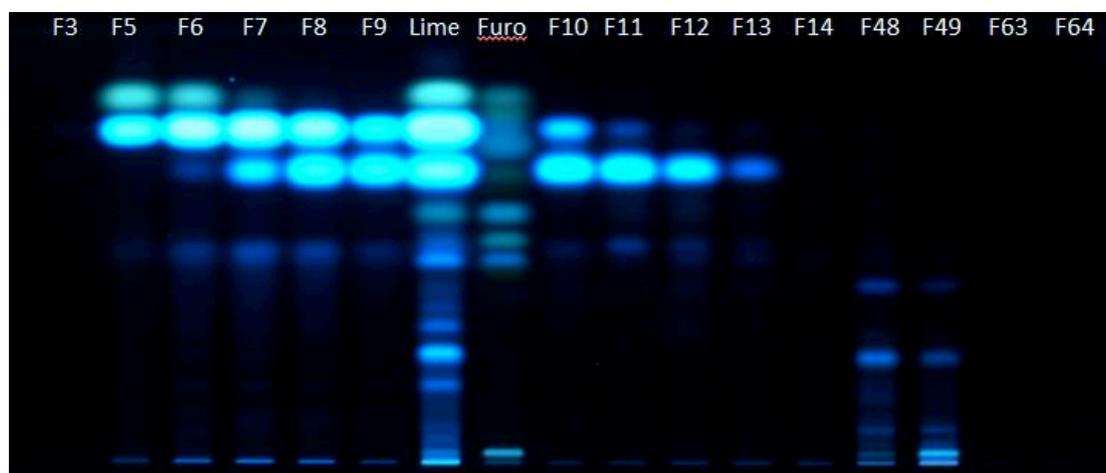


Figure 66: Suivi d'un fractionnement par chromatographie flash avec méthode HPTLC-1D N, détection à 366nm. L'huile essentielle de départ ainsi que le mélange des standards 1-15 ont été déposés au centre de la plaque pour comparaison avec les différentes fractions (F).

Cette méthode peut également être utilisée dans un but semi-quantitatif en déposant l'ingrédient en même temps que différents points de gamme pour estimer une teneur approximative. En effet, à 366nm, les composés **1-15** donnent des taches toujours visibles à 5mg/l voire 1mg/l pour certaines (Figure 67). A 254nm par contre, les furocoumarines sont détectables uniquement jusqu'à 50mg/l environ (Figure 68).



Figure 67 : Détection à 366nm du mélange des standards 1-15 déposé à différentes concentrations et analysé avec la méthode HPTLC-1D N



Figure 68 : Détection à 254 nm du mélange des standards 1-15 déposé à différentes concentrations et analysé avec la méthode HPTLC-1D N

L'étude HPTLC de l'huile essentielle de citrus et de sa version rectifiée par distillation moléculaire (DM) a permis par exemple d'émettre l'hypothèse de la présence de **11** (tache 15) à une concentration supérieure à 250ppm, de **5** (tache 6) à environ 250ppm, de **6** (tache 2) à environ 100ppm (Figure 69).

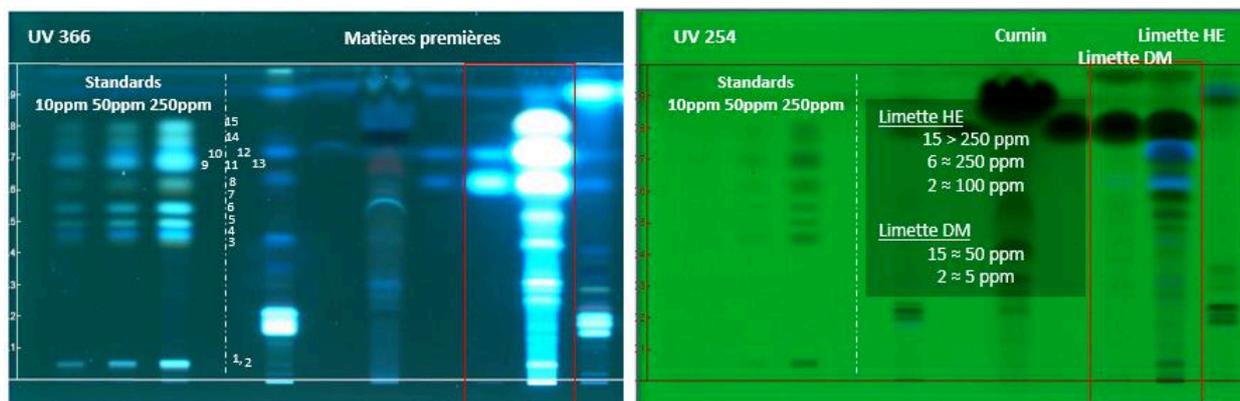


Figure 69 : Détection à 366nm (gauche) et 254 nm (droite) de matières premières déposées en même temps que le mélange de 1-15 à 10, 50 t 250ppm après élution selon la méthode HPTLC 1D en phase normale

Le potentiel quantitatif de la méthode HPTLC-1D N a été évalué au travers de la mise en place d'une méthode pour quantifier le bergaptène par densitométrie.

2 Quantification du bergaptène par densitométrie avec la méthode HPTLC-1D N

Le bergaptène a été quantifié par densitométrie à 310nm par calibration externe en appliquant une régression linéaire non pondérée sur la gamme 2-25mg/kg (Figure 70, droite). Lorsque la gamme de calibration est élargie jusqu'à 100mg/kg, la droite de calibration prend une allure quadratique (Figure 70, gauche).

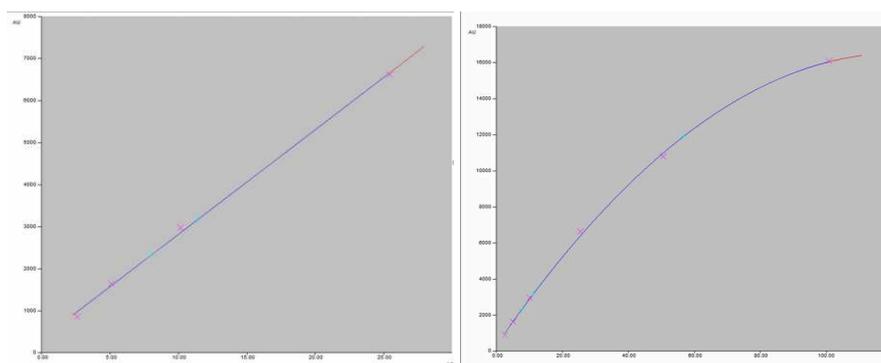


Figure 70 : Droites de calibration obtenues pour le bergaptène à 310nm entre 2 et 25mg/kg (gauche) ou 2 et 100mg/kg (droite) et analysé dans les conditions de la méthode HPTLC-1D N.

Sa LD a été estimée à 2 mg/kg car il s'agissait de la plus petite concentration permettant son identification sans ambiguïté compte tenu de l'allure du spectre UV obtenu, à Rf égal (Figure 71).

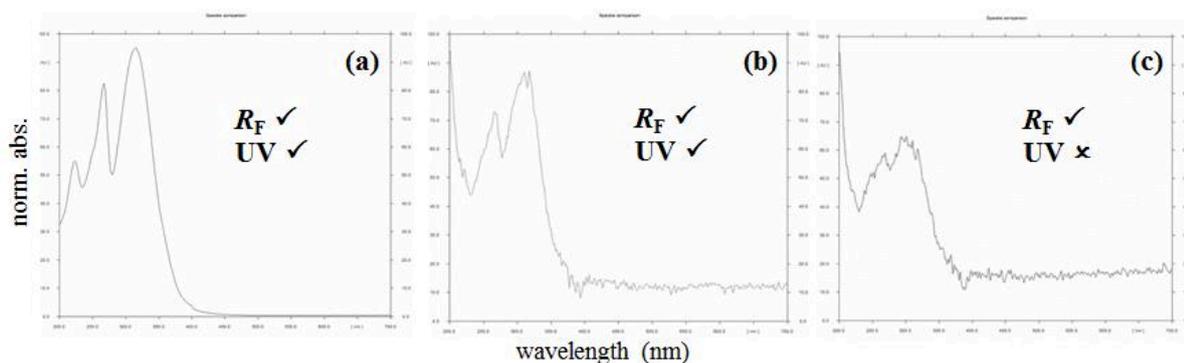


Figure 71 : Spectre UV du bergaptène détecté à 310nm par densitométrie en fonction de la concentration et dans les conditions de la méthode HPTLC-1D N. (a)100mg/kg, (b) 2mg/kg, (c) 1mg/kg.

La méthode a été évaluée à la fois en gamme solvant et en gamme matrice à la fois avec la gamme de calibration réduite et élargie. Dans tous les cas, la méthode s’est avérée linéaire ($R^2 > 0.994$) aussi nous avons décidé de garder la calibration quadratique pour maximiser la plage de linéarité de la méthode entre 2.5 et 100mg/kg.

Les profils d’exactitude en IT à 80% obtenus en gamme matrice et en gamme solvants, en régression quadratique, sont représentés en Figure 72.

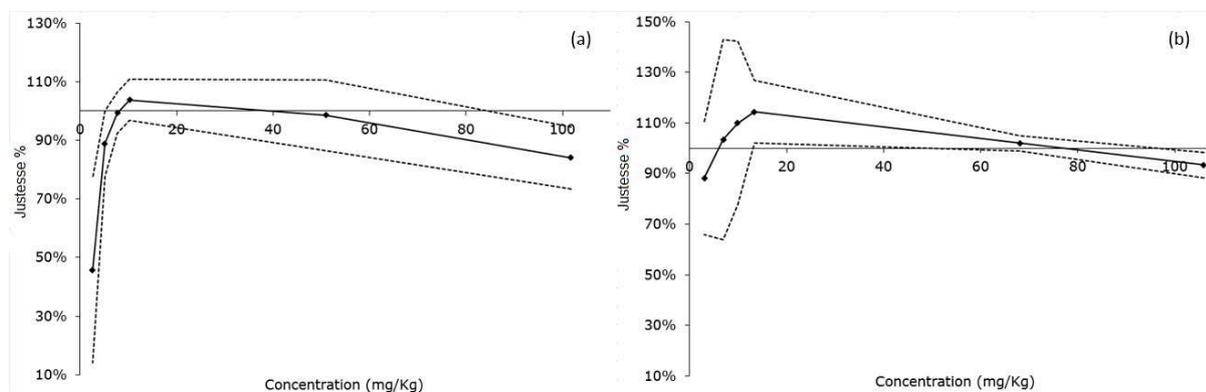


Figure 72 : Profils d’exactitude obtenus en gamme solvant (a) ou matrice (b) pour le dosage du bergaptène avec la méthode HPTLC-1D N et une détection par densitométrie à 310nm. La justesse est représentée par trait plein tandis que les pointillés représentent l’IT à 80%

En autorisant une erreur de 30% sur les résultats, les LQ ont été estimées à 5mg/kg pour la gamme solvant et 13 mg/kg pour la gamme matrice.

A condition que le bergaptène ne coélue pas avec un autre analyte, les performances de cette méthode sont donc comparables avec celles de la méthode HPLC/UV de l’IFRA^[180] tout en permettant un gain de temps loin d’être négligeable et recherché dans les laboratoires de contrôle qualité.

La méthode a ensuite été utilisée pour doser le bergaptène dans différentes matières premières avec des résultats proches de ceux obtenus par HPLC/UV avec la méthode IFRA. Par exemple, dans le cas d'une huile essentielle de limette modifiée par distillation moléculaire, la méthode HPTLC-1D N (Figure 73) a permis une estimation de la teneur en bergaptène de 35.1mg/kg contre 30.2mg/kg avec la méthode UHPLC/UV de l'IFRA.^[79]

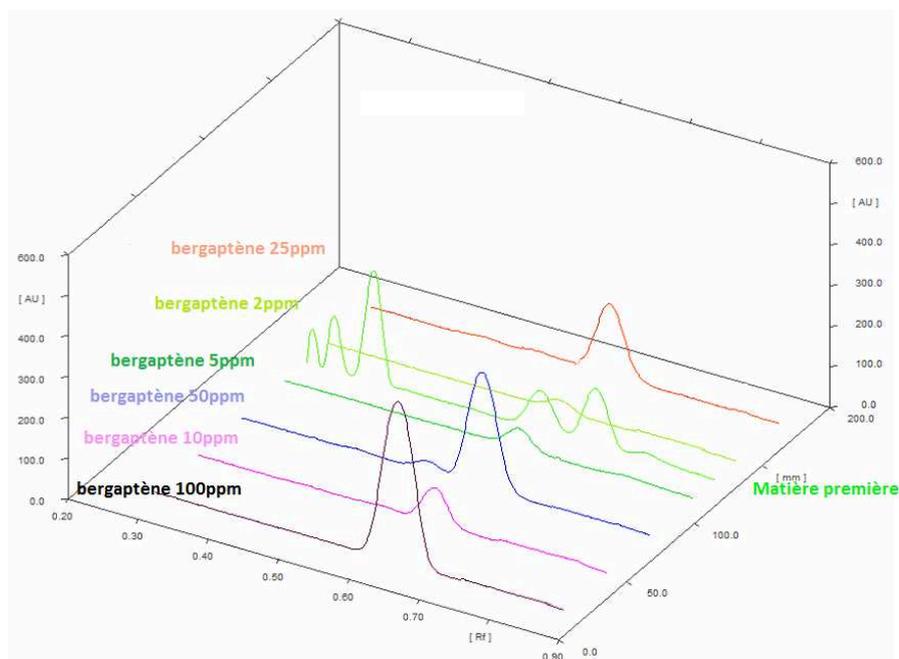


Figure 73 : Chromatogrammes obtenus à 310nm par HPTLC/densitométrie avec la méthode HPTLC-1D N pour la calibration du bergaptène entre 2 et 100ppm et une matière première.

3 Mise en place de la méthode HPTLC-2D N

Pour essayer de séparer les analytes coéluant avec la méthode HPTLC-1D N, des essais ont été réalisés en 2 dimensions. La principale limite de cette approche est de permettre l'analyse d'un seul échantillon à la fois. Elle ne pourra donc pas permettre la quantification par densitométrie et le bénéfice temps est perdu. Si plusieurs systèmes HPTLC 2-D ont déjà été proposés dans la littérature pour séparer les furocoumarines, il n'a jamais été question de l'analyse simultanée de **1-15**.^[208–212]

Le système 2D a donc été développé à partir du système 1-D préalablement optimisé pour analyser **1-15** à savoir un mélange chloroforme/heptane 95 :5 (v/v). Après rotation de la plaque à 90°C, la seconde élution a été réalisée avec un mélange de dichlorométhane + 3% éther diéthylique (v/v) (Figure 74, tableau 20).

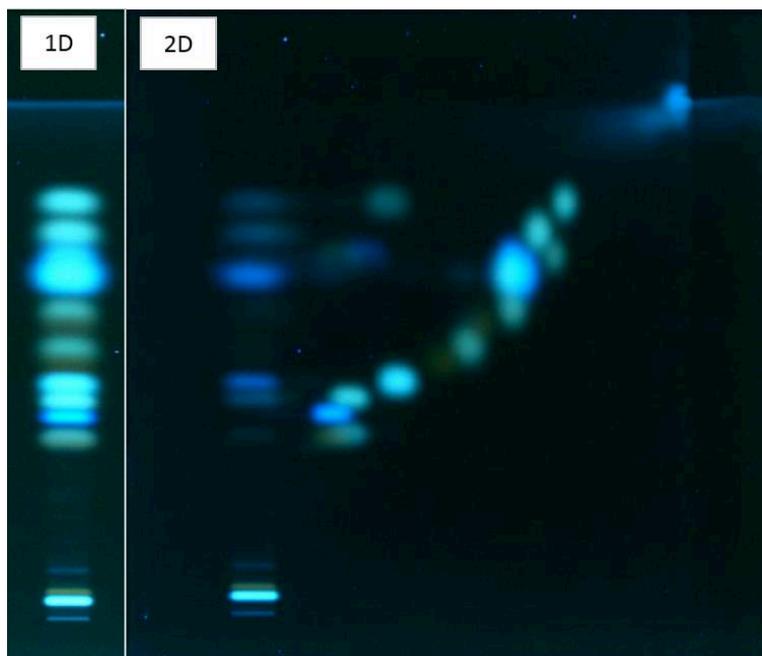


Figure 74 : Plaque obtenue à 366nm dans le cas de l'analyse des composés 1-15 en condition HPTLC-2D N

Tableau 20 : Rapports frontaux observés en 1^{ère} dimension (Rf 1D) et en 2^{ème} dimension (Rf 2D) pour les furocoumarines 1-15 avec la méthode HPTLC-2D N

N° de spot (en partant du bas)	Furocoumarine*	Rf 1D	Rf 2D
1	6	0.03	0
2	8	0.05	0
3	7	0.34	0.16
4	9	0.34	0.22
5	15	0.41	0.23
6	5	0.45	0.33
7	4	0.49	0.43
8	3	0.53	0.5
9	14	0.57	0.52
10	12	0.59	0.6
11+12	1+2	0.66	0.6
13	13	0.66	0.7
14	10	0.74	0.65
15	11	0.81	0.71

* numérotation selon Tableau 9

Grâce à la plus grande force éluante du second système les composés **9** et **7** ont été séparés alors qu'ils coéluaiement avec la méthode HPTLC-1D N. Cependant, les composés **1** et **2** restent coélus sur la plaque malgré les différents essais d'optimisation réalisés. Sur la base de la couleur de leur

tache ils pourront cependant être identifiés à condition qu'ils ne soient pas tous les deux présents simultanément dans l'ingrédient.

La spécificité de la méthode HPTLC-2D N a été évaluée en analysant les composés supplémentaires **16** à **26** et les mêmes conclusions que celles obtenues en 1D peuvent être tirées à savoir que les Rf sont proches mais que les couleurs des taches à 254 et 366nm permettent de repérer les furocoumarines d'intérêt des autres composés.

La méthode en 2D peut être utilisée pour obtenir une composition qualitative en furocoumarine d'un ingrédient comme illustré dans la Figure 75. Lors de l'analyse en 1D, seules les furocoumarines **5**, **6** et **11** avaient été envisagées. Grâce à l'analyse 2D, nous pouvons émettre l'hypothèse de la présence des furocoumarines **4**, **5**, **6**, **10**, **11** et **14**. L'analyse HPLC/UV dans les conditions IFRA de la même huile essentielle de limette a permis de confirmer ces hypothèses (Figure 76).

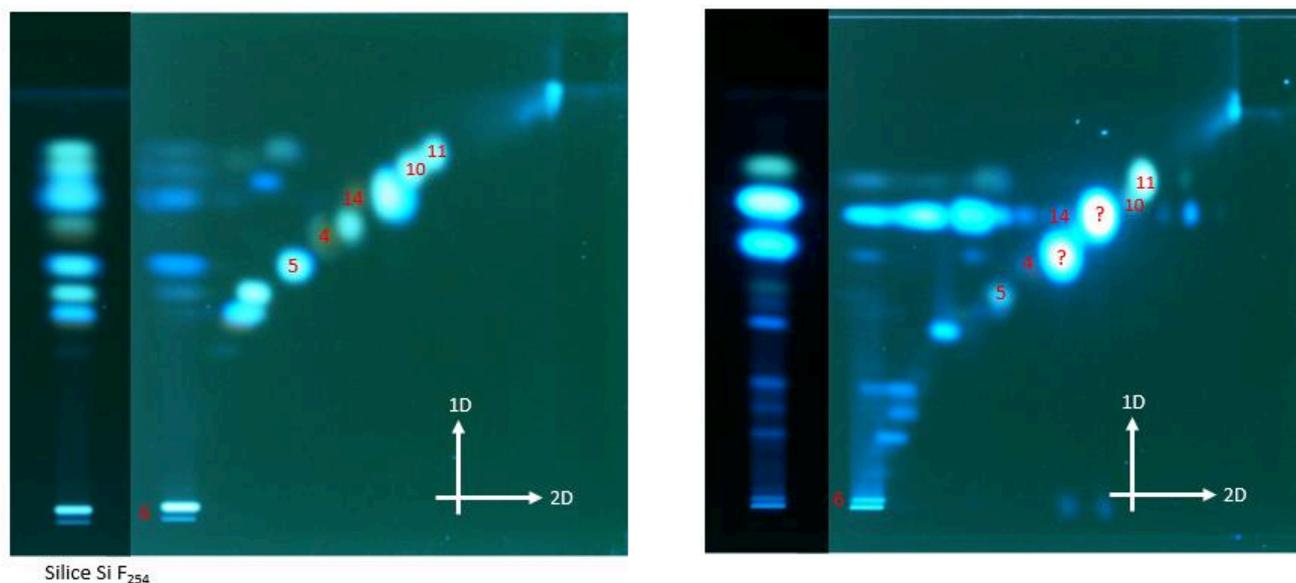


Figure 75 : Plaques obtenues à 366nm dans le cas de l'analyse des composés 1-15 (gauche) ou d'une huile essentielle de limette (droite) avec la méthode HPTLC-2D N

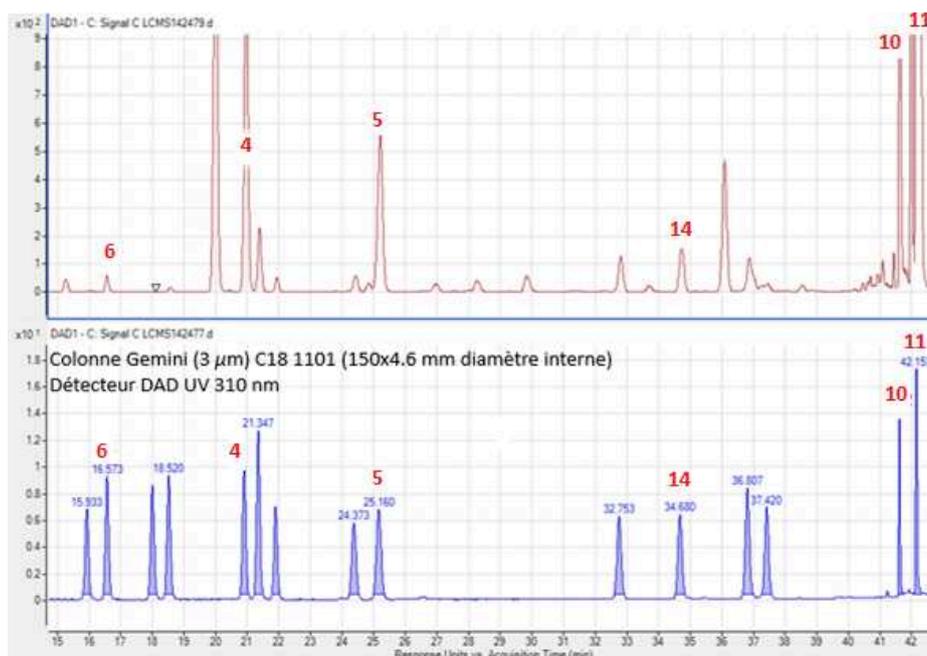


Figure 76 : Chromatogrammes obtenus à 310nm lors de l'analyse d'une huile essentielle de limette (haut) ou du mélange des furocoumarines 1-15 dans les conditions de la méthode IFRA.^[180]

Les deux méthodes HPTLC-1D N et HPTLC-2D N proposées permettent donc en un temps réduit d'avoir une idée assez bonne de la présence de furocoumarines dans un extrait de parfumerie mais certaines coélutions non résolues peuvent apparaître limitantes. Dans ce contexte, un développement de méthode en condition de phase inverse a été considéré (méthode HPTLC 1D-R).

4 Méthode HPTLC 1D-R

La séparation des furocoumarines par HPTLC en phase inverse avait déjà été reportée dans la littérature. Ce manuscrit ne détaillera pas les divers essais d'optimisation pour éviter la redondance avec le développement en phase normale. Les plaques obtenues avec la méthode optimisée HPTLC 1D-R sont représentées en Figures 77 et 78.

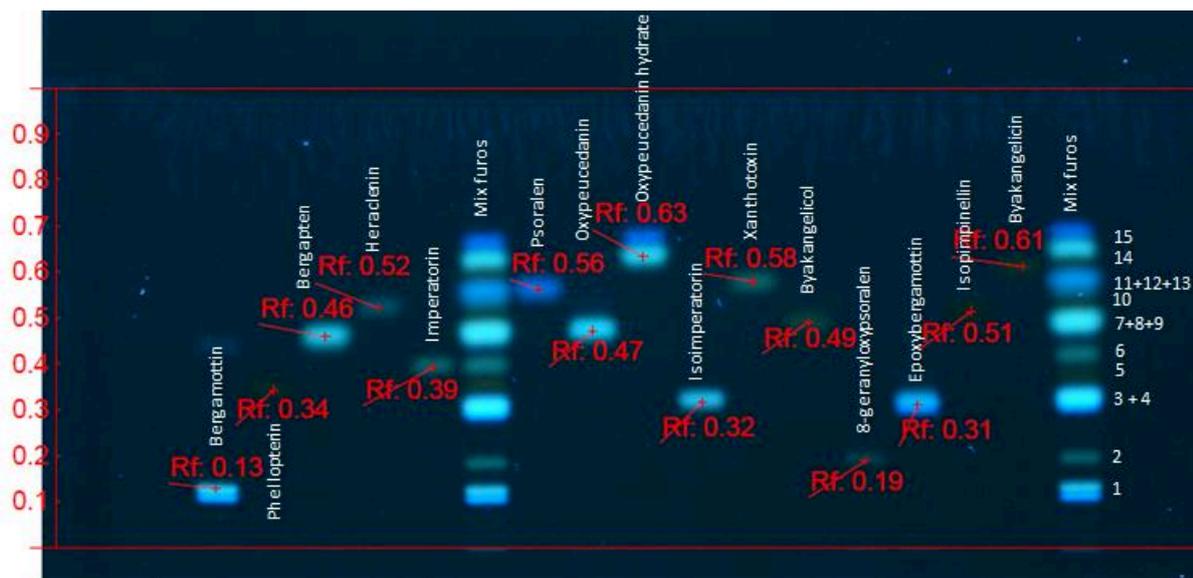


Figure 77 : Séparation des furocoumarines 1-15 avec la méthode HPTLC-1D R. Au milieu de la plaque et à droite a été déposé le mélange des furocoumarines 1-15 pour comparaison.

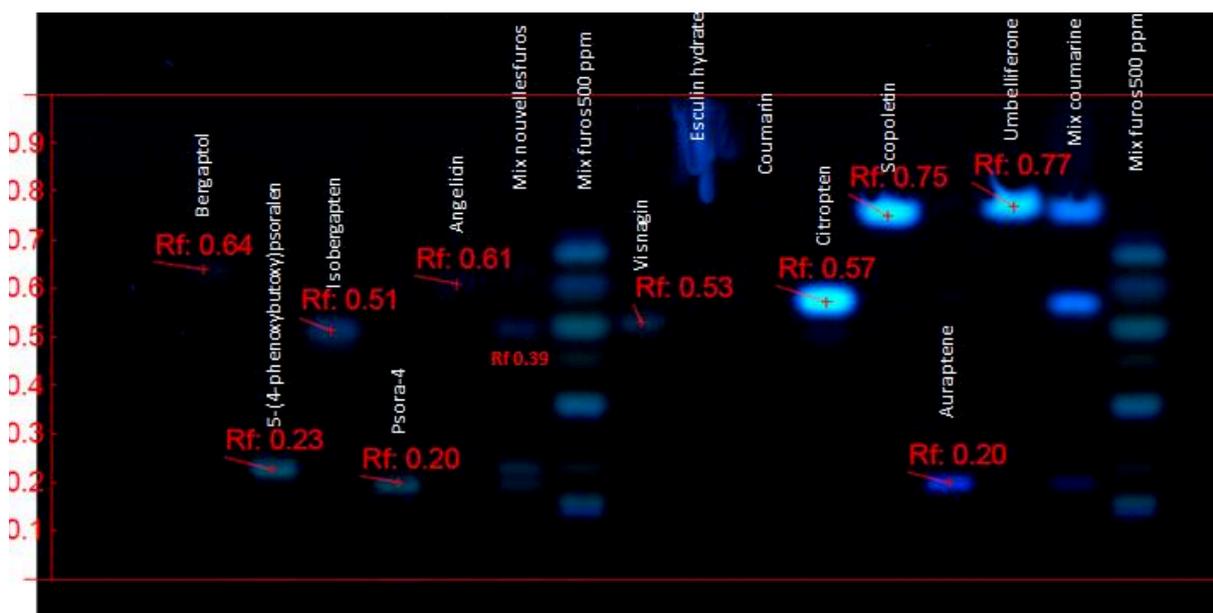


Figure 78 : Séparation des furocoumarines supplémentaires avec la méthode HPTLC-1D R. Au milieu de la plaque et à droite a été déposé le mélange des furocoumarines 1-15 pour comparaison.

Dans ces conditions, les composés **1-15** présentent des Rf tels que compilés dans le tableau 22. Par comparaison avec la méthode HPTLC-1D N, cette fois **1** et **2** sont séparés mais ceci au profit d'autres coélutions avec **9** dans le premier cas et **5** et **7** dans le second. Si **10** ne coélué plus avec **16** et **19**, ces derniers ne sont pas séparés l'un de l'autre. A présent, **15** et **13**, correctement séparés sur phase normale, présentent le même Rf en phase inverse.

Tableau 21 : Rf observés pour les furocoumarines 1-15 en conditions HPTLC-1D R

N° de spot (en partant du bas)	Furocoumarine*	Rf 1D
1	11	0,16
2	10	0,23
3 + 4	15 + 13	0,35
5	14	0,4
6	12	0,44
7 + 8 + 9	2 + 5 + 7	0,51
10	4	0,55
11	1 + 9	0,59
12	3	0,59
13	8	0,63
14	6	0,66

* numérotation selon Tableau 9

Compte tenu du coût plus important des plaques HPTLC greffées C18 par rapport à celui des plaques de silice, il a été décidé de ne pas perdre plus de temps dans l'optimisation des conditions de séparation de la méthode HPTLC-1D R.

Cependant, cette méthode trouvera tout son intérêt dans le cas où des analytes, autres que **1,2,5,7,9,13** et **15**, coélueraiient avec un constituant de la matière première analysée par la méthode HPTLC-1D N.

5 Conclusions et perspectives

Trois méthodes HPTLC ont été développées pour séparer les furocoumarines **1-15** dans le contexte d'analyse de contrôle qualité. Aucune des trois méthodes ne permet de séparer totalement les 15 analytes cibles, malgré les essais d'optimisation des conditions d'élution, le recours à la phase inverse ou aux analyses en deux dimensions.

D'autres phases stationnaires pourraient être considérées mais il a été décidé de garder des phases stationnaires classiques au sein du laboratoire pour des questions de coût et d'optimisation des commandes de consommables.

Ces trois méthodes permettent néanmoins d'avoir une idée rapide de la nature des furocoumarines d'un ingrédient et la méthode HPTLC-1D N peut même être utilisée pour

quantifier le bergaptène par densitométrie dans une gamme de concentration de 13 à 100mg/kg.

Cependant les méthodes développées ne permettent pas d'analyser des matrices complexes et/ou inconnues à cause des coélutions persistantes et du manque de spécificité de la détection UV. Dans ce cas, le recours à la détection par spectrométrie de masse semble être une solution. Notre système HPTLC n'étant pas équipé de ce détecteur, il n'a pas été possible de vérifier cette hypothèse.

Les méthodes HPTLC présentées dans cette étude sont donc utilisées en routine au sein du laboratoire uniquement à des fins de contrôle qualité d'ingrédients bien connus. Dans les autres cas, les analyses sont réalisées par UHPLC/MS tel que décrit dans le *Chapitre 2a*.

Ce travail a fait l'objet d'un poster^[385] et d'une publication scientifique.^[386]

Les furocoumarines ne sont pas les seuls composés réglementés dans le domaine des arômes et parfums. Le chapitre suivant présente par exemple les analyses des 26 allergènes de parfumerie réalisées dans le cadre d'études collaboratives dans deux groupes de travail scientifiques différents.

CHAPITRE 3 : Etudes collaboratives sur l'analyse des 26 allergènes de parfumerie

PARTIE 1 : Introduction et rappels bibliographiques

1 Etudes collaboratives

1.1 Généralités sur les études inter-laboratoires

Lors de la validation d'une méthode analytique, la mesure de la fidélité permet d'en connaître les performances en fonction de changements plus ou moins importants. Comme déjà détaillé dans le *Chapitre Introduction et état de l'art général*, la fidélité se divise en trois catégories que sont la répétabilité, la fidélité intermédiaire et la reproductibilité. Cette dernière considère des résultats obtenus sur un même échantillon dans des laboratoires différents. La reproductibilité d'une méthode ne peut donc être évaluée qu'au travers d'une étude inter-laboratoires.

Une étude inter-laboratoire correspond à l'organisation de tests ou mesures dans le but d'évaluer la performance de méthodes identiques ou similaires dans deux laboratoires, ou plus, et dans des conditions prédéfinies.^[225] On appelle coordinateur la personne ou l'équipe en charge d'organiser et diriger toutes les activités liées à une étude inter-laboratoire.

Les études inter-laboratoires sont réalisées pour différentes raisons :^[225]

- Détermination de la performance de laboratoires individuels dans le cas de tests spécifiques ou sur le long terme au travers de ce que l'on appelle *Proficiency testing* ;
- Identification des problèmes de performance dans les laboratoires dans le but d'une amélioration : personnel, calibration, instrumentation ;
- Vérification de la performance de nouveaux tests et méthodes ou méthodes déjà en place ;
- Identification des différences inter-laboratoires ;
- Détermination des performances d'une méthode au travers de ce que l'on appelle des études collaboratives ;
- Caractérisation de matériaux de référence et vérification de leur légitimité à être utilisés dans des tests spécifiques ou des procédures de mesures.

Ce chapitre s'intéressera en particulier aux études collaboratives.

1.2 Etudes collaboratives dans le domaine des arômes et parfums

Dans le domaine des arômes et parfums, les coordinateurs des études inter-laboratoires peuvent être des sociétés qui voudraient comparer les résultats obtenus dans des sites différents. Il peut également s'agir d'associations spécifiques au domaine telles que PRODAROM en France, ou, au niveau international, l'IFRA pour la parfumerie ou l'IOFI pour les arômes. Les coordinateurs peuvent également être des associations normatives nationales, comme l'AFNOR en France, ou internationales comme le CEN (comité européen de normalisation) par exemple. Dans les deux derniers cas, des normes sont en général proposées à la suite des études collaboratives réussies.

Les méthodes validées au travers d'études collaboratives dans le domaine des arômes et parfums concernent soit des pratiques analytiques, telle que l'utilisation de facteurs de réponse FID prédits proposée par l'IOFI^[157], soit, bien plus fréquemment, le dosage de composés réglementés comme celui des furocoumarines par LC/UV proposé par l'IFRA.^[79] En effet, dans le cas de composés réglementés, il apparaît très important que les résultats obtenus d'un laboratoire à l'autre soient comparables, que ce soit dans les sociétés productrices, clientes ou les laboratoires de contrôle certifiés.

Dans ce chapitre seront présentées deux études collaboratives concernant le dosage des composés réglementés que sont les 26 allergènes de parfumerie. Le détail de ces études collaboratives est donné dans le tableau 22.

