Partenariat Analyse Authenticité Arômes

P3A

Focus
Analyse chirale dans le contrôle de la conformité des arômes naturels

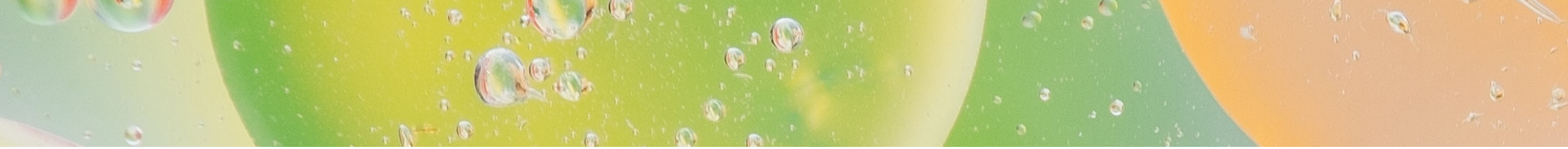
Octobre 2022

Aromalyse
EXPERT CHEMICAL ANALYSIS & MUCH MORE
www.aromalyse.com

BETA
www.betalabservices.com

eurofins
www.eurofins.fr

SNIAA
Syndicat National des Ingrédients Aromatiques Alimentaires
www.sniaa.org



Ce document a été élaboré par le Comité Scientifique du Partenariat Analyse Authenticité Arômes (P3A). P3A, construit entre le SNIAA et plusieurs laboratoires d'analyses, a pour but de renforcer la confiance envers à la fois les résultats des laboratoires d'analyses et les productions des entreprises producteurs d'arômes.

Les membres du partenariat P3A sont en effet fréquemment sollicités afin que soient pratiquées des analyses visant à confirmer cette conformité des arômes naturels.

Le Comité Scientifique P3A a décidé la rédaction de plusieurs documents ayant pour objectif d'apporter des éléments pratiques et explicatifs du rôle de chacune de ces méthodes d'analyse dans le contrôle de la conformité des arômes naturels.

1.Définition de la chiralité

2.Détermination de la chiralité - Analyse énantiosélective

2.1. Les sélecteurs chiraux

2.2. Mise en œuvre expérimentale

2.3. Stabilité des ratio énantiomériques

2.4. Construction d'une base de données

3.Chiralité et conformité réglementaire

1.Définition de la chiralité

La **chiralité** est une notion liée au domaine de la géométrie dans l'espace, et trouve une application importante dans la description de la stéréochimie des molécules quand celles-ci sont des édifices tridimensionnels. La stéréochimie définit un arrangement spatial d'atomes au sein d'une molécule. Les molécules qui ne sont pas superposables à leur image dans un miroir sont dites **chirales**. Des exemples comparables d'un tel phénomène dans la vie quotidienne sont les coquilles d'escargot et le tire-bouchon.

L'asymétrie moléculaire est due à la présence de centres stéréogènes au sein des molécules. Il en existe plusieurs catégories. Les **carbones asymétriques** sont les centres stéréogènes les plus couramment rencontrés dans les molécules naturelles. Un carbone asymétrique est par définition un atome de **carbone hybridé sp3 lié à quatre groupements différents.**[1] Ceci introduit une asymétrie au sein de la molécule qui va entraîner des propriétés physico-chimiques différentes en fonction de l'énantiomère concerné.

Lorsqu'une molécule est chirale, elle possède donc deux formes dites **énantiomères**, encore appelés **isomères optiques**. Cette dénomination découle d'une propriété fondamentale des molécules chirales car celles-ci sont actives sous lumière polarisée. On appelle **lévogyre** (du latin *laevus* : gauche) l'énantiomère qui dévie le plan de la lumière polarisée « vers la gauche » (selon un angle négatif ; sens anti-horaire). Celui-ci est noté **l- ou (-)**, tandis que la forme **dextrogyre** qui dévie le plan de la lumière polarisée « vers la droite » (du latin *dexter* : droite), est notée **d- ou (+)**[2] (Figure 1).

