

Analyse des contrefaçons dans les produits naturels et biosourcés

Hervé Casabianca et Patrick Jame

Résumé Le marché économique que représentent les produits dits naturels est en très forte expansion depuis ces dernières années, poussé par l'engouement des consommateurs pour ce type de label. La très forte différence de prix avec les homologues de pure synthèse aboutit à un phénomène de fraude par une non-conformité entre l'étiquetage et le contenu des produits formulés. Cet article présente deux méthodes permettant d'obtenir une signature physicochimique spécifique à une origine naturelle : la spectrométrie de masse des rapports des isotopes stables et la chromatographie énantiosélective (ou chirale). Des applications illustrent les potentialités dans le domaine du contrôle de la naturalité (ou authenticité).

Mots-clés **Rapports d'isotopes stables, impuretés, énantiomères, naturalité, authenticité, JIREC 2016.**

Abstract **Counterfeiting analysis in natural and biobased products**
The economic market represented by the natural products has been in very strong expansion for these last years, pushed by the craze of the consumers for this type of label. The very strong price difference with the equivalent flavor from pure synthesis results in a phenomenon of fraud by a non-compliance between the labeling and the contents of the formulated products. This article presents two methods allowing to obtain a specific physico-chemical fingerprint for natural origin: stable isotopes mass spectrometry, and enantioselective gas chromatography. Applications illustrate the potentialities in the field of naturalness control.

Keywords **Stable isotopes ratio, impurities, enantiomers, authenticity, JIREC 2016.**

Les substances d'origine naturelle sont utilisées dans des secteurs aussi variés que l'agroalimentaire, la pharmacie et la parapharmacie, les produits d'hygiène et de soins, les cosmétiques, et entrent dans nos produits de consommation courante de façons aussi diverses que les emballages, peintures et autres formulations à base de produits biosourcés. Dans l'objectif de contrôler au mieux ce marché en très forte croissance économique, des moyens analytiques ont été développés pour pouvoir attester du caractère naturel de ces ingrédients, appelé ici naturalité. Malheureusement, de nombreuses affaires liées à un manque flagrant de traçabilité, à un étiquetage douteux et un commerce par correspondance en pleine expansion ont fait apparaître de nombreuses failles relatives à la qualité des ingrédients. Les laboratoires ont effectué dans ce domaine analytique des travaux de R & D afin de pouvoir proposer des méthodologies fiables de contrôle de la naturalité. Nous présentons dans cet article des méthodes permettant la détection d'impuretés (révélatrices d'une voie de synthèse), l'étude de la répartition des énantiomères (signature d'une catalyse enzymatique stéréosélective) et la mesure des rapports des isotopes organiques stables (empreinte de la photosynthèse d'une plante). Ces méthodes sont illustrées d'exemples d'adultérations mesurées sur des produits issus du marché international.

Les métabolites secondaires issus des végétaux représentent une vaste gamme de structures chimiques offrant des applications d'intérêt socio-économique. L'engouement des sociétés actuelles à consommer et/ou se soigner de façon différente a permis l'émergence depuis de nombreuses années de produits dits « d'origine naturelle ».

L'identification des constituants d'un mélange complexe peut être obtenue par la plupart des méthodes analytiques

actuelles (techniques séparatives, méthodes spectroscopiques). Par contre, ces méthodes ne permettent pas de différencier un produit d'origine naturelle de son homologue « identique nature » issu de la synthèse à base de pétrochimie. Du point de vue des législations en vigueur, l'affichage « naturel » doit répondre à certaines considérations, tout manquement constituant une fraude. Des méthodes telles que l'étude des rapports isotopiques d'éléments organiques stables ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^2\text{H}/^1\text{H}$, $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$) ou instables (^{14}C) ainsi que la chromatographie énantiosélective (ou chirale) sont développées permettant d'établir des diagnostics de naturalité de molécules dans un mélange. Leur présentation est accompagnée de nombreux exemples illustrant le potentiel de ces méthodes particulières.

Le métabolisme végétal

Les isotopes stables

Une plante utilise le dioxyde de carbone atmosphérique comme source de carbone lui servant par la suite à la photosynthèse et l'élaboration des chaînes carbonées des métabolites primaires et secondaires indispensables à sa vie. Trois mécanismes de fixation du dioxyde de carbone ont été mis en évidence qui impliquent principalement deux processus et enzymes spécifiques (les cycles de Calvin ou C3 [1] et celui de Hatch et Slack ou C4 [2-3]) ; le troisième mécanisme (CAM ou « crassulacean acid metabolism ») est en fait un compromis des deux premiers alterné sur les périodes diurne et nocturne et présenté par les travaux d'Osmond et O'Leary *et coll.* [4-5]. Ces mécanismes vont donner à la plante une signature