Tableau 22 : Détail des études collaboratives présentées dans ce manuscrit

Analytes concernés par la méthode	Type de méthode	Coordinateur	Traitement des données	Dates
24 allergènes volatils de parfumerie	GC/MS en mode SIM	CEN/TC 347/WG 4 avec un suivi au niveau français par La commission cosmétique AFNOR S91K	Firmenich	2008-2010
2 allergènes non volatils de parfumerie (atranol et chloroatranol)	LC/MS en mode SIM	PRODAROM CST	Robertet et Cosmo International Ingredients	2014-2017

2 Allergènes volatils de parfumerie

En 1999, le comité scientifique pour les produits cosmétiques et les produits non alimentaires destinés aux consommateurs (SCCNFP) a publié une opinion concernant 26 substances parfumantes et supposées allergènes à limiter dans les produits cosmétiques, parmi lesquelles 24 composés volatils et deux extraits naturels (Tableau 23).^[158] Dans le reste du manuscrit, ces substances volatiles seront directement désignées par le terme « allergènes ».

En 2003, les 26 allergènes étaient inclus à l'annexe III sur la directive cosmétique par le 7^{ème} amendement (directive 2003/15/EC) rendant obligatoire leur étiquetage si présents à plus de 10mg/kg dans les produits cosmétiques non rincés et à 100mg/kg dans les produits rincés.^[226]

Tableau 23 : Liste des 24 allergènes du SCCNFP^[158]

Nom	numéro CAS
α -amyl cinnamaldéhyde	122-40-7
Alcool α amylcinnamique	101-85-9
Alcool anisique	105-13-5
Alcool benzylique	100-51-6
Benzoate de benzyle	120-51-4
Cinnamate de benzyle	103-41-3
Salicylate de benzyle	118-58-1
Butylphenyl méthylpropional (lilial®)	80-54-6
Cinnamaldéhyde	104-55-2
Alcool cinnamique	104-54-1
Citral	5392-40-5
Citronellol	106-22-9, 1117-61-9, 7540-51-4
Coumarine	91-64-5
Eugénol	97-53-0
Farnésol	4602-84-0
Géraniol	106-24-1
α -Hexyl cinnamaldéhyde	101-86-0
Hydroxyisohexyl, 3-cyclohexene	31906-04-4/51414-25-6
Hydroxycitronellal	107-75-5
Isoeugénol	97-54-1
α -isométhyl ionone	127-51-5
(d,l)-Limonène	138-86-3
Linalol	78-70-6
2-Octynoate de méthyle	111-12-6

Cette année-là, l'AWG de l'IFRA a proposé une méthode d'analyse pour doser les 24 allergènes volatils dans les concentrés de parfum par GC-MS en mode SIM par étalonnage interne.^[91]

Lors de cette étude, l'utilisation de deux colonnes de polarité différente avait été proposée car il n'avait pas été possible de séparer les 24 allergènes sur une seule phase. Différents greffages

(100% polydiméthylsiloxane, 5% phénylméthylpolysiloxane, 25% phénylméthylpolysiloxane et 50% phénylméthylpolysiloxane) et différentes dimensions de colonne ont été comparés. Les colonnes de type polyéthylène glycol n'avaient pas été considérées par le groupe à cause du manque de stabilité du greffage dans le temps. Il est ressorti de cette étude le choix du couple des deux colonnes type DB-1 (100% polydiméthylsiloxane) et DB-17 (50% phénylméthylpolysiloxane). Trois ions ont été choisis par analyte : un quantifiant et deux qualifiants. L'identité de l'allergène était validée si la *Q-value* (équation 5), était supérieure ou égale à 90. Le cas échéant, il était conseillé de faire des analyses en mode Scan pour vérification.

A l'époque la méthode n'avait pas été validée mais les dosages semblaient possibles dans une gamme allant de 2 à 100 mg/l.

En 2007, les performances de la méthode ainsi que l'impact du traitement des résultats ont été évalués par l'AWG.^[94] L'étude a montré que les meilleurs résultats étaient obtenus lorsque les trois ions étaient utilisés pour quantifier (tour à tour quantifiant et qualifiant). C'est ce qui a été appelé la stratégie « 2 colonnes X 3 ions ». Au final six concentrations étaient obtenues par allergène. La plus petite valeur des six, avec une *Q-value* acceptable, étant retenue.

La limite de quantification des allergènes a été déterminée à 10mg/l avec cette méthode mais aucune autre donnée de validation n'a été fournie à l'époque.

La méthode IFRA a ensuite été officialisée auprès de ses membres en rendant disponible le protocole associé.^[227] C'est dans ce contexte que la méthode a été soumise par la suite CEN pour qu'elle devienne une norme.

3 Atranol et Chloroatranol

En 2004, le SCCP (pour *Scientific Committee on Consumer Products* en Anglais) a publié une opinion sur l'atranol (CAS 526-37-4) et le chloroatranol (CAS 57074-21-2) en faveur de leur absence de tout produit cosmétique compte tenu de leur fort pouvoir allergène (Figure 79).^[159]

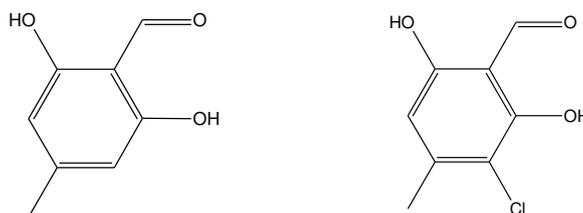


Figure 79 : Structure de l'atranol (gauche) et du chloroatranol (droite)

Or ces composés sont présents dans les extraits d'*Evernia prunastri* (L.) Arch et de *Pseudevernia furfuracea* qui sont des ingrédients importants dans le domaine de la parfumerie^[228,229] et dont le pouvoir allergisant a été souligné en 2008 par le SCCP.^[230]

Dans ce contexte, l'IFRA a proposé la même année de limiter l'atranol et le chloroatranol à 100 ppm dans les extraits de mousse d'arbre et de mousse de chêne.^[231]

La commission scientifique et technique (CST) de PRODAROM a proposé en 2012, suite à quatre études collaboratives préliminaires, une méthode de dosage de ces composés dans les lichens d'arbre et de chêne par LC/UV à 280 nm.^[232] A l'époque certains laboratoires impliqués dans l'étude collaborative avaient également dosé en parallèle les allergènes par spectrométrie de masse. Des méthodes avaient en effet déjà été proposées pour doser l'atranol et le chloroatranol dans les produits finis par LC/MS.^[233,234] Les résultats obtenus s'étaient avérés prometteurs car ils permettaient de palier à la surestimation des allergènes parfois observée avec la détection UV de par son manque de spécificité. La CST de PRODAROM a donc proposé d'utiliser la méthode de dosage par UV de manière routinière tant que la concentration déterminée restait en dessous de 50 ppm. Si toutefois la concentration était supérieure à 50 ppm, il n'était pas exclu que cela soit dû à une surestimation plutôt qu'à une teneur réelle. Dans ce cas, une analyse par spectrométrie de masse devait permettre de conclure. C'est dans ce contexte que l'étude collaborative sur le dosage de l'atranol et du chloroatranol par LC/MS a été initiée par la CST de PRODAROM en 2014.

4 Objectifs de cette étude

La partie résultat de ce manuscrit décrira les résultats globaux obtenus lors des études collaboratives visant à développer des méthodes de dosage des 26 allergènes de parfumerie.

Une première partie du chapitre concernera l'étude collaborative initiée par le CEN sur le dosage de 24 allergènes par GC/MS sous l'angle du traitement des résultats traités par la société coordinatrice Firmenich. Le laboratoire en charge du traitement des données n'avait pas participé à l'étude pour éviter d'être juge et partie.

La deuxième partie du chapitre concernera l'étude collaborative initiée par PRODAROM sur le dosage de l'atranol et du chloroatranol par HPLC/MS sous deux angles : la participation

individuelle du laboratoire Cosmo International Ingredients et le traitement des résultats qui ont été réalisés en collaboration avec le Dr. Jérôme Masson de la société Robertet.

PARTIE 2 : Partie expérimentale

1 Laboratoires impliqués dans les études collaboratives

1.1 Etude sur les 24 allergènes volatils

Dix sociétés ont été sollicitées pour participer à cette étude collaborative organisée par le CEN :

- AFSSAPS, 635 rue de la Garenne, 34740 Vendargues, France ;
- Chanel, 135 Avenue Charles de Gaulle, F-92521 Neuilly-sur-Seine Cedex, France ;
- Eurofins Consumer Product Testing GmbH, D-22761 Hamburg, Germany;
- Firmenich SA, Corporate R&D Division, 1 Route des Jeunes, PO Box 239, CH-1211 Genève-8, Suisse ;
- LGC Ltd., Queens Road, Middlesex, Teddington TW11 OLY, UK;
- Robertet SA, 37 avenue Sidi Brahim, 06130 Grasse, France (via PRODAROM, 48 avenue Riou Blanquet, BP 21017, 06131 Grasse Cedex, France) ;
- SCL-DGCCRF-DGDDI, 146 traverse Charles Susini, 13388 Marseille Cedex-13, France ;
- TÜV Rheinland LGA Products GmbH, Am Grauen Stein, D-51105 Köln, Germany;
- V. MANE FILS, 620 route de Grasse, 06620 Le-Bar-Sur-Loup, France ;
- Yves-Rocher, 101 quai du Président Roosevelt, 92444 Issy les Moulineaux Cedex, France.

1.2 Etude sur l'atranol et le chloroatranol

Six sociétés ont été sollicitées pour participer à cette étude collaborative organisée par la CST de PRODAROM lors de la première étude collaborative :

- Chanel, 135 Avenue Charles de Gaulle, 92521 Neuilly-sur-Seine Cedex ;
- Cosmo International Ingredients, 855 avenue M. Donat, 06250 Mougins ;
- ERINI, Espace Jacques-Louis Lions - 4 Traverse Dupont, 06130 Grasse ;
- IFF France SAS LABORATOIRE MONIQUE REMY, Avenue Louison BOBET, 06130 Grasse ;
- Robertet SA, 37 avenue Sidi Brahim, 06130 Grasse ;
- V. MANE FILS, 620 route de Grasse, 06620 Le-Bar-Sur-Loup.

Dans le cas de la deuxième étude collaborative, la société IFF Nederland (Zevenheuvelenweg 60, 5048 AN Tilburg, Hollande) a également participé en plus des six précédentes compagnies.

2 Standards

2.1 Etude sur les 24 allergènes volatils

Les allergènes ont été fournis par la société Firmenich avec les puretés suivantes: limonène: 97.6%, linalol: 99.8%, 2- octynoate de méthyle: 99.5%, citronellol: 99.2%, citral 100% (néral: 37.1%; géraniol: 62.9%), cinnamaldehyde: 98.6%, alcool anisique: 100%, hydroxycitronellal: 98.4%, alcool cinnamique: 98.7%, eugénol: 100%, coumarine: 100%, isoeugénol: 96.0%, alcool α -amylcinnamique: 42.0% (+benzylheptanol), alcool benzylique: 99.7%, α -amylcinnamaldéhyde: 99.5%, α -hexylcinnamaldehyde: 91.7% (somme des 2 isomères), benzoate de benzyle: 100%, cinnamate de benzyle: 100%, farnésol: 100% (2 isomères: 50.9% et 42.4%), géraniol: 99.4%, lilial®: 98.3%, lyral®: 81.3%, α -isométhylionone: 87.6%, salicylate de benzyle: 100%.

Les laboratoires participants ont tous reçu des échantillons du même lot.

Les standards internes ont été achetés chez Aldrich (Steinheim, Allemagne): 1,4-dibromobenzene (98%) et 4,4'-dibromobiphenyl (98%).

Une matrice parfum sans aucun allergène a été fournie pour l'analyse.

2.2 Etudes sur l'atranol et le chloroatranol

Les standards d'atranol et de chloroatranol (>95%) ont été achetés indépendamment par chaque laboratoire chez Aromascience conseil (Avignon Le Pontet, France) dans le cas de la première étude collaborative. Pour la seconde étude, les standards achetés par la société Robertet auprès du même fournisseur ont été employés par tous les laboratoires. Les mousses ont été fournies par la société IFF-LMR (1^{ère} étude) et Robertet (2^{ème} étude). Les solvants de qualité LC/MS (méthanol, acide acétique) ont été fournis par VWR Chemicals (Fontenay sous-bois, France).

3 Solutions standards

3.1 Etude sur les 24 allergènes volatils

Les laboratoires ont reçu les solutions mères des 24 allergènes préparées par Firmenich. Dans un souci de stabilité, deux solutions standards, à 5 g/l dans le pivalate de méthyle, ont été fournies. La première solution comprenait les composés carbonylés tandis que la deuxième contenait les allergènes restants.

La solution d'étalons internes a été préparée à une concentration de 1 g/l dans le pivalate de méthyle. A partir des solutions mères d'allergènes, des solutions filles ont été préparées par dilution en cascade aux concentrations suivantes par chaque laboratoire : 1,5,10,20,30 et 40 mg/l avec dans chacune 10 mg/l de standards internes.

Les laboratoires ont également reçu une matrice parfum dopée avec les 24 allergènes dans une gamme de concentration allant de 10 à 100 mg/kg.

3.2 Etude sur l'atranol et le chloroatranol

Gamme de calibration

Pour la première étude collaborative, une solution mère contenant l'atranol et le chloroatranol dans le méthanol à 200 mg/l a été préparée par chaque laboratoire avec ses propres standards. Les solutions de calibration ont ensuite été préparées par dilution en cascade dans le méthanol pour atteindre les huit concentrations suivantes : 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2 mg/l analysées en triplicata.

Pour la seconde étude collaborative, chaque laboratoire a reçu une solution mère, des deux allergènes à environ 100ppm dans le méthanol, préparée par la société Robertet et une mousse contenant peu d'allergène (qualité « Low »). Les participants devaient suivre un schéma de dilution détaillé dans le protocole afin de préparer une calibration en gamme méthanol ou en gamme matrice avec six solutions aux concentrations suivantes : 0.2, 0.5, 1, 2, 5 et 10 mg/l dont la teneur en mousse était constante (environ 10% massique).

Extraits de mousse

Pour la première étude collaborative, chaque laboratoire a préparé trois solutions mères en pesant environ exactement 2g de mousse dans 10ml (M1a), 20ml (M2a) ou 25ml (M3a) de méthanol. Chaque solution a été homogénéisée 3min dans un bain à ultrasons. Chacune des solutions mères a ensuite été diluée au demi (M1b, M2b, M3b) ou au dixième (M1c, M2c, M3c).

Pour la deuxième étude collaborative, les laboratoires ont reçu deux mousses de qualité « low » et « high » correspondant à une faible ou forte teneur en allergènes. Les participants devaient préparer des solutions aux dilutions suivantes : 0.005, 0.01, 0.0125, 0.02, 0.025, 0.04, 0.05, 0.1, 0.2 en suivant le protocole fourni.

Toutes les solutions de mousse ont été filtrées sur filtre seringue PTFE de 0.45µm de porosité avant analyse en triplicata.

Extraits de mousse dopés

Pour la première étude collaborative, la société Robertet a fourni trois échantillons de mousse dopés en atranol et chloroatranol aux six laboratoires qui n'en connaissaient pas la concentration. L'analyse devait se réaliser en triplicata.

4 Instrumentation**4.1 Etude sur les 24 allergènes volatils**

Les instruments GC/MS ainsi que les colonnes utilisées par les 10 laboratoires lors de l'étude sont compilés dans le tableau 24 :

Tableau 24 : Equipements utilisés lors de l'étude collaborative sur les 24 allergènes

Laboratoire	MS	Colonne 1	Colonne 2
1	Varian MS-1200	5% Ph - 95% Me	50% Ph - 50% Me
2	Shimadzu QP2010	PEG	100% diMe
3	Agilent 5975C	5% Ph - 95% Me	50% Ph - 50% Me
4	Agilent 5973	PEG	100% diMe
5	Agilent 5973	50% CN-50% Ph	50% Ph - 50% Me
6	Agilent 5973	5% Ph - 95% Me	PEG
7	Agilent 5973	PEG	50% Ph - 50% Me
8	Agilent 5975C	PEG	50% Ph - 50% Me
9	Agilent 5973	PEG	100% diMe
10	Agilent 5973	100% diMe	PEG

Me-, pH-, CN-= méthyl, phényl et cyanopropyl-polysiloxane, PEG= polyéthylène glycol

Les dix laboratoires ont reçu un protocole détaillé à suivre pour les dosages. Ce protocole est un document interne au CEN qui ne peut pas être communiqué dans ce manuscrit. En résumé, les analyses ont été effectuées en mode SIM en utilisant trois ions, chacun étant à tour de rôle quantifiant tandis que les deux autres sont qualifiants (Tableau 25). Le dosage devait être effectué par étalonnage interne en représentant les ratios d'aires en fonction des ratios de concentration. Le protocole définissait quel standard devait être utilisé pour chaque analyte.

Tableau 25 : Ions suivis pour l'analyse en SIM des 24 allergènes volatils

Nom	Ion 1 (m/z)	Ion 2 (m/z)	Ion 3 (m/z)
α -amyl cinnamaldéhyde	202	201	129
Alcool α amylocinnamique	133	115	204
Alcool anisique	138	137	109
Alcool benzylique	108	79	107
benzoate de benzyle	105	212	194
Cinnamate de benzyle	131	192	193
Salicylate de benzyle	91	228	65
Butylphényl méthylpropional (lilial®)	189	147	204
Cinnamaldéhyde	131	132	103
Alcool cinnamique	92	134	115
Citral: néral	69	94	109
Citral: géranial	69	84	94
Citronellol	95	69	81
Coumarine	146	118	89
Eugénol	164	103	149
Farnésol	69	93	81
Géraniol	69	123	93
α -Hexyl cinnamaldéhyde	216	215	129
Hydroxyisohexyl, 3-cyclohexene	192	136	149
Hydroxycitronellal	59	71	43
Isoeugénol	164	149	131
α -isométhyl ionone	206	135	150
Limonène	68	93	67
Linalol	93	71	121
2-octynoate de méthyle	95	123	79
1,4-Dibromobenzène (standard 1)	236	234	238
4,4'-Dibromobiphényl (standard 2)	312	310	314

4.2 Étude sur l'atranol et le chloroatranol

Les instruments LC/MS ainsi que les colonnes utilisées par les sept laboratoires lors des études collaboratives sont compilés dans le tableau 26.

Tableau 26 : Equipements utilisés lors des études collaborative sur l'atranol et le chloroatranol

Laboratoire	Système LC/MS	Colonne
1	Agilent LC.MAS SQ 6120	Zorbax SB C18, 1.8µm, 2.1mm X 50mm
2	Acquity UPLC-Xevo G2 TOF	Acquity UPLC HSS T3 1.8µm, 2.1mm X 100mm
3	Acquity UPLC-Xevo G2 TOF	Acquity UPLC BEH C18 1.8µm, 2.1mm X 50mm
4	Thermo LC ultimate 300 Q exactive benchtop	Kinetec C18, 2.6µm, 2.1mm X 100mm
5	Agilent LC.MAS SQ 6120	Zorbax SB C18, 3.5µm, 2.1mm X 150mm
6	Agilent LC-TQD 6420	Eclipse plus C18 RRHD 1.8µm, 2.1mm X 50mm
7	Thermo TSQ Ventage	Zorbax Eclipse Plus C18 HT 1.8µm, 4.6mm X 100m

Les laboratoires ont reçu, pour chaque étude collaborative, un protocole détaillé à suivre pour réaliser les calibrations et les dosages. Etant donné qu'il s'agit de documents internes à la CST de PRODAROM, ils ne seront pas reproduits dans ce manuscrit. Plusieurs compositions de phases mobiles (solvants organiques et tampons) étaient proposées ainsi que plusieurs conditions d'ionisation.

L'analyse devait se faire en mode SIM en ESI négatif en suivant un ion quantifiant et deux ions qualifiants :

- Atranol : quantifiant m/z 151, qualifiants m/z 152, 123 ;
- Chloroatranol : quantifiant m/z 185, qualifiants m/z 187, 157.

Au sein de notre laboratoire (6), nous avons appliqué les conditions d'élution détaillées dans le tableau 27 lors de la première étude collaborative. Lors de la seconde étude, l'acide acétique a été remplacé par l'acétate d'ammonium à 5mM (Sigma Aldrich).

Tableau 27 : Conditions d'élution utilisées par le laboratoire 6 pour l'étude collaborative sur l'atranol et le chloroatranol

Temps (min)	H ₂ O+ 0.5% acide acétique	MeOH + 0.5% acide acétique (%)
0	85%	15%
10	15%	85%
12	0%	100%
15	0%	100%

Avec MeOH=méthanol, H₂O= eau

5 Traitement des données

5.1 Traitement des données d'études collaboratives

Les dix laboratoires ayant participé à l'étude collaborative du CEN sur les 24 allergènes ont fourni les résultats bruts à la société Firmenich où ils ont été compilés et exploités.

Dans le cas de l'étude collaborative de la CST PRODAROM sur l'atranol et le chloroatranol, les laboratoires ont fourni les résultats bruts à la société Robertet qui les a traités en collaboration avec la société Cosmo International Ingrédients.

5.2 Validation de méthodes

5.2.1 Limites de détection

Dans le cas de l'atranol et du chloroatranol analysés par LC/MS, les ratios d'ions qualifiants ont été employés avec comme critère les tolérances définies par l'IOFI.^[50]

Dans le cas des analyses par GC/MS, l'identification des analytes est basée sur l'utilisation des *Q-value* (équation 5) mais aucune LD n'a été déterminée au cours de l'étude collaborative.

5.2.2 Linéarité

Les linéarités des méthodes ont toutes été évaluées en représentant la concentration calculée en fonction de la concentration réelle. Une méthode est considérée linéaire si le coefficient de détermination de l'équation obtenue est >0.994 .^[90]

5.2.3 Fidélité

La répétabilité et la fidélité intermédiaire des méthodes n'ont pas été évaluées. Cependant la fidélité des méthodes a été estimée au travers de la reproductibilité.

5.2.4 Profils d'exactitude et limites de quantification

Les LQ des analytes ont été définies dans tous les projets à partir des profils d'exactitude.^[235] Dans le cas de l'atranol et du chloroatranol, un intervalle de tolérance à 80% (IT, équation 16) ont été ajoutés sur le graphe pour encadrer la justesse. Dans le cas de l'analyse des 24 allergènes volatils, c'est un intervalle de prédiction à 90% qui a été ajouté (IT, équation 18).

Dans les deux cas, l'intervalle d'acceptabilité était de 30%.

PARTIE 3 : Résultats

1 Allergènes volatils

La méthode développée par l'AWG de l'IFRA en 2003 pour doser les 24 allergènes volatils de parfumerie^[91] par GC/MS en mode SIM, dont la stratégie de traitement « 2 colonnes X 3 ions » a été publiée 4 ans plus tard, n'avait pas été validée.^[94] Dans ce contexte, le CEN a décidé d'évaluer sa performance au travers d'une étude collaborative.

Dans un premier temps, une étude collaborative préliminaire a été réalisée pour entraîner les laboratoires et pour affiner le protocole. Ensuite une seconde étude a été lancée dont les résultats sont présentés dans ce manuscrit.

Les droites de calibrations obtenues pour les 6 ions dans la gamme 1-40 mg/l étaient représentées par régression linéaire non pondérée. Parfois la droite pouvait prendre une allure quadratique mais cela avait été attribué à une pollution du système d'injection par des composés non volatils.^[91] Les participants devaient quantifier les allergènes qui avaient été ajoutés à une matrice parfum entre 10 et 100mg/kg.

Les participants devaient fournir leurs résultats selon deux approches différentes :

- Utilisation de l'arbre décisionnel :

Dans ce cas l'analyste devait répondre aux différentes questions de l'arbre décisionnel pour arriver finalement à fournir le résultat en fonction des *Q-values* (Equation 3, Figure 80).

- Utilisation d'une feuille Excel automatisée :

Dans ce cas, l'analyste collait les 6 valeurs de dosages avec les *Q-values* associées dans une feuille Excel qui vérifiait automatiquement quelle était la plus petite valeur rapportée pour une *Q-value* satisfaisante (>89).

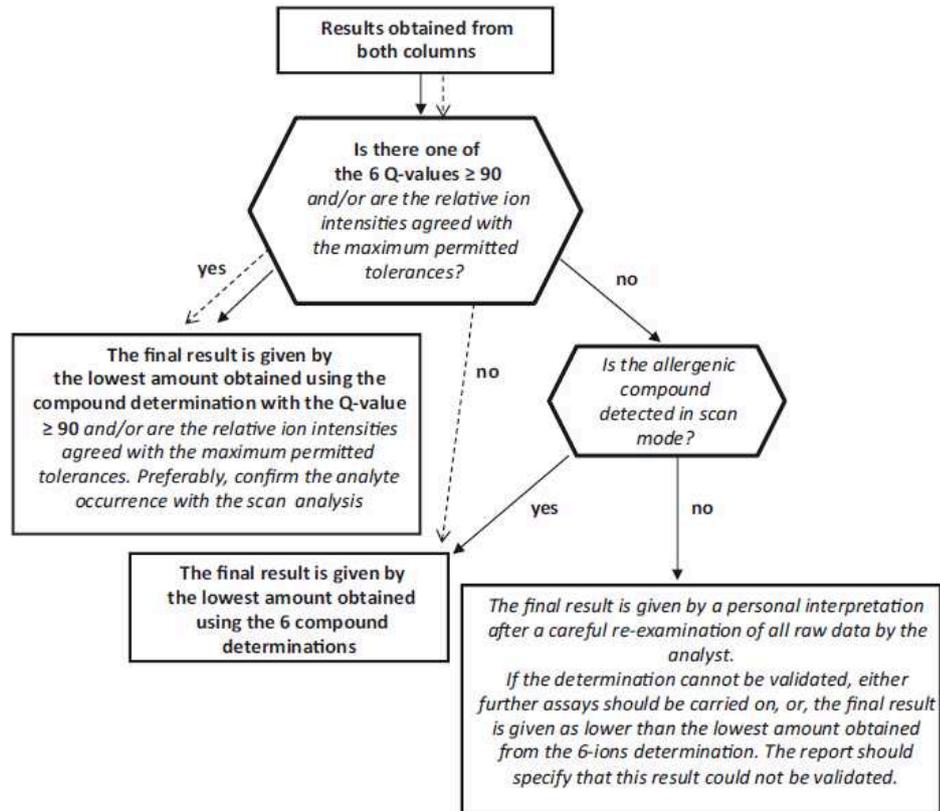


Figure 80 : Arbre décisionnel à suivre pour décider de la valeur de concentration en allergène à fournir. *Figure reproduite à partir de [95] avec l'accord d'Elsevier.*

La linéarité de la méthode a été jugée équivalente selon les deux stratégies avec des coefficients de détermination (R^2) assez similaires : 0.9339 et 0.9993 avec la stratégie automatisée et 0.9721 et 0.9993 avec la stratégie manuelle. Cependant dans le cas de trois allergènes (farnésol, α -isométhyl ionone et α -amylcinnamique), les R^2 étaient insuffisants avec l'approche automatique. Il a été conclu que le traitement manuel par un analyste entraîné était au final indispensable.

Les profils d'exactitude obtenus pour les 24 allergènes ont ensuite été représentés pour les deux stratégies (Figure 81).

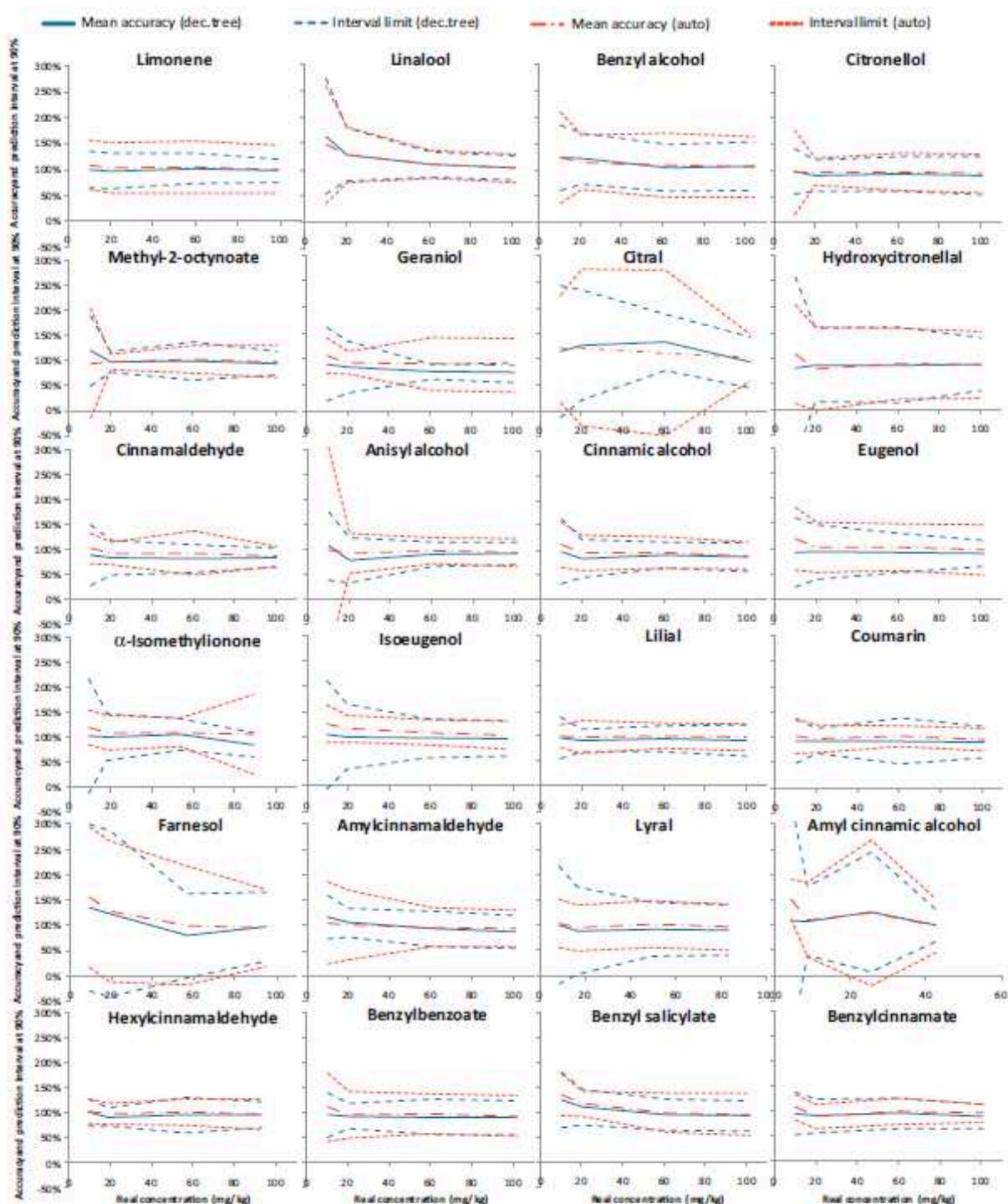


Figure 81 : Profils d'exactitude obtenus pour les 24 allergènes selon la stratégie de l'arbre décisionnel (bleu) ou par traitement automatique (rouge). En pointillé : intervalle de prédiction à 90%. *Figure reproduite à partir de [95] avec l'accord d'Elsevier.*

En considérant une erreur autorisée de $\pm 30\%$, il apparaît que la LQ de la plupart des analytes est de 10mg/kg. Cependant pour certains allergènes comme par exemple le farnésol, le citral ou l'alcool α -amylocinnamique les résultats ne sont pas satisfaisants. Il a été supposé par le groupe de travail du CEN que cela était dû aux coélutions de composés de la matrice avec ces allergènes.

Il aurait fallu changer de matrice pour estimer la performance de la méthode mais l'étude collaborative n'a pas été réitérée. Au lieu de cela, il a été estimé que globalement tous les allergènes devaient se comporter de la même façon et il a donc été décidé de considérer une performance globale de la méthode au lieu d'une performance individuelle. C'est-à-dire que des profils d'exactitude « moyens » ont été proposés (Figure 82).

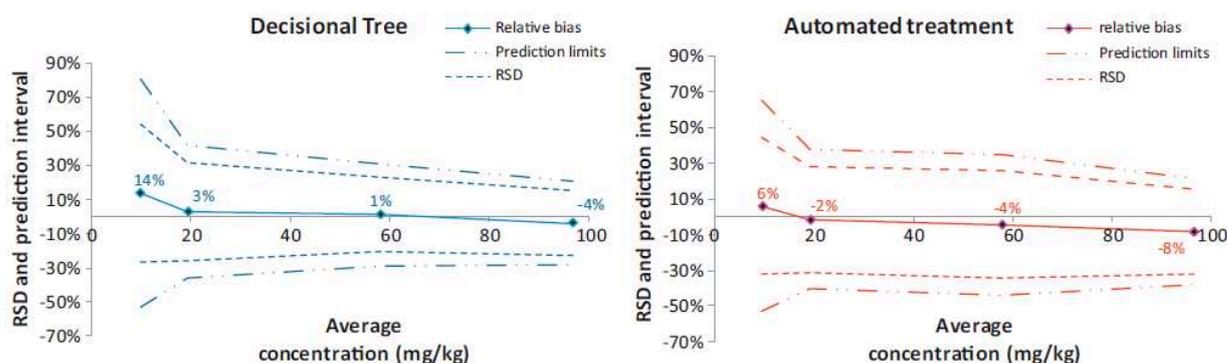


Figure 82 : Profils d'exactitude moyens obtenus selon la stratégie de l'arbre décisionnel (bleu) ou par traitement automatique (rouge). En pointillé : intervalle de prédiction à 90%. Figure reproduite à partir de [95] avec l'accord d'Elsevier.

La performance de la méthode IFRA pour doser les 24 allergènes a été jugée suffisamment bonne lors de ce travail collaboratif par le CEN pour pouvoir justifier la création d'une norme par la suite.^[236]

2 Atranol et chloroatranol

En 2014, une étude collaborative pour doser l'atranol et le chloroatranol par LC/MS en mode SIM a été initiée par la CST de PRODAROM. Le but était de proposer une méthode plus spécifique que la méthode de dosage par LC/UV proposée deux ans plus tôt^[232], dont les limites (LD et LQ) étaient déjà suffisamment basses pour se conformer aux exigences législatives, mais qui pouvait parfois conduire à des surestimations des deux allergènes en cas de coélution.

L'étude s'est déroulée en deux temps puisque les observations de cette étude collaborative en gamme solvant ont donné lieu à une deuxième étude collaborative deux ans plus tard en gamme matrice.

2.1 Etude collaborative en gamme solvant

Les six laboratoires participant à cette étude devaient analyser en triplicata par LC/MS en mode SIM, selon les conditions qu'ils pouvaient choisir dans le protocole fourni, huit solutions de calibration dans le méthanol, neuf solutions de mousses et trois solutions de mousses dopées en atranol et chloroatranol à des concentrations inconnues.

Les laboratoires devaient fournir à la société Robertet, en charge du traitement de données, les éléments suivants dans un fichier Excel qui leur avait été remis :

- Concentrations retrouvées dans les solutions de validation pour chaque triplicata ;
- Ratio des ions quantifiants/qualifiants trouvés dans les solutions de validation à chaque concentration pour chaque triplicata ;
- Moyenne des dosages en triplicata des neuf solutions de mousses ;
- Moyenne des dosages en triplicata des trois solutions de mousses dopées en allergènes.

2.1.1 Résultats individuels au sein du laboratoire

Avant de fournir les résultats au coordinateur, la performance de la méthode a été évaluée au sein du laboratoire.

Sur la base des ratios d'ions quantifiants/qualifiants et compte tenu des directives IOFI^[50], des LD pour l'atranol et le chloroatranol de 0.03 et 0.02 mg/l ont pu être déterminées.