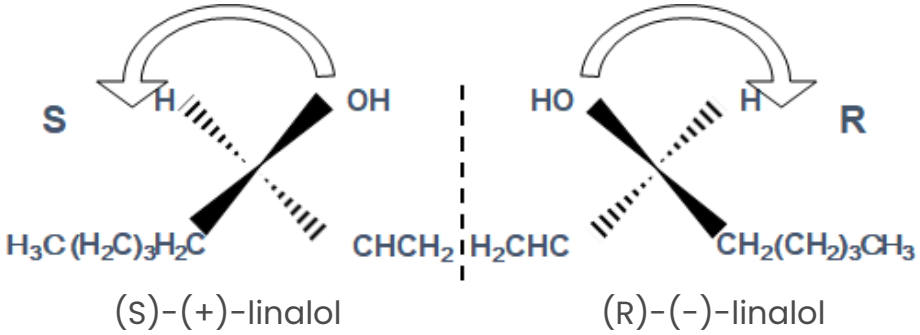


Figure 1. Enantiomères (S)-(+) et (R)-(-) du linalol (de formule brute $C_{10}H_{18}O$)

[1] Selon les règles de priorité édictées par Cahn, Ingold et Prelog (règles CIP), il est possible de déterminer la configuration absolue, R ou S, d'un atome de carbone asymétrique. On trouvera les définitions adéquates dans tout manuel de chimie organique de premier cycle universitaire. En plus des descripteurs usuels de la chiralité (+) ou (-), l- ou d-, on peut décrire une molécule chirale en utilisant ses descripteurs de configuration absolue, comme par exemple le **(R)-(+)-limonène** retrouvé en abondance dans les essences de citrus.

[2] Il convient de ne pas confondre les descripteurs l- et d- qui décrivent l'activité optique de la molécule (forme laevo ou dextrogyre) avec les descripteurs L- et D- qui ne sont liés qu'à la détermination de la configuration selon Fischer (par exemple L-alanine, D-glucose).

Le mélange des deux énantiomères dans la même proportion est appelé un **mélange racémique**. Quand un des énantiomères est majoritaire par rapport à l'autre, il est d'usage de parler d'**excès énantiomérique (ee)** pour décrire la proportion entre les deux formes. A titre d'illustration, prenons l'exemple de deux énantiomères notés (-)-E_L et (+)-E_D, présents respectivement dans les proportions 96:4. On calcule l'excès énantiomérique en appliquant la relation suivante :

$$ee = 100 \times \frac{(E_L - E_D)}{(E_L + E_D)}$$

On détermine ainsi que dans les proportions indiquées l'énantiomère (-)-E_L présente un excès énantiomérique de 92%.

Les molécules organiques, **constituants des extraits naturels**, sont pour la plupart toutes **issues de processus métaboliques** qui font intervenir une batterie d'enzymes pour catalyser les réactions qui aboutissent à la formation des structures de base. Les enzymes étant elles-mêmes des édifices chiraux (formés à partir d'acides aminés), ces réactions métaboliques primaires s'accompagnent souvent de la mise en place de la **configuration absolue des carbones asymétriques-clés** qui vont déterminer par la suite la **configuration** des autres carbones asymétriques, notamment au moment de la fonctionnalisation des différents squelettes. Tout ceci aboutit souvent à une complexité structurale qui trouve donc son origine dans l'arsenal biochimique de la plante, et donc à son patrimoine génétique. Ainsi, pour certaines molécules chirales courantes comme certains terpénoïdes, esters, ou lactones, **leur chiralité est fonction de leur matrice d'origine**, et on ira même jusqu'à déterminer pour certaines molécules des **excès énantiomériques caractéristiques** des extraits dans lesquels elles sont présentes.

Enfin, on ne saurait être complet sur le sujet sans évoquer le **lien évident entre la chiralité d'une molécule et son caractère organoleptique**. L'odeur d'une molécule organique est déterminée par plusieurs facteurs physico-chimiques (volatilité, polarité), mais dans le cas présent, le principal paramètre demeure sa **capacité à activer un ou plusieurs types de récepteurs neuronaux,** localisés dans l'épithélium olfactif de la cavité nasale. Au même titre que les enzymes, ces récepteurs sont des protéines fonctionnelles constituées d'acides aminés. Les récepteurs olfactifs sont donc des édifices chiraux qui auront plus ou moins d'affinité en fonction de l'énantiomère de la molécule odorante considérée. Il n'est pas rare qu'un des deux énantiomères soit odorant, tandis que le deuxième est beaucoup moins puissant, ou désagréable à l'odeur, voire tout à fait inodore. On parle ici de reconnaissance chirale (Figure 2).