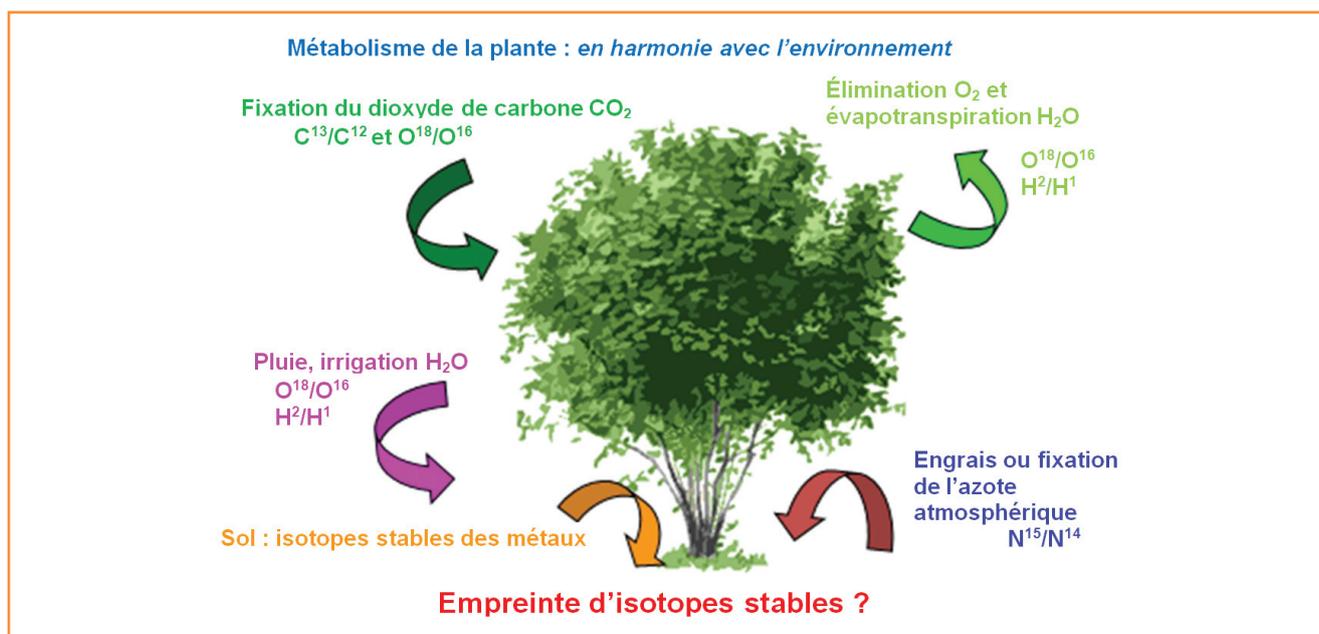


Figure 1 - Flux des matières permettant une signature isotopique à un végétal.

isotopique particulière à partir du rapport isotopique du CO₂ atmosphérique.

La *figure 1* schématise un végétal en interaction avec son environnement : des éléments tels que le carbone, l'hydrogène, l'oxygène et l'azote ainsi que les éléments métalliques contenus dans le sol sont en interaction avec l'environnement du végétal (zones géographiques, nature des engrais, évapotranspiration du végétal...) et donnent à ce dernier une empreinte spécifique.

Les isotopes stables organiques ²H, ¹³C, ¹⁵N et ¹⁸O sont principalement mesurés à l'aide de spectromètres de masse des rapports isotopiques (SMRI) qui effectuent la détermination de ces rapports dans des gaz (H₂, CO, CO₂, N₂...). Le résultat est communiqué en une unité isotopique appelée delta (δ) dont la formule est la suivante :

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

où R (¹³C/¹²C) échantillon est le rapport isotopique ¹³C/¹²C de l'échantillon.

Les résultats sont exprimés relativement au standard international pour la mesure du ¹³C qui est un carbonate de calcium appelé « Vienna pee dee belemenite » (VPDB). Pour ¹⁵N/¹⁴N, le standard international est la valeur isotopique de l'azote de l'air, et pour ²H/¹H et ¹⁸O/¹⁶O, c'est une eau qui provient du milieu du Pacifique appelée « standard mean ocean water » (SMOW). Mais pour obtenir ces rapports isotopiques, le SMRI sera connecté à un appareil de minéralisation permettant la transformation des éléments organiques, des composés étudiés, en gaz. Dans le cas de mesures isotopiques globales d'échantillons, notamment pour le contrôle de l'authenticité de matières premières ou d'arômes purifiés (vanilline), le SMRI sera couplé à un analyseur élémentaire (AE) selon le module spécifique :

- analyseur carbone-azote pour la mesure ¹³C et/ou ¹⁵N par combustion et réduction pour obtenir CO₂ et N₂ qui seront envoyés séparément dans le SMRI ;
- analyseur hydrogène-oxygène pour la mesure ²H et/ou ¹⁸O par pyrolyse à température élevée dans un tube en carbone et transformation des gaz en H₂ et CO qui seront injectés

également séparément dans le spectromètre de masse isotopique.

