



## APPORT DE LA CHROMATOGRAPHIE GAZEUSE EN PHASE CHIRALE DANS LE CONTROLE DE L'ORIGINE NATURELLE DES AROMES <sup>(1)</sup>

Brigitte ROCCA\*, Claude ARZOUYAN\*, J. ESTIENNE\*\*

### RÉSUMÉ

L'utilisation de la chromatographie gazeuse en phase chirale (bêta-cyclodextrine) et de la chromatographie multidimensionnelle nous a permis d'obtenir la séparation des énantiomères de gamma-lactones, du menthol, d'hydrocarbures terpéniques dans des matrices aussi complexes que des arômes fraise, pêche, menthe et huiles essentielles d'agrumes. L'ajout de substances de synthèse a pu être mis en évidence sans ambiguïté.

### MOTS CLÉS

Chromatographie gazeuse phase chirale ; heart-cutting ; séparation des énantiomères de gamma-lactones, menthol, hydrocarbures terpéniques.

### SUMMARY

By gas chromatography on chiral phase (beta-cyclodextrin) and using multidimensional chromatography, we have achieved enantiomeric separation of gamma-lactones, menthol, alpha-pinene, beta-pinene and limonene from complex matrices: strawberry, peach, mint aroma, and citrus essential oils. Through these technical means, we have proved synthetic molecules addition in those products.

### KEY WORDS

Gas chromatography on chiral phase ; heart-cutting ; enantiomeric separation of gamma-lactones, menthol, monoterpenes.

### INTRODUCTION

La recherche de l'authentification d'extraits naturels utilisés dans l'industrie des arômes en particulier est à l'origine du développement de techniques analytiques permettant de différencier une substance naturelle de son homologue de synthèse. Parmi ces techniques, la chromatographie en phase gazeuse sur colonnes chirales, en permettant la séparation d'énantiomères, occupe désormais une place prépondérante. Les nombreux travaux de Mosandl [1 - 2] et König [3] ont montré l'intérêt de l'utilisation des bêta-cyclodextrines modifiées, comme phases chirales, pour la résolution de racémiques de natures très diverses dont, entre autres, les gamma-lactones, les alcools et les hydrocarbures terpéniques.

Dans le cadre d'un contrôle sur la nature et l'origine des arômes, nous avons réalisé les séparations énantiomériques de certains composés contenus dans des

*Communication présentée le 8 avril 1992.*

\* CERVAC - BT 8 - Parc Club du Golf, 13856 - AIX EN PROVENCE

\*\* ICACQ - Parc Club des Ayalades, 31, Boulevard Frédéric Sauvage 13331 - MARSEILLE CEDEX 14

arômes de fraise, de pêche, de menthe et dans des huiles essentielles d'agrumes, afin de détecter l'ajout de produits de synthèses souvent racémiques.

## **PARTIE EXPÉRIMENTALE**

- Réactifs : les gamma-lactones [C<sub>6</sub> - C<sub>12</sub>] et le D,L-Menthol sont fournis par Extrasynthèse(Genay-France)

- Les solvants sont de qualité pour analyse

- Matériel :

• Chromatographie sur colonne chirale

Chromatographe Hewlett Packard 5890 série II détection FID

Colonne WCOT CP-bêta-Cyclodextrin-2,3,6-M-19  
25 m x 0.25 mm x 0.25 µm (Chrompack, Les Ulis, France)

• Chromatographie multidimensionnelle double four

Système MDS 2000 (SGE, Villeneuve-Saint-Georges, France)

Chromatographe Hewlett Packard 5890 série II détection FID

Précolonne : CP Sil 8 CB  
30 m x 0.32 mm x 0.25 µm (Chrompack, Les Ulis, France)

Chromatographe Carlo Erba série 4100 détection FID

Colonne chirale : WCOT CP-bêta-Cyclodextrin-2,3,6-M-19  
25 m x 0.25 mm x 0.25 µm (Chrompack, Les Ulis, France)

### **I - Arômes, sirops de fraise, extraits, liqueurs, vins de pêche**

#### **I - 1. Préparation des échantillons**

50 ml d'arôme fraise ou d'extrait de pêche, ainsi que 200 ml de sirop de fraise ou de liqueur ou de vin de pêche sont extraits en ampoule à décanter avec 3 x 50 ml d'un mélange éther/pentane (50/50). Les phases organiques sont réunies et séchées sur sulfate de sodium. Après filtration, le solvant est évaporé sous évaporateur rotatif jusqu'aux environs de 2 ml. 1 µl de solution ainsi obtenue est injecté suivant les conditions chromatographiques des sections I-2 et I-3.

#### **I - 2. Chromatographie sur colonne chirale**

Température injecteur : 220 °C

Température détecteur : 250 °C

Mode d'injection : split, fuite : 60 ml/min

Gaz vecteur : H<sub>2</sub>, 70 kPa

Programmation de température : de 90 °C à 200 °C à raison de 1.5 °C/min

#### **I - 3. Chromatographie multidimensionnelle**

Température injecteur : 230°C

Température détecteurs : 250°C

Mode d'injection : split, fuite: 15 ml/min

Gaz vecteur : H<sub>2</sub>, 85 kPa

Programmation de température de la précolonne : 60 °C isotherme 5 min jusqu'à 220 °C, isotherme 5 min à raison de 5 °C/min.

Programmation de température de la colonne chirale : de 90 °C à 200 °C à raison de 1 °C/min.

**II - Essences, sirops, bonbons à la menthe****II - 1. Préparation des essences de menthe**

Les échantillons sont dilués environ 100 fois dans du pentane. 1  $\mu$ l de solution ainsi obtenue est injecté suivant les conditions chromatographiques des sections II- 4 et II- 5.

**II - 2. Préparation des sirops de menthe**

200 ml de sirop de menthe sont extraits en ampoule à décanter avec 3 x 50 ml d'un mélange éther/pentane (50/50). Le mode opératoire est poursuivi de la même manière que dans la section I - 1. Les conditions chromatographiques figurent dans les sections II - 4 et II - 5.

**II - 3. Préparation des bonbons à la menthe**

L'huile essentielle est extraite par micro-ondes selon un procédé décrit dans une publication à paraître [10].

De 3 à 5 bonbons, suivant la grosseur, en suspension dans 50 ml de 1,1,1 - trichloroéthane, sont soumis à 2 minutes d'extraction micro-ondes. Recommencer 2 fois la manipulation. Les phases organiques sont réunies, filtrées, et le solvant est évaporé sous évaporateur rotatif, jusqu'aux environs de 2 ml. 1  $\mu$ l de solution ainsi obtenue est injecté suivant les conditions chromatographiques des sections II - 4 et II-5.

**II - 4. Chromatographie sur colonne chirale**

Température injecteur : 220°C

Température détecteur : 250°C

Mode d'injection : split, fuite: 60ml/min

Gaz vecteur : H<sub>2</sub>, 70 kPa

Programmation de température : de 90°C à 200°C à raison de 1 °C/min.