Une intégration manuelle des pics était indispensable pour obtenir des droites de calibration linéaires pour les deux allergènes ($R^2 > 0.994$, Figure 83) mais également pour obtenir des ratios quantifiants/qualifiants exploitables. En effet, aux plus faibles concentrations, et malgré les ajustements des paramètres d'intégration, les pics étaient mal intégrés.

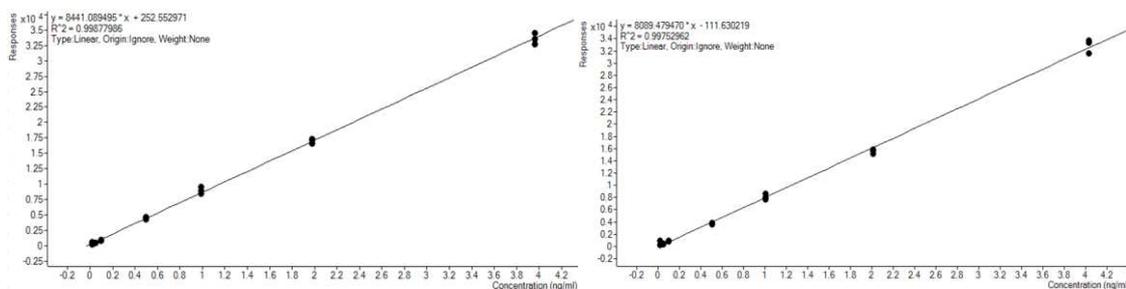


Figure 83 : Droites de calibrations obtenues dans le cas de l'atranol (gauche) et du chloroatranol (droite)

La méthode s'est avérée linéaire sur toute la gamme de calibration pour les deux allergènes (Figure 84).

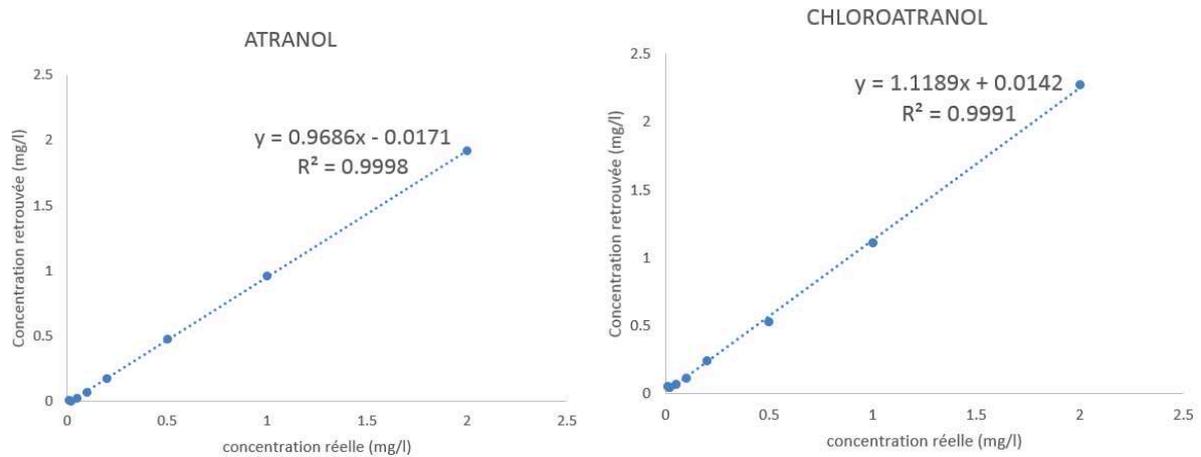


Figure 84 : Profils de linéarité de la méthode LC/MS pour le laboratoire 6

Les LQ ont été déterminées grâce aux profils d'exactitude avec un IT à 80% en s'autorisant une erreur de 30%, valeur fixée par la CST de PRODAROM, comme étant 0.5 mg/l pour l'atranol et le chloroatranol.

Lors du dosage des allergènes dans les mousses, un effet matrice assez important notamment dans le cas du chloroatranol a été observé au sein du laboratoire. En effet, plus la mousse était diluée, plus la concentration retrouvée était élevée (Figure 85).

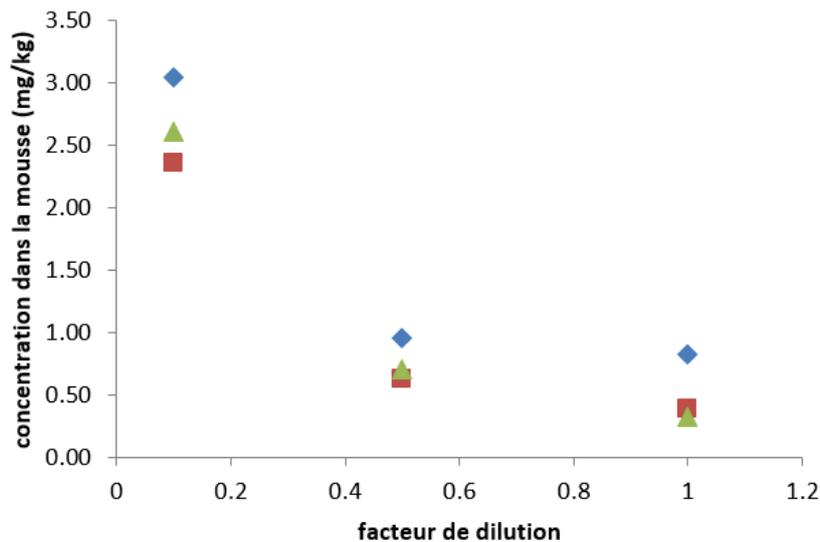


Figure 85 : Concentration en atranol estimée dans la mousse en fonction du facteur de dilution. Les différentes couleurs correspondent à des injections en triplicata.

Ces observations ont été rapportées à la CST de PRODAROM afin de considérer l'intérêt de réaliser une nouvelle étude collaborative en faisant appel cette fois à une calibration en matrice ou à l'utilisation de la méthode EDA^[237],^[44]

Les résultats individuels de la société ont ensuite été fournis à la société Robertet pour être traités avec ceux des cinq autres laboratoires.

2.1.2 Résultats de l'étude collaborative en solvant

Les sociétés Robertet et Cosmo International Ingrédients ont traité les résultats fournis par les six laboratoires participant à l'étude collaborative de la même façon que présentée dans la partie précédente.

Il en est ressorti que la méthode était linéaire dans la gamme 0.1-2 mg/l pour l'atranol et 0.2-2.1 mg/l pour le chloroatranol. Les LD ont été estimées à 0.03 pour l'atranol et 0.02mg/l pour le chloroatranol.

Les profils d'exactitude obtenus avec un IT à 80% pour les deux allergènes sont représentés dans la figure 86 pour comparaison. Les LQ définies grâce aux profils d'exactitude en IT avec 30% d'erreur autorisées étaient de 0.5 mg/l pour les deux allergènes.

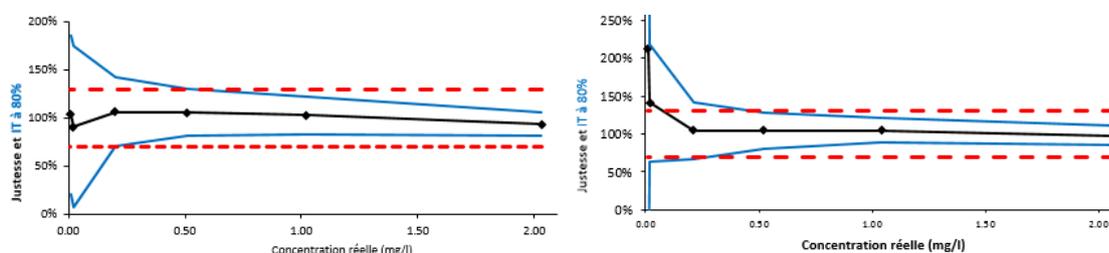


Figure 86 : Profils d'exactitude (ligne noire) pour l'atranol (gauche) et le chloroatranol (droite) obtenus avec un intervalle de tolérance à 80% (lignes bleues) dans le cas de l'étude collaborative impliquant 6 laboratoires. Les pointillés rouges représentent l'erreur autorisée

La gamme de la méthode a donc été définie, suite à cette étude collaborative comme étant 0.5-2.0 mg/l pour l'atranol et 0.5-2.1 mg/l pour le chloroatranol en gamme méthanolique.

Pour vérifier l'applicabilité de la méthode à l'étude d'échantillons réels, les laboratoires avaient dû analyser un extrait de mousse de chêne et trois échantillons de mousse dopés en allergènes à des concentrations inconnues. Le dosage a été fait en appliquant l'approche de l'EDA.^[44] L'effet

matrice observé au sein du laboratoire a été confirmé au niveau de l'étude collaborative. Les résultats obtenus sont compilés dans le tableau 28.

Tableau 28 : Quantification de l'atranol et du chloroatranol dans l'extrait de mousse et dans les échantillons de mousse dopés 1 à 3.

	Atranol				Chloroatranol			
	Concentration théorique (mg/Kg)	Concentration retrouvée* (mg/kg)	σ	erreur (%)	Concentration retrouvée* (mg/kg)	Moyenne (ppm)	σ	erreur (%)
Echantillon 1	1.72	1.09	0.27	-36.5	1.58	0.64	0.41	-59.3
Echantillon 2	0.71	0.51	0.11	-27.2	0.54	0.21	0.14	-60.6
Echantillon 3	0.25	0.23	0.03	-8.3	0.07	0.04	0.03	-47.8
Mousse		3.29	0.35			0.4	0.86	

* : moyenne des déterminations provenant des 6 laboratoires

Si les erreurs de quantification sont dans l'ensemble acceptables pour l'atranol, elles le sont moins pour le chloroatranol. D'autre part le biais est systématiquement négatif ce qui pourrait être expliqué par l'effet matrice. En effet, la calibration a été faite dans le méthanol. Si la matrice induit une diminution du signal des allergènes par rapport au méthanol, comme observé au sein du laboratoire, leur concentration sera sous-estimée dans les mousses.

D'autre part, en traitant les résultats, il est apparu que les laboratoires qui avaient analysé les solutions dopées le plus tardivement étaient ceux qui avaient fait le plus d'erreur sur leur dosage. Après vérification, l'atranol et le chloroatranol semblent se dégrader d'un facteur 2 et 10 respectivement dans la mousse en dilution méthanolique au bout d'un mois.

Il a donc été décidé, pour la prochaine étude collaborative, que les laboratoires analyseraient des solutions fraîches pour éviter d'introduire un biais dans l'évaluation de la performance de la méthode.

Lors du traitement des résultats sur le dosage des mousses dopées, il s'est avéré que les performances du laboratoire n'étaient pas parmi les meilleures. Après vérification en interne, il a été montré que le choix du tampon de la phase mobile n'était pas forcément optimal. En effet,

l'acide acétique avait été choisi au sein du laboratoire, parmi les tampons proposés dans le protocole fourni par PRODAROM, car il avait permis d'obtenir un signal maximal lorsque les analytes étaient dilués dans le méthanol. Lorsque la mousse dopée en allergène a été ré-analysée dans les mêmes conditions, il est apparu que l'acide acétique ne permettait pas de contrebalancer suffisamment l'effet matrice dû à la mousse par rapport aux autres tampons. En effet, les aires obtenues étaient inférieures et parfois le chloroatranol n'était tout simplement plus détecté. Il a donc été décidé que lors de la prochaine étude collaborative, l'impact du tampon serait considéré par le laboratoire pour confirmer ces hypothèses.

2.2 Etude collaborative en gamme solvant avec EDA et en gamme matrice

Suite aux observations de la première étude, une seconde étude collaborative a été initiée deux ans plus tard.

Le but était d'estimer si une calibration en matrice est indispensable pour s'affranchir de l'effet matrice ou bien si l'utilisation de la méthode EDA^[44] peut permettre de corriger les résultats qui seront obtenus avec une calibration dans le méthanol.

Pour éviter les redondances avec le paragraphe précédent, seules les conclusions clés de cette étude collaborative seront reportées dans ce manuscrit.

2.2.1 Confirmation de l'effet matrice

Lors de la première étude collaborative, un effet matrice avait été suspecté à cause des biais systématiquement négatifs obtenus lors du dosage des allergènes dans les mousses dopées. La Figure 87 permet d'illustrer cet effet matrice puisque les aires SIM obtenues dans la mousse pour les allergènes sont plus faibles que celles obtenues dans le méthanol, à concentration égale.

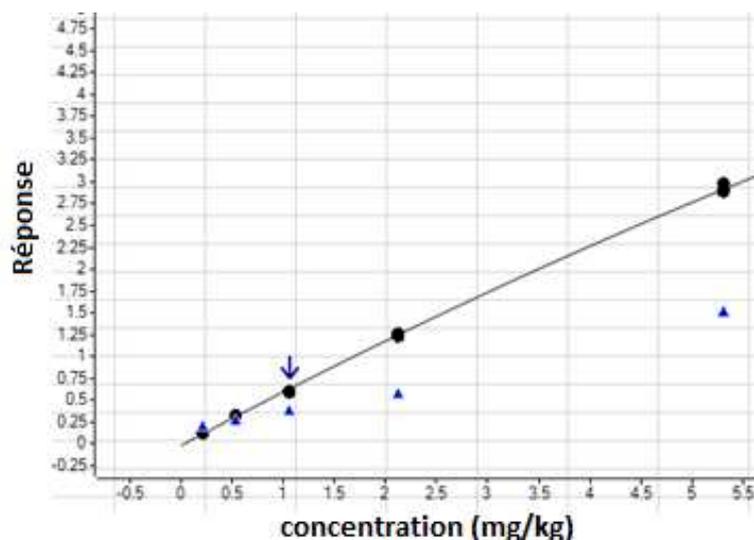


Figure 87 : Comparaison des droites de calibration obtenues pour l'atranol dans le méthanol (ronds noirs) ou dans la mousse (triangles bleus)

Il résulte de cette observation la confirmation qu'une gamme de calibration réalisée dans le méthanol ne peut pas être utilisée pour quantifier les analytes dans une mousse et qu'une gamme de calibration dans la mousse est indispensable tant que l'approche EDA^[44] n'est pas testée.

2.2.2 Effet du tampon

Les analystes étaient libres de choisir leur tampon pour réaliser leurs analyses. Il était suggéré dans le protocole certaines compositions de phase mobile notamment contenant 0.2 ou 0.5% d'acide acétique ou bien un mélange d'acide formique 0.1% et de formiate d'ammonium (5mM).

Au sein du laboratoire, il a été décidé de comparer l'acide acétique et l'acétate d'ammonium pour des questions de disponibilité de réactifs.

2.2.2.1 Impact du tampon sur la détection

Lorsque l'acide acétique était employé, aucun signal n'a été obtenu pour le chloroatranol dans la calibration en mousse, quelle que soit la concentration. L'utilisation de l'acétate d'ammonium a permis de récupérer le signal pour cet analyte.

2.2.2.2 Impact du tampon sur la calibration

La Figure 88 permet de mettre en évidence l'impact du tampon sur la courbe de calibration dans le cas de l'atranol. En effet, si une allure quadratique a été observée lorsque l'acide acétique a

été employé, l'utilisation de l'acétate d'ammonium a permis l'obtention d'une droite de calibration linéaire.

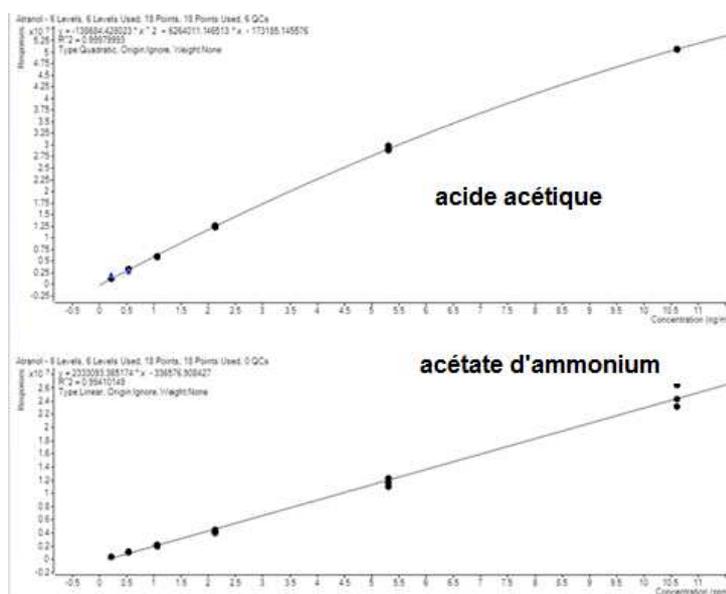


Figure 88 : Comparaison des droites de calibration obtenues pour l'atranol dans la mousse avec un tampon acide acétique (haut) ou acétate d'ammonium (bas)

Après discussion de ces observations au sein de la CST de PRODAROM, il s'est avéré que les analystes ayant observé des allures quadratiques pendant l'étude avaient pour la plupart utilisé l'acide acétique. Des études complémentaires devaient donc par la suite être lancées en interne pour les sociétés concernées.

2.2.3 Diminution du signal au cours de la séquence

L'étude nécessitait l'injection des solutions de calibration en triplicata. Ces injections devaient se faire selon une séquence fournie dans le protocole. En comptant les blancs, les calibrations en solvant ou en mousse et les échantillons à doser, il y avait 27 acquisitions entre deux points équivalents de la première et de la deuxième calibration et 54 entre la première et la troisième calibration.

Une nette diminution du signal au cours du temps a été observée au sein du laboratoire pour les deux analytes. La Figure 89 illustre ce phénomène dans le cas du chloroatranol.

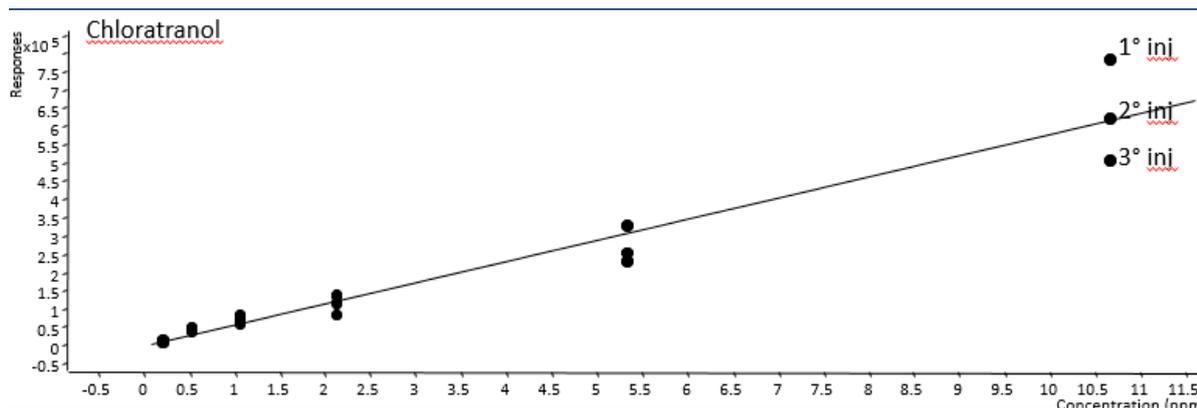


Figure 89 : Superposition des trois gammes de calibration en matrice dans le cas du chloroatranol

Lors du traitement des résultats, il est apparu que cette diminution avait également été observée dans certains autres laboratoires ayant participé à l'étude.

Pour le traitement des résultats globaux, la moyenne des calibrations a donc été prise en compte pour quantifier. Cela a permis de valider la méthode en maximisant l'erreur obtenue. Après discussion au sein de la CST de PRODAROM il a été suggéré aux analystes d'utiliser les solutions de calibration injectées les plus proches des échantillons à doser. Il a également été conseillé de recalibrer toutes les dix injections ou à minima d'injecter des échantillons QC régulièrement dans la séquence pour déterminer le moment où la calibration doit être refaite.

2.2.4 Paramètres de validation en gamme matrice

Les paramètres de validation obtenus en gamme matrice, selon la stratégie des profils d'exactitude décrite dans la première étude collaborative, sont récapitulés dans le Tableau 29.

Tableau 29 : Paramètres de validation de la méthode de dosage de l'atranol et du chloroatranol par LC/MS en mode SIM en gamme matrice

Analyte	Gamme de linéarité (mg/L)	LQ *(mg/L)	LD**(mg/L)	Gamme de la méthode (mg/L)
Atranol	0.21-10	1.50	0.21	1.50-10
Chloroatranol	0.21-10	1.07	<0.21	1.07-10

* obtenu grâce au profil d'exactitude avec un intervalle de tolérance de 80% et une erreur autorisée de +/-30%

** obtenu d'après les ratios d'ions quantifiant/qualifiants selon les tolérances IOFI^[50]

2.2.5 Comparaison des résultats en gamme matrice ou en gamme solvant avec EDA

Deux mousses avaient été fournies aux laboratoires avec des teneurs différentes en allergènes : une qualité « low » et une qualité « high ».

Les allergènes ont été quantifiés dans ces deux mousses soit en utilisant la gamme de calibration en matrice soit en utilisant la gamme de calibration dans le méthanol mais avec l'approche EDA. [44]

Les résultats obtenus sont équivalents avec les deux méthodes (Tableau 30). Etant donnée la difficulté de trouver une mousse suffisamment peu riche en allergènes pour permettre de réaliser une calibration en matrice d'une part, et l'impossibilité de trouver une matrice qui serait équivalente à l'échantillon à doser (mêmes effets matrice) d'autre part, la calibration en gamme solvant avec approche EDA semble être la meilleure des deux alternatives.

Tableau 30 : Dosage de l'atranol et du chloroatranol dans deux mousses en utilisant une calibration en matrice ou une calibration en solvant avec l'approche EDA

Mousse	Atranol		Chloroatranol	
	EDA Avec gamme solvant (mg/kg)	Gamme matrice (mg/kg)	EDA Avec gamme solvant (mg/kg)	Gamme matrice (mg/kg)
Qualité « low »	2.7 ± 1.5	1.6 ± 0.9	0.2 ± 0.1	0.4 ± 0.4
Qualité « high »	47 ± 17	40 ± 13	26 ± 14	38 ± 26

3 Conclusions et perspectives

Les études collaboratives permettent de s'assurer que les performances d'une méthode analytique sont suffisantes et équivalentes d'un laboratoire à l'autre. Elles permettent de mettre à disposition des analystes du domaine des méthodes validées, pour répondre aux exigences

législatives, notamment dans le cas des composés réglementés, et dont les limitations sont connues de tous. Cela permet aux sociétés productrices d'arômes, parfums et extraits naturels et aux sociétés clientes de pouvoir analyser dans les mêmes conditions les analytes en évitant au maximum les litiges sur les résultats obtenus. Enfin ces études permettent de former les laboratoires et analystes y prenant part en leur permettant de se situer par rapport aux autres participants.

Deux études collaboratives ont été présentées dans ce chapitre. Elles concernaient l'évaluation de la performance de deux méthodes de dosages de composés réglementés que sont les 26 allergènes de parfumerie. Les deux méthodes ont été jugées valides à la suite de ces études collaboratives et ont été par la suite partagées avec les membres des associations concernées.

Ce travail a fait l'objet d'un poster^[387] et d'une publication scientifique.^[95]

Depuis la publication de ces travaux, il est possible d'apporter quelques précisions sur les avancées de chacun des sujets.

3.1 Allergènes volatils

Dans le cas des allergènes, la méthode validée par le CEN qui avait été publiée en 2011 a donné lieu à l'élaboration d'une norme européenne EN 16274 en 2012.^[236] Une opinion du SCCS (pour *Scientific Committee on Consumer Safety* en Anglais) sur les allergènes de parfumerie dans les produits cosmétiques a été dévoilée la même année.^[238] La liste des substances suspectées allergisantes a été élargie à 85 dont 28 extraits naturels.

La méthode de dosage des 26 allergènes (2 colonnes x 3 ions) a été adaptée par l'AWG de l'IFRA pour l'analyse des nouveaux allergènes volatils soit au total 57 allergènes et leurs isomères. La méthode a été validée par une étude collaborative puis partagée à tous les membres IFRA en décembre 2016^[239] et rendue publique sur le site internet de l'association en avril 2017.^[240] Elle est en cours de considération par le CEN par le groupe TC 347/WG 4 pour devenir une norme et au niveau français par le groupe de travail GT3 (méthodes d'analyse) de la commission cosmétique (S91K) de l'AFNOR. La société Cosmo International Ingredient fait partie des experts français qui participent à ce projet.

La plupart des analystes du domaine des arômes et parfums se sont attachés à améliorer la séparation chromatographique des allergènes pour en améliorer la quantification en faisant

notamment appel à la CPGxCPG. En 2004 déjà, la société Firmenich proposait une méthode de dosage des 24 allergènes volatils par CPGxCPG-MS.^[241] Une dizaine d'années plus tard, les analystes des sociétés Chanel^[242], Firmenich^[243] et Givaudan^[244] faisaient encore appel à cette technique pour quantifier les nouvelles substances allergisantes. Cependant, même s'il n'est pas remis en doute l'utilisation routinière de ces méthodes au sein de ces sociétés, il n'est pas évident que tous les laboratoires de contrôle qualité de sociétés plus confidentielles puissent se doter de tels équipements. D'autre part, la nécessité de logiciels de traitement très spécifiques complique l'accessibilité de ces méthodes.

D'autres analystes ont proposé de gagner en sensibilité et en spécificité en jouant sur la détection et en faisant notamment appel à de la MS/MS. Les analystes de la société Yves Rocher ont par exemple proposé le dosage des 24 allergènes volatils par GC/MS QqQ.^[245] C'est ce qui a été proposé chez Robertet dans le travail de thèse de Mlle Barat. Elle a testé la performance du mode de détection MRM pour quantifier la liste étendue des allergènes volatils. Elle propose d'utiliser cette méthode dans le cas d'ingrédients dont les allergènes sont déjà identifiés. Elle propose comme amélioration, d'associer le mode SCAN au mode MRM dans le but d'obtenir une méthode plus universelle. En effet, cette méthode a également été comparée à une méthode plus classique de dosage en mode SIM/Scan comme la méthode actuellement proposée par l'IFRA mais en faisant appel à une stratégie de type « 1 ion x 3 colonnes » contre la stratégie « 3 ions x 2 colonnes de l'IFRA ».^[246] C'est apparemment cette dernière méthode qui permet d'obtenir le moins de faux négatifs et qui a donc été préférée dans le cas de l'étude de matrices inconnues. Cette méthode a l'avantage d'être facilement implantable en routine dans tous les laboratoires de contrôle, au même titre que la méthode IFRA, même si elle nécessite un équipement GC/MS supplémentaire.^[95]

Enfin, l'analyse des allergènes en faisant appel à l'UPC² a été proposée récemment par la société Waters mais pour l'instant les performances reportées ne sont pas au niveau des méthodes actuellement en place dans les laboratoires de contrôle.^[247]

3.2 Atranol et le chloroatranol

Dans le cas du dosage de l'atranol et du chloroatranol, un projet de Règlement de la Commission européenne visant l'interdiction des deux allergènes a été soumis à discussion en janvier 2017.^[248] En mars 2017, les deux allergènes ont été ajoutés à l'annexe II du règlement cosmétique qui liste les "substances interdites".^[249] Les résultats des deux études collaboratives initiées par PRODAROM ont été présentées à l'IFRA en mars 2017. La méthode a été mise à disposition du public sur le site internet de l'association en avril 2017.^[250]

Si l'analyse des allergènes, comme celle des furocoumarines, est liée à la réglementation cosmétique, le domaine des arômes et parfum doit également répondre à d'autres exigences réglementaires notamment concernant la naturalité et l'authenticité.

Le chapitre suivant illustrera ce point au travers de l'étude de la vanille.

CHAPITRE 4 : Contrôle de l'authenticité appliqué à la vanille

PARTIE 1 : Introduction et rappels bibliographiques

1 Naturalité

Selon la norme ISO 9235:2013, ^[251,252] une matière première naturelle peut être d'origine végétale, animale ou microbiologique. Elle peut avoir été transformée par des procédés physiques, enzymatiques, microbiologiques, ou traditionnels de préparation comme l'extraction, la distillation, le chauffage, la torréfaction et la fermentation. La directive 88/388/CEE^[253], qui s'applique aux arômes, donne une définition assez similaire au terme « naturel ». Dans le cas des ingrédients de parfumerie, ils seront considérés naturels par l'IFRA (International Fragrance Association) dès lors qu'ils sont obtenus par des moyens physiques à partir d'une matière première d'origine naturelle telle que définie dans la norme ISO 9235.^[254] La présence de solvants issus du pétrole et antioxydants est tolérée en trace, à partir du moment où ils sont déclarés.

Lorsque la version naturelle d'un ingrédient est beaucoup plus chère que sa version synthétique, les tentations de frauder sont importantes. Les allégations mensongères sur la naturalité des arômes ne sont pas rares comme ce fut le cas des arômes de vanille. En 1999 par exemple, la vanilline ex-gousses se vendait entre 1200 et 4000 \$/kg contre moins de 15 \$/kg pour sa version synthétique ex-lignine.^[255]

2 Vanille

2.1 Origines et qualités des gousses de vanille

La vanille est une orchidée tropicale qui appartient à la famille des Orchidacées. Près de 150 variétés ont été identifiées dans cette famille parmi lesquelles trois sont très connues bien que seules les deux dernières soient cultivées : *Vanilla pompona*, *Vanilla fragrans* synonyme *Vanilla planifolia* et *Vanilla tahitensis*.^[256]

Dans le domaine des arômes, l'espèce *planifolia* est celle qui est la plus employée. Dans le reste de ce manuscrit, le terme vanille se réfèrera donc à cette espèce.

Les gousses de vanille commerciales proviennent principalement de Madagascar, d'Indonésie, des Comores, de Chine, du Mexique, de la Réunion et de Tahiti.

Dans le commerce, les gousses de vanille sont classées selon différents grades en fonction de leur couleur (rouge ou noire), de leur forme (entière ou fendue) et de leur longueur.^[256,257] Les caractéristiques générales et commerciales des gousses de vanille sont définies par la norme ISO 5565-1.^[258] Il existe une norme malgache qui classe les gousses de vanille en catégorie « Extra » pour des gousses noires fendues (NF) et non fendues (NFN) souples et saines, « Prima » pour des gousses NF et NFN sèches, « Supérieures » pour les gousses rouges fendues (FR) ou non fendues (NFR) et enfin « Courantes » pour les gousses fendues ou non, de petites tailles ou coupées en morceaux (cuts).^[259] Sur le marché, les classifications des gousses se multiplient et sont surtout liées aux cahiers des charges des pays importateurs en termes d'humidité résiduelle ou de teneur en vanilline.^[259,260]

2.2 Composition aromatique de la gousse de vanille

Plus de 700 composés volatils ont été reportés dans les gousses de vanille parmi lesquels les quatre composés majoritaires que sont la vanilline, le *p*-hydroxybenzaldehyde (pHB) et leurs acides respectifs (Figure 90).^[261]

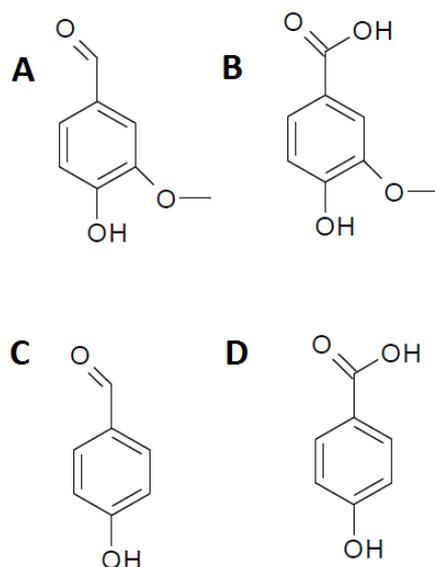


Figure 90 : Structure de la vanilline (A), de l'acide vanillique (B), du *p*-hydroxybenzaldehyde (C) et de son acide (D)

La vanilline est le constituant clé de l'arôme de la gousse de vanille. Présente sous forme β -glycosylée dans la gousse verte, elle est libérée lors de l'étape de maturation de cette dernière qu'elle soit naturelle ou provoquée (Killing process).^[262] La vanilline peut être extraite des gousses de vanille mais elle peut être obtenue par synthèse, hémisynthèse ou biotechnologie^[256] à partir de l'eugénol, de l'acide férulique^[263], de la lignine, du glucose^[264], du catéchol ou gaïacol,

de la curcumine^[265], ou encore de la coniférine. En fonction de son mode d'obtention, la vanilline n'aura pas le même prix.

2.3 Fraudes possibles concernant la vanille

Dans le cas des gousses ou des extraits de vanille, il se peut que l'origine annoncée ne soit pas la bonne. C'est le cas par exemple de la revendication de gousse Bourbon qui ne s'applique qu'aux gousses provenant de Madagascar, l'île de la Réunion, l'île Maurice, Les Comores et les Seychelles.

Il est également possible que l'extrait de vanille naturel ait été dopé en vanilline de synthèse pour en améliorer les qualités organoleptiques. En 1999, par exemple, la répression des fraudes a publié un rapport mentionnant l'emploi de vanilline de synthèse dans 17 sur 22 arômes naturels contrôlés dans le cas de glaces et crèmes glacées.^[266]

Dans le cas de mélanges de substances aromatisantes, il se peut que des composés artificiels ou non endogènes aux gousses aient été ajoutés comme l'éthylvanilline ou la coumarine.

Face aux risques élevés d'adultération ou d'allégations mensongères, différentes méthodes analytiques ont été proposées ces cinquante dernières années pour contrôler la naturalité de la vanilline et des autres constituants clés de la gousse :

- Quantification des constituants de la vanille par chromatographie liquide haute performance (HPLC) et détermination de plusieurs ratios ;^[259,260,267-273]
- Détermination des abondances isotopiques du ¹³C et ²H par spectrométrie de masse à rapport isotopique (IRMS) ;^[274-277]
- Distribution des atomes de ²H et de ¹³C dans le squelette chimique de la vanilline par étude du fractionnement isotopique naturel spécifique par résonance magnétique nucléaire quantitative.^{[278-280],[281,282]}

Dans tous les cas, une étape d'extraction préalable est nécessaire avant de faire appel aux techniques permettant l'authentification. Dans le cas des analyses isotopiques par RMN, une purification de l'analyte est également indispensable.

3 Extraction de la vanille

Plusieurs méthodes d'extraction ont été rapportées dans le cas des gousses de vanille, des extraits, arômes ou produits finis mais les deux les plus employées restent la macération et l'extraction en continu.

3.1 Macération

La macération des gousses pour en extraire les composés aromatisants est décrite dans la méthode officielle de l'AOAC (*Association of Official Agricultural Chemists*) n°960.37.^[283] Les gousses doivent macérer pendant 12h dans de l'eau à 40°C puis pendant 12h dans l'éthanol à température ambiante.

Cette procédure a été utilisée telle quelle^[284] ou avec des modifications de solvants.^[274,285,286]

3.2 Extraction en continu

La norme ISO 5565-2 recommande l'extraction éthanolique des gousses au Soxhlet pendant 16h avant la quantification des constituants.^[287] Les solvants alcooliques semblent conduire à un bon rendement d'extraction de la vanilline^[271,279] mais l'utilisation du dichlorométhane, avant les analyses isotopiques, a déjà été rapportée.^[288]

3.3 Extraction accélérée par solvant

L'extraction accélérée par solvant (ASE) est une technique introduite dans les années 1990 et dont le principe est d'extraire plusieurs fois la matrice avec du solvant frais à la température souhaitée et sous pression.^[289]

L'ASE a été utilisée pour extraire les composés phénoliques des gousses de vanille.^[290] Les auteurs n'ont cependant pas comparé leurs résultats avec ceux obtenus dans le cas des méthodes officielles AOAC 960.37^[283] et ISO 5565-2.^[287]

3.4 Autres types d'extraction

Si l'extraction au CO₂ supercritique est utilisée à l'échelle industrielle pour extraire les gousses de vanille^[291], cette méthode n'a jamais été considérée pour des applications analytiques certainement à cause de son coût et du faible rendement d'extraction des constituants autres que la vanilline.