La technique de mesure globale (AE-SMRI) est très rapide (temps d'analyse de l'ordre de 10 mn) pour un coût financier abordable (moins de cinquante euros) permettant aux industriels de tester rapidement des lots de matières premières lors de transactions.

Un exemple intéressant est celui du squalane, un émoullant largement utilisé dans les crèmes cosmétiques et fabriqué par hydrogénation du squalène issu de deux principales origines naturelles : végétale (olive) et animale (foie de requin). Or les représentants de l'industrie cosmétique tendent à bannir les origines animales dans la préparation de leurs composés commerciaux et le requin n'est pas considéré comme une source renouvelable et durable. La mesure du ¹³C du squalane a permis ces dernières années de garantir l'origine de ce composé, que ce soit en mesure globale lors de transactions commerciales de squalane pur comme matière première, ou bien par extraction et chromatographie en phase gazeuse pour assurer au consommateur l'origine végétale de ce composé dans les crèmes cosmétiques commercialisées [6-7]. Les valeurs isotopiques du squalane issu du squalène originaire du requin ont des δ¹³C proches de - 20 ‰ alors que celles ayant comme origine végétale l'olive sont proches de - 28 ‰. L'incertitude de mesure étant proche de +/- 0,3 ‰, la méthode est pertinente pour détecter des ajouts de plusieurs dizaines de pourcents de squalane de requin dans du squalane d'olive. Depuis quelques années, la société Amyris produit à partir de la canne à sucre, par un procédé biotechnologique, du squalane qui a une signature isotopique δ¹³C proche de - 10 ‰. Cette valeur étant très différente de l'origine animale requin, la technique isotopique reste donc la méthode de référence pour la validation de l'origine du squalane.

Cependant, la vérification de l'authenticité concernera souvent des composés plus complexes (huiles essentielles, préparations aromatiques...) nécessitant des extractions ou des purifications, mais surtout l'utilisation de méthodes séparatives car le composé comprendra un mélange de molécules. L'appareillage le plus utilisé est le couplage

CG-C/P-SMRI. Un chromatographe en phase gazeuse permettant la séparation des molécules cibles sera associé à une unité de combustion (C) ou de pyrolyse (P) permettant de minéraliser les molécules cibles en gaz afin de déterminer les rapports isotopiques (mêmes transformations chimiques que pour la mesure globale).

Dans le cas d'authentification d'huiles essentielles, comme l'huile essentielle de cannelle (*Cinnamomum zeylanicum*), c'est la mesure isotopique du ^2H du (*E*)-cinnamaldéhyde (50 % environ de l'huile essentielle) qui sera pertinente pour valider l'origine naturelle du composé.

Sur la base de plus de 120 huiles essentielles authentiques, nous avons déterminé que l'intervalle de distribution du rapport isotopique $\delta^2\text{H}$ du cinnamaldéhyde doit être compris entre - 172 et - 69 ‰, alors que les équivalents de synthèse sont entre + 60 et + 540 ‰. Une huile essentielle commerciale contrôlée à + 250 ‰ ne fait aucun doute sur sa totale non-conformité de naturalité. De plus, comme le présentera le paragraphe suivant, la mise en évidence d'une impureté caractéristique d'un procédé de synthèse a été faite, confirmant l'anomalie de la distribution isotopique.

Pour certaines huiles essentielles, il est possible de mesurer les rapports isotopiques de la molécule à expertiser et de trouver une corrélation isotopique avec un ou des précurseurs directement liés à sa biosynthèse. Le thymol et le carvacrol sont issus de l'hydroxylation enzymatique du *p*-cymène, lui-même issu de la déshydrogénation du γ -terpinène. Il a été démontré une corrélation entre les rapports isotopiques $^2\text{H}/^1\text{H}$ de ces molécules permettant d'utiliser les deux précurseurs comme standard interne pour la mesure du phénol dans le but d'authentifier des huiles essentielles de thym, de sarriette et d'origan [8].