**II - 5. Chromatographie multidimensionnelle**

Température injecteur : 230°C

Température détecteurs : 250°C

Mode d'injection : split, fuite : 15 ml/min

Gaz vecteur : H<sub>2</sub>, 85 kPa

Programmation de température de la précolonne : 60 °C isotherme 5 min jusqu'à 220 °C isotherme 5 min à raison de 5 °C/min.

Programmation de température de la colonne chirale : de 80 °C à 200 °C à raison de 1 °C/min.

**III - Huiles essentielles d'agrumes****III - 1. Préparation des huiles essentielles d'agrumes**

Les échantillons sont dilués environ 100 fois dans du pentane. 1  $\mu$ l de solution ainsi obtenue est injecté suivant les conditions chromatographiques de la section III-2.

**III - 2. Chromatographie multidimensionnelle**

Température injecteur : 230 °C

Température détecteurs : 250 °C

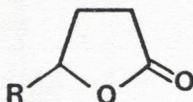
Mode d'injection	: split, fuite : 15 ml/min
Gaz vecteur	: H <sub>2</sub> , 85 kPa
Back-flush	: après 21.5 min

Programmation de température de la précolonne : 70 °C isotherme 20.5 min jusqu'à 200 °C isotherme 10 min à raison de 20 °C/min.

Programmation de température de la colonne chirale : 60 °C isotherme 20 min jusqu'à 80 °C à raison de 20 °C/min.

### SÉPARATION ÉNANTIOMÉRIQUE DES GAMMA-LACTONES

Les 4-alkyl-gamma-lactones (Schéma 1) dont la gamma-décalactone, sont des composés aromatiques importants d'une grande variété de fruits, parmi lesquels la fraise et la pêche.



R = Méthyl à n-Octyl

Schéma 1 :

#### 4-alkyl-1-gamma-lactones (gamma-pentalactone à gamma-dodécalactone)

Elles sont fréquemment utilisées dans les formulations aromatiques. D'où l'intérêt de pouvoir différencier une gamma-lactone d'origine naturelle d'une gamma-lactone d'origine synthétique. Récemment, les travaux de Schreier [4] ont révélé un excès en faveur de l'énantiomère R allant de 86.3 % à 89 % pour la gamma-décalactone issue naturellement de la pêche, et de 97.5 % à 100 % pour la gamma-décalactone issue naturellement de la fraise.

Sur la base de ces données, nous avons réalisé la séparation, sur colonne chirale, des racémiques d'une série homologue de 4-alkyl-gamma-lactones (Fig. 1). En application, nous avons traité des matrices plus complexes telles qu'un arôme et un sirop de fraise (Fig. 2 et 3) ainsi qu'un extrait, une liqueur et un vin de pêche (Fig. 4, 5 et 6).

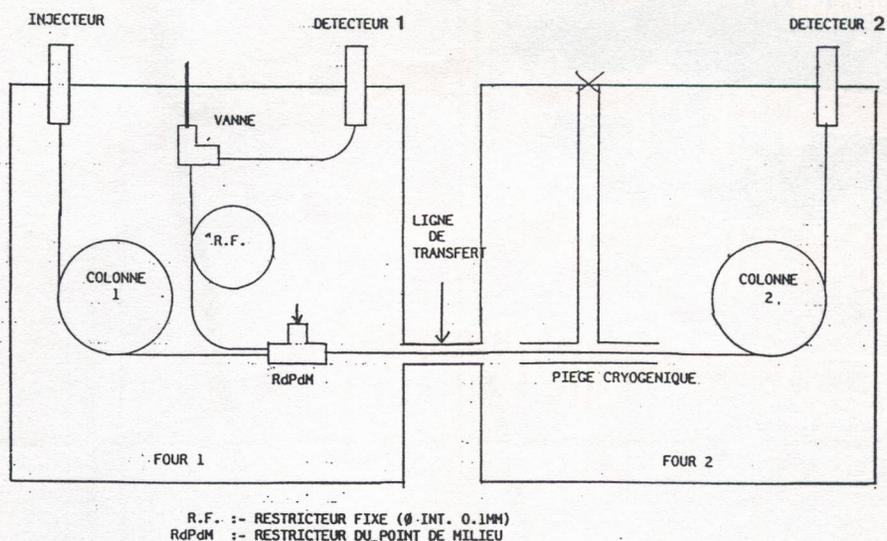
L'observation de tous ces chromatogrammes, réalisés sur colonne chirale en injection directe, montre la présence, en mélange racémique, de gamma-décalactone (Fig. 2, 3, 4, 5, 6), de gamma-dodécalactone (Fig. 4) et de gamma-undécalactone (Fig. 6).

Afin d'éliminer les interférences chromatographiques susceptibles de gêner la séparation des énantiomères de ces gamma-lactones, dues à l'injection directe d'un mélange complexe sur colonne chirale, la technique du "heart cutting" a également été utilisée et confirme les résultats obtenus.

Une brève description de cette technique est donnée à la suite (Schéma 2).

Mode colonne 1 seule (précolonne) : la vanne est ouverte. Le débit de la colonne 1 passe par le restricteur fixe vers le détecteur 1, ceci par application d'une pression fixe au restricteur du point de milieu.

Mode "heart-cut" : la vanne est fermée. Le débit de la colonne 1 passe par le restricteur du point de milieu, la ligne de transfert et dans la colonne 2 (colonne chirale) vers le détecteur 2.



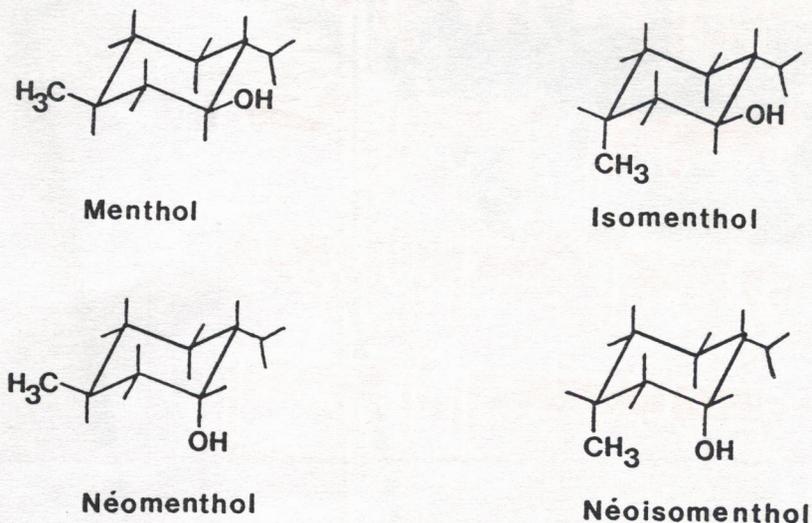
**Schéma 2 :**  
**Schéma de principe de la chromatographie bidimensionnelle**

Ainsi, un premier chromatogramme de la fraction aromatique de l'extrait de pêche, par exemple, a été réalisé sur une précolonne apolaire (Fig. 7). Lors d'une deuxième injection, les pics attribués à la gamma-décalactone et à la gamma-dodécalactone sont "détournés" de la détection appliquée à la précolonne pour être "transférés" sur la colonne chirale où ils sont séparés respectivement en 2 énantiomères (Fig. 8).