Certains auteurs ont également proposé l'extraction assistée par micro-ondes (MAE) ou ultrasons (UAE)^[292–294] mais les résultats obtenus semblaient moins bons que ceux de l'ASE.

4 Purification

Selon la technique analytique choisie pour authentifier un extrait, une étape de purification est nécessaire après l'étape d'extraction.

La CCM a déjà été utilisée avant étude par IRMS^[295] mais cette méthode est fastidieuse. L'utilisation d'une colonne remplie de silice activée à pression atmosphérique^[285,288] ou sous pression (0.5/1 bar)^[279] permet la récupération de quantités d'analyte pur de l'ordre du gramme après au moins une journée de purification. L'HPLC semi-préparative ou préparative peut également être employée pour purifier les analytes^[296] mais les quantités purifiées sont relativement faibles et les colonnes assez chères tout comme dans le cas de la GC préparative qui permet de récupérer un peu moins de 5mg par injection.^[297,298]

5 Contrôle de l'authenticité par étude du profil aromatique

5.1 Intérêt du profil aromatique

L'analyse qualitative et quantitative des composés présents dans les gousses et dans les extraits de vanille est la première possibilité pour éliminer les adultérations grossières. La présence de composés synthétiques ou non présents naturellement dans les gousses comme l'éthylvanilline ou la coumarine permet déjà de faire un premier tri^[299–303] tout comme la teneur en composés clés peut renseigner sur l'origine naturelle de la vanille.^[259,260,267,268,271]

5.2 Chromatographie pour étudier le profil aromatique

Si l'utilisation de la GC^[303–307] a parfois été rapportée, la LC reste la technique de choix pour étudier le profil aromatique de la vanille.^[268,271,273,284,293,296,308,309]

La norme ISO 5565-2 préconise une séparation sur colonne de silice greffée C18 en mode isocratique avec une phase mobile constituée de méthanol et d'eau acidifiée et une quantification à 254 nm par étalonnage interne avec l'acide acétylsalicylique.^[287]

Dans la littérature, la séparation est effectuée indifféremment en mode isocratique^[273,298] ou gradient^[271,284,293] en utilisant, comme dans la norme ISO 5565-2, une phase mobile à base d'eau acidifiée et de méthanol ou parfois d'acétonitrile. La quantification se fait indifféremment par

calibration externe^[273,284,293] ou par étalonnage interne^[271] soit à 254 nm soit aux maxima d'absorption des analytes cibles à savoir entre 260 et 280nm (Figure 91).

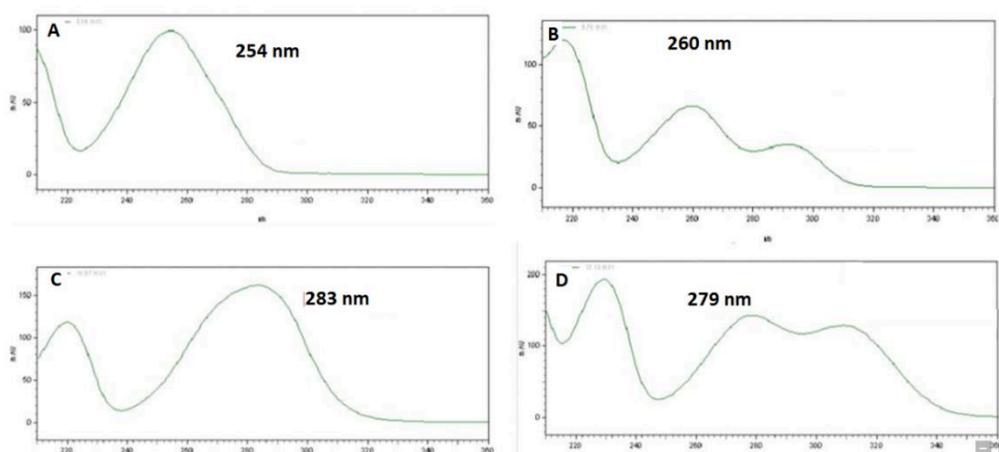


Figure 91 : Spectres UV et λ_{\max} pour l'acide pHB (A), l'acide vanillique (B), le pHB (C) et la vanilline(D)

Les méthodes publiées pour analyser la vanille n'ont jamais fait l'objet d'une validation ou cette dernière a été menée de façon incomplète. Ainsi en 2006, Sharma *et al.* ont publié des paramètres de linéarité, de justesse, des limites de détection, de quantification mais n'a pas vérifié la fidélité ni la spécificité.^[293] D'autre part, seule la vanilline a été considérée dans cette étude et la répétabilité évaluée en milieu de gamme ne saurait être généralisée à toute la gamme de la méthode. L'année suivante, Sinha *et al.* ont proposé la quantification de dix composés phénoliques dans des extraits éthanoliques de vanille.^[310] Cette fois, la spécificité et la fidélité de la méthode ont été reportées en plus des critères de validation classiques mais les LQ reportées semblent vraiment faibles comparées aux gammes de linéarité de leur méthode. D'autre part les auteurs ont quantifié sept composés sur dix hors gamme.

Dans le cas de l'analyse de la vanille, toutes les séparations reportées ont été obtenues en conditions HPLC avec des colonnes aux diamètres de particules comprises entre 5 et 10 μ m. Cependant le recours à des diamètres de particules inférieures à 2 μ m, en conditions de chromatographie liquide à ultra haute performance (UHPLC), a été proposé en 2008 par Spacil *et al.* pour séparer certains composés phénoliques dont l'acide vanillique.^[311] La séparation était plus efficace, rapide et écologique qu'en conditions HPLC. Cependant aucune donnée quantitative n'a été fournie dans cette étude.

5.3 Résultats quantitatifs

Des valeurs de concentrations en composés clés des gousses de vanille ont déjà été plusieurs fois rapportées dans la littérature. Dans le cas des gousses malgaches, par exemple, les teneurs en vanilline peuvent aller d'un peu plus d'1% à presque 3%.^[259,260,267,268,271,271,273,298,312]

Une limite de l'utilisation des concentrations en composés clés pour authentifier la naturalité d'un extrait est la variété des valeurs possibles selon la provenance des gousses. Les valeurs reportées dans la littérature concernent principalement les gousses Bourbon ce qui n'est pas représentatif de toutes les origines possibles.

En 2003, une note a été publiée par la direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes (DGCCRF) concernant les critères analytiques pour la détermination de l'authenticité de la vanilline, des extraits et des arômes naturels.^[313] Selon cette note, la teneur moyenne en vanilline dans les gousses devrait être d'environ 2%. Toute valeur trop basse ou beaucoup trop haute peut être le signe d'une adultération même si la teneur en vanilline ne fait pas l'objet de spécification réglementaire.

Au lieu de considérer les valeurs de teneur absolue, les ratios de concentration entre les quatre composés clés de la vanille ont été employés à des fins d'authentification par la DGCCRF (Tableau 31).^[313]

Tableau 31 : Ratios pour la vanille et les extraits standards de vanille Bourbon ^[313]

Ratios	Bornes
R1=vanilline/pHB	10/20
R2=acide vanillique/pHB	0.53/1.5
R3=acide pHB/pHB	0.15/0.35
R4=vanilline/acide vanillique	12/29
R5=vanilline/acide pHB	40/110

Les valeurs reportées en 2003 avaient fait l'objet d'une modification par rapport aux précédentes bornes utilisées depuis 1988^[314] compte tenu des variations observées dans le temps. D'ailleurs l'IOFI qui recommandait en 2000^[315] les ratios initiaux comme critère d'authentification les a abrogés en 2005^[316].

L'utilisation des ratios de constituants apparaît comme un premier moyen de contrôle des adultérations cependant ils sont facilement ajustables par ajout de composés purs. La fraude ne sera pas décelable sans faire appel à des analyses isotopiques.

6 Contrôle de l'authenticité par les analyses isotopiques

6.1 Généralités sur les analyses isotopiques

6.1.1 Isotopes et isotopomères

Les isotopes sont des atomes d'un même élément qui diffèrent par le nombre de neutrons dans le noyau. Pour un même élément, on peut observer un ou des atome(s) qui seront qualifiés de « léger(s) » ou « lourd(s) ». Dans le cas de la matière organique, les atomes les plus abondants sont le carbone, l'oxygène, l'hydrogène et l'azote. Ils se rencontrent sous forme d'isotopes stables ^{12}C , ^{13}C , ^{16}O , ^{17}O , ^{18}O , ^1H , ^2H (D), ^{14}N , ^{15}N mais également sous forme d'isotopes instables comme ^{14}C et ^3H (T). Dans la nature, les isotopes lourds sont moins nombreux que les isotopes légers.

Les isotopomères sont des molécules ayant la même constitution mais différant par leur substitution isotopique. Les isotopomères ont un poids moléculaire qui variera donc en fonction des neutrons présents dans les noyaux constitutifs. Dans le cas du CO_2 , on aura par exemple les isotopomères suivants : $^{12}\text{C}^{16}\text{O}_2$ de masse 44, $^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{17}\text{O}$ ou $^{13}\text{C}^{16}\text{O}_2$ de masse 45, $^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{18}\text{O}$, $^{13}\text{C}^{16}\text{O}^{17}\text{O}$, $^{12}\text{C}^{17}\text{O}_2$ de masse 46. Il y a statistiquement peu de chance que deux atomes lourds se retrouvent ensemble aussi les deux derniers isotopomères sont négligeables en abondance naturelle. Dans le cas de la vanilline $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$, il existe statistiquement 884736 isotopomères.^[278] Cependant l'isotopomère $^{13}\text{C}_8^2\text{H}_6^{18}\text{O}_3$ a seulement $6.44 \cdot 10^{-5}$ chance d'être observé.

6.1.2 Grandeurs isotopiques

6.1.2.1 Rapport isotopique R

Le rapport isotopique R est égal au quotient du nombre d'isotopes lourds par rapport à celui des éléments légers. Ainsi dans le cas du carbone, $R = ^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$.

6.1.2.2 Abondance isotopique A

L'abondance isotopique A renseigne sur la proportion relative d'un isotope. Dans le cas du ^{13}C , $A = \frac{^{13}\text{C}}{(^{12}\text{C} + ^{13}\text{C})}$.

Le tableau 32 reporte les abondances relatives moyennes des isotopes stables observées naturellement.^[317]

Tableau 32 : Abondances relatives moyennes des différents isotopes stables^[317]

Atome	Isotope stable	%
Hydrogène	^1H	99.985
	D	0.015
Oxygène	^{16}O	99.759
	^{17}O	0.037
	^{18}O	0.204
Carbone	^{12}C	98.89
	^{13}C	1.11

6.1.2.3 Déviation isotopique δ

Les variations observées naturellement sur les abondances relatives sont relativement faibles c'est pourquoi les résultats sont exprimés en ‰ par rapport à un standard international en faisant appel à la déviation isotopique δ .

Elle est calculée en comparant le ratio isotopique R entre les isotopes concernés et leur standard selon l'équation 29. Dans le cas des atomes d'oxygènes et d'hydrogène, il s'agit du standard eau, le V-SMOW (Vienna Standard Mean Ocean Water) et dans le cas du carbone, il s'agit du standard CaCO_3 , le V-PDB (Vienna Pee Dee Belemnite). En réalité, le V-PDB n'est pas disponible à la vente et l'étalonnage se fait par rapport à un étalon secondaire, lui-même étalonné par rapport au V-PDB par l'IAEA (*International Atomic Energy Agency*) Dans le cas du deutérium les standards V-GISP (Greenland Ice Sheet Precipitation) et V-SLAP (Standard Light Antarctic Precipitation) peuvent également être utilisés.

Équation 29: Déviation isotopique δ ^[318]

$$\delta_i \text{ ‰} = \left(\frac{R_i}{R_{\text{reference}}} - 1 \right) * 1000$$

6.1.2.4 Fractionnement isotopique

Le fractionnement isotopique correspond à l'enrichissement ou appauvrissement d'un isotope par rapport à l'autre à cause de phénomènes physiques, chimiques ou biologiques. Il est dû au fait que deux isotopes auront des propriétés physicochimiques légèrement différentes.

Fractionnement isotopique d'origine physique

Les fractionnements isotopiques d'origine physique sont dus à la différence de masse entre les isotopes légers et lourds. Ce fractionnement est courant lors des étapes de séparation, de purification par chromatographie, de diffusion, de sublimation ou de distillation. [282,288,319–321] Par contre, il a été démontré que les extractions liquide-liquide ou par Soxhlet n'entraînaient pas de fractionnement isotopique^[322].

Fractionnement isotopique d'origine chimique

Les fractionnements isotopiques d'origine chimique peuvent être cinétiques ou thermodynamiques.

Les effets isotopiques cinétiques (EIC) sont dus à la différence de constantes de vitesses k des isotopes légers et lourds. Cet effet, parfois également appelé α , est calculé comme le ratio de la constante de vitesse de l'isotopomère léger sur celle de l'isotopomère lourd. Il existe un effet cinétique primaire lorsque l'atome substitué par un des isotopes est le centre de la réaction ou secondaire lorsque l'atome substitué est éloigné du centre réactionnel. Ces derniers sont généralement moins importants. En général l'EIC observé pour l'hydrogène est plus important que pour le carbone.

Les effets isotopiques thermodynamiques (EIT) sont observés en régime d'équilibre. Ils sont expliqués par la différence d'affinité relative entre les isotopes légers ou lourds pour les partenaires en échanges. L'EIT se calcule comme le ratio des constantes d'équilibre K . Le cycle évaporation/condensation induit des effets isotopiques thermodynamiques. Ces effets sont notables dans le cas du ^2H ou du ^{18}O lorsque le cycle de l'eau est étudié. Dans l'océan, les abondances isotopiques sont nulles puis une succession de fractionnements intervient à chaque étape d'évaporation et condensation avec une tendance à l'appauvrissement en isotope lourd au fur et à mesure que l'eau s'éloigne des océans pour rentrer dans les terres.^[323]

En conclusion, l'abondance isotopique globale d'un élément dans une molécule sera la moyenne pondérée des contributions de chaque isotopomère de cet élément. La composition isotopomérique finale reflètera donc à la fois la distribution isotopique des substrats de départ mais également le procédé de transformation.

6.1.3 Isotopes comme marqueurs de l'origine botanique ou géographique

Au cours de leur croissance, les plantes vont assimiler de l'eau et du dioxyde de carbone pour se développer. Les études isotopiques peuvent permettre de déterminer les origines géographiques et botaniques des analytes étudiés.

6.1.3.1 Atomes d'oxygène et d'hydrogène

L'hydrogène assimilé par les plantes provient exclusivement des eaux océaniques et météoriques qui donnent également une partie de l'oxygène. La succession des cycles d'évaporation/condensation de l'eau induit un fractionnement isotopique du deutérium et du ^{18}O qui sera caractéristique de l'origine géographique.

Du fait des différences de température sur terre, un effet « latitude » est également observé avec des valeurs en deutérium et en ^{18}O dans les eaux océaniques plus faibles près des pôles.^[324]

6.1.3.2 Atome de carbone

Dans le cas du ^{13}C , les valeurs observées sur la planète sont assez stables donc il sera impossible de déterminer l'origine géographique d'une substance.

Cependant, un fractionnement isotopique du carbone est observé chez les plantes en fonction du type de photosynthèse qu'elles utilisent. Il est donc possible de se servir de ce critère pour déterminer l'origine botanique ou synthétique de la vanilline.

Les plantes intègrent en effet le carbone atmosphérique par assimilation du CO_2 au travers de la photosynthèse selon trois cycles possibles : le cycle de Calvin-Benson en C_3 , le cycle de Hatch et Slack en C_4 et le cycle CAM (métabolisme acide des Crassulacées). Les valeurs isotopiques obtenues selon les trois cas seront différentes avec $\delta^{13}\text{C}_{\text{C}_3} < \delta^{13}\text{C}_{\text{CAM}} < \delta^{13}\text{C}_{\text{C}_4}$.

La vanille utilise le métabolisme CAM. La vanilline naturelle peut donc être différenciée de celle obtenue par hémisynthèse à partir de l'eugénol ou de la lignine par exemple car ces précurseurs

proviennent respectivement du giroflier ou des pins et que ces plantes utilisent le métabolisme C3. [295,325,326]

6.2 Spectrométrie de masse à rapport isotopique

6.2.1 Principe de la spectrométrie de masse à rapport isotopique

Contrairement à la spectrométrie de masse avec une source EI, dont le but est d'obtenir des fragments suffisamment caractéristiques permettant d'identifier un composé, l'IRMS ne s'intéresse qu'aux ions moléculaires. Ils sont produits dans la source d'ionisation à impact électronique. Ils sont ensuite analysés dans un champ magnétique puis détectés dans des cylindres de Faraday. Etant donné que la configuration du spectromètre est fixe, mise à part la modulation possible du champ magnétique, les ions analysés seront toujours les mêmes et les détecteurs seront spécifiques à une masse donnée.

L'échantillon organique est préalablement transformé en gaz soit hors ligne (*Off-line*) soit en ligne (*On-Line*) avant d'être analysé. Le spectromètre peut être utilisé en mode combustion (C-IRMS) pour détecter les atomes de carbone, d'azote et de soufre ou en mode pyrolyse (P-IRMS) dans le cas des atomes d'oxygène et d'hydrogène.

Pour analyser les isotopes du carbone, du CO₂ sera produit, et dans le cas de l'hydrogène, on produira du H₂. Dans le cas de l'analyse du CO₂, les isotopomères de masse 44,45 et 46 seront suivis. Le rapport 45/44 donnera le rapport ¹³C/¹²C. Cependant la masse 45 peut également provenir de l'isotopomère ¹²C¹⁷O¹⁶O. La correction de Craig est donc appliquée pour éliminer l'impact de ¹⁷O dans le résultat.

Pour déterminer le rapport ¹⁸O/¹⁶O d'une molécule organique, le rapport 30/28 sera évalué après pyrolyse et formation de CO.

La mesure isotopique se fera toujours par rapport à un gaz de référence étalonné de composition isotopique connue. En mode *Off-line*, le gaz à analyser est introduit via un système d'introduction double (*dual inlet*) en alternance avec le gaz de référence. Etant donné que tout ce qui va être introduit sera transformé, y compris les impuretés, l'échantillon doit être parfaitement purifié en mode *Off-Line*. Il faut cependant minimiser les fractionnements isotopiques liés à la préparation d'échantillon.

L'IRMS peut également être couplée à la GC et à la LC. Dans ce cas, la séparation dans la colonne chromatographique assure la pureté à l'entrée du spectromètre de masse cependant les effets de fractionnements isotopiques liés à la séparation ou à la forme des pics devront être pris en compte.^[282,327]

6.2.2 Etudes par spectrométrie de masse à rapport isotopique de la vanille

De nombreuses études ont été conduites pour déterminer la naturalité ou l'origine des vanilles, extraits ou composés purs par IRMS. La plupart de ces études isotopiques concernent l'atome de carbone.

Les valeurs de $\delta^{13}\text{C}\text{‰ PDB}$ reportées dans la littérature dans le cas de la vanilline ex-lignine, ex-gaïacol, ou ex-eugénol sont bien différentes de celles reportées en général dans le cas de la vanilline naturelle ex-gousse (Tableau 33).

Tableau 33 : Valeurs de $\delta^{13}\text{C}\text{‰ PDB}$ observées dans la littérature pour la vanilline en fonction de son origine

Origine de la vanilline	$\delta^{13}\text{C}\text{‰ PDB}$
Lignine	-28.7/-26.9‰ ^[297,319,325,328-332]
Gaïacol	-36.2/-29‰ ^[297,319,325,328,329,331]
Eugénol	-31.7/-29.9‰ ^[319,331]
Acide férulique (ex-riz)	-37.9/-35.1 ^[331,333]
Gousse de vanille	-20.8/-18‰ ^[286,295,297,309,312,319,325,326,328-332,334]

Les mêmes différences significatives sont également observées pour les trois autres composés clés de la vanille. Ainsi, en 2003, dans sa note d'information, la DGCCRF a proposé les valeurs isotopiques limites du ^{13}C suivantes :^[313]

- Vanilline : $\geq -21,2 \text{‰}$;
- Aldéhyde pHB : $\geq -19,2 \text{‰}$;
- Acide vanillique : $\geq -24,0 \text{‰}$;
- Acide pHB : $\geq -23,0 \text{‰}$.

La note précise que ces valeurs sont valables dans le cas de *Vanilla planifolia* et que les valeurs de *Vanilla tahitensis* peuvent être aux alentours de - 18‰ pour les deux aldéhydes et - 20 ‰ PDB pour les deux acides.

Il semblerait que la maturation des gousses n'entraîne pas de fractionnement isotopique.^[309]

Les analyses isotopiques de l'hydrogène^[285,328,335] ou de l'oxygène^[331,336,337] ont également été menées dans le cas de la vanille mais de façon plus sporadique à cause notamment de l'échange chimique observé au niveau de la fonction aldéhydique lors de la préparation d'échantillon.

6.2.3 Etude du fractionnement isotopique naturel spécifique par IRMS

La principale limitation de l'IRMS est le fait de mesurer des rapports isotopiques moyens. Ainsi au début des années 80, Krueger *et al.* ont mis en évidence des adultérations par enrichissements en ¹³C des vanillines de synthèse pour mimer les valeurs obtenues dans le cas des vanillines naturelles.^[297,332]

Il est toutefois possible de réaliser des mesures de composition isotopique intramoléculaire en ciblant des sites atomiques dans une structure en utilisant l'IRMS. On parle de PSIA (*position-specific isotope analysis*). Cependant une étape de dégradation de la molécule est nécessaire avant que les fragments obtenus ne soient analysés (Figure 93).^[338]

Dans le cas des mesures isotopiques du ¹³C de la vanilline, deux des huit sites possibles seront étudiés (Figure 92) :

- le carbone du méthoxy en analysant l'aldéhyde protocatéchique^[312,329,334] ou l'iodure de méthylène ;^[297]
- le carbone du carbonyle en analysant le CO₂^[332] ou le guaiacol.^[331]

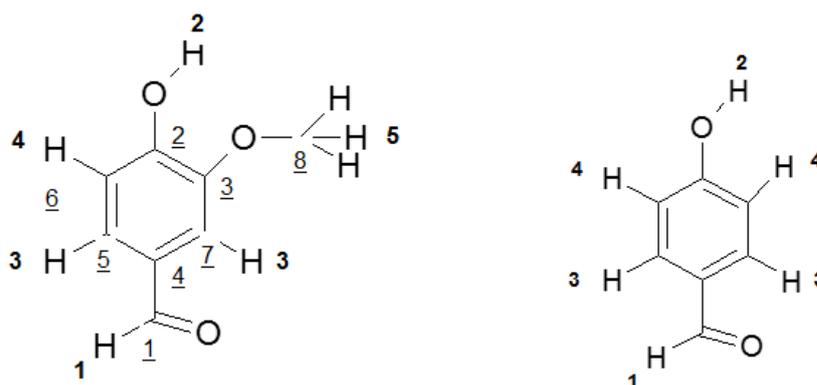


Figure 92: Numérotation des sites carbonés (soulignés) ou hydrogénés (gras) de la vanilline (gauche) et numérotation des sites hydrogénés du pHB (droite)

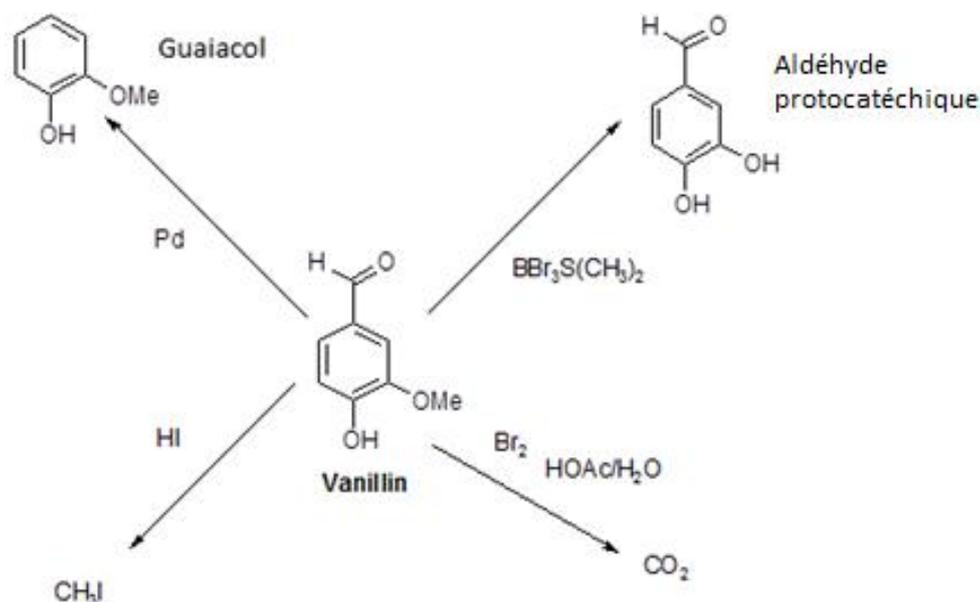


Figure 93: Transformations possibles de la vanilline pour étude IRMS ciblée

Le ^{18}O a également fait l'objet du même genre d'étude mais ne façon plus sporadique.^[331,336]

Malgré la faisabilité de ces études, elles restent fastidieuses et des modifications isotopiques peuvent avoir lieu lors de la préparation d'échantillon comme dans le cas par exemple de l'échange entre l'oxygène du groupement formyle de la vanilline et celui de l'eau lors de la préparation d'échantillon.^[331]

6.3 Résonance Magnétique Nucléaire quantitative

6.3.1 Résonance magnétique nucléaire isotopique

La RMN isotopique, ou irm-RMN (*isotopic ratio monitoring*), parfois également appelée FINS-RMN (Anglais SNIF : *Specific Natural Isotope fractionation*), permet directement de faire de la PSIA.

Comme il s'agit de RMN quantitative, Le signal détecté est directement proportionnel au nombre d'atomes.

Si l'on considère une substance contenant n atomes dont les isotopes d'un élément E sont distribués sur les sites i de la structure, il est possible de calculer la fraction molaire f_i de l'isotopomère correspondant à la position i selon l'équation 30.

$$f_i = \frac{S_i}{\sum_i S_i}$$

Équation 30 : Fraction molaire de l'isotopomère à la position i. avec S= aire sous le pic correspondant au site moléculaire i.

L'abondance isotopique spécifique x_i sera ensuite calculée avec l'équation 31 en faisant appel à l'abondance isotopique globale x_b calculée par IRMS.

$$x_i = x_b \frac{f_i}{F_i}$$

Équation 31: Abondance isotopique spécifique au site i. avec F_i la fraction molaire de l'isotopomère i s'il était uniformément réparti sur tous les n atomes et égal n_i/n

Il est possible de calculer directement l'abondance isotopique sans avoir recours à l'IRMS si un composé organique de composition isotopique connue est utilisé comme référence. On fera alors appel à l'équation 32.

$$x_i = x_{ref} \frac{S_i}{S_{ref}} \times \frac{n_{ref}}{n_i} \times \frac{m_{ref}}{m} \times \frac{p_{ref}}{p} \times \frac{M}{M_{ref}}$$

Équation 32: Abondance isotopique spécifique au site i. avec m la masse dans le tube RMN, M la masse molaire et p la pureté

Il est possible de se passer de standard interne en générant un signal électronique pour créer un pic virtuel. On parle de la méthodologie ERETIC™ (*Electronic Reference To access In vivo Concentration*).

6.3.2 Résonance magnétique nucléaire isotopique appliquée à la vanille

Grâce à la RMN isotopique, 13 isotopomères de la vanilline peuvent être observés avec 4 sites pour l'hydrogène et 8 sites pour le carbone (Figure 92). L'hydrogène en position n°2 trop labile aura tendance à s'échanger en solution et ne pourra donc pas être observé, tout comme dans le cas du pHB.

6.3.2.1 Résonance magnétique nucléaire ^2H appliquée à la vanille

Les différentes sources naturelles, synthétiques et hémisynthétiques de la vanilline peuvent être discriminées par RMN du ^2H de la vanilline et du pHB.^[279,309] En 2006, l'AOAC a d'ailleurs adopté la détermination du fractionnement isotopique naturel spécifique du deutérium par FINS-RMN comme méthode officielle pour authentifier la vanilline (Tableau 34).^[339]

Tableau 34 : Valeurs moyennes observées lors de l'étude collaborative par ^2H FINS-RMN de 8 laboratoires dans le cadre du développement de la méthode AOAC 2006.05^[339]

Origine de la vanilline	(D/H) ₁	(D/H) ₃	(D/H) ₄	(D/H) ₅
Gousse	124.1	151.9	185.2	124.6
Gaïacol	358.3	135.2	138.6	140.1
Gaïacol (duplicata)	335.5	131.6	135.9	133.6
Lignine	109.1	129.6	168.4	108.0
Mélange naturel/synthétique	242.4	143.8	161.8	132.3

Les numérotations des positions correspondent aux numérotations de la Figure 92

Cependant, d'après l'AOAC, cette méthode permet de discriminer la vanilline ex-gousses des versions synthétiques courantes mais elle n'a pas été validée pour les versions obtenues par biotechnologie notamment à partir de l'acide férulique issu du riz ou de la betterave sucrière à cause d'un manque de données suffisantes pour créer une base de données exploitable.

6.3.2.2 Résonance magnétique nucléaire ^{13}C appliquée à la vanille

La RMN du ^{13}C permet de mieux discriminer la vanilline en fonction de son origine naturelle, synthétique ou biotechnologie.^[333]

L'accès direct aux huit rapports isotopiques spécifiques par RMN ^{13}C , permettrait, selon Eve Tenailleau^[340], d'être plus discriminant qu'en RMN ^2H . D'autre part, la teneur en ^{13}C est plus robuste que celle en ^2H sujet aux effets d'échange. C'est pour ces raisons que la ^{13}C FINS-RMN a par la suite été davantage développée.

7 Objectifs de cette étude

Cette étude a été conduite s'est déroulée en trois étapes :

- Mise en place d'une méthode d'analyse des extraits de vanille par (U)HPLC au sein du laboratoire

Le but était de développer et de valider une méthode d'analyse, d'abord par HPLC, puis quelques années après, par UHPLC, qui permettrait d'analyser les extraits de vanille pour détecter les adultérations grossières. Grâce à cette méthode, des extraits de gousses de vanille provenant de différentes origines seraient ensuite analysés afin de déterminer les rapports de constituants R1 à R5 définis par la DGCCRF.^[313]

- Mise en place d'une méthode d'extraction des constituants clés de la vanille par ASE

Le but était de proposer une méthode plus rapide que les méthodes officielles proposées par l'AOAC^[283] ou la norme ISO 5565-2^[287] afin de vérifier l'authenticité des gousses de vanille achetées par la société. La méthode ne devait pas induire de fractionnement isotopique ni de modification du profil aromatique par comparaison avec les méthodes officielles. Les extraits obtenus dans ces conditions feraient l'objet d'analyse par (U)HPLC et IRMS.

- Mise en place d'une méthode de purification de la vanilline à partir d'extraits de vanille

Le but était de proposer une méthode de purification de la vanilline n'entraînant pas de fractionnement isotopique afin d'effectuer des mesures ²H et ¹³C FINS RMN.

Chacune des trois étapes sera donc détaillée dans ce manuscrit sans toutefois divulguer d'information confidentielle qui n'auraient pas déjà été publiées.

PARTIE 2 : Partie expérimentale

1 Standards et échantillons

La vanilline (>98%), le pHB (>98%), l'acide vanillique (>97%) et l'acide pHB (>99%) ont été achetés chez Fluka Sigma Aldrich (Büchi, Suisse). Les constituants utilisés pour déterminer la spécificité des méthodes de chromatographie liquide faisaient partie de la collection interne à la société Firmenich (Genève, Suisse). Les gousses de vanille ont été fournies par Vanipro (Le Bar Sur Loup, France).

2 Préparation des échantillons

2.1 Pour le développement de la méthode d'extraction

Les extraits obtenus par différentes méthodes d'extraction ont été évaporés à l'évaporateur rotatif et dilués dans l'éthanol absolue avant leur analyse par chromatographie liquide.

2.1.1 Extraction accélérée par solvant

Les gousses ont été coupées en morceaux d'environ 3/4mm et mélangées à de la terre de diatomée (Hydromatrix, Millian, Genève, Suisse) avec un ratio gousse/hydromatrix d'un pour un. Le mélange a été introduit dans des cartouches de 33 ou 100ml et extrait avec un système ASE-100 (Dionex, Olten, Suisse) selon les conditions décrites par Sharma *et al.*^[293] ou selon les conditions testées lors des essais d'optimisation avec différents solvants, différents nombres de

cycles et sous différentes températures. Les conditions optimales d'extraction des gousses ont été déterminées comme étant une extraction éthanolique à 100°C après quinze cycles de trois minutes. Les yaourts et glaces ont été extraits à 100°C pendant quatre cycles de trois minutes avec de l'acétate d'éthyle.

2.1.2 Soxhlet

20g de gousses coupées en morceaux de 3/4mm ont été extraits pendant 16h au Soxhlet avec de l'éthanol selon les conditions préconisées par l'ISO 5565-2^[287] ou avec de l'acétate d'éthyle ou du dichlorométhane.

2.1.3 Macération

Deux grammes de gousses coupées en morceaux de 3/4mm ont macéré dans 5ml d'eau à 40°C pendant 16h puis dans 5ml d'éthanol à température ambiante pendant trois jour comme dans la méthode officielle AOAC.^[283] D'autres essais de macération ont été effectués sur 2g de gousses à température ambiante pendant sept jours avec 10ml de pentane, méthanol, éther diéthylique, acétate d'éthyle, éthanol, acétonitrile ou dichlorométhane.

2.2 Pour le développement des méthodes de chromatographie liquide (ultra) haute performance

Les solutions de calibration ont été préparées dans l'éthanol. Les extraits de vanille ont été obtenus selon les conditions ASE optimisées. Les solutions ont été filtrées sur filtre PTFE 0.45µm. La matrice modèle de vanille a été préparée en diluant à 10% dans l'éthanol de la graisse de vanille obtenue par extraction Soxhlet de 200g de gousses avec du pentane pendant 16h puis évaporée à sec à laquelle ont été rajoutés les quatre composés clés à des concentrations typiques des extraits naturels.

2.3 Pour la MPLC

Les vanilles ont été extraites dans les conditions ASE optimales décrites plus haut. Les composés lipophiles ont été éliminés par extraction liquide-liquide à l'eau puis à l'éther. Le solvant a ensuite été évaporé à l'évaporateur rotatif à 40°C sous 145mbar. En général de l'eau restait au fond du ballon permettant l'injection de l'extrait concentré dans le système MPLC après filtration sur filtre PTFE de 0.45µm.

La matrice modèle de vanille était la même que celle utilisée pour développer les méthodes HPLC et UHPLC.

2.4 Pour les analyses isotopiques

Les extraits de vanille obtenus dans les conditions ASE optimales ont été analysés par IRMS.