La chromatographie énantiosélective (ou chirale)

Le diphosphate de géranyle (GPP) est le précurseur physiologique universel des monoterpènes [9]. Il est cyclisé à partir de son isomère allylique tertiaire, le (-)-(3*R*) ou (+)-(3*S*) diphosphate de linalyle, selon la stéréospécificité des enzymes. Les réactions catalysées par les monoterpènes synthétases sont stéréosélectives à différents degrés d'énantiosélectivité. Ceci est parfaitement illustré par

l'exemple de la biosynthèse de la carvone à partir du limonène dans des plantes telles que la menthe poivrée (*Mentha piperita*) et le carvi (*Carum carvi*). Sous l'effet de la limonène-6-hydroxylase permettant la synthèse régiosélective du *trans*-carvéol ((+) pour la menthe et (-) pour le carvi), les (+) et (-) carvones dans ces plantes permettent ainsi de valider l'origine botanique [10].

Les colonnes capillaires sur lesquelles ont été greffées des cyclodextrines modifiées permettent dans de nombreux cas la résolution chromatographique de ces mélanges. Elles sont utilisées par les laboratoires de contrôle pour valider les excès énantiomériques spécifiques à la signature de naturalité de molécules cibles [11-15]. La *figure 2* présente un exemple de résolution des énantiomères de molécules importantes (le linalol et son acétate [12]) dans de nombreuses huiles essentielles (lavande, bergamote, laurier, cardamome, ylang-ylang...) par chromatographie en phase gazeuse et détection par ionisation de flamme.

L'un des inconvénients majeurs des produits naturels est la variabilité observée pour une analyse physicochimique donnée. Des facteurs tels que la variété, le terroir, la maturité, le procédé de production, les effets saisonniers, influent sur le métabolisme et la composition des métabolites secondaires présents dans un extrait d'intérêt. Il est donc nécessaire de disposer de banques de données conséquentes permettant de palier et prendre en compte toutes ces possibilités de variations. Pour ce faire, de nombreux échantillons naturels sont indispensables afin d'en valider la distribution selon une loi normale, ce qui permet à partir de la moyenne et de l'écart type d'obtenir des probabilités et bornes de distributions indispensables à l'expertise. La *figure 3* schématise cette démarche et permet de donner les intervalles de naturalité avec de bonnes probabilités : 99,73 % pour une distribution bilatérale et 99,87 % pour une distribution unilatérale.

Lorsque cette étude est appliquée à l'huile essentielle de lavande (*Lavandula angustifolia*), sur la base d'une distribution normale obtenue à partir de 250 échantillons certifiés authentiques, les données statistiques indiquent que l'énantiomère (*R*) du linalol doit au minimum être à 91,7 % et l'acétate de (*R*)-linalyle au minimum à 98,8 %.

La même stratégie appliquée à l'huile essentielle de rose (*Rosa damascena*) avec 120 échantillons indique une pureté

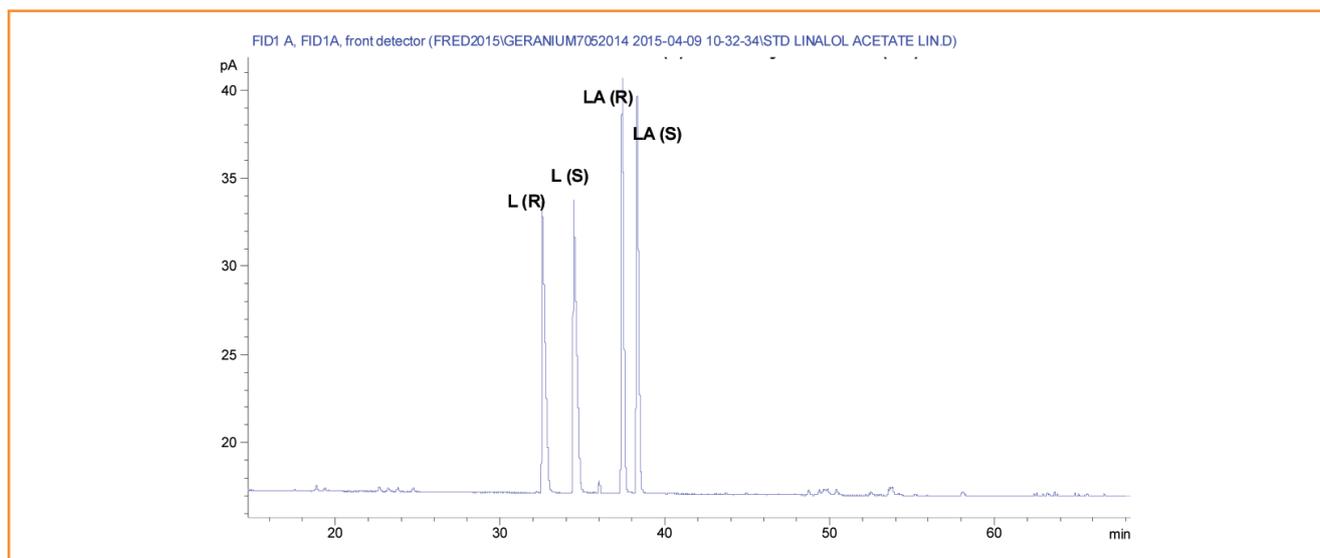


Figure 2 - Résolution des énantiomères du linalol (L) et de l'acétate de linalyle (LA) par GC-FID. Sélecteur chirale : 6-tertiobutyl-diméthylsilyl-2,3-diéthyl- β -cyclodextrine.