Les données de la littérature [1, 2, 4] sur la distribution énantiomérique des gamma-lactones, dont la gamma-décalactone, issue naturellement de la fraise et de la pêche, font apparaître un très net excès en faveur de l'énantiomère R. Les gamma-lactones identifiées sur les échantillons à base de fraise et de pêche que nous avons analysés, ont été détectées en mélange racémique. Par conséquent, tous ces produits ont subi l'ajout de substances de synthèse.

### SÉPARATION ÉNANTIOMÉRIQUE D'UN ALCOOL TERPÉNIQUE : LE MENTHOL

Le menthol est le principal constituant des huiles essentielles de menthe à menthol (30 à 80 %). Ces "menthes crues" doivent être rectifiées pour être utilisées en aromatisation, et on peut supposer que, soit pour compenser les pertes à la distillation, soit pour augmenter la teneur en menthol, on puisse être amené à faire un ajout de menthol de synthèse. On sait que le menthol se présente sous forme de quatre diastéréoisomères. Chacun d'entre eux (Menthol, Isomenthol, Néomenthol et Néoisomenthol) est dédoublable en deux énantiomères (Schéma 3).



**Schéma 3 :**  
**Diastéréoisomères du menthol**

Le menthol de synthèse, dont l'adjonction est la plus intéressante sur le plan économique, est un menthol racémique alors que le menthol naturel n'existe que sous une seule forme énantiomérique qui est le (-) menthol.

Les premières analyses sur colonne chirale font appel à la transformation du menthol en dérivé uréthane avant chromatographie sur colonne de type valine phényléthylamide [5]. Récemment, Shurig [6] et Fellous [7] ont obtenu la séparation énantiomérique du menthol, sans dérivatisation, respectivement sur bêta-cyclodextrine et sur maltosylcyclodextrine.

Ces derniers travaux nous ont amenés à réaliser directement la résolution du menthol racémique sur colonne chirale (Fig. 9).

En application, nous avons traité des matrices plus complexes telles qu'une essence, un sirop et des bonbons à la menthe (Fig. 10, 11, et 12).

L'observation de tous ces chromatogrammes réalisés sur colonne chirale en injection directe montre la présence de 1.6 % de (+) menthol dans l'essence de menthe (Fig. 10), 4.0 % de (+) menthol dans le sirop de menthe (Fig. 11) et 7.4 % de (+) menthol dans les bonbons à la menthe (Fig. 12).

L'identification des énantiomères du menthol a été confirmée par la technique du "heart-cutting". La figure 13 correspond au chromatogramme de la fraction aromatique du sirop de menthe par exemple, réalisé sur précolonne apolaire. La figure 14 montre la séparation des énantiomères du menthol obtenue sur colonne chirale après "transfert" du pic attribué au menthol sur la précolonne.

Les données de la littérature [8] font apparaître que le menthol naturel n'existe que sous une seule forme qui est le (-) menthol, alors que le menthol de synthèse est un menthol racémique.

Par conséquent, la présence de (+) menthol, dans les échantillons à base de menthe que nous avons analysés, montre que tous ces produits ont subi l'addition de menthol de synthèse.

### SÉPARATION ÉNANTIOMÉRIQUE D'HYDROCARBURES TERPÉNIQUES : L'ALPHA-PINÈNE, LE BETA-PINÈNE ET LE LIMONÈNE

Ces hydrocarbures terpéniques entrent dans la composition d'un grand nombre d'huiles essentielles, dont les huiles essentielles d'agrumes (Schéma 4).

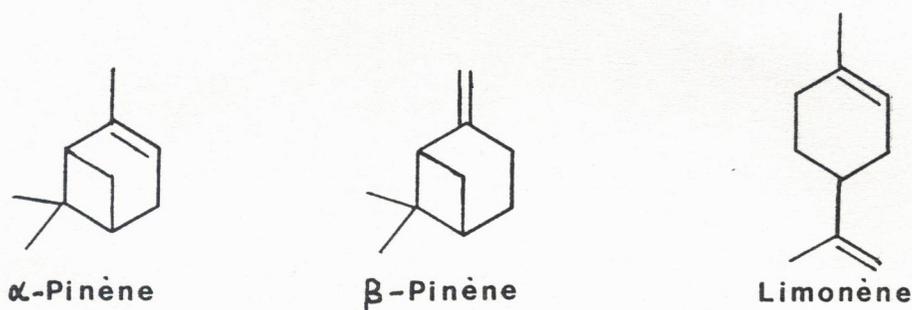


Schéma 4 :  
Hydrocarbures terpéniques

La connaissance de la distribution énantiomérique de ces monoterpènes peut contribuer à l'authentification d'une huile essentielle.

Récemment, Mosandl et son équipe [9] ont étudié la distribution énantiomérique de l'alpha-pinène, bêta-pinène et limonène dans des huiles essentielles d'agrumes, et dans des huiles essentielles présentant des notes typiques de citron.

Ces travaux nous ont amenés à obtenir la séparation énantiomérique de ces trois monoterpènes dans des huiles essentielles de citron, orange, pamplemousse et mandarine d'origine sûre (Fig. 15, 16, 17, 18), ainsi que dans une huile essentielle de citron d'origine non certifiée (Fig. 19). Nous avons employé la chromatographie gazeuse multidimensionnelle, associée à la technique du "heart-cutting", et utilisant le couplage "on-line" d'une précolonne apolaire et d'une colonne chirale.

Le tableau I regroupe les rapports énantiomériques trouvés pour l'alpha-pinène, le bêta-pinène et le limonène dans des huiles essentielles d'agrumes. Les résultats obtenus pour les échantillons d'origine sûre sont en accord avec les valeurs annoncées par Mosandl [9] dans son étude sur les huiles essentielles d'agrumes.

Dans une huile essentielle de citron d'origine sûre, les rapports énantiomériques donnent en moyenne : alpha-pinène (S : 66 % ; R : 34 %), bêta-pinène (S : 94.7 % ; R : 5.3 %), limonène (S : 1.3 % ; R : 98.7 %).

Par contre, dans une huile essentielle de citron d'origine non certifiée, les rapports énantiomériques de l'alpha-pinène (S : 40 % ; R : 60 %) et du limonène (S : 8 % ; R : 92 %) sont susceptibles d'être la conséquence d'une adultération.