La vanilline a été purifiée à partir des fractions MPLC par extraction liquide-liquide avec 250ml de dichlorométhane. La phase organique a été séchée sur sulfate de sodium anhydre puis évaporée à l'évaporateur rotatif à pression atmosphérique sous 226mbar puis à 10mbar pour éliminer les dernières traces de dichlorométhane. La vanilline a ensuite été séchée dans un dessiccateur sur P₂O₅. Le point de fusion de la poudre récupérée a été mesuré avec un système B-540 de Büchi et comparé à la référence.

Pour les études IRMS, 1 à 5mg de composés purs ont été placés dans des capsules en étain.

Pour les études RMN, 250mg de composé pur ont été dissous dans 400µl d'acétone-d₆ (EURISOTOP) avec ajout de 100 µl d'une solution à 0.1M dans l'acétone (VWR) de tris(2,4-pentadionato)chromium-III (Cr(Acac)₃, 97%, Acros Organics).

3 Chromatographies

3.1 Chromatographie liquide haute performance

Les analyses HPLC ont été réalisées sur un système HPLC Beckman (Fullerton, USA) équipé d'un système de pompes 126 et d'un passeur d'échantillon 508 et couplé à un DAD. La colonne C-18 utilisée était une Hypersil 5U ODS de marque Phenomenex, de 25cm de long, 4.6mm de diamètre et avec des particules de 5µm de diamètre (Brechtler, Prilly, Suisse). La colonne était connectée à une colonne de garde garnie de la même phase stationnaire. La colonne était thermostatée à 30°C dans un four de marque Spark Holland, modèle Mistral (AJ Emmen, Pays bas). Le volume d'injection était de 5µl et le débit était maintenu à 1.5ml/min. La détection était faite de 210 à 600nm et la quantification a été réalisée à 260nm pour l'acide vanillique et l'acide pHB et 280 pour le pHB et la vanilline.

3.2 Chromatographie liquide ultra haute performance

Les analyses ont été réalisées sur un système UPLC Acquity de marque Waters (Baden, Suisse) couplé à un DAD. La colonne C-18 utilisée était une Acquity BEH C18 de marque Waters, de 5cm

de long, 2.1mm de diamètre et avec des particules de 1.7 μ m de diamètre. La colonne était connectée à une colonne de garde garnie de la même phase stationnaire. La colonne était thermostatée à 30°C. Le volume d'injection était de 0.5 μ l et le débit était maintenu à 0.3ml/min. La détection a été effectuée dans les mêmes conditions que pour les analyses HPLC.

3.3 MPLC

Une colonne de 46cm et 3.6cm de diamètre interne ainsi qu'une précolonne de 10cm et 1cm de diamètre interne ont été remplies avec de la silice greffée C18 sphérique (300A, 20-45 μ m) achetée chez Silicycle (Quebec, Canada). Une pompe B-688 et un collecteur de fraction 684 de chez Büchi étaient connectés à la colonne de purification.

6ml d'extrait ASE nettoyé, concentré et filtré ont été injectés dans la boucle d'injection avec 2ml de phase mobile avant et après l'échantillon pour assurer un transfert quantitatif de l'échantillon dans la colonne. L'élution s'est faite en mode isocratique avec un mélange acétonitrile/eau 3/97 (V/V) avec un débit de 9.5ml/min. 50ml ont été collectés par fraction. Les fractions ont été analysées par UHPLC et celles contenant de la vanilline ont été rassemblées.

4 Analyses isotopiques

Les mesures des ratios isotopiques par IRMS et RMN ont été effectuées au CEISAM (Université de Nantes, France).

4.1 Spectrométrie de masse à rapport isotopique

Les déviations isotopiques globales $\delta^{13}\text{C}$ ont été déterminées par combustion dans un analyseur élémentaire (NA 2100 Fisons Instruments) à 1050°C dans une atmosphère riche en oxygène et couplé à un spectromètre de masse à rapport isotopique de marque Finnigan et de modèle MAT Delta-V advantage IRMS. La référence utilisée était l'acide glutamique standardisé par rapport à un matériel de référence internationale calibré (IAEA-N1 ou IAEA-N2, Vienne, Autriche). Les résultats ont été exprimés en ‰ par rapport au V-PDB selon l'équation 29.

4.2 Résonance magnétique nucléaire

Les spectres quantitatifs RMN du ^{13}C ont été enregistrés avec un système Bruker 400 Avance III équipé d'une sonde de 533 (BBFO+) à une fréquence de 100.6MHz. La température de la sonde était fixée à 303K. Les paramètres d'acquisitions étaient les suivants : impulsions de 9.5 μ s (90°),

largeur spectrale 24 000 Hz, temps d'acquisition 1s. Un découplage « Gate inverse » a été appliqué pour éviter l'effet Overhauser nucléaire. La séquence de découplage utilisait une impulsion adiabatique telle que décrite par Tenailleau *et al.*^[341] Cinq spectres par mesure ont été enregistrés. Le nombre de scan a été ajusté pour obtenir une valeur de signal sur bruit ≥ 500 .

5 Validation des méthodes de chromatographie liquide

La spécificité de la méthode a été vérifiée en injectant une trentaine de composés connus pour être présents dans les arômes de vanille. Un extrait naturel de vanille a également été analysé pour vérifier l'absence de coélution avec des composés endogènes. Les LD ont été déterminées comme étant les plus petites concentrations permettant une identification formelle de l'analyte en prenant en compte le spectre UV. La linéarité de la méthode a été vérifiée en représentant les concentrations calculées en fonction des concentrations réelles ($R^2 > 0.994$ ^[90]). La répétabilité a été évaluée par des injections en triplicata tandis que la fidélité intermédiaire a été évaluée pendant trois jours consécutifs. Les LQ ont été déterminés à partir des profils d'exactitude avec un IC de 10% et un intervalle d'acceptabilité de 10%. La gamme de la méthode a été déterminée comme étant la gamme de linéarité bornée vers le bas par la LQ. La robustesse des méthodes a été évaluée en faisant varier le pH de la phase mobile, la température du four et le débit et en observant l'impact sur les temps de rétention et les spectres UV des analytes.

6 Traitement des données

6.1 Chromatographie

La performance des méthodes chromatographiques a été évaluée en prenant en compte la résolution (R_s , équation 33) entre deux pics et la capacité de pics (P_c , équation 34).

Équation 33 : Résolution entre deux pics (avec Tr = temps de rétention et w =largeur des pics à la base)

$$R_s = 2 \left(\frac{tr_2 - tr_1}{w_2 + w_1} \right)^2$$

Équation 34 : Capacité de pics (avec t_g le temps de gradient considéré, n le nombre de pics dans ce temps considéré et w la largeur des pics à la base)

$$P_C = 1 + \frac{t_g}{(1/n) \sum_1^n \omega_i}$$

La résolution moyenne a été calculée comme la moyenne géométrique entre les quatre pics majoritaires selon l'équation 35.

Équation 35 : Résolution moyenne (avec T_r le temps de rétention, du pic i , w la largeur à mi-hauteur et n le nombre de pics)

$$\bar{R} = 1.18 \left[\prod_{i=1}^{i=n-1} \left(\frac{t_{R,i+1} - t_{R,i}}{w_{h,i} + w_{h,i+1}} \right) \right]^{1/n-1}$$

La méthode UHPLC a été obtenue en convertissant la méthode HPLC à l'aide du logiciel « Method translator and Cost Saving » version 2.0 de la société Agilent.

Le débit sur la colonne UHPLC a été calculé à partir de celui sur la colonne HPLC selon l'équation 36.

Équation 36: Calcul de débit Q pour la colonne 2 à partir de celui de la colonne 1 avec d =diamètre

$$Q_{\text{column2}} = Q_{\text{column1}} \times \left(\frac{d_2}{d_1} \right)^2$$

6.2 Plan d'expérience

Afin de déterminer les meilleures conditions d'extraction par ASE, un plan d'expérience a été généré grâce au logiciel NemrodW, version 2000-D (LPRAI, Marseille, France). Les résultats ont été traités par le logiciel Statistica (StatSoft, Tulsa, USA).

6.3 Résonance magnétique nucléaire

La décroissance libre de l'induction (Free Induction delay, FID) a été soumise à une multiplication de signal induisant un élargissement de bande de 2Hz. L'ajustement a été obtenu en utilisant une fonction lorentzienne grâce au logiciel PerchTM (Université de Kuopio, Finlande). A partir des aires des pics RMN et des valeurs moyennes obtenues en IRMS, la valeur de $\delta_i^{13}\text{C}$ a été estimée avec l'équation 31.

PARTIE 3 : Résultats

1 Analyse des extraits de vanille par chromatographie liquide

1.1 Développement des méthodes de chromatographie liquide (ultra) haute performance

1.1.1 Développement de la méthode de chromatographie liquide haute performance

Une méthode HPLC-DAD a d'abord été développée pour permettre la séparation et la quantification des quatre composés clés de la vanille à savoir la vanilline, le pHB et leurs deux acides. Une colonne de silice greffée C18 a été choisie pour le développement étant donné que la plupart des analyses de vanille reportées dans la littérature étaient faites en phase inverse. Très souvent, l'utilisation de méthanol a été reportée par les analystes mais nous avons préféré utiliser l'acétonitrile de par sa plus grande force d'élution, et sa moins grande réactivité. Pour le solvant aqueux, de l'eau acidifiée avec tampon H₃PO₄ a été choisi comme préconisé dans la méthode ISO 5565-2. [287]

Quatorze conditions d'élution ont été testées (A-N) afin d'optimiser la séparation des quatre analytes en testant des séparations en mode isocratique ou en mode gradient, en faisant varier la composition initiale de la phase mobile ou encore le gradient (Tableau 35).

Tableau 35 : Conditions HPLC testées dans le cadre du développement de la méthode de séparation de la vanilline, du pHB et de leurs acides

Conditions	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
% ACN initial	10	0	5	15	10	10	10	10	10	10	10	5	10	15
Début du gradient (min)	8	5	5	5	2	5	3	3	8	5				
Durée du gradient (min)	8	10	10	10	8	10	10	10	8	8				
% ACN final	20	20	20	20	40	20	20	15	20	20	20	5	10	15
Température (°C)	30	30	30	30	30	30	30	30	25	30	30	30	30	30

Avec ACN=acétonitrile

Afin de déterminer laquelle des conditions testées permettaient d'obtenir les meilleurs résultats, plusieurs paramètres ont été considérés.

1.1.1.1 Temps d'analyse

Il paraissait important de développer une méthode permettant l'analyse des quatre constituants en moins de 20min. La méthode L n'a pas été considérée par la suite car le dernier analyte éluait à près de 40min.

1.1.1.2 Résolution

Dans nos conditions d'analyse, l'ordre d'élution était le suivant : acide pHB (1), acide vanillique (2), pHB (3) et vanilline (4). La résolution a été calculée entre les trois paires de pics 1-2, 2-3 et 3-4 en utilisant l'équation 33. Les méthodes donnant des $R_s < 1$, donc des séparations insuffisantes, ont été éliminées, à savoir : C, D, E, G, J, K, M et N.

1.1.1.3 Sélectivité α

Les méthodes B et I ont été éliminées car elles entraînaient une sélectivité $\alpha > 1.2$ pour les trois paires de pics considérés ce qui signifiait que le temps entre deux pics risquait d'être trop long.

1.1.1.4 Capacité de pics P_c

Finalement, parmi les méthodes restant A, F et H, la deuxième a été choisie car elle permettait d'obtenir la meilleure capacité de pic (équation 34) avec une valeur de 16 quand les deux autres donnaient 11 et 10 respectivement. La méthode F permettrait donc de séparer plus de composés dans le même temps d'analyse.

1.1.2 Développement de la méthode de chromatographie liquide ultra haute performance

La méthode UHPLC a été obtenue en adaptant les conditions de la méthode F, qui étaient optimales pour une colonne de 25cm avec des particules de 5 μ m de diamètre, pour donner des performances au moins équivalentes avec une colonne de 5cm et avec des particules de 1.7 μ m grâce à un logiciel de transfert de méthodes. Pour tomber dans la zone optimale de la courbe de Van-Deemter, le débit de la méthode UHPLC aurait dû être compris entre 0.45 et 1ml/min. Cependant, nous avons décidé de fixer ce dernier à 0.3ml/min, tel que calculé avec l'équation 42. En effet, le gain de temps avec un débit supérieur était négligeable (moins de 40s) avec un très faible gain en capacité de pics mais la consommation de solvant aurait été doublée. D'autre

part la résolution moyenne (équation 41) obtenue dans ces conditions non optimales était tout de même 15 fois supérieure à celle observée avec la méthode HPLC.

Les conditions finales pour les méthodes HPLC et UHPLC sont compilées dans le tableau 36.

Tableau 36 : Comparaison des conditions de gradient des méthodes HPLC et UHPLC

Conditions	HPLC	UHPLC
% ACN de départ	10	10
Début du gradient (min)	5	1.67
Durée du gradient (min)	10	1.66
% ACN final	20	20
T°C du four	30	30
pH de la phase aqueuse	2	2
Débit (ml/min)	1.5	0.3
Volume d'injection (µl)	5	0.5

Avec ACN=acétonitrile

La méthode UHPLC permet donc de séparer les quatre analytes en quatre fois moins de temps que dans le cas de la méthode HPLC (Figure 94) avec une consommation de solvant diminuée d'un facteur 20.

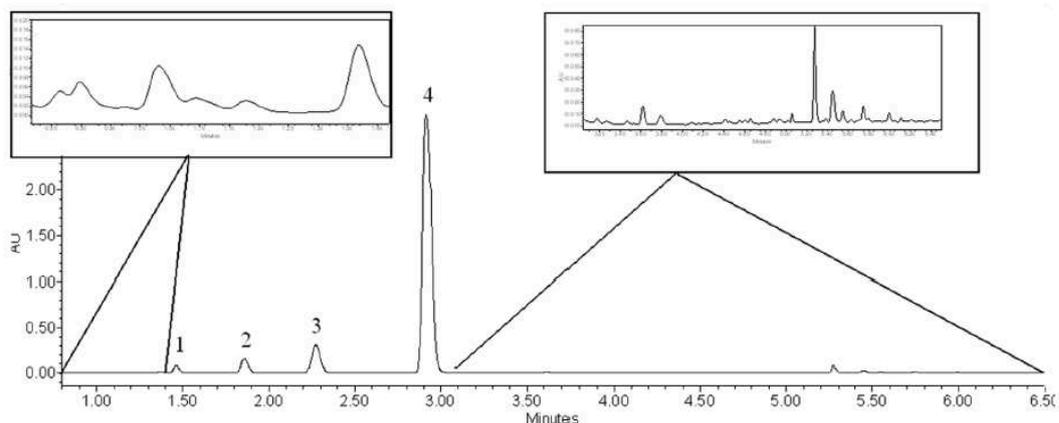


Figure 94 : Chromatogramme à 260nm d'un extrait de vanille obtenue par ASE (100°C, 1 cycle de 3min) par UHPLC-DAD avec 1 : acide pHB, 2 : acide vanillique, 3 : pHB et 4 : vanilline. Figure reproduite à partir de [342] avec l'autorisation de Wiley.

1.2 Validation des méthodes de chromatographie liquide (ultra) haute performance

Les deux méthodes ont été validées selon les critères ICH^[104] et en utilisant les profils d'exactitude pour représenter les résultats et accéder plus facilement à la détermination des limites de quantification.^[109]

1.2.1 Spécificité

Une liste de composés pouvant être trouvés dans la vanille ou dans les compositions aromatisantes de vanille a été établie sur la base des compositions déjà publiées ou en interne avec les aromaticiens de la société. Au final, un mélange de 30 composés, en plus des quatre analytes clés, a été analysé avec les deux méthodes juste développées pour vérifier l'absence de coélution (Tableau 37). La spécificité aurait pu inclure également l'étude des supports d'arômes mais cela n'avait pas été considéré à l'époque compte tenu des pratiques de formulation d'arôme de la société.

Tableau 37 : Liste des composés analysés pour déterminer la spécificité et temps de rétention en conditions HPLC

CAS	Nom	Temps de rétention (min)
000513-86-0	3-Hydroxybutanone	2.542
000623-05-2	Alcool pHB	4.412
000498-00-0	Alcool vanillique	5.304
000098-00-0	Alcool furfurique	5.858
000099-96-7	Acide pHB	6.975
000121-34-6	Acide vanillique	8.879
000123-08-0	pHB	10.967
000121-33-5	Vanilline	13.258
000108-95-2	Phénol	13.929
000600-14-6	2,3-pentanedione	15.092
000097-53-0	Eugénol	15.120
000503-74-2	Acide isovalérianique	15.512
000105-13-5	Alcool anisique	15.567
000590-86-3	Aldéhyde isovalérianique	17.837
000090-05-1	Gaïacol	18.733
000710-04-3	δ-undécalactone	22.535
000100-52-7	Benzaldéhyde	22.842
000121-32-4	Ethyl vanilline	22.879
000120-14-9	Vératraldéhyde	23.504
006379-72-2	Methylisoeugénol	23.533
000120-57-0	Héliotropine	24.788
005471-51-2	Frambinone	25.000
000106-44-5	<i>p</i> -crésol	26.933
000098-86-2	Acétophénone	28.271
000123-11-5	Anisaldéhyde	28.592
000093-51-6	4-méthyl guaïacol	29.054
000100-06-	Hélonal	31.229
000118-71-8	Dihydrocoumarine	32.567
000118-71-8	Maltol	37.280
000120-51-4	Benzoate de benzyle	40.162
000122-91-8	Formate d'anisyle	41.612

CAS	Nom	Temps de rétention (min)
000093-28-7	Acétate d'eugényle	48.163
055418-52-5	Pipéronylacétone	49.854
000121-98-2	Anisate de méthyle	55.063
000094-47-3	Benzoate de phényléthyle	56.533
000104-21-2	Acétate d'anisyle	59.308

Les deux méthodes se sont montrées spécifiques puisqu'aucune coélution n'a été observée et que le spectre UV des composés les plus proches étaient différents de ceux des analytes cibles (Figure 95).

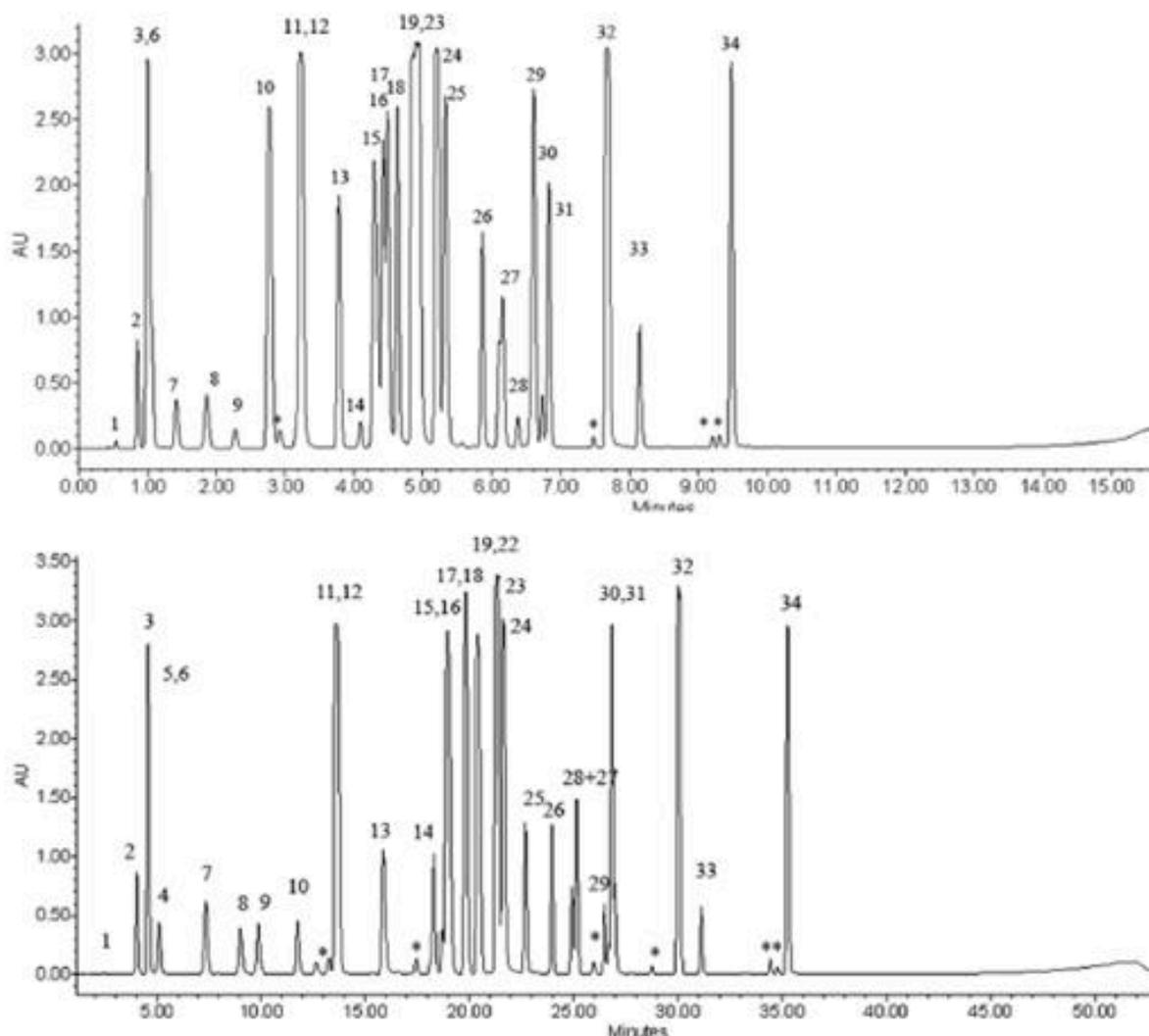


Figure 95 : Vérification de la spécificité des méthodes UHPLC (haut) et HPLC (bas). Chromatogrammes UV à 260nm obtenus pour l'analyse d'un mélange de composés listés dans le tableau 38. Avec 7=acide pHB, 8 : acide vanillique, 9 : pHB et 10 : vanilline. Numérotation selon^[342] avec l'autorisation de Wiley.^[342]

1.2.2 Limites de détection

Les limites de détection des deux méthodes ont été déterminées pour les quatre analytes en prenant en compte deux critères : le temps de rétention et le spectre UV des pics. En effet, ces

deux critères sont indispensables pour valider l'identité des analytes lorsque des extraits inconnus sont analysés.

Nous n'avons pas utilisé la stratégie du signal sur bruit (S/N) selon laquelle la limite de détection serait de trois S/N car si un pic peut effectivement être visible sur le chromatogramme, rien ne prouve qu'il s'agit bien du bon analyte surtout dans le cas de l'analyse d'extraits naturels.

Le temps de rétention ainsi que le spectre UV des analytes à 1000 mg/l ont été pris comme référence puis des concentrations décroissantes ont été injectées jusqu'à ce que l'écart observé par rapport à la référence soit trop important. Dans le cas du temps de rétention, nous tolérons une différence de +/-10%. Dans le cas du spectre UV, nous avons utilisé deux stratégies différentes basées sur les différences de logiciel à notre disposition. Dans le cas de l'HPLC, la LD était déterminée comme étant la plus petite concentration permettant d'obtenir une similarité de spectre UV >90% telle que calculée par le logiciel. Dans le cas de l'UHPLC, nous avons toléré une variation de λ_{max} de +/- 5nm. Le tableau 38 compile les données obtenues dans les conditions UHPLC pour la vanilline pour laquelle la LD a été déterminée à 0.78 mg/l car à 0.39mg/l, la variation sur le troisième λ_{max} était supérieure à 5nm.

Tableau 38 : Détermination de la LD de la vanilline pour la méthode UHPLC

mg/l	Tr	λ_{max}		
		1	2	3
101.70	-1%	0	-1.2	4.3
16.29	-1%	-1.8	-2.4	3.1
4.17	-1%	0.7	-2.4	-3.7
0.78	-4%	0.7	-4.9	0.6
0.39	-1%	0	-4.9	9.9

Avec λ_{max} pour vanilline : 1=230.8, 2=279.8, 3=310

Les valeurs que nous avons obtenues pour la méthode HPLC ont pu être comparées avec celles déjà disponibles dans la littérature^[343] une fois exprimées en quantité injectées sur la colonne, pour s'affranchir du volume d'injection. Une assez bonne adéquation a été retrouvée mise à part dans le cas de l'acide pHB que nous semblons détecter à une plus faible concentration (Tableau 39).

Tableau 39 : LD exprimées en masse injectées sur la colonne pour les quatre analytes en fonction des méthodes d'analyse

Analyte	UHPLC	HPLC	Sinha <i>et al.</i> ^[343]
Acide pHB	0.440 pg	0.995 ng	1.300 ng
Acide vanillique	0.425 pg	1.220 ng	1.200 ng
pHB	0.315 pg	0.193 ng	0.180 ng
Vanilline	0.395 pg	0.376 ng	0.300 ng

1.2.3 Linéarité

Les analytes ont été quantifiés par calibration avec une régression linéaire non pondérée. La pertinence du modèle a été vérifié par ANOVA. Les méthodes HPLC et UHPLC se sont toutes deux montrées linéaires ($R^2 > 0.994$) sur trois ordres de grandeur de concentration :

- Vanilline : 0.094-1362 mg/l en HPLC et 0.57-1835 mg/l en UHPLC
- pHB : 0.4-1900 mg/l en HPLC et 0.13-1181 mg/l en UHPLC
- Acide vanilline : 0.08-2000 mg/l en HPLC et 0.12-1285 mg/l en UHPLC
- Acide pHB : 0.2-2800 mg/l en HPLC et 0.13-1592 mg/l en UHPLC

Etant données les différences de quantité injectables sur les colonnes HPLC et UHPLC, le point haut de la gamme de linéarité dans le cas de l'UHPLC est toujours plus faible que celui obtenu par HPLC.

Les deux méthodes sont donc plus performantes que la méthode développée par Sinha *et al.* dont la gamme de calibration s'étend sur deux ordres de grandeur (vanilline : 70-350mg/l, pHB : 5-25 mg/l, acide vanillique : 50-250mg/l et acide pHB : 60-300mg/l).^[343] Dans leur étude, les auteurs n'ont cependant pas évalué la linéarité de leur méthode mais uniquement la réponse instrumentale.

1.2.4 Fidélité

Les deux méthodes se sont montrées très fidèles puisque nous avons obtenu des coefficients de variation de répétabilité (CV_r) et de fidélité intermédiaire (CV_R) inférieurs à 5% comme illustré dans le tableau 40 dans le cas du dosage de la vanilline par HPLC.

Tableau 40 : Répétabilité et fidélité intermédiaire de la méthode HPLC dans le cas de la vanilline

mg/l	5.55	55.5	104	1396
CV _r	2.31%	0.39%	0.95%	0.68%
CV _R	4.95%	1.29%	2.42%	3.70%

Les fidélités ont été prises en compte dans le cas de la construction des profils d'exactitude.

1.2.5 Profils d'exactitude, gammes et limites de quantification

Le profil d'exactitude obtenu pour la vanilline avec la méthode HPLC n'a pas été publié et ne peut donc pas être représenté dans ce manuscrit car les données restent confidentielles. Les profils d'exactitude obtenus avec la méthode UHPLC sont reproduits en figure 96.

La gamme de concentration sur laquelle les méthodes se sont montrées linéaires a été divisée en deux pour générer deux profils d'exactitude avec chevauchement des concentrations afin de de minimiser les erreurs sur les plus faibles concentrations et d'améliorer la LQ haute.

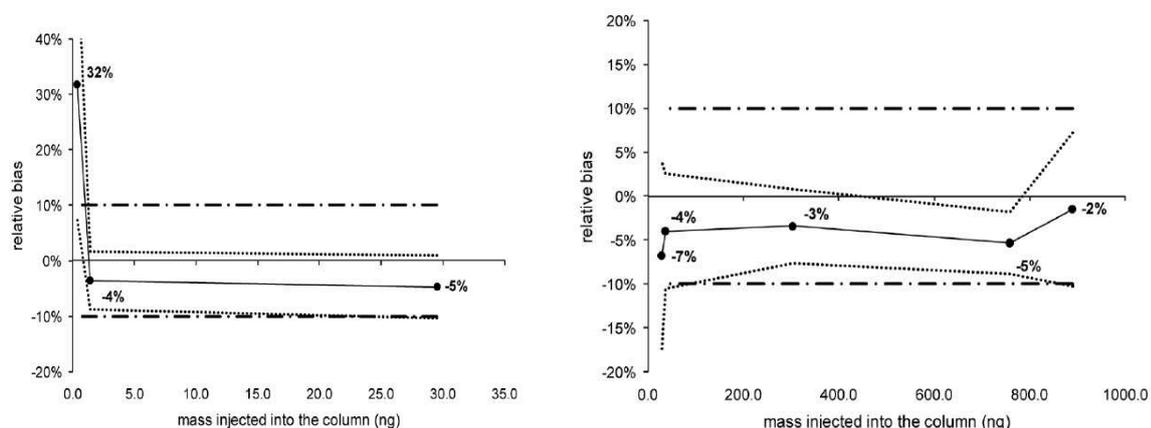


Figure 96 : Profils d'exactitude obtenus dans le cas de la méthode UHPLC avec la gamme de masse injectée divisée en deux : 0.365-29.5ng (gauche) et 28.5-889ng (droite). Figures reproduites à partir de [342] avec l'autorisation de Wiley.

Les LQ ainsi déterminées sont compilées dans le tableau 41. Elles sont plus importantes que celles publiées par Sinha *et al.* surtout dans le cas de la vanilline et de son acide.^[343] Cependant, les auteurs ont déterminé les LQ comme étant 10 fois le signal sur bruit sans prendre en compte la justesse de leur mesure ni sa fidélité.

Tableau 41 : LQ exprimées en masse injectées (ng) sur la colonne pour les quatre analytes en fonction des méthodes d'analyse

Analyte	UHPLC	HPLC	Sinha <i>et al.</i> ^[343]
Acide pHB	0.93	4.90	3.96
Acide vanillique	0.53	6.10	3.62
pHB	0.50	0.48	0.54
Vanilline	1.42	1.88	0.90

1.2.6 Robustesse

Etant donné que les analytes sont identifiés en se basant sur leurs temps de rétention et sur leurs spectres UV, nous avons décidé d'étudier l'impact de la variation de différents paramètres sur ces deux critères. Les principales variations qui peuvent intervenir dans la méthode sont soit dues à l'analyste lors de la préparation des phases mobiles en oubliant le tampon ou en se trompant dans sa concentration par exemple ou bien à l'instrument dans le cas où des modules ne fonctionneraient pas bien. Le système de pompage peut, en cas de problème, entraîner une composition erronée de phase mobile ou délivrer un débit incorrect. La température du four peut également ne pas être celle demandée.

Etant donné que nous avons déjà estimé l'impact de la nature de la phase mobile ou du gradient, nous n'avons pas considéré ces paramètres ici. Par contre nous avons estimé l'impact d'une variation de pH dans la phase aqueuse, de température de la colonne mais également du débit dans des conditions réalistes à savoir de 1 à 7, +/-5°C et +/- 10% respectivement.

Les résultats obtenus dans le cas de la vanilline sont représentés dans la figure 97. Les mêmes types de graphes ont été obtenus pour les trois autres analytes et ne seront donc pas représentés ici.

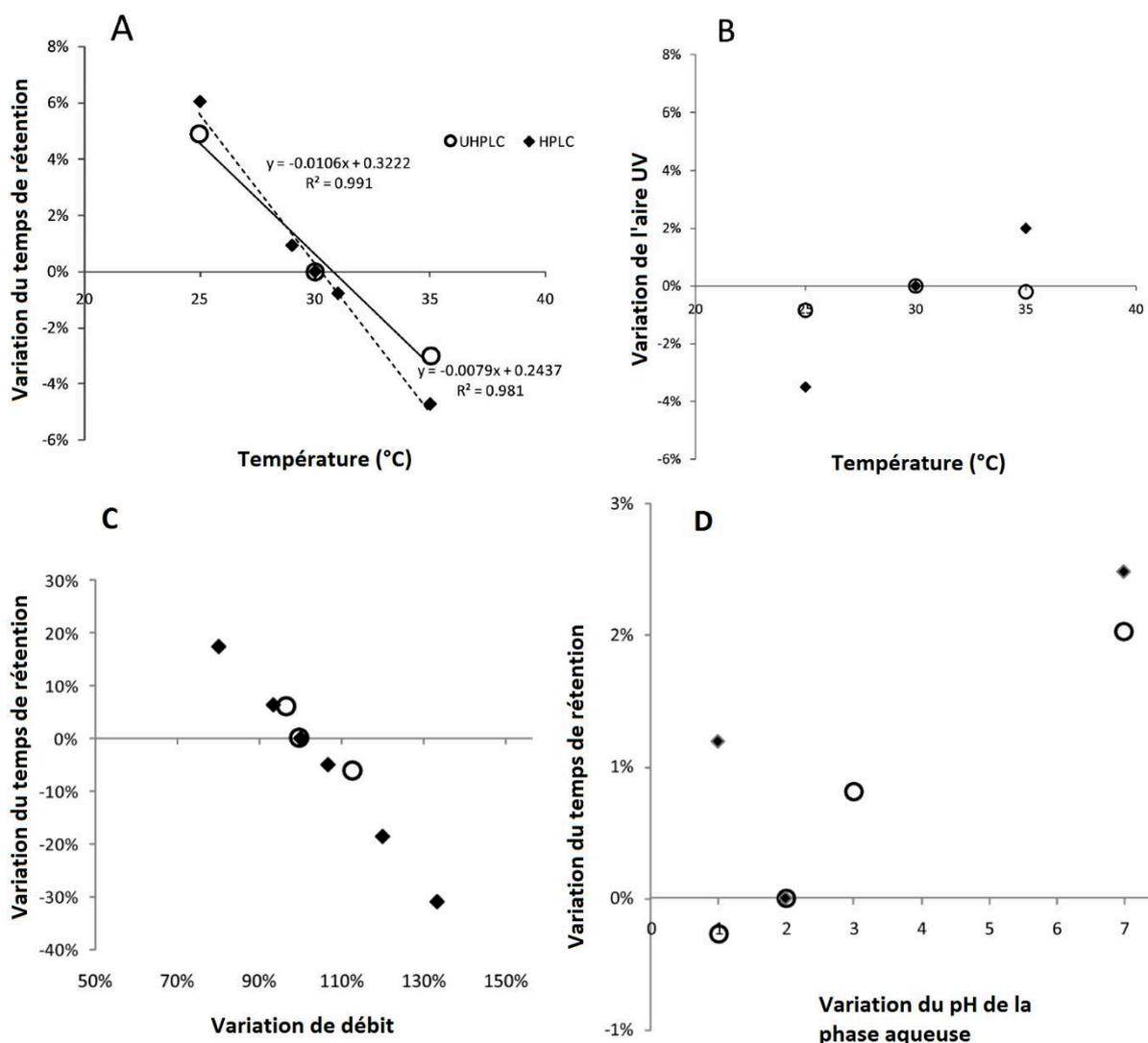


Figure 97 : Evaluation de la robustesse des méthodes HPLC et UHPLC : impact de la température sur le temps de rétention (A) ou sur l'UV (B), impact du débit (C) et impact du pH (D). Figures reproduites à partir de [342] avec l'autorisation de Wiley.

Comme attendu, lorsque la température augmente, le temps de rétention des analytes diminue ce qui est principalement dû au changement de viscosité de la phase mobile. Cependant cette variation est négligeable ($\pm 6\%$) pour les deux méthodes lorsque la température varie de $\pm 5^\circ\text{C}$ ce qui est acceptable.

Les mêmes observations sont faites dans le cas d'une variation raisonnable de débit de 90 à 110%.