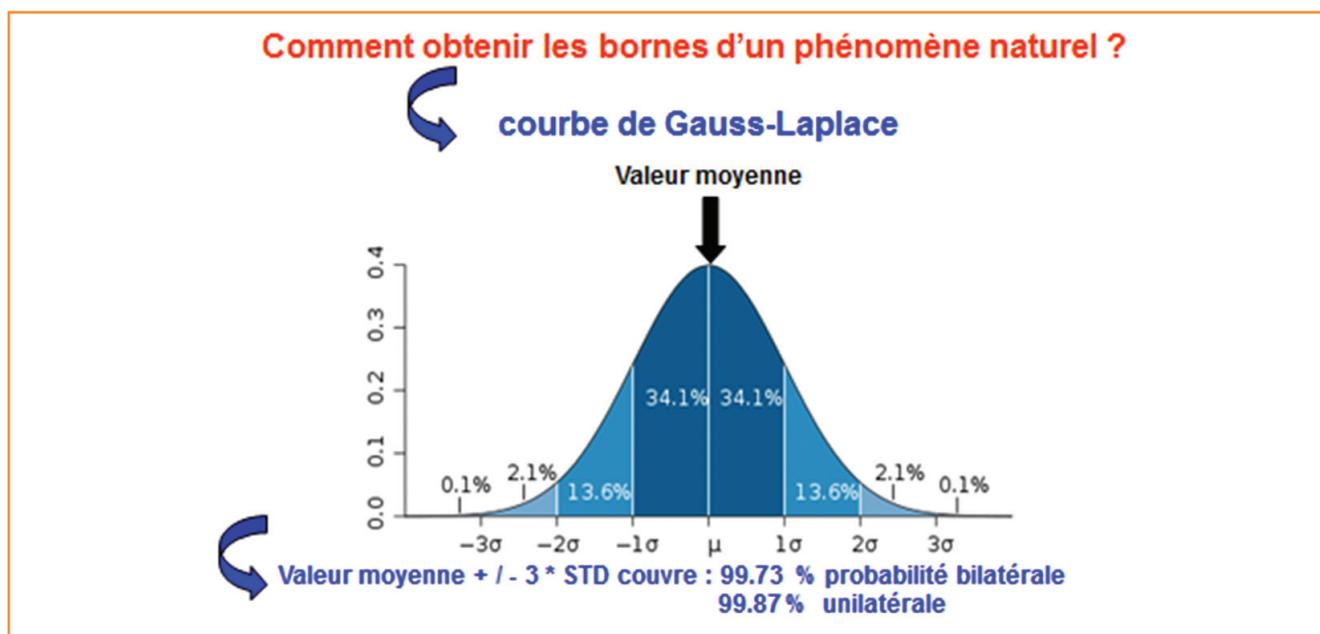


Figure 3 - Distribution gaussienne et calculs des intervalles de naturalité.

optique pour la molécule de citronellol au minimum à 98,6 % pour l'énantiomère (S). Cette démarche statistique est indispensable afin de rendre un résultat d'expertise avec un risque calculé.

Malgré la puissance de cette méthode, certaines réserves sont à prendre en compte. Dans certains cas, une distribution racémique peut être observée naturellement pour certaines molécules ; on peut citer les cas du linalol dans l'huile essentielle de bois de rose (*Aniba rosaeodora*) ainsi que le géranium (*Pelargonium rosat*). Il en est de même pour le citronellal dans l'eucalyptus citronné (*Eucalyptus citriodora*). À ces exceptions s'ajoute une possibilité de racémisation naturelle observée par exemple pour le linalol, l' α terpinéol et le terpinén-4-ol en milieu aqueux et acide. De ce fait avec le temps, on observe une perte d'excès énantiomérique, par exemple du (*R*)-linalol dans des matrices telles que l'eau florale de lavande, de fleurs d'oranger et du jus de muscat [12].

Détection d'impuretés révélatrices d'une voie de synthèse

Par la connaissance d'un procédé de fabrication de molécules d'intérêt, il peut être envisagé de développer des méthodologies analytiques relatives à la recherche soit de traces de matières premières révélatrices du procédé, soit d'impuretés qui elles aussi peuvent être considérées comme une signature de voie de synthèse.