**CONCLUSION**

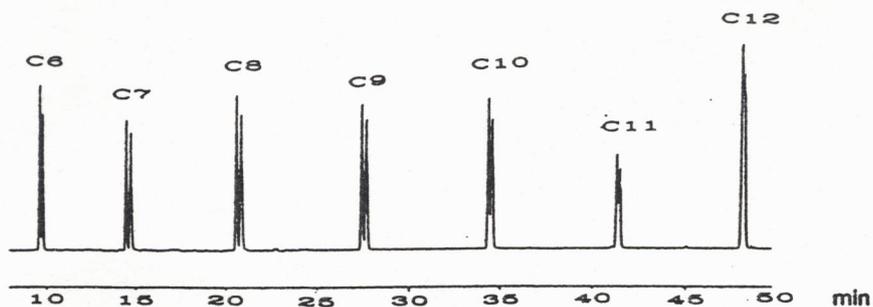
L'association de la chromatographie gazeuse sur colonne chirale et de la chromatographie multidimensionnelle permet la résolution d'énantiomères de natures très diverses. Au moyen de ces techniques, nous avons obtenu, entre autres, la séparation énantiomérique de gamma-lactones, du menthol, de l'alpha-pinène, bêta-pinène et limonène dans des matrices aussi complexes que des arômes fraise, pêche, menthe, huiles essentielles d'agrumes. Ceci nous a permis de détecter l'ajout de substances de synthèse. En complément à d'autres techniques de contrôle, l'utilisation de la chromatographie en phase gazeuse sur colonne chirale est un atout supplémentaire dans le contrôle de l'origine naturelle des arômes.

**TABLEAU I**  
**Rapport énantiomérique (%) de l'alpha-pinène, bêta-pinène et limonène**  
**dans des huiles essentielles d'agrumes**

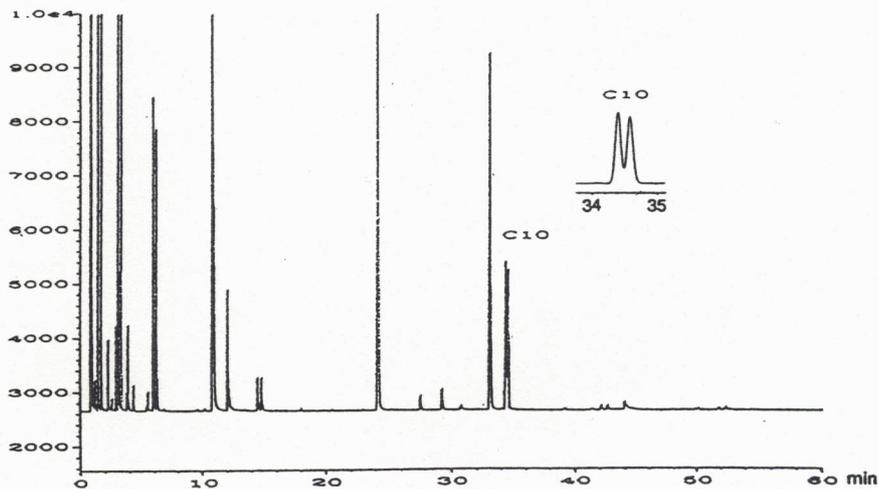
	ALPHA-PINENE		BETA-PINENE		LIMONENE	
	S	R	S	R	S	R
Huile essentielle de citron	70	30	95	5	2	98
	62	38(a)	95	5(a)	1	99(a)
	67	33(b)	94	6(b)	1	99(b)
Huile essentielle d'orange	traces	100	39	61	0.5	99.5
	traces	100(a)	46	54(a)	traces	100(a)
	traces	100(b)	27	73(b)	traces	100(b)
Huile essentielle de pamplemousse	traces	100	40	60	0.5	99.5
	traces	100(a)	34	66(a)	traces	100(a)
	1	99(b)	37	63(b)	traces	100(b)
Huile essentielle de mandarine	48	52	4	96	2	98
	43	57(a)	3	97(a)	traces	100(a)
	32	68(b)	16	84(b)	1	99(b)
Huile essentielle de citron origine non certifiée	40	60	94	6	8	92

(a) Résultats obtenus par Mosandl [9]

(b) Valeurs obtenues par Mosandl [9] à partir du zeste



**Figure 1 :**  
**Résolution d'une série homologue de 4-alkyl-gamma-lactones**  
**(gamma-hexa à gamma-dodécalactone).**  
**Conditions : H<sub>2</sub>, 70 kPa. Progr. temp. : de 90 °C à 200 °C**  
**à raison de 1.5 °C/min.**



**Figure 2 :**  
**Extrait d'un arôme fraise sur colonne chirale.**  
**Conditions : voir figure 1.**

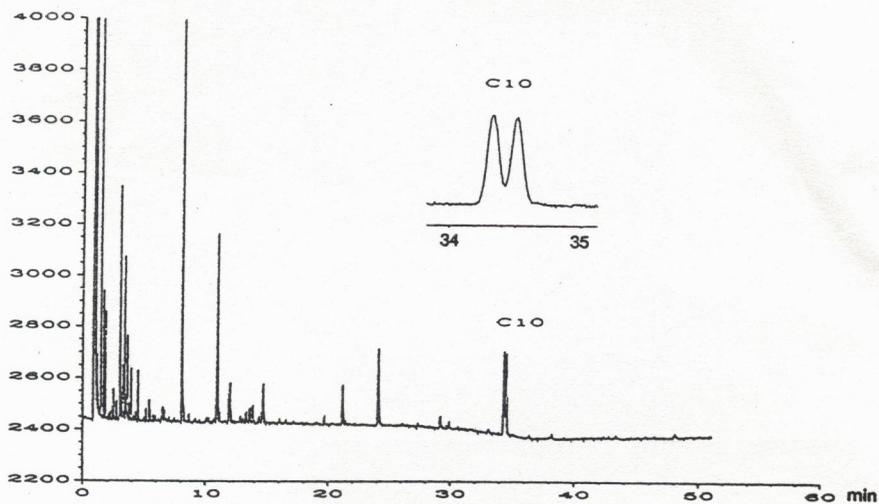


Figure 3 :  
Extrait d'un sirop de fraise sur colonne chirale.  
Conditions : voir figure 1.

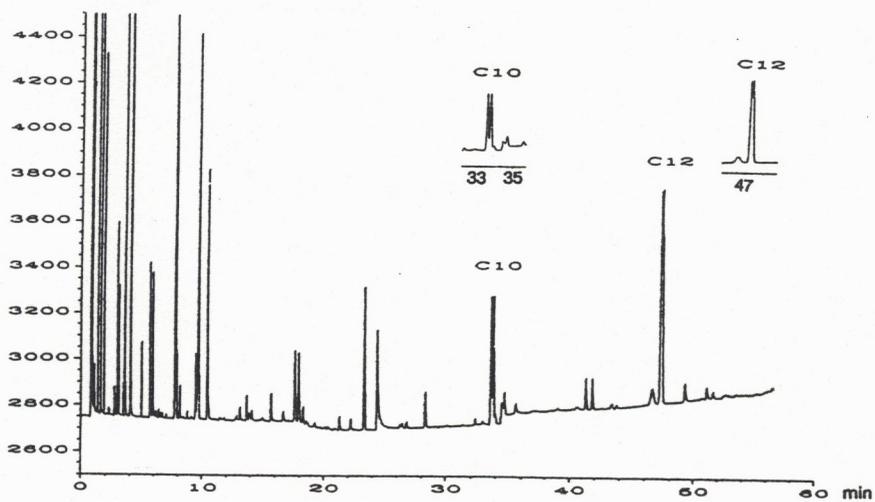


Figure 4 :  
Extrait d'un extrait de pêche sur colonne chirale.  
Conditions : voir figure 1.