Lorsque le pH de la phase aqueuse varie de 1 à 7, sachant que la valeur de référence est de 2, aucune variation significative n'a été observée non plus ni sur les temps de rétention ni sur les spectres UV.

Les méthodes sont donc suffisamment robustes dans les conditions que nous avons testées.

1.3 Comparaison des méthodes de chromatographie liquide (ultra) haute performance

Les performances des deux méthodes ont été comparées et l'UHPLC permet d'obtenir des LD plus faibles que l'HPLC. Les LQ sont équivalentes dans le cas des deux aldéhydes mais meilleures dans le cas des deux acides. Les résolutions observées pour les trois paires de pics étaient supérieures dans le cas de l'UHPLC (Tableau 42). La résolution moyenne calculée selon l'équation 41 était de 229 dans le cas de l'UHPLC contre 15.4 dans le cas de l'HPLC. La capacité de pic est de 18 dans le premier cas contre 16 dans le second.

Tableau 42 : Comparaison des résolutions obtenues avec les deux méthodes

Paire de pics	HPLC	UHPLC
1-2	3.5	5.9
2-3	2.2	5.1
3-4	2.0	7.6

Avec 1 : acide pHB, 2 : acide vanillique, 3 : pHB, 4 : vanilline

Des solutions modèles ont été préparées pour mimer un extrait de vanille tout en maîtrisant les quantités réelles d'analytes à doser pour pouvoir estimer correctement les erreurs de dosage. En effet les quatre composés ont été dopés à des concentrations proches de celles observées généralement dans des extraits de vanille. Les résultats quantitatifs obtenus avec les deux méthodes se sont avérés équivalents. L'erreur maximale observée était de 6% ce qui est dans la gamme de tolérance des méthodes que nous avons validées avec une tolérance de 10% d'erreur.

Les deux méthodes peuvent donc être indifféremment utilisées pour doser des extraits de vanille.

Cependant, la méthode UHPLC sera préférée pour la suite de notre étude de par le gain de temps substantif et l'économie de solvant qu'elle entraîne par rapport à la méthode HPLC.

Nous savons que les erreurs de dosage obtenus seront inférieures à 10% dans 90% des cas. Les résultats quantitatifs obtenus lors du dosage de deux extraits différents pourront donc être comparés et être utilisés à des fins d'authentification.

2 Extraction des gousses de vanille

2.1 Premières considérations sur l'extraction

Les méthodes officiellement recommandées pour vérifier l'authenticité des vanilles sont assez longues. En effet, la méthode AOAC nécessite trois jours^[283] tandis que la méthode ISO demande une journée complète.^[287]

Dans ce contexte nous avons voulu développer une méthode d'extraction plus rapide qui donnerait des résultats équivalents aux méthodes officielles tout en n'induisant aucun fractionnement isotopique.

Nous avons fait appel à l'ASE car cette technique permet d'extraire plusieurs fois la matrice avec du solvant frais sous pression et à des températures variables. D'autre part, du fait de la configuration instrumentale, il nous était possible de récupérer les fractions après chaque cycle et nous avons souhaité savoir si nous pouvions modéliser l'extraction pour prédire les valeurs théoriques des analytes dans les gousses sans avoir à réaliser une extraction complète car cela n'avait jamais été fait à notre connaissance.

Pendant que nous réalisons nos travaux, une équipe indienne a publié des conditions d'extractions des gousses de vanille par ASE.^[293] Lors de cette étude, les analystes ont comparé leurs résultats avec ceux obtenus par ultrason ou avec des microondes mais ils n'ont pas considéré les conditions d'extractions officielles. Nous avons néanmoins décidé d'inclure les conditions ASE qu'ils avaient publiées à notre étude pour comparer les résultats obtenus.

2.2 Optimisation des conditions d'extraction par extraction accélérée par solvant

Pour optimiser les conditions d'extraction des quatre analytes à partir des gousses de vanille, nous avons utilisé un plan d'expérience (Tableau 43). 17 expériences ont été nécessaires pour évaluer l'impact du nombre de cycle d'extraction (1,2 ou 3), la température (ambiante, 50 ou 100°C), le temps d'extraction (3,10 ou 20min) et le solvant d'extraction (éthanol, acétate d'éthyle, pentane, acétonitrile).

Tableau 43 : Plan d'expérience utilisé pour optimiser les paramètres ASE

Ordre aléatoire	Nombre de cycles	Température (°C)	Temps d'extraction par cycle (min)	Solvant
5	1	Room T	3	EtOH
12	3	50	10	EtOH
7	1	100	20	EtOH
17	1	Room T	10	EtOAc
4	3	50	20	EtOAc
8	1	100	3	EtOAc
15	1	50	3	Pentane
2	3	100	10	Pentane
13	1	Room T	20	Pentane
14	1	50	20	ACN
10	3	100	3	ACN
9	1	Room T	10	ACN
11	1	100	10	EtOH
6	3	Room T	20	EtOH
1	1	50	3	EtOH

Avec EtOH=éthanol, ACN= acétonitrile

Le rendement d'extraction augmente pour les quatre composés cibles en fonction des expériences : 17<13<5<1<15<9<6<12<14<4<10<2<8<11<7.

L'analyse des données a montré que la température était le paramètre le plus significatif ($p < 5\%$) suivi par le solvant (éthanol) comme illustré dans les graphes de Pareto (*non représentés*). La température a donc été fixée à 100°C pour le reste de l'étude. Pour les autres paramètres qui ne se sont pas avérés significatifs, nous avons gardé la plus petite valeur testée à savoir 1 cycle de 3 minutes.

Les rendements d'extractions obtenus avec nos conditions optimisées sont meilleurs que ceux obtenus dans les conditions publiées par Sharma *et al.*^[344] (Figure 98). L'équipe indienne avait conclu qu'une température de 60°C donnait de meilleurs résultats qu'une extraction à 100°C or il apparaît qu'une seule extraction de 3min à 100°C donne de meilleurs rendements que deux extractions de 5min à 60°C.

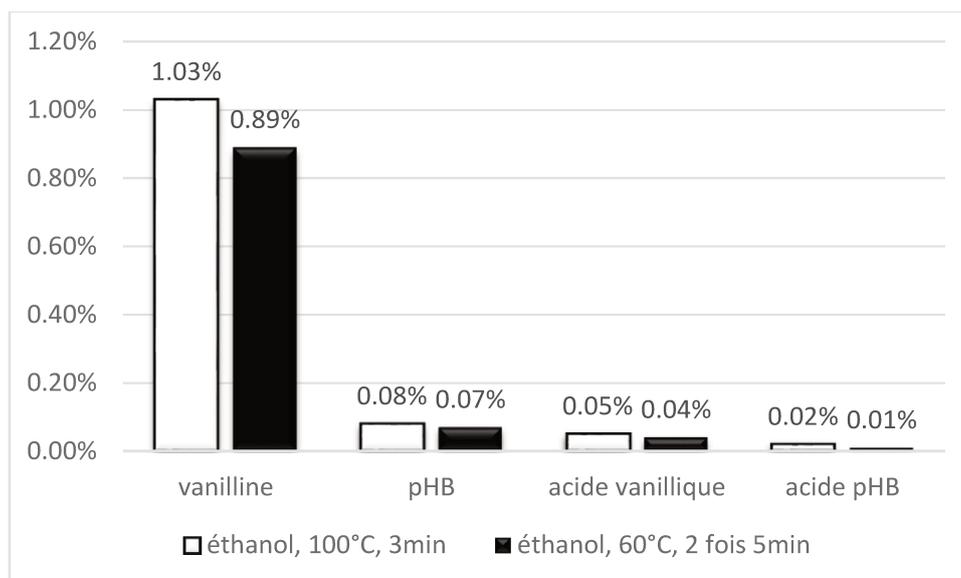


Figure 98 : Comparaison des teneurs en composés clés dans les extraits ASE de gousses malgaches NF et dosés par UHPLC-DAD. Adapté de [345] avec l'autorisation de Wiley.

2.3 Modélisation de l'extraction accélérée par solvant

A notre connaissance, aucune étude n'avait été publiée jusque-là pour savoir quel était le rendement d'extraction des analytes cibles à partir des gousses de vanille. Nous avons donc voulu modéliser l'extraction ASE afin de prédire les teneurs exactes dans les gousses.

Nous avons modélisé l'extraction en partant du principe que pour chaque étape d'extraction, le coefficient de partage des analytes entre la gousse et le solvant (K) était égal au quotient des concentrations (Equation 37).

Équation 37 : Coefficient de partage K entre le solvant (s) et la gousse (g) avec C=concentration

$$K = \frac{C_s}{C_g}$$

En partant du principe que le volume de solvant est le même à chaque extraction, il est possible de calculer la quantité A_i d'analyte récupéré à chaque étape i (Equation 38).

Équation 38 : Quantité d'analyte A_i récupéré à l'étape i avec ρ le rendement d'extraction

$$A_i = \rho(A_{i-2} - A_{i-1})$$

Si l'on applique le même raisonnement que celui de l'extraction headspace dynamique,^[346] on peut en déduire l'équation linéaire 39.

Équation 39 : Relation entre la quantité d'analyte A_i récupérée à chaque étape i , avec ρ le rendement d'extraction, pour n extractions

$$\ln(A_i) = (n - 1) \ln(1 - \rho) + \ln(\rho A_0)$$

A_0 étant la quantité initiale présente dans les gousses

Il suffit donc de représenter les données expérimentales pour en déduire la teneur initiale A_0 .

La configuration de l'instrument ASE permet de récupérer facilement les fractions après chaque cycle d'extraction. Nous avons réalisé 15 extractions successives dans les conditions optimales justes définies et nous avons analysé les fractions par UHPLC-DAD. Dans la pratique, lorsque les valeurs expérimentales sont représentées, les cinq premiers points ne permettent pas d'obtenir une droite.

Cela peut facilement s'expliquer par le fait que le coefficient de partage K que nous avons postulé constant ne l'est pas en réalité au début de l'extraction. En effet, la composition de la gousse va changer de par notamment l'extraction des graisses. Il semblerait cependant qu'après cinq cycles d'extraction, la composition de la gousse soit suffisamment constante pour se retrouver dans les conditions prédites de linéarité.

Il suffit donc de représenter les résultats à partir de l'extraction 6 afin de récupérer la pente et l'ordonnée à l'origine des droites obtenues pour prédire les quantités d'analytes présents dans les gousses à la 6^{ème} extraction (Figure 99). Il reste alors à rajouter à cette valeur les quantités dosées dans les extraits 1 à 5 pour estimer la teneur initiale dans les gousses.

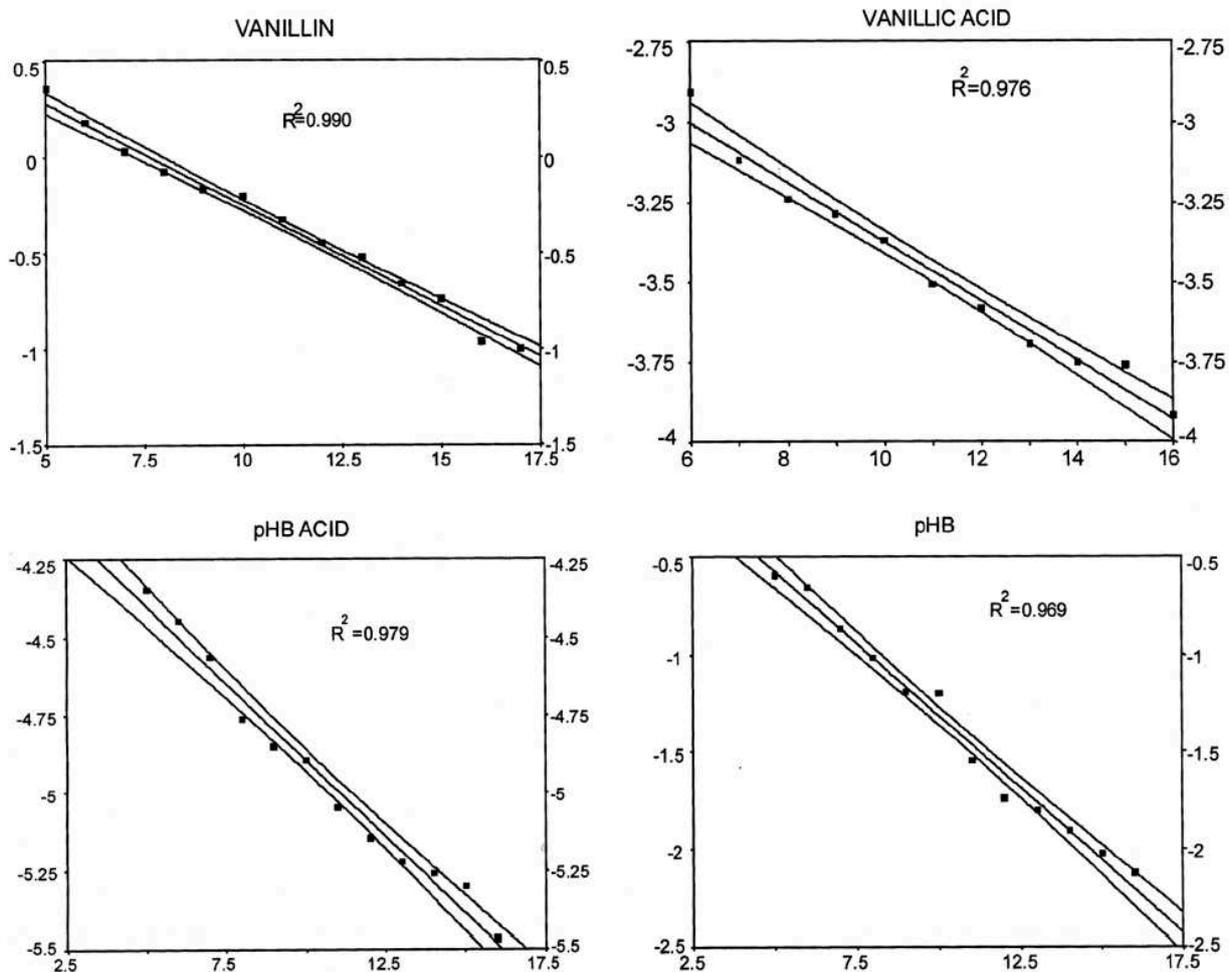


Figure 99 : Représentation des données expérimentales obtenues pour les extractions 6 à 18 de gousses NF de Madagascar avec un intervalle de confiance à 95%. Figures reproduites à partir de [345] avec l'autorisation de Wiley.

Dans le cas des gousses malgaches NF que nous avons étudiées, les teneurs prédites par le modèle sont de 2.24% de vanilline, 0.16% de pHB, 0.11% d'acide vanillique et 0.04% d'acide pHB. Si nous comparons ces valeurs avec celles obtenues avec nos conditions ASE optimales, il est clair que ces dernières n'ont permis d'extraire que 50% des analytes initialement présents (Figure 98). Cependant, étant donné que les critères d'authentification basés sur les teneurs en constituants ont été obtenus dans les conditions d'extraction officielles AOAC et ISO, il paraît plus important de savoir si l'extraction ASE permet d'obtenir des extraits semblables que de savoir s'ils sont représentatifs de la gousse. D'autre part, étant donné que 15 cycles ASE sont nécessaires pour prédire les teneurs initiales dans les gousses, nous avons décidé de toujours les réaliser dans la suite de notre étude. En effet, malgré la multiplicité des cycles, l'extraction ne dure au total que 45min ce qui est négligeable par rapport aux extractions officielles.

2.4 Application de la méthode aux produits finis

Très peu de publications concernent l'analyse des composés clés de la vanille dans les produits finis. Quelques données sont en effet disponibles dans le beurre,^[347] les glaces^[348,349] ou encore les boissons chocolatées.^[350]

L'ASE permet de récupérer 100% de la vanilline présente dans un yaourt allégé en gras et 98% dans un yaourt non allégé ou d'une glace.

2.5 Comparaison des méthodes d'extraction

Différentes méthodes d'extraction ont été considérées pour être comparée à l'ASE avec en premier lieu les extractions officielles AOAC 960.37^[283] et ISO 5565-2^[287] mais également diverses macérations, extractions Soxhlet pour essayer d'être représentatif de ce que nous avons trouvé dans la littérature. Etant donné le prix des gousses Malgaches, les essais ont été faits principalement sur des gousses mexicaines NFR.

2.5.1 Macération

Les gousses de vanille ont macéré pendant sept jours à température ambiante dans différents solvants. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec l'acétate d'éthyle. Dans les conditions AOAC 960.37^[283], les pourcentages obtenus étaient supérieurs pour les aldéhydes et inférieurs pour les acides avec 1.63, 0.07, 0.14 et 0.02 % pour la vanilline, le pHB et leurs deux acides respectivement.

2.5.2 Extractions Soxhlet

Les gousses de vanille ont été extraites par Soxhlet à l'éthanol dans les conditions recommandées par l'ISO 5565-2^[287] mais également avec du dichlorométhane ou de l'acétate d'éthyle. C'est ce dernier solvant qui semble donner les meilleurs résultats bien que la variabilité de l'extraction n'ait pas été évaluée pour pouvoir conclure si les différences observées sont significatives.

2.5.3 Comparaison des résultats d'extraction

Le tableau 44 donne, pour chacune des conditions d'extraction testées sur les gousses mexicaines NFR, les rendements d'extraction des quatre analytes calculés par rapport aux valeurs théoriques prédites.

Tableau 44 : Rendements d'extraction expérimentaux calculés à partir des valeurs théoriques prédites pour les gousses mexicaines NFR

Extraction	Solvant	Vanilline	pHB	Acide vanillique	Acide pHB
ASE	EtOH*	91	98	96	77
Soxhlet	EtOH (Selon ISO 5565-2)	86	67	101	75
Macération	H ₂ O et EtOH (Selon AOAC 960.37)	92	90	91	60
Soxhlet	EtOAc	84	89	74	91
Soxhlet	CH ₂ Cl ₂	87	85	56	106
Macération	EtOH	34	38	19	17
Macération	EtOAc	27	48	19	27
Macération	MeOH	66	61	50	53
Macération	Et ₂ O	59	48	56	53
Macération	EtOH	81	73	50	80
Macération	EtOAc	84	73	94	80
Macération	CH ₂ Cl ₂	66	36	31	27
Macération	Pentane	16	12	6	27
Macération	ACN	69	73	62	53

Avec EtOAc= acétate d'éthyle, CH₂Cl₂= dichlorométhane, MeOH=méthanol, EtOH=éthanol, ACN=acétonitrile, * : 15 cycles de 3min, 100°C

Les rendements d'extraction très faibles obtenus par macération à température ambiante rendent ces méthodes peu intéressantes. Si la vanilline, le pHB et l'acide vanillique sont bien extraits avec la méthode AOAC 960.37 (rendement>90%), l'acide pHB est clairement sous-estimé (<60%). Une meilleure extraction de ce dernier semble être obtenue par la méthode ISO 5565-2 ou par ASE mais dans tous les cas le rendement n'est pas quantitatif (environ 75%). En revanche, la méthode ISO 5565-2 ne permet pas d'extraire correctement le pHB. Il s'avère donc qu'aucune des trois méthodes considérées (ASE, ISO et AOAC) ne donne les mêmes rendements d'extraction. Il en découle donc que les ratios qui seront calculés avec l'une ou l'autre des méthodes seront différents (tableau 45). Si l'on applique ces trois méthodes pour extraire des gousses noires, fendues ou non, provenant de Madagascar, il apparaît que les extractions ASE et ISO 5565-2 permettent d'obtenir des ratios conformes aux spécifications propres aux vanilles Bourbon^[313] alors que les gousses NF pourraient être suspectées d'adultération en utilisant la méthode AOAC 960.37 au vu des ratios R3 et R5 (liés tous deux à l'acide pHB).

Tableau 45 : Ratios de constituants obtenus pour différents extraits dans des gousses malgaches noires fendues et non fendues

	Bornes*	Madagascar NF			Madagascar NFN		
		ASE**	ISO 5565-2	AOAC 960.37	ASE**	ISO 5565-2	AOAC 960.37
R1	10-20	18	17	16	13	15	15
R2	0.53-1.50	0.89	1.06	0.7	0.67	0.73	0.73
R3	0.15-0.35	0.27	0.28	0.13	0.22	0.19	0.18
R4	12-29	20	16	24	19	21	21
R5	40-110	66	62	124	58	80	82

* : limites définies par la DGCCRF pour les vanilles Bourbon ^[313], ** : 15 cycles de 3min, à l'éthanol, 100°C

Les analyses isotopiques semblent donc finalement indispensables pour authentifier les extraits de vanille.

2.6 Compatibilité de l'extraction accélérée par solvant avec les analyses isotopiques

Pour vérifier si l'ASE induit un fractionnement isotopique nous avons déterminé la déviation isotopique du ¹³C dans le cas d'une seule extraction ou après 15 extractions et nous avons comparé les valeurs obtenues avec celles trouvées dans un extrait obtenu par la méthode ISO 5565-2 qui n'induit pas de fractionnement isotopique. Les valeurs obtenues par IRMS étant respectivement de -20.9, -20.7 et -20.8‰. Sachant que la précision sur la mesure est de 0.3‰, nous pouvons conclure que l'ASE n'entraîne pas de fractionnement isotopique. Dans les trois cas, les valeurs obtenues sont conformes aux recommandations de la DGCCRF ($\geq -21.2\text{‰}$).^[313] Cette technique peut donc être employée pour extraire les constituants de la vanille avant des analyses isotopiques.

3 Purification de la vanilline avant analyse isotopique

3.1 Premières considérations sur la purification

Si les extraits de vanille peuvent directement être analysés par GC-IRMS, un isolement des analytes est indispensable pour effectuer des analyses RMN. Etant donné que les méthodes de purification publiées jusque-là étaient fastidieuses, nous avons souhaité développer une procédure automatisable n'entraînant pas de fractionnement isotopique. Nous avons décidé de faire appel à la MPLC. La plupart des méthodes de purification sur colonne reportées dans la littérature se font en phase normale mais comme la silice n'est pas régénérable, la phase

stationnaire est jetée après chaque purification. Nous avons décidé de réaliser notre purification sur phase inverse. Si la silice greffée C18 est chère à l'achat, elle est régénérable près de 50 fois ce qui permet d'absorber les coûts dans le temps. Pour pouvoir calculer les rendements de récupération en vanilline de chaque étape, nous avons utilisé un extrait éthanolique modèle constitué de graisses de vanille et des quatre analytes clés dans des concentrations connues et proches de celles observées dans un vrai extrait.

3.2 Dégraissage des extraits

Les extraits obtenus à partir des gousses de vanille comprennent une quantité de graisses non négligeable pouvant aller jusqu'à 15%.^[351] Les composés lipophiles doivent être éliminés avant de procéder à la purification par MPLC sur phase inverse car ils risquent de rester adsorbés sur la colonne. Pour éliminer les graisses nous avons réalisé une extraction liquide-liquide des extraits ASE avec de l'eau. L'eau qui était enrichie en analytes cibles a été extraite à l'éther. La phase organique a été séchée sur sulfate de sodium anhydre avant d'être évaporée à l'évaporateur rotatif. Il restait généralement toujours un peu d'eau au fond du ballon ce qui permettait de récupérer l'extrait avant l'injection MPLC.

Après dégraissage de l'extrait de vanille modèle, il s'est avéré que 90% de la vanilline était extraite.

3.3 Purification par MPLC

L'extrait modèle dégraissé a ensuite été injecté sur une colonne MPLC garnie de silice greffée C-18 selon les conditions définies dans la partie expérimentale. Les fractions ont été analysées par UHPLC avec la méthode précédemment décrite. Celles contenant de la vanilline ont été rassemblées. A cette étape, un rendement de récupération en vanilline de 97% a été obtenu.

3.4 Récupération de la vanilline

Une extraction liquide-liquide au dichlorométhane a été réalisée afin d'éliminer l'eau présente dans la phase mobile. La phase organique a été séchée sur sulfate de sodium anhydre puis évaporée à l'évaporateur rotatif. Cette dernière étape a permis de récupérer 97% de la vanilline. Le produit obtenu a ensuite été séché au dessiccateur avec P₂O₅.

Le rendement global de récupération de la vanilline, depuis l'extrait modèle jusqu'à la poudre récupérée est de 94%.

3.5 Mesure isotopique

La vanilline purifiée à partir des extraits modèles a été analysée par IRMS et ^{13}C -RMN (Tableau 46). La procédure de purification a été réalisée trois fois pour en connaître la variabilité. La déviation standard interlot, pour les sites carbonés 1 à 8, est comprise entre 0.40 et 1.20 (Tableau 46) ce qui est comparable à celle déjà observée dans le cas d'études de répétabilité de mesures ^{13}C -RMN.^[281] Si l'on compare les valeurs de déviation isotopique obtenues avant et après purification, la différence n'apparaît pas significative donc ce procédé de purification ne semble pas induire de fractionnement isotopique.

Tableau 46 : Déviations isotopiques globales (IRMS $\delta^{13}\text{C}$) et spécifiques (^{13}C FINS RMN) obtenues dans le cas de la vanilline ex-lignine purifiée de l'extrait modèle (triplicata)

		Vanilline de départ	Vanilline purifiée par MPLC				Biais*	
			Lot 1	Lot 2	Lot 3	Moyenne		SD (‰)
IRMS $\delta^{13}\text{C}$		-28.20	-28.00	-28.10	-28.00	-28.00	0.10	0.20
$\delta_i^{13}\text{C}$ RMN	C1	-38.30	-37.60	-38.50	-37.60	-37.90	0.50	0.40
	C2	-27.70	-27.90	-27.00	-28.10	-27.70	0.60	0.00
	C3	-26.80	-26.80	-25.90	-28.10	-26.90	1.10	-0.10
	C4	-24.60	-22.90	-23.40	-24.40	-23.60	0.80	1.00
	C5	-27.40	-29.10	-29.60	-28.40	-29.00	0.60	-1.60
	C6	-28.10	-26.40	-27.70	-25.40	-26.50	1.20	1.60
	C7	-26.20	-27.50	-27.40	-28.20	-27.70	0.40	-1.50
	C8	-26.70	-25.50	-25.60	-23.90	-25.00	1.00	1.70

* Différence entre la valeur avant et après purification

De la vanilline a ensuite été purifiée dans les conditions précédemment détaillées à partir de gousses de vanille noires provenant de Madagascar et extraites par ASE. Les valeurs obtenues pour les sites 1 à 8 étaient respectivement de -29.9, -17.9, -14.7, -8.3, -28.1, -15.5, -25.1 et -28.8‰. Cette étude a été réalisée en collaboration avec l'université de Nantes, et de la vanilline provenant de deux autres lots de gousses malgaches et purifiée sur colonne de silice au sein de cette université ont donné des valeurs assez proches ($0.2\text{‰} < \text{SD} < 1.5\text{‰}$).

Cependant, lorsque ces résultats ont été comparés à ceux publiés par Botosoa pendant sa thèse^[352], il a été mis en avant que les valeurs de $\delta^{13}\text{C}_i$ obtenues au cours de notre étude étaient légèrement supérieures pour tous les sites sauf pour les sites 5 et 7 qui étaient beaucoup plus faibles.

Cela pourrait être attribué à l'échange relatif entre les deux conformères associés à la position du groupement aldéhyde qui peut être soit comme illustré dans la figure 92 soit dans la direction opposée. En fonction de la vitesse de l'échange, lent ou rapide, les carbones 5 et 7 pourront donner des signaux plus ou moins larges. Ce phénomène est dépendant du spectromètre utilisé et nous n'avons pas utilisé le même équipement que Botosoa pour effectuer les mesures. Au moment où nous avons réalisé cette étude, des essais inter laboratoires étaient prévus pour élucider ce phénomène.

4 Conclusions et perspectives

La détermination de l'authenticité est un aspect important du contrôle qualité des arômes. Dans ce chapitre nous avons détaillé le cas de la vanille. Pour vérifier la naturalité des gousses, des extraits ou des constituants clés dont la vanilline, nous avons proposé un ensemble de techniques allant de l'analyse chromatographique à la purification en passant par l'extraction. Nous avons montré au travers de nos essais d'extraction par ASE et en utilisant la méthode UHPLC/UV que nous avons développée et validée pour quantifier les quatre composés clés de la vanille, que les ratios de constituants clés ne sont pas suffisants pour authentifier l'origine des gousses. Les analyses isotopiques, et plus particulièrement intramoléculaires, semblent plus appropriées. Nous avons dans ce contexte proposé une méthode d'extraction et de purification de la vanilline compatible avec les analyses isotopiques puisqu'elles n'entraînent pas de fractionnement isotopique. Cependant dans un contexte de contrôle qualité, les analyses isotopiques ne sont pas toujours possibles car les laboratoires ne sont pas forcément équipés et qu'il faut considérer leur coût et le délai nécessaire dans le cas d'une sous-traitance. L'étude de la composition des extraits de vanille semble donc encore avoir de l'avenir.

Ce travail a fait l'objet de trois publications scientifiques.^[342,345,388]

Depuis la publication de ces travaux, le contrôle de l'authenticité de la vanille est toujours d'actualité. En effet, un contrôle effectué en 2014 par la répression des fraudes a montré l'utilisation de vanilline de synthèse dans 9% des produits naturels contrôlés.^[353]

Les avancées analytiques ont concerné les trois domaines étudiés dans ce manuscrit à savoir la purification, la séparation chromatographique et l'analyse isotopique.

La chromatographie de partage centrifuge (CPC) a été considérée pour purifier la vanilline à partir d'extraits de vanille. La société Camag a en effet réussi à obtenir des fractions pures de vanilline (99 à 100% de pureté) en utilisant un système SCPC-EX-250 avec le système de solvant Arizona L. Cependant, le rendement de la purification n'était pas suffisant pour éviter un fractionnement isotopique ce qui n'est donc pas compatible avec des analyses d'authentification.^[354]

Schipilliti *et al.* ont récemment proposé une extraction par SPME avant analyse par GC-C-IRMS pour différencier de la vanilline synthétique ou biosynthétique dans des extraits de vanille ou des produits aromatisés.^[355]

L'analyse des extraits de vanille par chromatographie supercritique a également été proposée,^[356] tout comme l'utilisation de la spectrométrie de masse haute résolution.^[357] L'approche métabolomique a été utilisée pour authentifier des extraits de vanille dans les travaux de thèse du Dr. Masson de la société Robertet.^[358] Les espèces *planifolia* et *tahitensis* ont pu être facilement discriminées par UHPLC/HR MS grâce à 58 marqueurs discriminants dont des dérivés de la vanilline pour l'espèce *planifolia* et des dérivés de l'anisaldéhyde pour l'espèce *tahitensis*. Cependant l'approche n'a pas permis de discriminer clairement les origines des gousses de vanille à cause de la trop grande variabilité inhérente à chaque groupe.

Concernant les analyses isotopiques, il est à présent possible de faire des études PSIA par irm ¹³C RMN sans avoir besoin de connaître précisément la masse ni la pureté de l'analyte et de sa référence interne. Ceci a été rendu possible grâce au développement d'une nouvelle séquence appelée Double-WET (DWET).^[359] Cette nouvelle stratégie a été appliquée récemment avec succès pour discriminer la vanilline ex-lignine de la vanilline ex-gousse.^[360] Pour aller plus loin, il est possible de lire deux revues publiées très récemment sur le contrôle de l'authenticité de la vanille^[318] et sur l'irm-RMN.^[361]

Conclusion générale

1 Conclusion sur les projets présentés dans cette thèse

Ce manuscrit a permis d'illustrer trois points clés du contrôle qualité des matières premières de parfumerie et d'arômes à savoir :

- La rigueur nécessaire dans la quantification, au travers de l'exemple des facteurs de réponses en GC-FID pour quantifier les composés volatils ;
- L'importance de l'analyse des composés réglementés comme les furocoumarines ou les 26 allergènes de parfumerie ;
- Et l'intérêt du contrôle de l'authenticité et de la naturalité des matières premières, avec le cas de la vanille.

Les conclusions de chaque chapitre ne seront pas rappelées dans cette conclusion générale pour éviter les redondances et le lecteur est invité à s'y référer.

Cette thèse a été rédigée dans un contexte de VAE, au travers de la compilation de travaux dont les résultats ont été publiés entre 2008 et 2017. Certains autres projets réalisés pendant cette période n'ont volontairement pas été abordés dans le manuscrit pour des soucis de concision d'une part, ou parce que les sujets des études étaient assez éloignés du sujet de la thèse d'autre part.

Cependant, compte tenu de leur intérêt dans le domaine des arômes, parfums et ingrédients naturels, un résumé peut être présenté dans cette conclusion.

2 Projets non présentés dans cette thèse

2.1 Etude des odeurs par olfactométrie

La chromatographie en phase gazeuse couplée à l'olfactométrie (GC-O) permet l'analyse des composés odorants d'un mélange ce qui est très important dans le domaine des arômes et parfum. Les méthodologies GPG-O peuvent être divisées en trois groupes : les méthodes de dilution (AEDA^[362], CHARM^[363]), les méthodes d'intensité (OSME, FSCM^[364]) ou encore les méthodes de détection de fréquence (OGA^[365], NIF/SNIF^[366]). Les méthodes de dilution ne sont pas adaptées à l'identification de composés à impact odorant contrairement aux deux autres méthodes.^[367] Cependant ces dernières ont des limites connues^[367-369] et l'association de deux méthodologies, pour obtenir une méthode hybride, permet de s'en affranchir ou de les limiter.

L'offre de représentation graphique de données olfactométriques hybrides est cependant très limitée^[370,371] et dans ce contexte il a été décidé de proposer une nouvelle façon de représenter les données, à l'aide de graphes bulles et de couleurs liées aux odeurs perçues. Ces graphes permettent de représenter sur l'axe des ordonnées le critère le plus important selon l'analyste (intensité ou fréquence de détection), la taille des bulles représentant l'autre paramètre. Les couleurs des bulles sont quant à elles liées à l'odeur selon le résultat d'une étude sur leur association synesthésique réalisée avec un panel international. Cette association s'est faite pour 25 familles olfactives préalablement définies, sans aucune étape d'olfaction. En effet, les consommateurs ont des attentes concernant l'odeur d'un produit sur la base de sa couleur^[372] probablement à cause de l'association de la couleur à la verbalisation de l'odeur pendant son apprentissage.^[373,374] Les résultats obtenus sont très proches de ceux obtenus par d'autres chercheurs au travers de véritables évaluations olfactives. Cette nouvelle représentation des données olfactométriques a déjà été appliquée avec succès à l'étude de l'huile essentielle et de l'extrait CO₂ de Timur.^[382, 392]

Ce travail a fait l'objet d'un poster présenté à l'ISEO de Nice en Septembre 2016^[389] et d'une publication.^[390] Il a également été présenté lors de deux communications orales à Marseille, le 16 juin 2017 au Club des Experts Chimistes de Méditerranée puis à Nice à la Journée Arômes et Parfums, le 23 juin 2017.

2.2 Étude des composés odorants soufrés

Les composés soufrés sont très importants dans le domaine des arômes et parfums car leur seuil de détection olfactif est très faible et ils sont responsables d'odeurs intéressantes caractéristiques de certains ingrédients tels que la cassis ou les fruits tropicaux ou au contraire de mauvaises odeurs parasitant un produit tels que certains composés libérés lors de la vinification par exemple.

Leur analyse peut être compliquée car, d'une part ils sont très réactifs et, d'autre part, ils sont souvent présents à des concentrations inférieures aux seuils de détection des détecteurs classiques (FID ou MS). Il est souvent nécessaire de faire appel à des techniques d'extraction pour les concentrer, à des techniques de dérivation pour diminuer leur réactivité ou augmenter leur détectabilité, ou encore à des techniques de détection très sensibles comme l'olfactométrie ou la spectrométrie de masse en tandem par exemple.