À titre d'exemple, il peut être cité la détection du phénylé E, E-2,4-pentadiénaldéhyde qui est une impureté produite lors de la synthèse du (*E*)-cinnamaldéhyde par condensation en milieu basique de l'acétaldéhyde sur le benzaldéhyde (produit de di-addition de l'acétaldéhyde). Ce sous-produit de réaction de masse moléculaire 158, avec deux principaux fragments m/z 129 et 128 (figure 4) peut être suivi par spectrométrie de masse sur ces trois ions ; la simple détection au temps de rétention du standard indique l'adultération (figure 5).

Des traces de catalyseurs d'hydrogénation peuvent aussi être recherchées (nickel, platine, rhodium, palladium...), caractéristiques d'une hydrogénation industrielle.

La chromatographie liquide à haute performance peut aussi être une méthodologie permettant de mettre en évidence des traces d'impuretés révélatrices de voies de synthèse. Le développement actuel des chromatographies bidimensionnelles (ou compréhensives) sont des technologies capables de donner des empreintes très complètes de ces matrices complexes que constituent les extraits de plantes aromatiques et médicinales. Dans certains cas, l'utilisation de nez électronique peut aussi permettre une discrimination et ainsi apporter très rapidement un diagnostic au contrôle des matières premières.

Conclusion

Ainsi, plusieurs méthodologies analytiques permettent de certifier l'authenticité de molécules d'intérêt. La spectrométrie de masse des rapports isotopiques permet de déterminer avec une très grande précision les rapports isotopiques d'éléments organiques tels que $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^2\text{H}/^1\text{H}$ et $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$. Dans de très nombreux cas, le métabolisme de la plante affecte aux métabolites secondaires une signature isotopique très différente de la molécule « identique nature » obtenue par synthèse à partir de matières premières d'origine fossile. Par la détermination de plusieurs rapports isotopiques et/ou par comparaison avec la signature de molécules voisines (métaboliquement liées), cette méthode permet très régulièrement des expertises relatives à la naturalité de molécules.

Dans les procédés de synthèse enzymatique au sein des plantes, un énantiomère est très régulièrement en fort excès par rapport à son stéréoisomère. La chromatographie chirale permet donc d'envisager le caractère naturel d'une molécule, l'homologue de synthèse présentant une distribution racémique. Il faut toutefois tenir compte de certaines limites, car il existe naturellement des distributions racémiques et, au cours du temps et dans certaines conditions d'acidité de la matrice, des énantiomères purs peuvent se racémiser (eaux florales, jus de fruits). En amont de ces approches, des traces d'impuretés ou de catalyseurs peuvent être aussi une signature de procédé de synthèse (cette partie est développée dans la version longue en ligne de l'article⁽¹⁾).