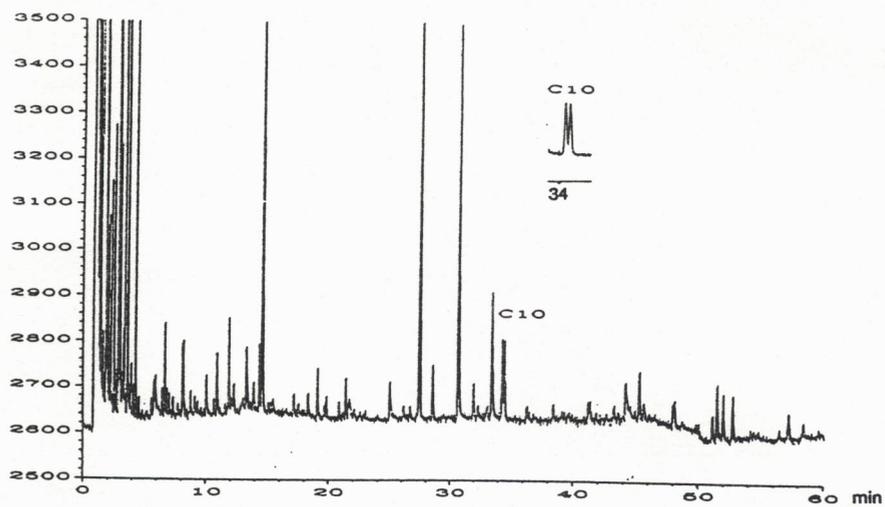


Figure 5 :  
Extrait d'une liqueur de pêche sur colonne chirale.  
Conditions: voir figure 1.

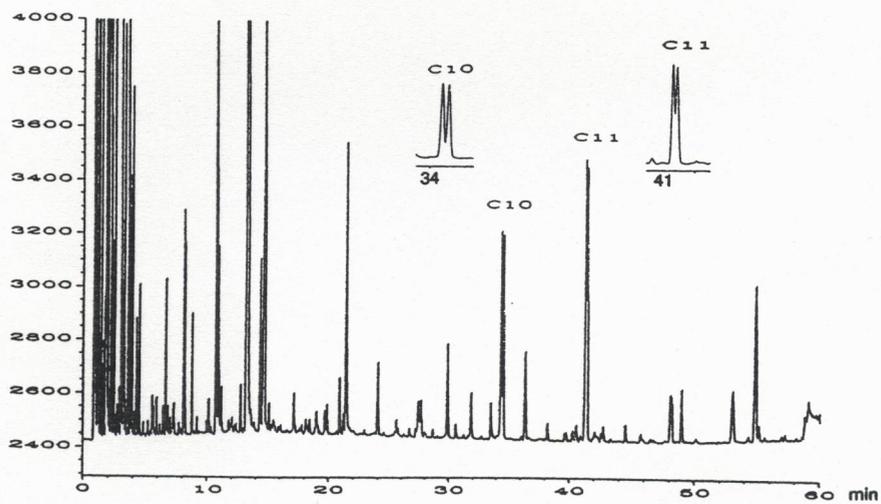


Figure 6 :  
Extrait d'un vin de pêche sur colonne chirale.  
Conditions : voir figure 1.

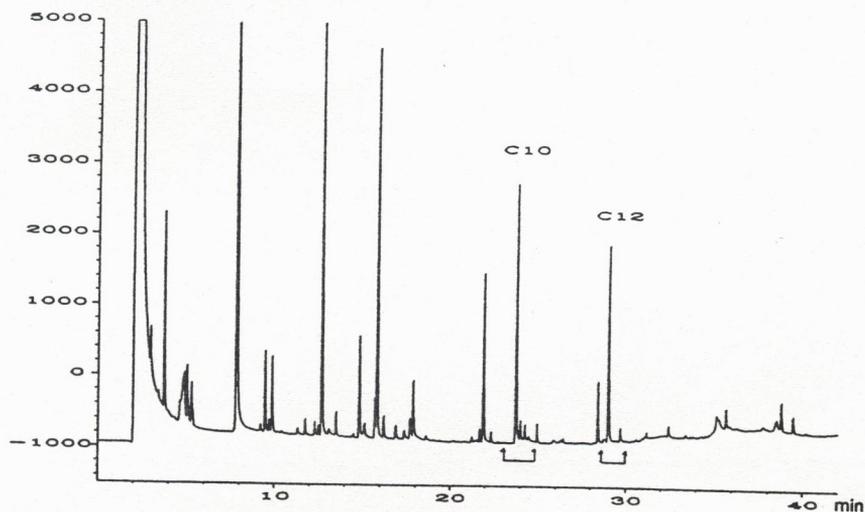


Figure 7 :

Préséparation d'un extrait d'extrait de pêche sur précolonne.  
 Conditions : H<sub>2</sub>, 85 kPa. Progr. temp. : 60 °C isotherme 5 min jusqu'à  
 220 °C isotherme 5 min à raison de 5 °C/min. Intervalles d'élution (↑↑)  
 transférés sur la colonne chirale.

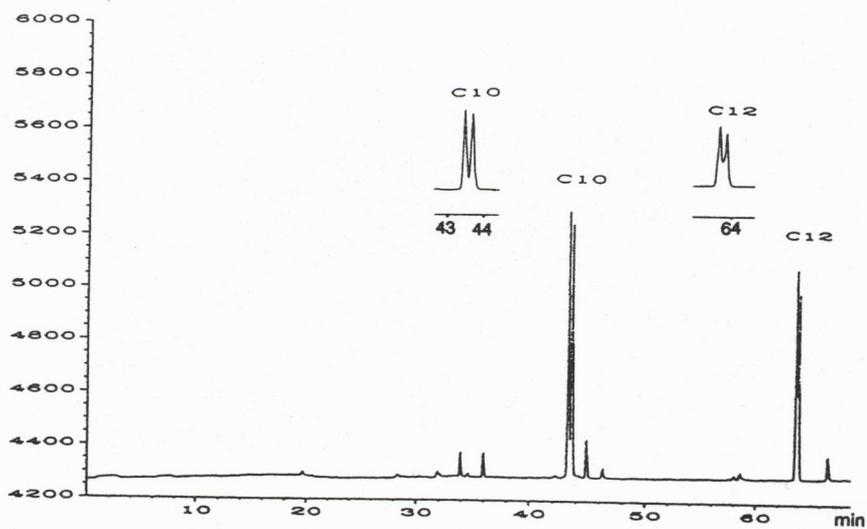


Figure 8 :

Gamma-décalactone et gamma-dodécalactone de l'extrait de pêche  
 préséparées sur précolonne (Fig. 7) et transférées sur colonne chirale.  
 Conditions: Progr. temp. : de 90 °C à 200 °C à raison de 1 °C/min.