(R)

(R)-(-)-carvone : odeur de menthe crépue

(S)

(S)-(+)-carvone : odeur de carvi

(S)-(-)-alpha ionone : odeur boisée, type bois de cèdre

(R)-(+)-alpha ionone : odeur de violette, type fruitée, framboise

Figure 2. Exemples d'énantiomères ayant des propriétés organoleptiques différentes

La détermination de la chiralité des molécules organiques au sein des extraits naturels a toujours été un sujet majeur touchant de nombreux domaines de la chimie, allant de la chimie des arômes et parfums jusqu'au pharmaceutique. Depuis plus de soixante-dix ans avec l'avènement des techniques chromatographiques modernes (GC, LC), cette thématique a engendré une recherche intense au niveau international dont le but avoué est de parvenir à tracer la naturalité des extraits naturels par l'examen de la chiralité de leurs constituants.

L'objectif du présent document est de :

- 1) **recenser et décrire les méthodologies liées à l'analyse de la chiralité** dans les extraits naturels, en mettant l'accent sur les molécules aromatisantes,

- 2) jeter les bases de la **construction d'une base de données** rassemblant l'essentiel des données de la littérature liées à cette thématique, et

- 3) examiner comment la détermination de la **chiralité dans les extraits naturels impacte leur conformité vis à vis de la réglementation.**

2.Détermination de la chiralité - Analyse énantiosélective

2.1. Les sélecteurs chiraux

Par abus de langage, on entend souvent dans le domaine des arômes et parfums que l'analyse de telle molécule a été réalisée par "GC (ou LC) chirale". A proprement parler, un chromatographe en phase gazeuse (ou liquide) n'est pas chiral, pas plus que ne l'est la colonne de séparation employée lors de l'analyse. En revanche, les phases stationnaires utilisées sont formulées à partir d'un support usuel achiral (PDMS, OV1701, etc...) dans lequel on a pris soin de dissoudre/suspendre un **sélecteur chiral** qui permettra d'obtenir, de manière variable, une reconnaissance chirale avec les molécules analysées.

Ainsi, pour une molécule chirale donnée, si un des deux énantiomères présente plus d'affinité que l'autre envers le sélecteur chiral sélectionné, il en résulte une plus forte rétention chromatographique pour cet énantiomère. On obtiendra donc une **séparation énantiosélective**.

Les sélecteurs chiraux les plus couramment rencontrés en chromatographie sont soit dérivés d'acides aminés, soit dérivés de sucres (cyclodextrines, amylose, cellulose). Les **cyclodextrines**, qui sont utilisées dans la plupart des colonnes destinées à l'analyse des composés volatils, sont des **oligomères cycliques de glucose** dont la forme globale est souvent assimilée à celle d'un cône tronqué. Aussi, la taille du cône varie avec le nombre d'unités de glucose qui constituent la cyclodextrine. Les 3 principaux types sont les cyclodextrines alpha (6 unités glucose), beta (7 unités) et gamma (8 unités) (Figure 3).