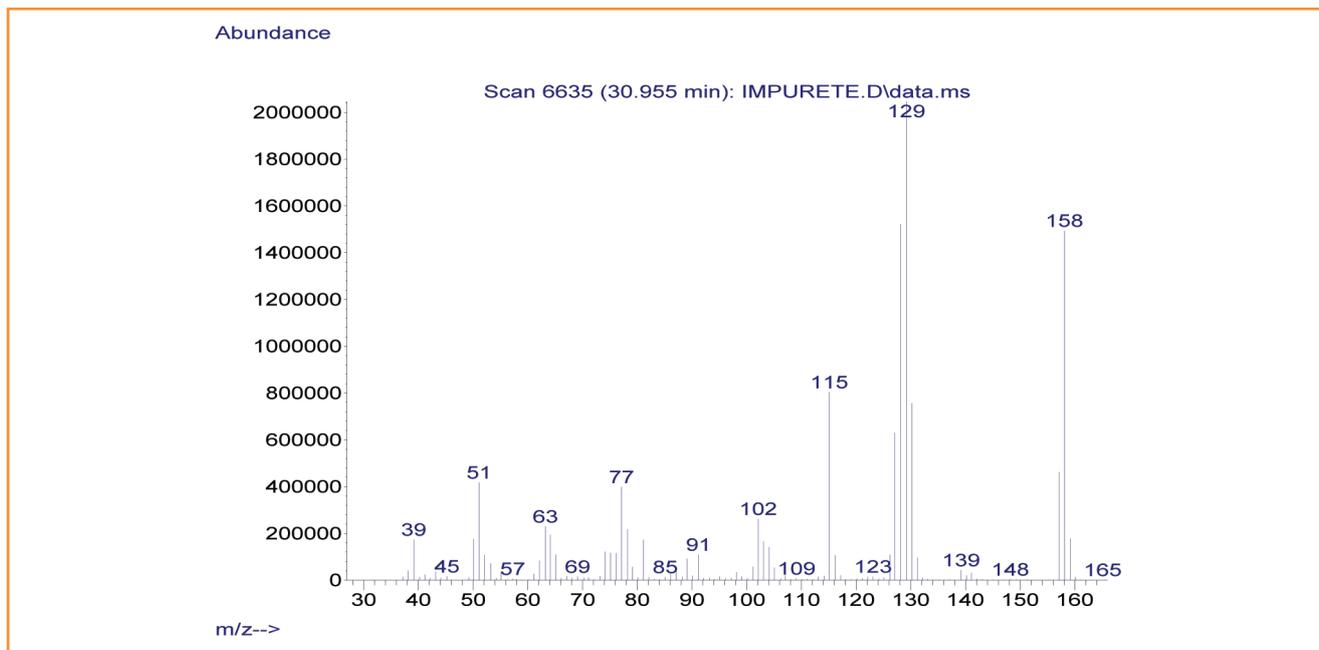


Figure 4 - Spectre de masse de l'impureté de synthèse du (*E*)-cinnamaldéhyde par condensation de l'acétaldéhyde sur le benzaldéhyde (produit de di-addition).

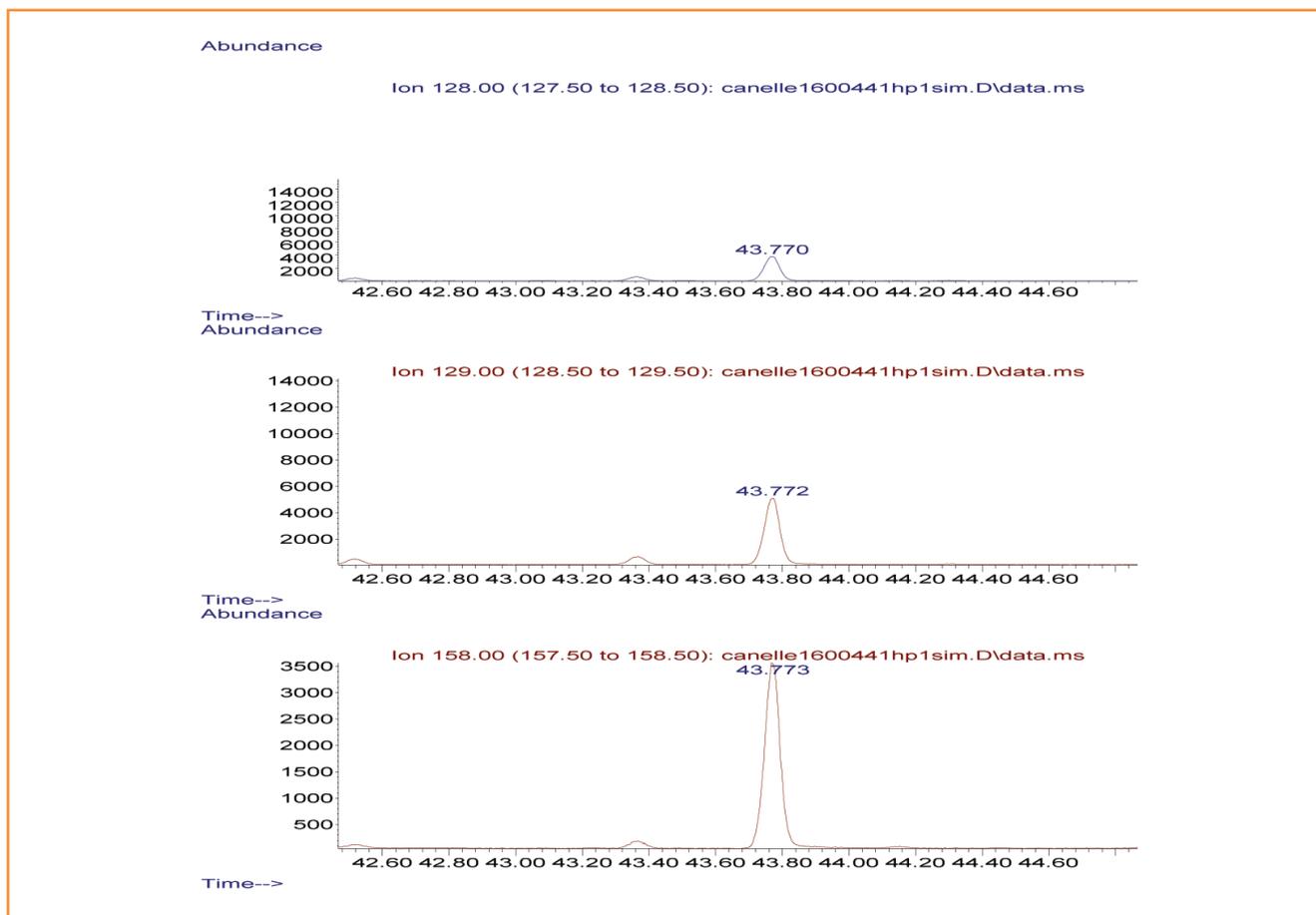


Figure 5 - Détection des ions à m/z = 158, 129 et 128 indicateurs d'impuretés de synthèse au temps de rétention 43,8 min dans une huile essentielle de cannelle commerciale.