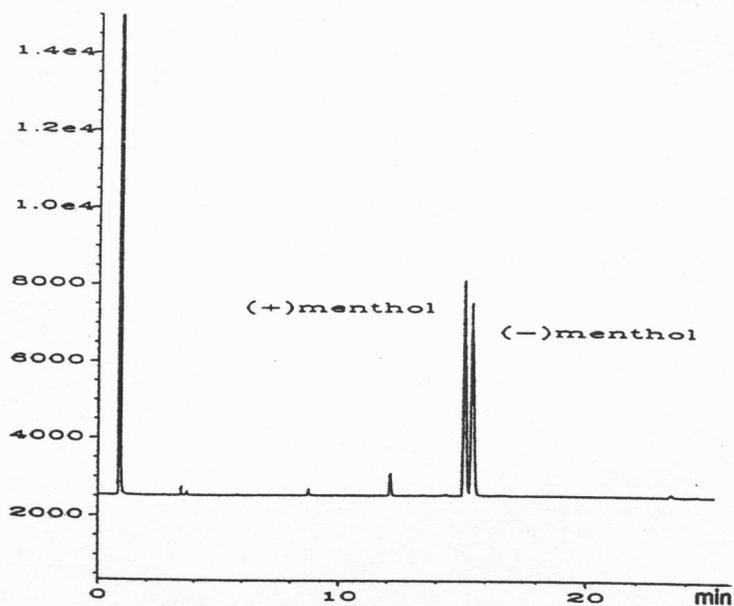


Figure 9 :

Résolution du menthol racémique sur colonne chirale.  
Conditions : H<sub>2</sub>, 70 kPa. Progr. temp.: de 90 °C à 200 °C  
à raison de 1 °C/min.

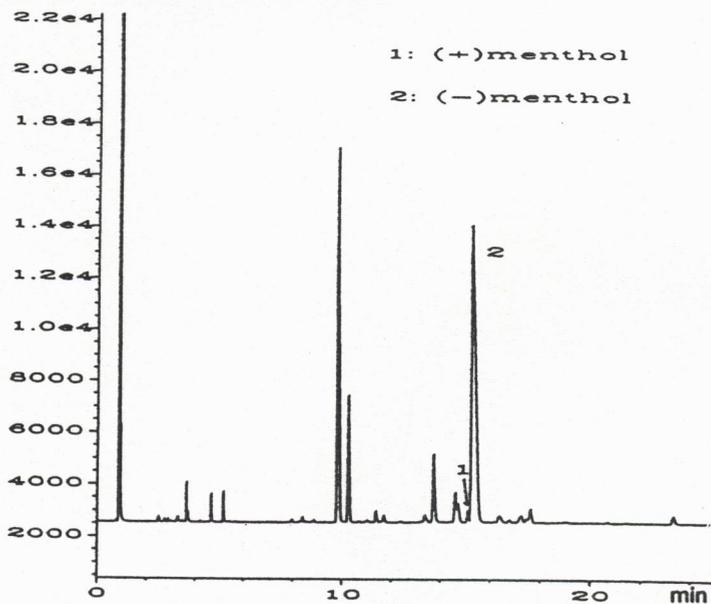


Figure 10 :

Essence de menthe sur colonne chirale. Conditions : voir figure 9.

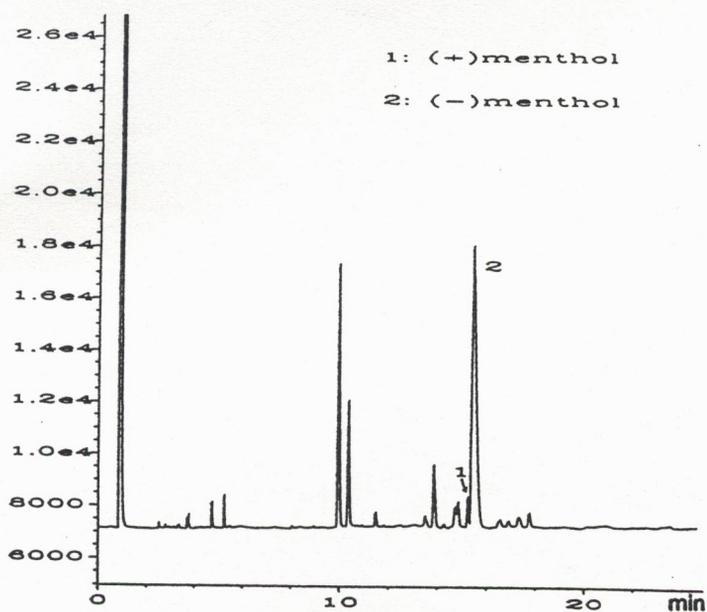


Figure 11 :  
Extrait d'un sirop de menthe sur colonne chirale.  
Conditions : voir figure 9.

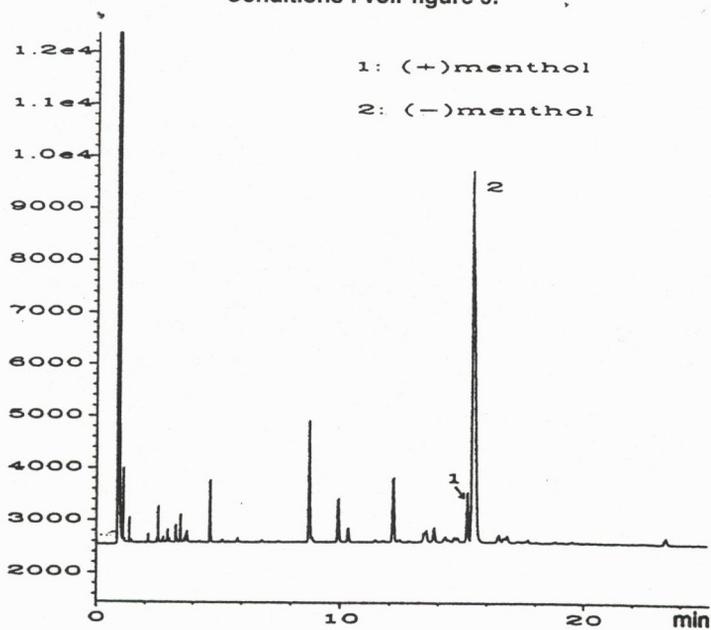


Figure 12 :  
Extraits de bonbons à la menthe sur colonne chirale.  
Conditions : voir figure 9.