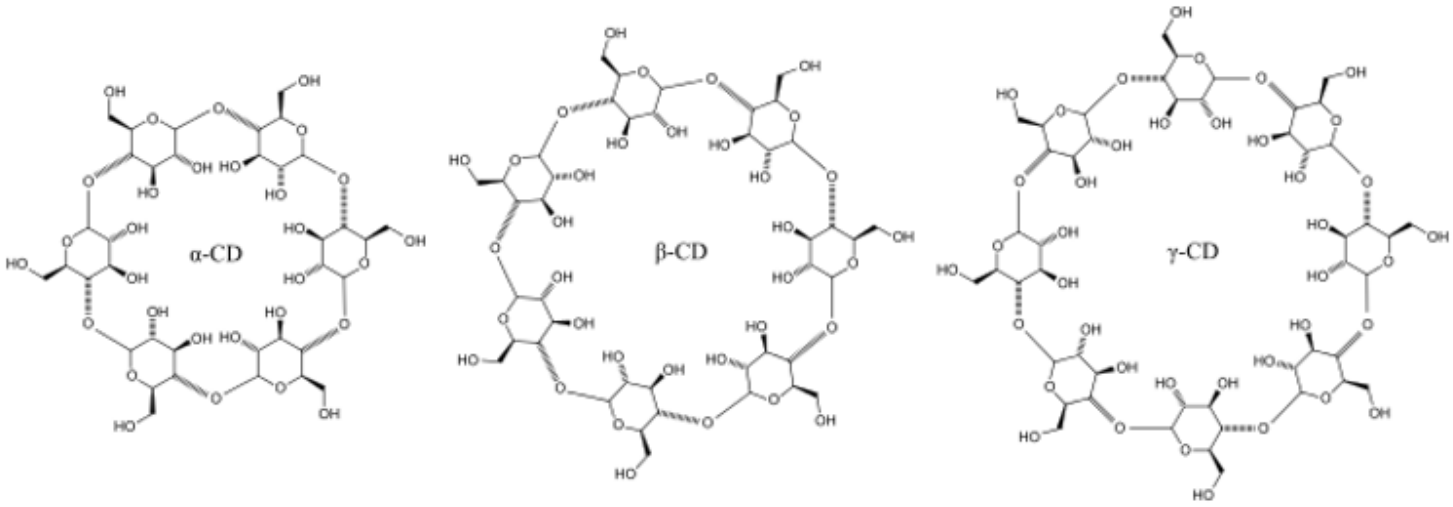


Figure 3. Structures de base des cyclodextrines les plus courantes

En chromatographie, notamment pour la détermination de la chiralité des composés volatils, les beta- et les gamma-cyclodextrines sont celles qui ont conduit aux principales applications analytiques. Celles-ci sont diversement greffées en position 2, 3 et 6 des unités glucose (figure 4) par des groupements organiques tels que :

- des éthers (O-méthyl, O-pentyl, O-méthoxyméthyl…),
- des esters (O-Ac, O-propionyl, O-butyryl, O-TFA…),
- des groupements silylés (O-TMS, O-TBDMS, O-THS…) qu'on retrouve quasi exclusivement en position 6.