Enfin, des traces d'impuretés ou de catalyseurs peuvent être aussi une signature de procédé de synthèse.

Note et références

- (1) Téléchargeable sur la page liée à cet article à partir du sommaire de ce numéro sur www.lactualitechimique.org
- [1] Calvin M., The photosynthetic carbon cycle, *J. Chem. Soc.*, **1956**, p. 1895.
- [2] Hatch M.D., Slack C.R., Photosynthetic CO₂ fixation pathways, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **1966**, p. 21.
- [3] Hatch M.D., Slack C.R., Photosynthesis by sugarcane leaves, *Biochem. J.*, **1966**, *101*, p. 103.
- [4] Osmond B., Crassulacean acid metabolism: a curiosity in context, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **1978**, *29*, p. 379.
- [5] O'Leary M.H., Osmond B., Diffusional contribution to carbon isotope fractionation during dark CO₂ fixation in CAM plants, *Plant Physiol.*, **1980**, *66*, p. 931.
- [6] Jame P., Casabianca H., Batteau M., Goetinck P., Salomon V., Differentiation of the origin of squalene and squalane using stable isotope ratio analysis, *SOFW J.*, **2010**, *136(1/2)*, p. 2.
- [7] Jame P., Casabianca H., Batteau M., Goetinck P., Guibert S., Watts R., Determination of squalane origin in commercial cosmetic creams using isotope ratio mass spectrometry, *SOFW J.*, **2011**, *137(1/2)*, p. 12.
- [8] Nhu-Trang T-T., Casabianca H., Grenier-Loustalot M-F., Deuterium/hydrogen analysis of thymol, carvacrol, gamma terpinene and para cymene in thyme, savory and oregano essential oils by gas chromatography-pyrolysis-isotope ratio mass spectrometry, *J. Chrom. A*, **2006**, *1132*, p. 219.
- [9] Lamarti A., Badoc A., Deffieux G., Biogénèse des monoterpènes III - Monoterpènes synthétases, *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, **1994**, *133*, p. 100.
- [10] Dewick P.M., The biosynthesis of C₅-C₂₅ terpenoid compounds, *Nat. Prod. Rep.*, **2002**, *19*, p. 181.
- [11] Casabianca H., Graff J.B., Jame P., Perrucchiotti C., Application of hyphanated techniques to the chromatographic authentication of flavors in food products and perfumes, *J. High Resolut. Chromatogr.*, **1995**, *18*, p. 279.
- [12] Casabianca H., Graff J.B., Faugier V., Fleig F., Grenier C., Enantiomeric distribution studies of linalool and linalyl acetate: a powerful tool for authenticity control of essential oils, *J. High Resolut. Chromatogr.*, **1998**, *21*, p. 107.
- [13] König W.A., Krüger A., Icheln D., Runge T., Enantiomeric composition of the chiral constituents in essential oils. Part 1: Monoterpene hydrocarbons, *J. High Resolut. Chromatogr.*, **1992**, *15*, p. 184.
- [14] König W.A., Gehrcke B., Icheln D., Evers P., Dönnecke J., Wang W., New selectively substituted cyclodextrins as stationary phases for the analysis of chiral constituents of essential oils, *J. High Resolut. Chromatogr.*, **1992**, *15*, p. 367.
- [15] Bicchi C., Artuffo G., D'Amota A., Galli A., Galli M., Cyclodextrin derivatives in the GC separation of racemic mixtures of volatile compounds, Part IV, *J. High Resolut. Chromatogr.*, **1992**, *15*, p. 655.



H. Casabianca

Hervé Casabianca est ingénieur de recherche CNRS, responsable de l'équipe « Produits naturels et biosourcés », et **Patrick Jame**, ingénieur de recherche CNRS, responsable de la plateforme « Analyses organiques et isotopiques », à l'Institut des Sciences analytiques de Villeurbanne*.



P. Jame

* Institut des Sciences analytiques, UMR 5280, 5 rue de la Doua, F-69100 Villeurbanne.

Courriel : hervé.casabianca@isa-lyon.fr