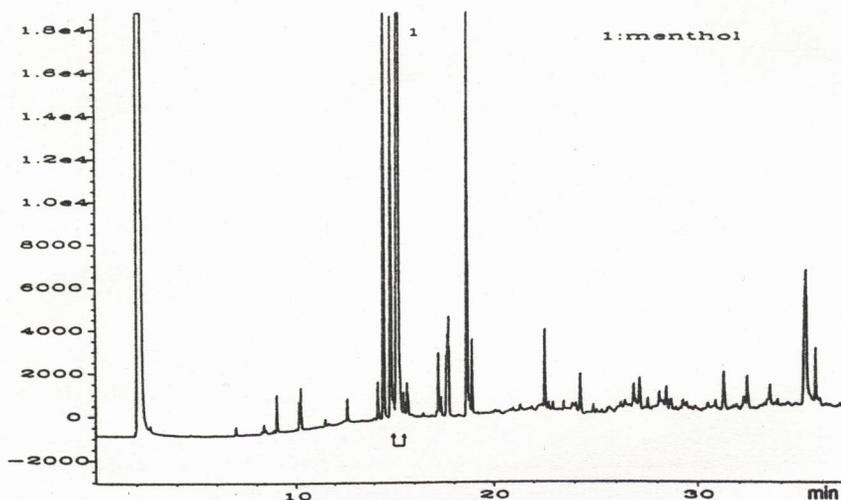


Figure 13 :

Préséparation de l'extrait de sirop de menthe sur précolonne.  
Conditions: voir figure 7.  
Intervalles d'éluion (↑) transférés sur la colonne chirale.

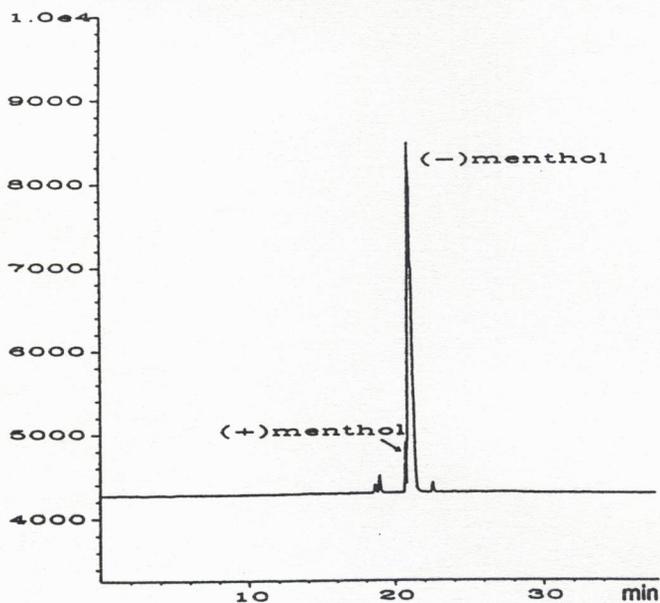


Figure 14 :

Séparation énantiomérique du menthol extrait du sirop de menthe après  
préséparation sur précolonne (Fig. 13) et transfert sur colonne chirale.  
Conditions : Progr. temp.: de 80 °C à 200 °C à raison de 1°C/min.

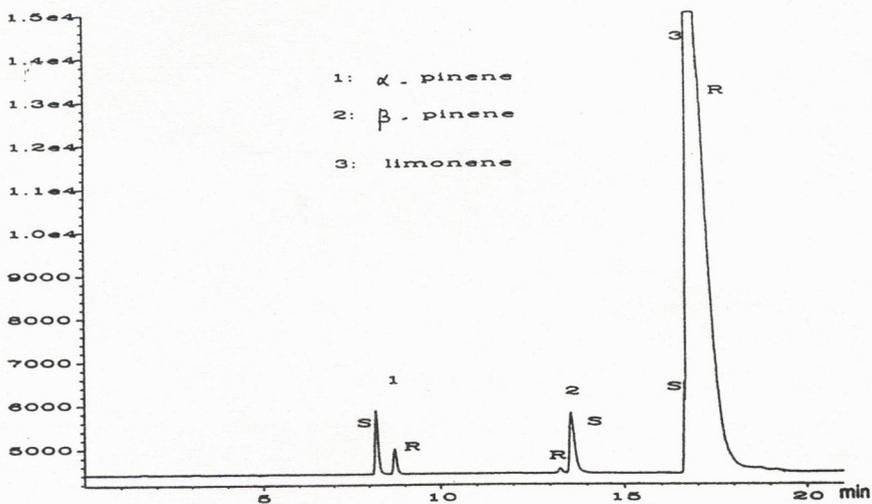


Figure 15 :  
Chromatographie multidimensionnelle  
d'une huile essentielle de citron d'origine sûre.  
Conditions : voir partie expérimentale, section III - 2.

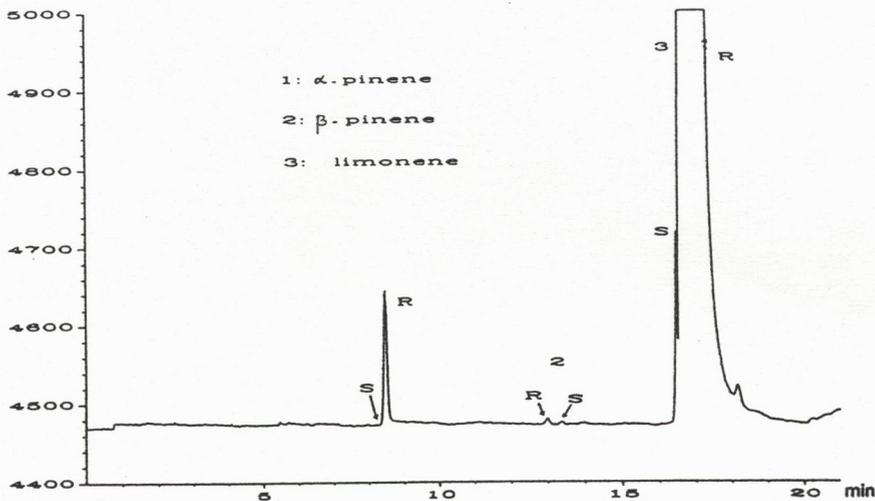


Figure 16 :  
Chromatographie multidimensionnelle  
d'une huile essentielle d'orange d'origine sûre.  
Conditions : voir figure 15.