C'est le cas de la méthode qui a été proposée ^[375], pour quantifier le sulfure d'hydrogène (H₂S) et le méthane-thiol dont l'odeur nauséabonde d'œuf et de chou pourris apparaissait dans le temps dans certains adoucissants. Les deux thiols, en solution aqueuse, ont été analysés par GC-MS QqQ, en mode MRM, après avoir été dérivatisés sur fibre SPME par le maléimide de N-éthyle. La méthode de dosage a été validée afin de déterminer sa linéarité et ses limites. Les LD, basées sur les ratios d'ions quantifiants et qualifiants, ont par exemple été démontrées comme étant inférieures aux seuils de perception olfactifs des deux thiols analysés. Cette méthode a ensuite été utilisée pour évaluer l'utilisation de deux composés de type isothiazolone, à savoir la 1,2-benzisothiazol-3(2H)-one et la 2-méthyl-4-isothiazolinone, comme agents limitant l'apparition des mauvaises odeurs liées aux thiols étudiés. Les thiols forment en effet un complexe non odorant avec ce composé ce qui limite voire empêche l'apparition des mauvaises odeurs. Par exemple, lors de la réaction d'H₂S avec la 1,2-benzisothiazol-3(2H)-one, la 2,2'-disulfanediyldibenzamide est formée comme confirmé par les études par RMN et MS. Un mécanisme de formation de la 2,2'-disulfanediyldibenzamide a également été proposé dans cette étude suite à des analyses effectuées par UHPLC-MS et GC-MS.

La technique de dérivatisation sur fibre SPME par des composés de type maléimides (N-éthyl et N-phényl) avait été appliquée sans succès lors de l'analyse des thiols odorants présents dans les extraits de Timur. Cependant, le laboratoire ne disposait pas d'un QqQ mais d'un simple quadripôle ce qui n'était visiblement pas suffisant pour les détecter. Malgré des essais de purification sur résine mercurique selon les travaux de Schneider *et al.*^[376] et de Tominaga *et al.*^[377], l'identité des quatre thiols, suspectés comme étant la 4-mercapto-4-pentane-2-one, le 3-mercaptohexanol, l'acétate de 3-mercaptohexyle et le 1-*p*-menthène-8-thiol, sur la base de leur odeur détectée par GC-O et leur LRI, n'a pas pu être validée. Il a fallu sous-traiter les analyses à une société spécialisée dans l'étude des thiols variétaux présents dans le vin par dilution isotopique stable et UHPLC-MS QqQ en mode MRM. L'identité des quatre thiols a ainsi été confirmée et ils ont ainsi pu être dosés dans les extraits et les graines fournis. Ce travail a été présenté lors du congrès ISEO de Nice en Septembre 2016 lors d'une présentation orale et dans un poster.^[392] Il est également repris dans la publication sur le Timur qui vient d'être acceptée.

[382]

2.3 Étude de composés non volatils

Dans le domaine des arômes et parfums, l'analyse des composés non-volatils est beaucoup moins développée que celle des ingrédients volatils. En effet, la plupart des composés responsables des odeurs et des arômes sont des composés volatils. Mais il existe trois cas principaux pour lesquels les composés non volatils, ou peu volatils, sont souvent étudiés. Dans un premier cas, il s'agit de composés aromatiques clés, comme par exemple la vanilline qui a été présentée dans le *Chapitre 4* de cette thèse. Dans un second cas, il peut s'agir de composés réglementés comme l'atranol et le chloroatranol ou encore les furocoumarines, comme illustré dans les *Chapitres 2a, 2b et 3* de cette thèse. Dans un dernier cas, il peut s'agir de composés responsables du goût d'un ingrédient, à savoir de son côté sucré, salé, amer, acide ou umami.

L'analyse des composés non volatils est la plupart du temps réalisée en chromatographie liquide. Ainsi, la présence d'amides à goût umami, a été confirmée dans des baies de poivre de Séchuan (*Zanthoxylum piperitum*) par UHPLC/MS par comparaison des spectres de masse et des temps de rétention avec ceux de standards synthétisés au sein du laboratoire. Les premiers essais avaient été réalisés en utilisant un autre spectromètre de masse que celui employé dans la publication qui a découlé de ces travaux [voir *partie remerciements*^[378]].

Les composés responsables du goût proviennent souvent des métabolites, primaires ou secondaires, produits par les plantes. Ces métabolites sont en général identifiés par différentes techniques spectroscopiques telles que la RMN ou la MS et leur intérêt cosmétique ou pharmaceutique, isolés, dans un extrait ou dans un ingrédient, peut-être évaluée par différents tests biologiques.

La phytochimie est en plein essor dans les sociétés du domaine des arômes et parfums car ces dernières développent de plus en plus d'ingrédients naturels pour des applications cosmétiques. Il est par exemple possible de citer la société Givaudan avec sa division « Active Beauty »^[379] ou Robertet et son pôle « actifs ».^[380] La société Cosmo International Ingredients présente également une forte activité dans le domaine de la phytochimie. En 2014, un poster sur l'activité biologique d'un extrait de calice de *Physalis* a été présenté au congrès cosmétique IFSCC^[391] (*International Federation of Societies of Cosmetic Chemists*). Ce poster a permis de détailler la stratégie d'étude phytochimique employée pour identifier les composés clés de cet extrait comme étant des sucrose esters. La RMN a été utilisée pour identifier la partie « sucre » et les

substitutions à courte chaîne des composés majoritaires de l'extrait, préalablement purifiés par HPLC préparative, tandis que la MS QqQ a permis de confirmer la longueur des chaînes grasses et d'identifier un schéma de fragmentation, en mode ESI, propre à cette famille de composés. La MS a également permis de proposer la présence de dizaines d'autres sucrose esters dans l'extrait. Un brevet a été déposé par la société^[381] et une publication est en cours de rédaction.

Il est également possible de citer deux autres brevets, déposés en 2016 et 2017, pour lesquels il n'est pas encore possible de préciser les plantes concernées. Cependant il est possible de dire que dans le premier cas, il s'agissait d'un hydrolysate peptidique contenant des peptides et des saccharides et qui a été analysé en faisant appel à des techniques de chromatographie liquide et notamment d'exclusion stérique (n° de dépôt FR1600441). Dans le second cas, il s'agissait d'un extrait riche en composés de types ester de terpényl cinnamates. En absence de standard pour quantifier, a été mise en place une stratégie de purification par chromatographie flash de fractions enrichies en standard afin de réaliser par la suite une quantification par HPLC-UV par calibration externe (n° de dépôt FR1771125).

3 Avenir du contrôle qualité dans le domaine des arômes et parfums

Il a été vu dans les quatre études présentées dans cette thèse que la technique analytique et le traitement des données analytiques a grandement évolué en une dizaine d'années seulement.

Toutes ces études ont permis de mettre en avant la polyvalence des compétences analytiques nécessaires pour contrôler efficacement une matière au travers de l'analyse de composés volatils et non volatils. La complexité des matrices étudiées, ainsi que la nécessité de quantifier des composés à très faible concentration, pour des questions réglementaires, invitent à l'utilisation de techniques analytiques de pointe et à l'emploi de techniques statistiques pour valider des méthodes, traiter des données ou encore rationaliser des expériences.

Le recours aux techniques issues d'autres domaines d'activité telles que la métabolomique ou encore les analyses ADN, mais également l'intérêt grandissant des sociétés de notre domaine à s'ouvrir à d'autres marchés tels que la cosmétique, laissent entrevoir tout le potentiel d'évolution de l'activité de contrôle qualité au sein des entreprises productrices d'arômes et parfums.

References

- [1] T. Acree, R. Teranishi (Eds.), *Flavour Science: Sensible Principles and Techniques*, ACS, **1993**.
- [2] Comité Européen de Normalisation, *Systèmes de management de la qualité — Principes essentiels et vocabulaire Quality management systems — Fundamentals and vocabulary*, **2000**.
- [3] R. Berger (Ed.), *Flavours and Fragrances. Chemistry, Bioprocessing and Sustainability*, Springer, **2007**.
- [4] G. Matheis, *Food Flavorings: Quality Control of Flavorings and Their Raw Materials.*, Ashurst,R., **1999**.
- [5] G. Losing, G. Matheis, H. Romberg, V. Schmidt, *Dragoco Report* **1999**, 42, 93.
- [6] AFNOR, NF ISO 279, *Huiles essentielles - Détermination de la densité relative à 20 degrés C - Méthode de référence*, **1999**.
- [7] AFNOR, NF ISO 280, *Huiles essentielles - Détermination de l'indice de réfraction*, **1999**.
- [8] AFNOR, NF ISO 592, *Huiles essentielles - Détermination du pouvoir rotatoire*, **1999**.
- [9] AFNOR, FD ISO/TR 11018, *Huiles essentielles - Directives générales pour la détermination du point d'éclair*, **1997**.
- [10] AFNOR, NF T 75-102, *Huiles essentielles - Détermination du point de congélation*, **1969**.
- [11] AFNOR, NF T 75-117, *Huiles essentielles - Évaluation quantitative du résidu d'évaporation*, **1976**.
- [12] AFNOR, NF ISO 11021, *Huiles essentielles - Détermination de la teneur en eau - Méthode de Karl Fischer*, **1999**.
- [13] AFNOR, NF ISO 875, *Huiles essentielles - Évaluation de la miscibilité à l'éthanol*, **1999**.
- [14] AFNOR, NF ISO 1242, *Huiles essentielles - Détermination de l'indice d'acide*, **1999**.
- [15] AFNOR, NF ISO 709, *Huiles essentielles - Détermination de l'indice d'ester*, **1994**.
- [16] AFNOR, NF ISO 1241, *Huiles essentielles - Détermination de l'indice d'ester, avant et après acétylation, et évaluation de la teneur en alcools libres et en alcools totaux*, **1997**.
- [17] AFNOR, NF T 75-125, *Huiles essentielles - Détermination de l'indice de carbonyle - Méthode à l'hydroxylamine libre*, **1984**.
- [18] AFNOR, NF ISO 1279, *Huiles essentielles - Détermination de l'indice de carbonyle - Méthodes potentiométriques au chlorure d'hydroxylammonium*, **1997**.
- [19] IFRA, *IFRA Analytical Method: Determination of the Peroxide Value*, **2011**.
- [20] E. s. Kovats, *Helv. Chim. Acta* **1958**, 41, 1915.
- [21] H. van den Dool, P. D. Kratz, *J. Chromatogr.* **1963**, 11, 463.
- [22] I. G. Mc William, R. A. Dewar, *Nature* **1958**, 181, 760.
- [23] J. Harley; W. Nel, V. Pretorius, *Nature* **1958**, 181, 177.
- [24] H. F. Calcote, R. N. Pease, *Ind. Eng. Chem.* **1951**, 43, 2726.
- [25] F. W. Fifield, D. Kealey, *Principles and Practice of Analytical Chemistry*, Blackwell Science, Oxford, Malden, Mass., **2000**.
- [26] A. T. Blades, *Can. J. Chem.* **1976**, 54, 2919.
- [27] A. J. C. Nicholson, *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1* **1982**, 78, 2183.
- [28] T. Holm, J. Ø. Madsen, *Anal. Chem.* **1996**, 68, 3607.
- [29] T. Holm, *J. Chromatogr. A* **1997**, 782, 81.
- [30] T. Holm, *J. Chromatogr. A* **1999**, 842, 221.
- [31] K. Schofield, *Prog. Energy Combust. Sci.* **2008**, 34, 330.
- [32] H. F. Calcote, *Symposium (International) on Combustion* **1961**, 8, 184.
- [33] J. A. Green, T. M. Sugden, *Symposium (International) on Combustion* **1963**, 9, 607.
- [34] M. P. Gardner, C. Vinckier, K. D. Bayes, *Chem. Phys. Let.* **1975**, 31, 318.
- [35] M. Klee, GC Solutions #11: The Flame Ionization Detector.
<https://www.sepscience.com/Techniques/GC/Articles/208-/GC-Solutions-11-The-Flame-Ionization-Detector> [2 April 2017].
- [36] R. F. Klemm, A. T. Blades, *Nature* **1966**, 212, 920.

- [37] A. T. Blades, *J. Chromatogr. Sci.* **1976**, *14*, 45.
- [38] B. L. Chawner, A. T. Blades, *Can. J. Chem.* **1978**, *56*, 2273.
- [39] A. Nicholson, D. L. Swingler, *Combust. Flame* **1980**, *39*, 43.
- [40] T. Fujiyoshi, T. Ikami, T. Sato, K. Kikukawa, M. Kobayashi, H. Ito, A. Yamamoto, *J. Chromatogr. A* **2016**, *1434*, 136.
- [41] A. Garrido Frenich, J. L. Martinez Vidal, J. L. Fernandez Moreno, R. Romero-Gonzalez, *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 4798.
- [42] E. Corbi, C. Peres, N. David, *Flavour Frag. J.* **2014**, *29*, 173.
- [43] AFNOR, NF V 03-110, *Analyse des produits agricoles et alimentaires - Protocole de caractérisation en vue de la validation d'une méthode d'analyse quantitative par construction du profil d'exactitude*, **2010**.
- [44] A. Krueve, I. Leito, K. Herodes, *Anal. Chim. Acta* **2009**, *651*, 75.
- [45] J. Masson, E. Liberto, J.-C. Beolor, H. Brevard, C. Bicchi, P. Rubiolo, *Food Chem.* **2016**, *206*, 223.
- [46] A. Krueve, K. Herodes, I. Leito, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2011**, *25*, 1159.
- [47] ISO, NF EN ISO 22892, *Qualité du sol - Lignes directrices pour l'identification de composés cibles par chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse*, **2006**.
- [48] IOFI, *Flavour Frag. J.* **2006**, *21*, 185.
- [49] IOFI, *Z. Lebensm. -Unters. Forsch.* **1991**, *192*, 530.
- [50] IOFI, *Flavour Frag. J.* **2010**, *25*, 2.
- [51] Royal Society of Chemistry-Analytical Methods Committee, *Analyst* **1981**, *106*, 448.
- [52] A. van Asten, *Trends Anal. Chem. TrAC* **2002**, *21*, 698.
- [53] N. W. Davies, *J. Chromatogr. A* **1990**, *503*, 1.
- [54] B. d'Acampora Zellner, C. Bicchi, P. Dugo, P. Rubiolo, G. Dugo, L. Mondello, *Flavour Frag. J.* **2008**, *23*, 297.
- [55] K. Goodner, *LWT* **2008**, *41*, 951.
- [56] A. Toth, L. Praszna, *Flavour Frag. J.* **1998**, *13*, 196.
- [57] A. M. Committee, *Analyst* **1997**, *122*, 1167.
- [58] Y. Sun, A. Huang, R. Zhang, L. He, *J. Chromatogr. A* **1993**, *648*, 395.
- [59] C. Bicchi, A. Binello, A. D'Amato, P. Rubiolo, *J. Chromatogr. Sci.* **1999**, *37*, 288.
- [60] M.-F. Herent, V. de Bie, B. Tilquin, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2007**, *43*, 886.
- [61] R. P. Adams, *Identification of essential oil components by gas chromatography - mass spectrometry*, Allured Publ. Corporation, Carol Stream (Ill.), **2007**.
- [62] W. G. Jennings, T. Shibamoto, *Qualitative analysis of flavor and fragrance volatiles by glass capillary gas chromatography*, Academic Press, San Francisco, **1980**.
- [63] Sadtler Research Laboratories, *The Sadtler standard gas chromatography retention index library*, Sadtler Research Laboratories, Philadelphia Pa., **1985-1986**.
- [64] D. Joulain, W. A. König, *The atlas of spectral data of sesquiterpene hydrocarbons*, E.B.-Verlag, Hamburg, **1998**.
- [65] A. Terry, A. Heinrich, Flavournet and human odor space. <http://www.flavournet.org/> [2 April 2017].
- [66] R. Mottram, The LRI and Odour Database. <http://www.odour.org.uk/> [2 April 2017].
- [67] M. El Sayed, The pherobase: Database of pheromones and semiochemicals. <http://www.pherobase.com/database/kovats/kovats-index.php> [2 April 2017].
- [68] W. A. König, D. Joulain, D. Hochmuth, MassFinder-Terpenoids and Related Constituents of Essential Oils: Database of pheromones and semiochemicals. http://massfinder.com/wiki/Terpenoids_Library_List [2 April 2017].
- [69] A. Lake, The Flavor Database. http://www.crec.ifas.ufl.edu/crec_websites/Rouseff/# [2 April 2017].
- [70] NIST, WebBook de Chimie NIST : Base de données standard de référence NIST numéro 69. <http://webbook.nist.gov/chemistry/> [2 April 2017].
- [71] E. Cantergiani, Food Analysis: Flavour and Fragrance Database. <http://www.foodanalysis.ch/> [2 April 2017].
- [72] NIST, NIST Standard Reference Database 1A v14. <https://www.nist.gov/srd/nist-standard-reference-database-1a-v14> [2 April 2017].

- [73] Wiley, Wiley Registry of Mass Spectral Data, 11th Edition.
<http://eu.wiley.com/WileyCDA/WileyTitle/productCd-1119171016.html> [2 April 2017].
- [74] NIST, AMDIS: Automated Mass spectral Deconvolution and Identification System.
<http://chemdata.nist.gov/dokuwiki/doku.php?id=chemdata:amdis> [2 April 2017].
- [75] Shimadzu, GCMS Solution.
<http://www.ssi.shimadzu.com/products/product.cfm?product=gcmssolution>.
- [76] D. Hochmuth, MassFinder 4. http://massfinder.com/wiki/MassFinder_4 [2 April 2017].
- [77] Bio-Rad, KnowItAll UV-Vis Spectral Library. http://www.bio-rad.com/fr-fr/product/uv-vis-spectral-databases?pcp_loc=catprod [2 April 2017].
- [78] A. Noelle, G. K. Hartmann, A. Fahr, *UV/Vis+ Spectra Data Base, 11. Ausgabe: UV/Vis+ Photochemistry Database*, science-softCon, Maintal, **2017**.
- [79] A. P. Macmaster, N. Owen, S. Brussaux, H. Brevard, R. Hiserodt, H. Leijs, B. Weber, G. Loesing, A. Sherlock, C. Schippa, M. Vey, E. Frerot, E. Tissot, A. Chaintreau, *J. Chromatogr. A* **2012**, *1257*, 34.
- [80] E. Frérot, R. Decorzant, *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 6879.
- [81] Metlin: The original and most comprehensive database of MS/MS metabolite database.
https://metlin.scripps.edu/landing_page.php?pgcontent=mainPage [2 April 2017].
- [82] Matrix Science, Mascot database.
http://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=MIS [2 April 2017].
- [83] National Institute of Biomedical Innovation, Japan, MassBank. <http://www.massbank.jp/> [2 April 2017].
- [84] CSIR - Central Drug Research Institute, India, Tandem Mass Spectrum Database.
<http://www.tmsdatabase.org/> [2 April 2017].
- [85] H.-C. Liu, R. H. Liu, H.-O. Ho, D.-L. Lin, *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 9002.
- [86] M. Mezcuca, O. Malato, J. F. García-Reyes, A. Molina-Díaz, A. R. Fernández-Alba, *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 913.
- [87] X. Yang, P. Neta, S. E. Stein, *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 6393.
- [88] CE, *Official J. Eur. Comm.* **2002**, *L221/8*, 1.
- [89] Flavour and Fragrance Journal, Guidelines for authors.
[http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/\(ISSN\)1099-1026/homepage/ForAuthors.html](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/(ISSN)1099-1026/homepage/ForAuthors.html) [2 May 2017].
- [90] IOFI, *Flavour Frag. J.* **2011**, *26*, 297.
- [91] A. Chaintreau, D. Joulain, C. Marin, C. O. Schmidt, M. Vey, *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 6398.
- [92] AFNOR, *Analyse par chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire – Méthode générale*, **1985**.
- [93] W. A. Dietz, *J. G. C.* **1967**.
- [94] M. Bassereau, A. Chaintreau, S. Duperrex, D. Joulain, H. Leijs, G. Loesing, N. Owen, A. Sherlock, C. Schippa, P.-J. Thorel, M. Vey, *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 25.
- [95] A. Chaintreau, E. Cicchetti, N. David, A. Earls, P. Gimeno, B. Grimaud, D. Joulain, N. Kupfermann, G. Kuropka, F. Saltron, C. Schippa, *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218*, 7869.
- [96] P. Gimeno, A.-F. Maggio, C. Bousquet, A. Quoirez, C. Civade, P.-A. Bonnet, *J. Chromatogr. A* **2012**, *1253*, 144.
- [97] *ISO 5725-1. Application de la statistique, Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure, Partie 1 Principes généraux et définitions.*, **1994**.
- [98] *ISO 5725-2. Application de la statistique, Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure Partie 2 Méthodes de base pour la détermination de la répétabilité et de la reproductibilité d'une méthode de mesure normalisée.*, **1994**.
- [99] *ISO 5725-3. Application de la statistique, Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure Partie 3 Mesures intermédiaires de la fidélité d'une méthode de mesure normalisée.*, **1994**.
- [100] *ISO 5725-4. Application de la statistique, Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure Partie 4 Méthodes de base pour la détermination de la justesse d'une méthode de mesure normalisée.*, **1994**.

- [101] ISO 5725-5. *Application de la statistique, Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure Partie 5 Méthodes alternatives pour la détermination de la fidélité d'une méthode de mesure normalisée*, **1998**.
- [102] ISO 5725-6. *Application de la statistique, Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure Partie 5 Utilisation dans la pratique des valeurs d'exactitude.*, **1994**.
- [103] AFNOR, NF ISO 13528, *Méthodes statistiques utilisées dans les essais d'aptitude par comparaison interlaboratoire*, **2015**.
- [104] ICH, *Q2(R1)-Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*, **2005**.
- [105] Commission SFSTP, *STP Pharma-Pratiques* **2003**, 13(3).
- [106] ISO/IEC 17025:2005, *Prescriptions générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnage et d'essais.*, **2016**.
- [107] US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, *Guidance for Industry: Bioanalytical Methods Validation for Human Studies (Draft guidance).*, **1998**.
- [108] *Commission of the European Communities. SANCO. 2002/657/CEE.*
- [109] commission SFSTP, *STP Pharma-Pratiques* **2006**, 16(1).
- [110] P. Hubert, P. Chiap, J. Crommen, B. Boulanger, E. Chapuzet, N. Mercier, S. Bervoas-Martin, P. Chevalier, D. Grandjean, P. Lagorce, M. Lallier, M. C. Laparra, M. Laurentie, J. C. Nivet, *Anal. Chim. Acta* **1999**, 391, 135.
- [111] E. Rozet, S. Rudaz, R. D. Marini, E. Ziemons, B. Boulanger, P. Hubert, *Anal. Chim. Acta* **2011**, 702, 160.
- [112] Arlenda, e-noval. <https://www.qualilab.com/e-noval.html> [5 June 2017].
- [113] p. Hubert, NGuyen-Huu, J.J., Boulanger, B., *STP Pharma Pratiques* **2006**, 16(1), 30.
- [114] AFNOR, NF ISO 16269-6, *Interprétation statistique des données - Partie 6 détermination des intervalles statistiques de dispersion*, **2014**.
- [115] INRA, Modèles de classeur Excel pour le traitement des données de validation selon le profil d'exactitude. <https://www6.jouy.inra.fr/metarisk/Productions/Software-programs/Excel-templates/NF-V03-110> [25 March 2017].
- [116] USP, Pharmacopeial Forum (PF) 42(5). <http://www.usp.org/usp-nf/pharmacopeial-forum/pf-table-contents> [27 April 2017].
- [117] AFNOR, NF ISO 16269-8, *Interprétation statistique des données - Partie 8 détermination des intervalles de prévision*, **2004**.
- [118] H. Y. Tong, F. W. Karasek, *Anal. Chem.* **1984**, 56, 2124.
- [119] A. D. Jorgensen, K. C. Picel, V. C. Stamoudis, *Anal. Chem.* **1990**, 62, 683.
- [120] A. R. Katritzky, E. S. Ignatchenko, R. A. Barcock, V. S. Lobanov, M. Karelson, *Anal. Chem.* **1994**, 66, 1799.
- [121] G. Musumarra, D. Pisano, A. R. Katritzky, A. R. Lapucha, F. J. Luxem, R. Murugan, M. Siskin, G. Brons, *TCM* **1989**, 2, 17.
- [122] B. Lučić, N. Trinajstić, S. Sild, M. Karelson, A. R. Katritzky, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **1999**, 39, 610.
- [123] M. Jalali-Heravi, Z. Garkani-Nejad, *J. Chromatogr. A* **2002**, 950, 183.
- [124] R. Costa, B. d'Acampora Zellner, M. L. Crupi, M. R. de Fina, M. R. Valentino, P. Dugo, G. Dugo, L. Mondello, *Flavour Frag. J.* **2008**, 23, 40.
- [125] J. C. Sternberg, W. S. Gallaway, D. Jones, in *Gas Chromatography: Proceedings of the Third International Symposium on Gas Chromatography (1960)*.
- [126] J. T. Scanlon, D. E. Willis, *J. Chromatog. Sci.* **1985**, 23, 333.
- [127] S. Clementi, G. Savelli, M. Vergoni, *Chromatographia* **1972**, 5, 413.
- [128] U. Jorgensen, M. Hansen, L. P. Christensen, K. Jensen, K. Kaack, *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48, 2376.
- [129] F. W. Jones, *J. Chromatogr. Sci.* **1998**, 36, 223.
- [130] M. Kállai, Z. Veres, J. Balla, *Chromatographia* **2001**, 54, 511.
- [131] M. Kállai, V. Máté, J. Balla, *Chromatographia* **2003**, 57, 639.
- [132] C. Cao, P. Huo, *J. Chromatogr. Sci.* **2007**, 45, 360.

- [133] A. D. Becke, *Phys. Rev. A* **1988**, *38*, 3098.
- [134] C. Lee, W. Yang, R. G. Parr, *Phys. Rev. B* **1988**, *37*, 785.
- [135] K. Kurose, D. Okamura, M. Yatagai, *Flavour Frag. J.* **2007**, *22*, 10.
- [136] M. C. G. Vallejo, L. Moujir, J. Burillo, L. L. Guerra, M. González, R. D. Peñate, L. S. Andrés, J. G. Luis, F. L. Blanco, C. M. R. de Galarreta, *Flavour Frag. J.* **2006**, *21*, 277.
- [137] F. Benkaci-Ali, A. Baaliouamer, B. Y. Meklati, F. Chemat, *Flavour Frag. J.* **2007**, *22*, 148.
- [138] M. C. Diaz-Maroto, N. Castillo, L. Castro-Vazquez, M. A. Gonzalez-Vinas, M. Perez-Coello, *Flavour Frag. J.* **2007**, *22*, 114.
- [139] E. Cicchetti, P. Merle, A. Chaintreau, *Flavour Frag. J.* **2008**, *23*, 450.
- [140] A. El-Naggar, *Pet. Sci. Technol.* **2006**, *24*, 41.
- [141] M. Dressler, M. Cigánek, *J. Chromatogr. A* **1994**, *679*, 299.
- [142] I. Halasz, W. Schneider, *Anal. Chem.* **1961**, *33*, 978.
- [143] K. Grob, *Split and Splitless Injection for Quantitative Gas Chromatography*, Wiley-VCH, Hoboken, **2008**.
- [144] M. A. Goss, B. Rightnour, A Comparison of Liner Geometries and Their Effect on Gas Chromatographic Performance. <http://www.restek.com/pdfs/pres-2005-270-26p.pdf> [2 November 2017].
- [145] E. Tissot, S. Rochat, C. Debonneville, A. Chaintreau, *Flavour Frag. J.* **2012**, *27*, 290.
- [146] J.-Y. de Saint Laumer, S. Leocata, E. Tissot, L. Baroux, D. M. Kampf, P. Merle, A. Boschung, M. Seyfried, A. Chaintreau, *J. Sep. Sci.* **2015**, *38*, 3209.
- [147] J. B. Pedley, R. D. Naylor, S. P. Kirby, *Thermochemical data of organic compounds*, Chapman and Hall, London, New York, **1986**.
- [148] J.-Y. de Saint Laumer, E. Cicchetti, P. Merle, J. Egger, A. Chaintreau, *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 6457.
- [149] A. Chaintreau, E. Tissot, S. Rochat, (Eds: V. Ferreira, R. Lopez), Academic Press, **2014**, pp. 391–395.
- [150] E. Delort, A. Jaquier, C. Chapuis, M. Rubin, C. Starckenmann, *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 11681.
- [151] J.-J. Filippi, E. Belhassen, N. Baldovini, H. Brevard, U. J. Meierhenrich, *J. Chromatogr. A* **2013**, *1288*, 127.
- [152] R. Olcese, V. Carré, F. Aubriet, A. Dufour, *Energy Fuels* **2013**, *27*, 2135.
- [153] R. N. Olcese, G. Lardier, M. Bettahar, J. Ghanbaja, S. Fontana, V. Carre, F. Aubriet, D. Petitjean, A. Dufour, *ChemPlusChem* **2013**, *6*, 1490.
- [154] D. L. Dalluge, T. Daugaard, P. Johnston, N. Kuzhiyil, M. M. Wright, R. C. Brown, *Green Chem.* **2014**, *16*, 4144.
- [155] U. Neuenschwander, A. Negron, K. F. Jensen, *The journal of physical chemistry. A* **2013**, *117*, 4343.
- [156] M. J. Calandra, Y. Wang, J. Impellizzeri, S. Frank, J.-Y. de Saint Laumer, S. Leocata, A. Chaintreau, *Flavour Frag. J.* **2016**, *31*, 241.
- [157] T. Cachet, H. Brevard, A. Chaintreau, J. Demyttenaere, L. French, K. Gassenmeier, D. Joulain, T. Koenig, H. Leijts, P. Liddle, G. Loesing, M. Marchant, P. Merle, K. Saito, C. Schippa, F. Sekiya, T. Smith, *Flavour Frag. J.* **2016**, *31*, 191.
- [158] European Commission-SCCNFP, FRAGRANCE ALLERGY IN CONSUMERS. http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/sccp/documents/out98_en.pdf [1 October 2017].
- [159] European Commission- SCCP, Opinion on Atranol and Chloroatranol present in natural extracts (e.g. oak moss and tree moss extract). https://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_sccp/docs/sccp_o_006.pdf [1 October 2017].
- [160] European Commission- SCCP, Opinion on Furocoumarins in cosmetic products. http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_sccp/docs/sccp_o_036.pdf.
- [161] Commission Européenne, Règlement (CE) n o 1334/2008 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 relatif aux arômes et à certains ingrédients alimentaires possédant des propriétés aromatisantes qui sont destinés à être utilisés dans et sur les denrées alimentaires et modifiant le règlement (CEE) n o 1601/91 du Conseil, les règlements (CE) n o 2232/96 et (CE) n o 110/2008 et la directive 2000/13/CE (Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE) : OJ L 354. http://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/?uri=uriserv:OJ.L_.2008.354.01.0034.01.FRA&toc=OJ:L:2008:354:TOC.

- [162] B. R. Scott, M. A. Pathak, G. R. Mohn, *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology* **1976**, *39*, 29.
- [163] R. D. H. Murray, J. Méndez, S. A. Brown, *The natural coumarins: Occurrence, chemistry, and biochemistry*, Wiley, Chichester, New York, **1982**.
- [164] D. McHale, J. B. Sheridan, *J. Essent. Oil Res.* **1989**, *1*, 139.
- [165] M. Russo, G. Torre, C. Carnovale, I. Bonaccorsi, L. Mondello, P. Dugo, *J. Essent. Oil Res.* **2012**, *24*, 119.
- [166] W. Stanley, *Phytochem.* **1967**, *6*, 585.
- [167] S. Milesi, B. Massot, E. Gontier, F. Bourgaud, A. Guckert, *Plant Sci.* **2001**, *161*, 189.
- [168] IARC Working Group, 5-METHOXYPsorALEN (Group 2A): IARC MONOGRAPHS SUPPLEMENT 7. <https://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/suppl7/Suppl7-103.pdf> [28 January 2017].
- [169] IARC Working Group, 8-methoxypsoralen (methoxsalen) plus ultraviolet radiation (group 1): iarc monographs supplement 7. <https://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/suppl7/Suppl7-104.pdf> [28 January 2017].
- [170] Commission Européenne, *dix-huitième directive 95/34/CE de la commission du 10 juillet 1995 portant adaptation au progrès technique des annexes II, III, VI et VII de la directive 76/768/CEE du Conseil concernant le rapprochement des législations des États membres relatives aux produits cosmétiques*, **1995**.
- [171] Official Journal of the European Union, Regulation (EC) N°1223/2009 on cosmetic products, 30 November **2009**
- [172] European commission-health & consumer protection directorate-general, *Opinion of the Scientific Committee on Consumer Products on furocoumarins in cosmetic products: SCCP/0942/05*, **2005**.
- [173] IFRA, Information Letter 799: Update on the Policy for controlling furocoumarin presence in citrus oils and other essential oils. http://www.ifraorg.org/view_document_annex.aspx?annexId=21170 [28 January 2017].
- [174] 48th Amendment IFRA STANDARD: Citrus oils and other furocoumarins containing essential oils. www.ifraorg.org/%2Fview_document.aspx%3FdocId%3D23615&usg=AFQjCNFFPCmRFYQOXsGnKG9BmMlbDOFO0g&sig2=RfIHej-V1WHWW1SgQW84aA&cad=rja [28 January 2017].
- [175] E. Frerot, E. Decorzant, *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 6879.
- [176] J. C. Beolor, J. Masson, A. Casazza, H. Brevard, *An UPLC-MS/MS method for the quantification of furocoumarins Comparison with classical methods - Poster at the 41st International Symposium on Essential Oils (ISEO2010) - Wroclaw (Poland), September 5–8, 2010*.
- [177] I. L. Bonaccorsi, H. M. McNair, L. A. Brunner, P. Dugo, G. Dugo, *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 4237.
- [178] C. K. Shu, J. P. Walradt, W. I. Taylor, *J. Chromatogr.* **1975**, *106*, 271.
- [179] M. Russo, I. Bonaccorsi, R. Costa, A. Trozzi, P. Dugo, L. Mondello, *J. Essent. Oil Res.* **2015**, *27*, 307.
- [180] A. P. Macmaster, N. Owen, S. Brussaux, H. Brevard, R. Hiserodt, H. Leijns, N. Bast, B. Weber, G. Loesing, A. Sherlock, C. Schippa, M. Vey, E. Frerot, E. Tissot, A. Chaintreau, *J. Chromatogr. A* **2012**, *1257*, 34.
- [181] Y.-x. Chang, Q.-H. Zhang, J. Li, L. Zhang, X.-r. Guo, J. He, P. Zhang, L. Ma, Y.-r. Deng, B.-l. Zhang, X.-M. Gao, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2013**, *77*, 71.
- [182] H. Zhang, C. Gong, L. Lv, Y. Xu, L. Zhao, Z. Zhu, Y. Chai, G. Zhang, *RCM* **2009**, *23*, 2167.
- [183] Y. Zhang, H. Xu, X. Chen, C. Chen, H. Wang, F. Meng, H. Yang, L. Huang, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2011**, *56*, 497.
- [184] X. Zheng, X. Zhang, X. Sheng, Z. Yuan, W. Yang, Q. Wang, L. Zhang, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2010**, *51*, 599.
- [185] W. Yang, C. Feng, D. Kong, X. Shi, X. Zheng, Y. Cui, M. Liu, L. Zhang, Q. Wang, *Food Chem.* **2010**, *120*, 886.
- [186] D.-Q. Tang, X.-X. Zheng, X. Chen, D.-Z. Yang, Q. Du, *JPA*. **2014**, *4*, 96.

- [187] J. Regueiro, A. Vallverdu-Queralt, N. Negreira, J. Simal-Gandara, R. M. Lamuela-Raventos, *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 2134.
- [188] R. Hiserodt, L. Chen, in *Recent Advances in the Analysis of Food and Flavors*, Vol. 1098, (Eds: S. Toth, C. Mussinan), American Chemical Society, Washington, DC, **2012**, pp. 71–88.
- [189] H. Prosen, D. Kočar, *Flavour Fragr. J.* **2008**, *23*, 263.
- [190] J. A. Mathey, K. Myung, S. Mertens-Talcott, H. Derendorf, V. Butterweck, W. W. Widmer, *Proc. Fla. State Hort. Soc.* **2006**, *119*, 361.
- [191] A. Dugrand, A. Olry, T. Duval, A. Hehn, Y. Froelicher, F. Bourgaud, *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 10677.
- [192] W. Yang, M. Ye, M. Liu, D. Kong, R. Shi, X. Shi, K. Zhang, Q. Wang, Z. Lantong, *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217*, 4587.
- [193] R. Hiserodt, L. Chen, in *Recent Advances in the Analysis of Food and Flavors*, Vol. 1098, (Eds: S. Toth, C. Mussinan), American Chemical Society, Washington, DC, **2012**, pp. 71–88.
- [194] W. D. Seo, J. Y. Kim, H. W. Ryu, J. H. Kim, S.-I. Han, J.-E. Ra, K. H. Seo, K. C. Jang, J. H. Lee, *Journal of Functional Foods* **2013**, *5*, 1421.
- [195] E. Corbi, C. Pérès, N. David, *Flavour Fragr. J.* **2014**, *29*, 173.
- [196] J. Masson, E. Liberto, J.-C. Beolor, H. Brevard, C. Bicchi, P. Rubiolo, *Food Chem.* **2016**, *206*, 223.
- [197] ICH, Q2(R1) Validation des méthodes d'analyse : Texte et méthodologie. <http://www.hc-sc.gc.ca/dhp-mps/prodpharma/applic-demande/guide-ld/ich/qual/q2r1-fra.php> [28 January 2017].
- [198] Université de Genève (Suisse), HPLC Calculator V.3. <https://epgl.unige.ch/labs/fanal/hplc-calculator> [3 March 2017].
- [199] Shimadzu, Separation Conditions 1 Fundamentals of a First-Choice Mobile Phase. <http://www.shimadzu.com/an/lcms/support/lib/lctalk/60/60lab.html>.
- [200] Agilent, *Agilent 5600 series Q-TOF LC/MS techniques and operation for Small molecules- Course N° R1904A, Volume I, student Manual*, **2016**.
- [201] W. Steck, B. K. Bailey, *Can. J. Chem.* **1969**, *47*, 2425.
- [202] D. L. Dreyer, *J. Org. Chem.* **1970**, *35*, 2294.
- [203] W. L. Stanley, S. H. Vannier, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 3488.
- [204] G. Kavli, J. Raa, B. E. Johnson, G. Volden, S. Haugsbø, *Contact Dermat.* **1983**, *9*, 257.
- [205] f. T, c. Kizilay, k. Erol, f. Kilic, m. Kurkcuoglu, k. Canbaser, *Food Chem.* **2008**, *107*, 990.
- [206] R. Kumar, S. K. Banerjee, K. L. Handa, *Planta Med.* **1976**, *30*, 291.
- [207] F. Begnaud, A. Chaintreau, *Phil. Trans. R. Soc. A* **2016**, *374*.
- [208] L. Ciesla, A. Bogucka-Kocka, M. Hajnos, A. Petruczynik, M. Waksmundzka-Hajnos, *J. Chromatogr. A* **2008**, *1207*, 160.
- [209] M. Waksmundzka-Hajnos, A. Petruczynik, M. L. Hajnos, T. Tuzimski, A. Hawryl, A. Bogucka-Kocka, *J. Chromatogr. Sci.* **2006**, *44*, 510.
- [210] S. K. Chaudhary, O. Ceska, C. Tetu, P. J. Warrington, M. J. Ashwood-Smith, G. A. Poulton, *Planta Med.* **1986**, DOI:10.1055/s-2007-969254.
- [211] Ł. Cieśla, A. Petruczynik, M. Hajnos, A. Bogucka-Kocka, M. Waksmundzka-Hajnos, *J. Planar. Chromatogr. - Mod. TLC.* **2008**, *21*, 237.
- [212] L. Cieśla, A. Petruczynik, M. Hajnos, A. Bogucka-Kocka, M. Waksmundzka-Hajnos, *J. Planar. Chromatogr. - Mod. TLC.* **2008**, *21*, 447.
- [213] G.-S. Qian, Q. Wang, K. S.-Y. Leung, Y. Qin, Z. Zhao, Z.-H. Jiang, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2007**, *44*, 812.
- [214] T. Wawrzynowicz, M. Waksmundzka-Hajnos, M. L. Bieganowska, *Chromatographia* **1989**, *28*, 161.
- [215] khushboo.
- [216] E. M. Murphy, L. Nahar, M. Byres, M. Shoeb, M. Siakalima, M. Mukhlesur Rahman, A. I. Gray, S. D. Sarker, *Biochem. Syst. Ecol.* **2004**, *32*, 203.
- [217] S. Nyiredy, K. Dallenbach-Toelke, G. C. Zogg, O. Sticher, *J. Chromatogr. A* **1990**, *499*, 453.
- [218] A. K. S. Rawat, A. P. Singh, D. P. Singh, M. M. Pandey, R. Govindarajan, S. Srivastava, *J. Chem.* **2013**, *2013*, 1.

- [219] A. Chlouchi, F. Muyard, C. Girard, P. G. Waterman, F. Bévalot, *Biochem. Syst. Ecol.* **2005**, *33*, 967.
- [220] N. R. Guz, P. Lorenz, F. R. Stermitz, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 6491.
- [221] I.-S. Chen, C.-T. Chang, W.-S. Sheen, C.-M. Teng, I.-L. Tsai, C.-Y. Duh, F.-N. Ko, *Phytochem.* **1996**, *41*, 525.
- [222] E. Hahn-Deinstrop, *Applied thin-layer chromatography: Best practice and avoidance of mistakes*, Wiley-VCH, Weinheim, **2007**.
- [223] E. Reich, A. Schibli, *J. Planar. Chromatogr. - Mod. TLC.* **2004**, *17*, 438.
- [224] P. Sah, D. Agarwal, S. P. Garg, *Indian J Pharm Sci* **2006**, *68*, 768.
- [225] ISO/IEC Guide 43-1:1997, *Proficiency testing by interlaboratory comparisons: Part 1: Development and operation of proficiency testing schemes.*, **1997**.
- [226] European Commission, directive 2003/15/EC of the European parliament and of the council of 27 February 2003 amending Council Directive 76/768/EEC on the approximation of the laws of the Member States relating to cosmetic products. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2003:066:0026:0035:en:PDF> [28 January 2017].
- [227] IFRA, analytical procedure: GC/MS Quantitation of potential fragrance allergens in fragrance compounds. http://www.ifraorg.org/view_document.aspx?docId=22183 [28 January 2017].
- [228] D. Joulain, R. Tabacchi, *Flavour Frag. J.* **2009**, *24*, 49.
- [229] D. Joulain, R. Tabacchi, *Flavour Frag. J.* **2009**, *24*, 105.
- [230] European Commission- SCCP, Opinion on Oak moss / Tree moss (sensitisation only). http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_sccp/docs/sccp_o_131.pdf [28 January 2017].
- [231] IFRA, Treemoss and oakmoss extracts. <http://www.ifraorg.org/en-us/standards-library/s/moss> [28 January 2017].
- [232] PRODAROM, *Application note from Prodarom - 2012 06 Dosage de l'atranol et du chloratranol dans les extraits de lichens d'arbre et de chêne par LC-UV.*, **2012**.
- [233] R. Bossi, S. C. Rastogi, G. Bernard, E. Gimenez-Arnau, J. D. Johansen, J.-P. Lepoittevin, T. Menne, *J. Sep. Sci.* **2004**, *27*, 537.
- [234] S. C. Rastogi, R. Bossi, J. D. Johansen, T. Menne, G. Bernard, E. Gimenez-Arnau, J.-P. Lepoittevin, *Contact Dermat.* **2004**, *50*, 367.
- [235] P. e. a. Hubert, *STP Pharma Pratiques* **2003**, *13(3)*, 101.
- [236] European Commission-CEN, *Methods for analysis of allergens — Quantification of suspected fragrance allergens in consumer products — Step 1: GC analysis of ready-to-inject sample*, **2012**.
- [237] A. Krueve, I. Leito, K. Herodes, *Anal. Chim. Acta* **2009**, *651*, 75.
- [238] SCCS, *SCCS/1459/11 OPINION on Fragrance allergens in cosmetic products*, **2011**.
- [239] IFRA, *Information Letter 1029: IFRA presents the analytical method to quantify 57 suspected allergens (and isomers) in ready to inject fragrance materials by gas chromatography and mass spectrometry*, **2016**.
- [240] IFRA, analytical method to quantify 57 suspected allergens (and isomers) in ready to inject fragrance materials by gas chromatography and mass spectrometry. <http://www.ifraorg.org/en-us/library#.WO3fG2nyiUm> [4 December 2017].
- [241] C. Debonneville, A. Chaintreau, *J. Chromatogr. A* **2004**, *1027*, 109.
- [242] A. Rey, E. Corbi, C. Peres, N. David, *J. Chromatogr. A* **2015**, *1404*, 95.
- [243] E. Belhassen, *Routine simultaneous quantification of 61 allergens in fragrance raw materials by a GCxGC-qMS method.*, Oral presentation at the 47st International Symposium on Essential Oils (ISEO 2016) -Nice (France), September 12-14, **2016**.
- [244] T. Dutriez, *Implementation of a global program for the quantification of the extended list of suspected allergens and regulated compounds in fragrance materials, including essential oils by GCxGC TOF- MS.*, Oral presentation at the 47st International Symposium on Essential Oils (ISEO 2016) -Nice (France), September 12-14, **2016**.
- [245] S. Kinani, S. Bouchonnet, A. Magne, *Spectra Analyse* **2006**.
- [246] N. Barat, *Développement de méthodes analytiques pour l'étude d'extraits aromatiques naturels et de compositions parfumantes : Analyse quantitative de substances suspectées allergisantes.*, Thèse, Université de Corse, **2017**.

- [247] Waters, Fast Analysis of Cosmetic Allergens Using Ultra Performance Convergence Chromatography (UPC2) with MS Detection. http://www.waters.com/waters/library.htm?cid=134864377&lid=134878656&locale=fr_FR [3 February 2017].
- [248] Commission Européenne, G/TBT/N/EU/436- Projet de règlement (UE) de la Commission modifiant l'annexe II du Règlement (CE) n° 1223/2009 du Parlement européen et du Conseil relatif aux produits cosmétiques. http://ec.europa.eu/growth/tools-databases/tbt/fr/search/?tbtaction=search.detail&Country_id=EU&num=436&dspLang=FR&basdateb=&basdatefin=&baspays=HUN&basnotifnum=30&basnotifnum2=&bastypepays=&baskeywords=&CFID=491586&CFTOKEN=3ebd9568229a6629-53B6696D-9D06-E86E-69B4EB56CB23C267 [1 October 2017].
- [249] European Parliament and the Council on cosmetic products, *Annex II to Regulation (EC) No 1223/2009*, **2009**.
- [250] IFRA, IFRA-PRODAROM LC-MS Analytical method for quantification of atranol and chloratranol in moss extracts. <http://www.ifraorg.org/en-us/library#.WO3fG2nyiUm> [4 December 2017].
- [251] AFNOR, NF T 75-006, *Matières premières aromatiques naturelles — Vocabulaire*, **2013**.
- [252] AFNOR, NF T 75-006, *Matières premières aromatiques naturelles — Vocabulaire, Rectificatif technique 1*, **2014**.
- [253] Commission Européenne, *Directive Européenne n°88-388*, **1988**.
- [254] IFRA, *IL 737-Guidance to "Green" Fragrance terminology*, **2005**.
- [255] A. Muheim, K. Lerch, *Applied Microbiology and Biotechnology* **1999**, 51, 456.
- [256] S Ramachandra Rao and GA Ravishankar, *J Sci Food Agric* **2000**, 80, 289.
- [257] K. Gassenmeier, B. Riesen, B. Magyar, *Flavour Fragr. J.* **2008**, 23, 194.
- [258] ISO 5565-1, *Vanilla [Vanilla fragrans(Salisbury) Ames] — Part 1 : Specification*, **1999**.
- [259] F. Saltron, C. Langella, M. Guerere, *Ann. Fals. Exp. Chim.* **2002**, 95(961), 419.
- [260] F. Saltron, C. Langella, M. Guerere, *Ann. Fals. Exp. Chim.* **2002**, 95(958), 79.
- [261] Triskelion B.V., VCF Volatile Compounds in Food 9.2. <http://www.vcf-online.nl> [3 January 2007].
- [262] N. J. Walton, M. J. Mayer, A. Narbad, *Phytochem.* **2003**, 63, 505.
- [263] S.-M. Kang, H.-Y. Jung, Y.-M. Kang, J.-Y. Min, C. S. Karigar, J.-K. Yang, S.-W. Kim, Y.-R. Ha, S.-H. Lee, M.-S. Choi, *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 3449.
- [264] K. Li, J. W. Frost, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 10545.
- [265] B. Anand, N. Gupta, *Indian J. Chem.* **2011**.
- [266] DGCCRF Marseille, Les arômes dans les glaces et crèmes glacées. <http://www.minefi.gouv.fr/htm> [3 January 2008].
- [267] A. S. Charvet, M. Derbesy, *Ann. Fals. Exp. Chim.* **2001**, 94(954), 79.
- [268] N. Arnaud, J. C. Bayle, M. Derbesy, *Parfums, Cosmétiques, Arômes* **1983**, 53, 99-101.
- [269] M. Derbesy, *Parfums, Cosmétiques, Arômes* **1989**, 87, 77.
- [270] E. Jagerdeo, E. Passeth, Dugar S.M., *J. AOAC Int.* **2000**, 83(1), 237-240.
- [271] B. Fayet, C. Tisse, M. Guerere, J. Estienne, *Analisis* **1987**, 15(5), 217.
- [272] A. Scharrer, A. Mosandl, *Deut. Lebensm. Rundsch.* **2001**, 97, 449.
- [273] Arvind S. Ranadive, *J. Agric. Food Chem.* **1992**, 1002(40), 1922.
- [274] A. Kaunzinger, D. Juchelka, A. Mosandl, *J. Agric. Food Chem.* **1997**, 45, 1752.
- [275] J. Bricout, J. Koziat, *Labo-Pharma-Problèmes et Techniques* **1980**, 299, 490.
- [276] C. Langella, F. Saltron, M. Guerere, *Ann. Fals. Exp. Chim.* **2003**, 96(962), 73.
- [277] B. Fayet, M. Derbesy, M. Guerere, *Analisis* **1996**, 24, 398.
- [278] G. J. Martin, "Tracking back the origin of vanilla by SNIF-NMR," pp. 509–527, **1996**.
- [279] G. S. Remaud, Y. L. Martin, G. G. Martin, G. J. Martin, *J. Agric. Food Chem.* **1997**, 45, 859.
- [280] E. Jamin, F. Martin, G. J. Martin, *J. AOAC Int.* **2007**, 90(1), 187.
- [281] E. Caytan, E. P. Botosoa, V. Silvestre, R. J. Robins, S. Akoka, G. S. Remaud, *Anal. Chem.* **2007**, 79, 8266.
- [282] E. P. Botosoa, E. Caytan, V. Silvestre, R. J. Robins, S. Akoka, G. S. Remaud, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 414.

- [283] AOAC International, *Official method 960.37- Plant material (Foreign) in vanilla extract*, **2005**, 36.2.19.
- [284] A. Herrmann, M. Stockli, *J. Chromatogr.* **1982**, 246, 313.
- [285] J. Bricout, J. C. Fontes, L. Merlivat, *J. AOAC Int.* **1974**, 57(3), 713.
- [286] A. Scharrer, A. Mosandl, *Deut. Lebensm. Rundsch.* **2002**, 98, 117-121.
- [287] ISO, *Vanilla [Vanilla fragrans(Salisbury) Ames] — Part 2: Test methods*, **1999**.
- [288] R. Fellous, G. George, C. Schippa, *Parfums, Cosmétiques, Arômes* **1992**, 106, 95.
- [289] B. E. Richter, B. A. Jones, J. L. Ezzell, N. L. Porter, N. Avdalovic, C. Pohl, *Anal. Chem.* **1996**, 68, 1033.
- [290] U. K. Sharma, N. Sharma, A. P. Gupta, V. Kumar, A. K. Sinha, *J. Sep. Sci.* **2007**, 30, 3174.
- [291] K. Nguyen, *J. Supercrit. Fluids.* **1991**, 4, 40.
- [292] A. Longares-Patron, M. P. Canizares-Marcias, *Talanta* **2006**, 69, 882.
- [293] A. Sharma, S. C. Verma, N. Saxena, N. Chadda, N. P. Singh, A. K. Sinha, *J. Sep. Sci.* **2006**, 29, 613.
- [294] C. Valdez-Flores, M. Canizares-Macias, *Food Chem.* **2007**, 105, 1201.
- [295] G. E. Martin, F. C. Alfonso, D. M. Figert, J. M. Burggraff, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1981**, 64(5), 1149.
- [296] G. Lamprecht, F. Pichlmayer, E. R. Schmid, *J. Agric. Food Chem.* **1994**, 42, 1722.
- [297] D. A. Krueger, H. W. Krueger, *J. Agric. Food Chem.* **1983**, 31, 1265.
- [298] P. A. Guarino, *J. AOAC Int.* **1982**, 65(4), 835.
- [299] M. C. Boyce, P. R. Haddad, T. Sostaric, *Anal. Chim. Acta* **2003**, 485, 179.
- [300] T. Sostaric, M. C. Boyce, E. E. Spickett, *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48, 5802.
- [301] L. S. de Jager, G. A. Perfetti, G. W. Diachenko, *J. Chromatogr. A* **2007**, 1145, 83.
- [302] R. D. Thompson, T. J. Hoffman, *J. Chromatogr.* **1988**, 438, 369.
- [303] L. S. de Jager, G. A. Perfetti, G. W. Diachenko, *Food Chem.* **2008**, 107, 1701.
- [304] M. Meili, H. Chaverdon, *Ann. Fals. Exp. Chim.* **1976**, 69(746), 745.
- [305] G. E. Martin, M. W. Ethridge, F. E. Kaiser, *J. Food Sci.* **1977**, 42(6), 1580.
- [306] J. C. Lhuguenot, B. F. Maume, C. Baron, *Chromatographia* **1971**, 4, 204-208.
- [307] A. Pérez-Silva, E. Odoux, P. Brat, F. Ribeyre, G. Rodriguez-Jimenes, V. Robles-Olvera, M. A. García-Alvarado, Z. Günata, *Food Chem.* **2006**, 99, 728.
- [308] Commission of the European communities, *commission regulation (EC) No 1459/98 of 8 July 1998 establishing a reference method for the determination of vanillin in concentrated butter, butter or cream*, **1998**.
- [309] T. V. John, E. Jamin, *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52, 7644.
- [310] A. K. Sinha, S. C. Verma, U. K. Sharma, *J. Sep. Sci.* **2007**, 30, 15.
- [311] Z. Spacil, L. Novakova, P. Solich, *Talanta* **2008**, 76, 189.
- [312] J. C. Bayle, M. Derbesy, *Parfums, Cosmétiques, Arômes* **1982**, 47, 71-73.
- [313] République Française- Ministère de l'économie des finances et de l'industrie, *Note d'information n°2003-61*, **2003**.
- [314] République Française- Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la qualité et de la sécurité, *Note de service N° 5387*, **1988**.
- [315] IOFI, *Information Letter 1271- Authenticity of natural vanilla products*, **2000**.
- [316] IOFI, *Information Letter 1323*, **2005**.
- [317] J. Bricout, J. Koziat, *Ann. Fals. Exp. Chim.* **1976**, 69(747), 845.
- [318] G. S. Remaud, S. Akoka, *Flavour Fragr. J.* **2016**, DOI:10.1002/ffj.3366.
- [319] P. G. Hoffman, M. Salb, *J. Agric. Food Chem.* **1979**, 27, 352.
- [320] R. Baudler, L. Adam, A. Rossmann, G. Versini, K.-H. Engel, *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54, 864.
- [321] C. Monsallier-Bitea, E. Jamin, M. Lees, B.-L. Zhang, G. J. Martin, *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54, 279.
- [322] S. Dautraix, K. Gerola, R. Guilluy, J.-L. Brazier, A. Chateau, E. Guichard, P. Etievant, *J. Agric. Food Chem.* **1995**, 43, 981.
- [323] J. R. Gat, *Annu. Rev. Earth Planet. Sci.* **1996**, 24, 225.

- [324] T. B. Coplen, J. K. Böhlke, P. de Bièvre, T. Ding, N. E. Holden, J. A. Hopple, H. R. Krouse, A. Lamberty, H. S. Peiser, K. Revesz, S. E. Rieder, K. J. R. Rosman, E. Roth, P. D. P. Taylor, R. D. Vocke, Y. K. Xiao, *Pure Appl. Chem.* **2002**, *74*.
- [325] C. Maubert, C. Guérin, F. Mabon, G. J. Martin, *Analisis* **1988**, *16(8)*.
- [326] J. Koziat, *Analisis* **1992**, *20(7)*, 42.
- [327] A. L. Sessions, *J. Sep. Sci.* **2006**, *29*, 1946.
- [328] R. A. Culp, J. E. Noakes, *J. Agric. Food Chem.* **1992**, *40*, 1892.
- [329] J. Bricout, J. Koziat, M. Derbesy, B. Beccat, *Ann. Fals. Exp. Chim.* **1981**, *74(803)*, 691.
- [330] O. Breas, F. Fourel, G. J. Martin, *Analisis* **1994**, *22*, 268.
- [331] F. F. Bensaid, K. Wietzerbin, G. J. Martin, *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 6271.
- [332] D. A. Krueger, H. W. Krueger, *J. Agric. Food Chem.* **1985**, *33(3)*, 323.
- [333] E. J. Tenailleau, P. Lancelin, R. J. Robins, S. Akoka, *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 7782.
- [334] M. Derbesy, C. Troney, J. C. Bayle, *Parfums, Cosmétiques, Arômes* **1982**, *43*, 73.
- [335] S. D. Kelly, I. G. Parker, M. Sharman, M. J. Dennis, *J. Mass Spectrom.* **1998**, *33*, 735.
- [336] G. Fronza, C. Fuganti, S. Serra, A. Burke, C. Guillou, F. Reniero, *HCA* **2001**, *84*, 351.
- [337] J. Koziat, *J. Mass Spectrom.* **1997**, *32*, 103.
- [338] A. Gilbert, R. Hattori, V. Silvestre, N. Wasano, S. Akoka, S. Hirano, K. Yamada, N. Yoshida, G. S. Remaud, *Talanta* **2012**, *99*, 1035.
- [339] AOAC International, *Site-specific deuterium/hydrogen (D/H) ratios*, **2006**.
- [340] E. J. Tenailleau, *Développement de la RMN quantitative du carbone 13 en abondance naturelle*, thèse, Université de Nantes, **2005**.
- [341] E. Tenailleau, S. Akoka, *J. Magn. Reson. (San Diego, Calif. 1997)* **2007**, *185*, 50.
- [342] E. Cicchetti, A. Chaintreau, *J. Sep. Sci.* **2009**, *32*, 3043.
- [343] A. K. Sinha, S. C. Verma, U. K. Sharma, *J. Sep. Sci.* **2007**, *30*, 15.
- [344] A. Sharma, S. C. Verma, N. Saxena, N. Chadda, N. P. Singh, A. K. Sinha, *J. Sep. Sci.* **2006**, *29*, 613.
- [345] E. Cicchetti, A. Chaintreau, *J. Sep. Sci.* **2009**, *32*, 1957.
- [346] A. Brachet, A. Chaintreau, *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 3045.
- [347] Commission européenne- (EC) No 175/1999, *Reference method for the determination of vanillin in concentrated butter, butter or cream amended by Commission Regulation*.
- [348] B. Fayet, C. Fraysse, C. Tisse, I. Pouliquen, M. Guerere, G. Lesgards, *Analisis* **1995**, *23*, 451.
- [349] M. Chevalier, Y. Prat, P. Navellier, *Ann. Fals. Exp. Chim.* **1972**.
- [350] M. Ohashi, H. Omae, M. Hashida, Y. Sowa, S. Imai, *J. Chromatogr. A* **2007**, *1138*, 262.
- [351] B. Ramaroson-Raonizafinimanana, E. M. Gaydou, I. Bombarda, *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 4739.
- [352] E. P. Botosoa, *Protocoles analytiques pour l'étude de la vanilline par RMN 13C isotopique en abondance naturelle- reproductibilité méthodologique, purification, origines du fractionnement isotopique*, thèse, Université de Nantes, **2008**.
- [353] DGCCRF Marseille, Contrôle des glaces et confiseries. <http://www.economie.gouv.fr/dgccrf/Consommation/Etiquetage-des-produits/Contrôle-des-glaces-et-confiseries> [11 August 2016].
- [354] CAMAG, *Présentation PowerPoint CPC-TMB- Application*, Grasse, **2012**.
- [355] L. Schipilliti, I. L. Bonaccorsi, L. Mondello, *Flavour Fragr. J.* **2017**, *32*, 85.
- [356] M. J. Paula Hong, P. Mc Conville, Authentication of Vanilla Extracts by Convergence Chromatography. <http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720004701en.pdf> [1 April 2017].
- [357] A. Dalmia, Rapid Detection of Vanilla Bean Extract Bean Extract with No Chromatography or sample Preparation. http://www.perkinelmer.com.cn/CMSResources/Images/46-152543APP_Vanilla-Adult-Tonka-Bean.pdf [1 April 2017].
- [358] J. Masson, *UHPLC-MS studies on the characterization of complex semi-volatile fractions from matrices of vegetal origin*, thèse, Université de Turin, **2015**.
- [359] K. Bayle, M. Julien, G. S. Remaud, S. Akoka, *J. Magn. Reson.* **2015**, *259*, 121.

- [360] K. Bayle, M. Grand, A. Chaintreau, R. J. Robins, W. Fieber, H. Sommer, S. Akoka, G. S. Remaud, *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 7550.
- [361] T. Jezequel, V. Joubert, P. Giraudeau, G. S. Remaud, S. Akoka, *MRC* **2016**, DOI:10.1002/mrc.4548.
- [362] F. Ullrich, W. Grosch, *Z. Lebensm. -Unters. Forsch.* **1987**, *184*, 277.
- [363] T. E. Acree, J. Barnard, D. G. Cunningham, *Food Chem.* **1984**, *14*, 273.
- [364] P. X. Etievant, G. Callement, D. Langlois, S. Issanchou, N. Coquibus, *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 1673.
- [365] J. Linssen, J. Janssens, J. P. Roozen, M. A. Posthumus, *Food Chem.* **1993**, *46*, 367.
- [366] P. Pollien, A. Ott, F. Montigon, M. Baumgartner, R. Munoz-Box, A. Chaintreau, *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 2630.
- [367] C. M. Delahunty, G. Eyres, J.-P. Dufour, *J. Sep. Sci.* **2006**, *29*, 2107.
- [368] S. van Ruth, E. Boscaini, D. Mayr, J. Pugh, M. A. Posthumus, *Int. J. Mass Spec.* **2003**, *223-224*, 55.
- [369] A. Villière, S. Le Roy, C. Fillonneau, F. Guillet, H. Falquerho, S. Boussey, C. Prost, *Flavour* **2015**, *4*, 764.
- [370] J.-L. Berdague, P. Tournayre, S. Cambou, *J. Chromatogr. A* **2007**, *1146*, 85.
- [371] J. Gerretzen, L. M. Buydens, A. O. van den Tromp – Beukel, E. Koussissi, E. R. Brouwer, J. J. Jansen, E. Szymańska, *Chemometr. Intell. Lab.* **2015**, *146*, 290.
- [372] A. N. Gilbert, A. J. Fridlund, L. A. Lucchina, *Food Qual Prefer.* **2016**, *52*, 203.
- [373] G. Morrot, F. Brochet, D. Dubourdiou, *Brain Lang.* **2001**, *79*, 309.
- [374] J. Ballester, H. Abdi, J. Langlois, D. Peyron, D. Valentin, *Chem. Percept.* **2009**, *2*, 203.
- [375] E. Frerot, A. Bagnoud, E. Cicchetti, *ChemPlusChem* **2014**, *79*, 77.
- [376] R. Schneider, Y. Kotseridis, J.-L. Ray, C. Augier, R. Baumes, *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 3243.
- [377] T. Tominaga, D. Dubourdiou, M.-L. Murat, *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 1044.
- [378] E. Frerot, N. Neirynek, I. Cayeux, Y. H.-J. Yuan, Y.-M. Yuan, *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 7161.
- [379] Givaudan, Active Beauty. <https://www.givaudan.com/fragrances/active-beauty> [24 April 2017].
- [380] Robertet, Division Actifs. <https://www.robertet.com/nos-expertises/actifs/> [24 April 2017].
- [381] R. Laville, E. Cicchetti, L. Duroure, S. Garnier, G. Manzone, J. Borsotto, Patent WO2015104484A1
- [382] E. Cicchetti, L. Duroure, M. Perez, L. Sizaire, C. Vasseur, *Flavour Fragr. J.* **2017**, *32* (5), 317
- [383] E. Cicchetti, P. Merle, JY. St Laumer, A. Chaintreau, *Quantitation in gas chromatography: usual practices and performances of a relative response factor (RRF) database - Poster at the 39st International Symposium on Essential Oils (ISEO 2008) -Quedlinburg (Germany), September 7-10 2008.*
- [384] L. Duroure, T. Bertrand, L. Sizaire, E. Cicchetti, *Validated UHPLC-MS QqQ method for the quantification of selected furocoumarins - Poster at the 47st International Symposium on Essential Oils (ISEO 2016) -Nice (France), September 12-14, 2016.*
- [385] E. Le Borgne, T. Bertrand, E. Cicchetti, *Qualitative and quantitative analysis of selected furocoumarins by HPTLC in essential oils - Poster at the 47st International Symposium on Essential Oils (ISEO 2016) -Nice (France), September 12-14, 2016.*
- [386] E. Le Borgne, T. Bertrand, E. Cicchetti, *Flavour Fragr. J.* **2017**, *32*(5), 330
- [387] PRODAROM, *Inter-laboratory validation of a LC/MS method for atranol and chloroatranol quantification in moss extracts: preliminary results - Poster at the 47st International Symposium on Essential Oils (ISEO 2016) -Nice (France), September 12-14, 2016.*
- [388] E. Cicchetti, A. Chaintreau, *Flavour Fragr. J.* **2010**, *25*, 463.
- [389] E. Cicchetti, C. Vasseur, *Critical comparison of selected olfactometric methods for the determination of impact odorants in essential oils: application to Timur - Poster at the 47st International Symposium on Essential Oils (ISEO 2016) -Nice (France), September 12-14, 2016.*
- [390] E. Cicchetti, C. Vasseur, *Flavour Fragr. J.* **2017**, doi. 10.1002/ffj.3426
- [391] Y. Maestro, R. Laville, E. Cicchetti, L. Sizaire, M. Debierre, S. Garnier, G. Manzone, et al. *Extraction, characterization and cosmetic potential uses of a waste product in food production: calyces of physalis peruviana - Poster at the 28st Symposium of International Federation of Societies of Cosmetic Chemists (IFSCC 2014) -Paris (France), October 27-23, 2014*

- [392] E. Cicchetti, L. Duroure, M. Perez, L. Sizaïre, C. Vasseur, *Volatile composition of the essential oil of timur seeds from Nepal - Poster at the 47st International Symposium on Essential Oils (ISEO 2016) -Nice (France), September 12-14, 2016.*

Développement de méthodes d'analyse pour l'étude de la qualité des matières premières de parfumerie et d'arômes.

Thèse de Doctorat – Esméralda Cicchetti

Le contrôle qualité (CQ) des matières premières (MP) de parfumerie et d'arômes fait appel à un grand nombre de techniques analytiques pour déterminer la composition qualitative (caractérisation) et quantitative d'un ingrédient.

La caractérisation fait appel à des méthodes spectroscopiques. Lorsque les MP sont complexes, un couplage avec des techniques séparatives est nécessaire comme avec la chromatographie en phase gazeuse (GC) ou liquide (LC), parfois précédées d'une étape de purification. L'identification formelle des analytes pourra ensuite se faire par exemple par spectrométrie de masse ou RMN. Certaines techniques isotopiques permettent de vérifier l'authenticité d'un ingrédient. Cet aspect sera illustré avec le cas de la vanille au travers de trois aspects que sont l'extraction des gousses par ASE (extraction accélérée par solvant), l'étude du profil aromatique par LC/UV et enfin la purification de la vanilline en vue de son analyse isotopique.

La quantification des analytes est également une étape importante pour le CQ. Le dosage des composés volatils se fait classiquement par GC couplée avec un détecteur à ionisation de flamme. Cette étude présentera la constitution d'une base de données de facteurs de réponse relatifs (RRF) pour une quantification ultérieure par étalonnage interne et proposera un modèle de prédiction des RRF basé sur les enthalpies de combustion pour les standards non disponibles.

Le domaine des arômes et parfums fait face à des restrictions de certaines substances devant être quantifiées dans les MP. Cette étude présentera les résultats de deux études collaboratives de validation de méthodes de quantification des 26 allergènes de parfumerie. L'analyse des furocoumarines, composés phototoxiques présents principalement dans les huiles essentielles de Citrus, sera également abordée dans ce manuscrit au travers du développement et de la validation de méthodes innovantes.

Mots clés : vanille, authenticité, allergènes, furocoumarines, validation

Development of analytical methods for the quality control of Flavour and Fragrance raw materials. PhD. thesis – Esméralda Cicchetti

Quality control of raw materials (RM) in the flavour and fragrance (F&F) industry is a key step requiring a huge number of analytical techniques to characterize and quantify an ingredient.

Spectroscopic methods are required to characterize an ingredient. In the F&F domain, RMs are very complex; spectroscopic methods are generally hyphenated with separative techniques such as gas chromatography (GC) or liquid chromatography (LC), sometimes preceded by a purification step, for a formal identification of their analytes, by mass spectrometry or NMR. Some isotopic techniques can be used to check naturality and authenticity of a RM or pure compounds. The example of vanilla authentication will be taken through the beans extraction by ASE (Accelerated Solvent Extraction), LC/UV profiling and vanillin purification prior to isotopic analyses.

Analytes quantification is also a key step of the quality control. Volatile constituents are generally quantified by GC hyphenated to a flame ionization detector. This study describes the creation of a relative response factors (RRF) database for a future quantification and, in the case of missing standards, proposes a prediction model based on combustion enthalpies.

F&F industry is facing restrictions of some substances that might be toxic or allergenic and that should be quantified at trace level. Two collaborative studies were driven by the European committee of normalization of the French syndicate Prodarom in order to validate innovative methods to quantify the 26 allergens. They are presented as well as optimized methods to analyse furocoumarins, phototoxic constituents of some Citrus essential oils.

Key words : vanilla, authenticity, allergens, furocoumarin, validation