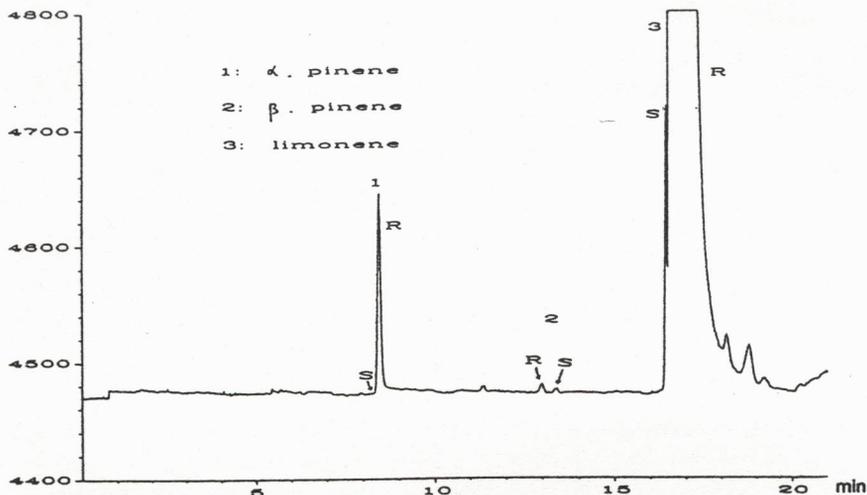


Figure 17 :  
Chromatographie multidimensionnelle  
d'une huile essentielle de pamplemousse d'origine sûre.  
Conditions : voir figure 15.

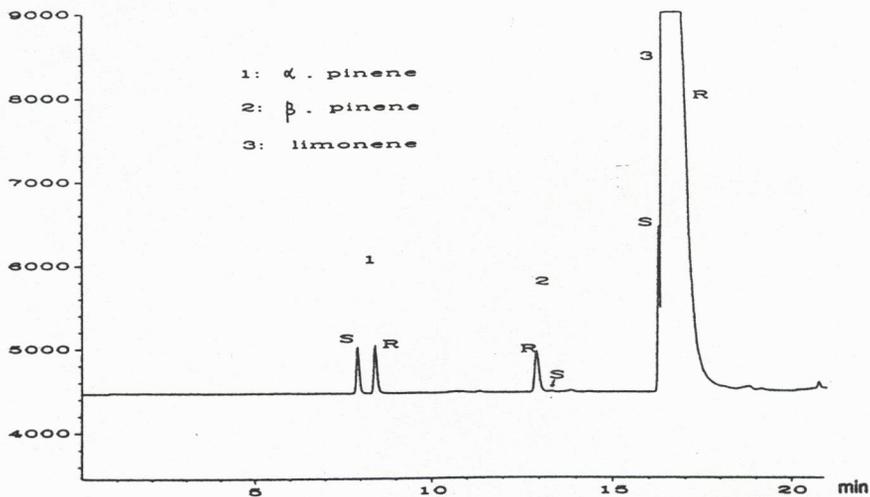
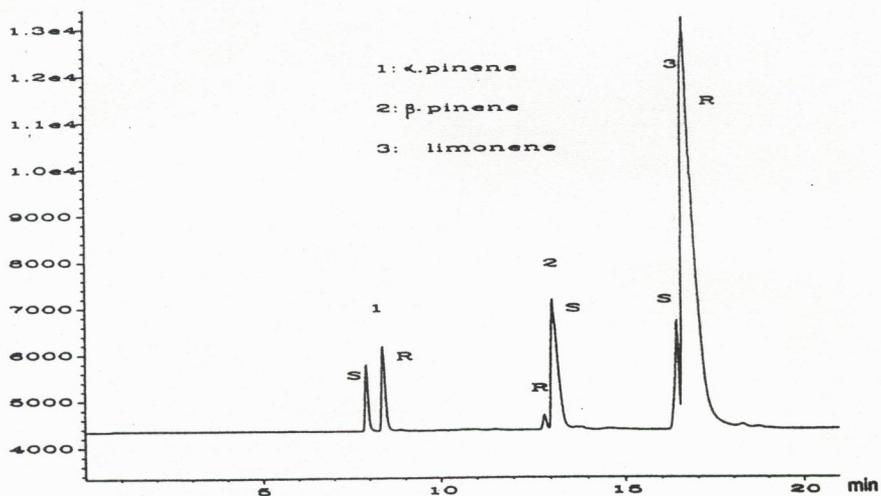


Figure 18 :  
Chromatographie multidimensionnelle  
d'une huile essentielle de mandarine d'origine sûre.  
Conditions : voir figure 15.



**Figure 19 :**  
**Chromatographie multidimensionnelle**  
**d'une huile essentielle de citron d'origine non certifiée.**  
**Conditions : voir figure 15.**

## BIBLIOGRAPHIE

- 
- [1]. MOSANDL A., KUSTERMANN A., Stereoisomere Aromastoffe - XXX. HRGC - Analyse chiraler gamma-lactone aus Getränken und Fruchtzubereitungen - Z Lebensm Unters Forsch, 1989, 189, 212-215.
- [2]. MOSANDL A., HENER U., HAGENAUER-HENER U., KUSTERMANN A., Stereoisomeric Flavor Compounds. 33. Multidimensional Gas Chromatography Direct Enantiomer Separation of Gamma-Lactones from Fruits, Foods and Beverages - J. Agric. Food Chem., 1990, 38, 767-771.
- [3]. KÖNIG W. A., KREBBER R., EVERS P., BRUHN G., Stereochemical Analysis of Constituents of Essential Oils and Flavor Compounds by Enantioselective Capillary Gas Chromatography - J. HRC, 1990, 13, 328-332.
- [4]. BERNREUTHER A., KOZIET J., BRUNERIE P., KRAMMER G., CHRISTOPH N., SCHREIER P., Chiroselective capillary gaschromatography (HRGC) and on-line HRGC - isotope ratio mass spectrometry of gamma-decalactone from various sources - Z Lebensm Unters Forsch, 1990, 191, 299-301.
- [5]. KÖNIG W. A., FRANCKE W., BENECKE I., Gas Chromatographic Enantiomer Separation of Chiral Alcohols - J. Chromatogr., 1982, 239, 227-231.
- [6]. SCHURIG V., JUNG M., SCHMALZING D., SCHLEIMER M., DUVEKOT J., BUYTEN J. C., PEENE J. A., MUSSCHE P., CGC Enantiomer Separation on Diluted Cyclodextrin Derivatives Coated on Fused Silica Columns - J. HRC, 1990, 13, 470-474.
- [7]. FELLOUS R., LIZZANI-CUVELIER L., LOISEAU A.-M., Séparations chirales par chromatographie gazeuse - Application aux arômes - Ann. Fals. Exp. Chim., 1991, 84, n° 900, 289-297.
- [8]. DERBESY M., UZIO R., BOYER D., COZON V., Application de chromatographie phase chirale à l'analyse des huiles essentielles de mentha piperita - Ann. Fals. Exp. Chim., 1991, 84, n° 898, 205-216.
- [9]. MOSANDL A., HENER U., KREIS P., SCHMARR M.-G., Enantiomeric Distribution of alpha-Pinene, beta-Pinene and limonene in Essential Oils and Extracts. Part 1. Rutaceae and Gramineae - Flavour Frag. J., 1990, 5, 193-199.
- [10]. ROCCA B., ARZOUYAN C., ESTIENNE J., Apport des micro-ondes dans les techniques d'extraction de laboratoire - Ann. Fals. Exp. Chim., sous presse.