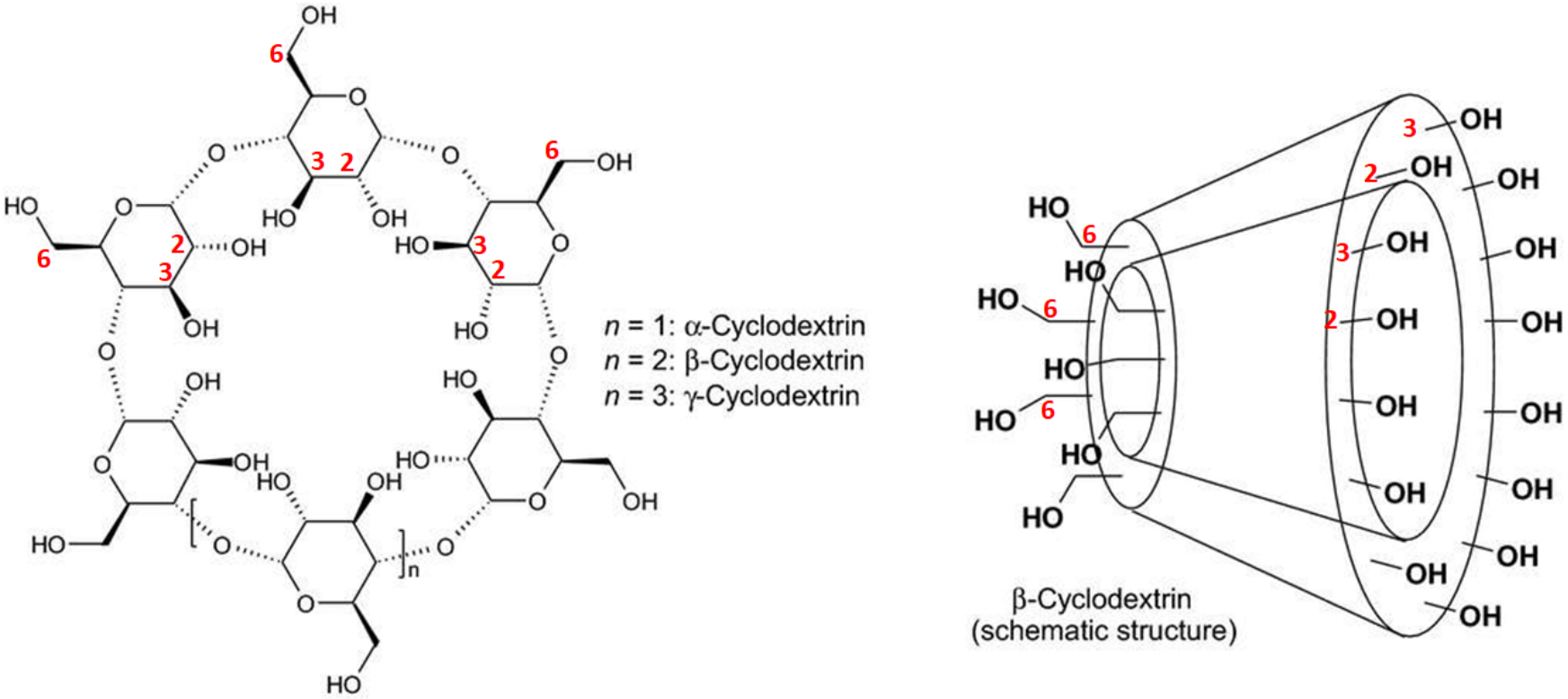


Figure 4. Représentation tridimensionnelle d'une cyclodextrine

Ainsi, sur le marché, on retrouve un large éventail de colonnes dites "chirales" préparées à partir de ß- ou ɣ-cyclodextrines (plus rarement α) diversement substituées aux positions citées plus haut, et qui sont recommandées par les fabricants ou la littérature scientifique en fonction de la cible à analyser.

2.2. Mise en œuvre expérimentale

Malgré plusieurs tentatives de rationalisation des processus de reconnaissance hôte-ligand entre les cyclodextrines et leur analytes-cibles (lactones, terpènes, etc), il n'est pas possible à l'heure actuelle de prédire qu'une cyclodextrine bien définie sera particulièrement adaptée à la séparation des énantiomères d'une molécule.

La séparation des énantiomères implique différents phénomènes de reconnaissance chirale qui ne se limitent pas au simple processus d'inclusion de l'hôte dans la cavité hydrophobe de la cyclodextrine. Il a été démontré que la reconnaissance chirale peut également se produire à l'extérieur du cône. C'est pourquoi **l'analyste travaillant dans le domaine de l'authenticité et de la naturalité se verra contraint de cribler un maximum de colonnes "chirales"** afin de déterminer la phase stationnaire la plus adaptée à la séparation qu'il souhaite réaliser. Afin de maximiser les chances de séparation, il conviendra de maîtriser plusieurs paramètres expérimentaux (figure 5) :

• En premier lieu, l'analyste devra disposer du **mélange racémique** pour développer ses conditions analytiques, ou tout du moins d'un mélange où les 2 énantiomères sont présents en quantité bien visible, et juger ainsi de la **qualité de séparation des pics par mesure de la résolution.**

• Afin de déterminer l'**ordre d'élution** des énantiomères, il conviendra au moins, en plus du mélange racémique, de disposer d'un **standard de chiralité définie** (dans le meilleur des cas, des 2 énantiomères).

• L'apport d'un **spectromètre de masse** pour la détection peut s'avérer utile pour confirmer l'identification des pics et la bonne séparation des **2 énantiomères** (on doit bien avoir **2 pics distincts présentant le même spectre de masse**).

Bien qu'en principe tout type de chromatographie (chromatographie liquide, supercritique, gazeuse, ...) soit utilisable pour la séparation des énantiomères d'un composé, en pratique l'**on préférera en général la chromatographie gazeuse** en raison de la nature volatile des composés d'arôme. L'utilisation d'un **détecteur universel de type FID est possible**, mais **la spectrométrie de masse est préférée** en raison de la possibilité de confirmer l'identité et la pureté des pics élués par comparaison des spectres avec ceux de composés de référence authentiques, analysés dans les mêmes conditions, ou par recherche dans des banques de spectres.

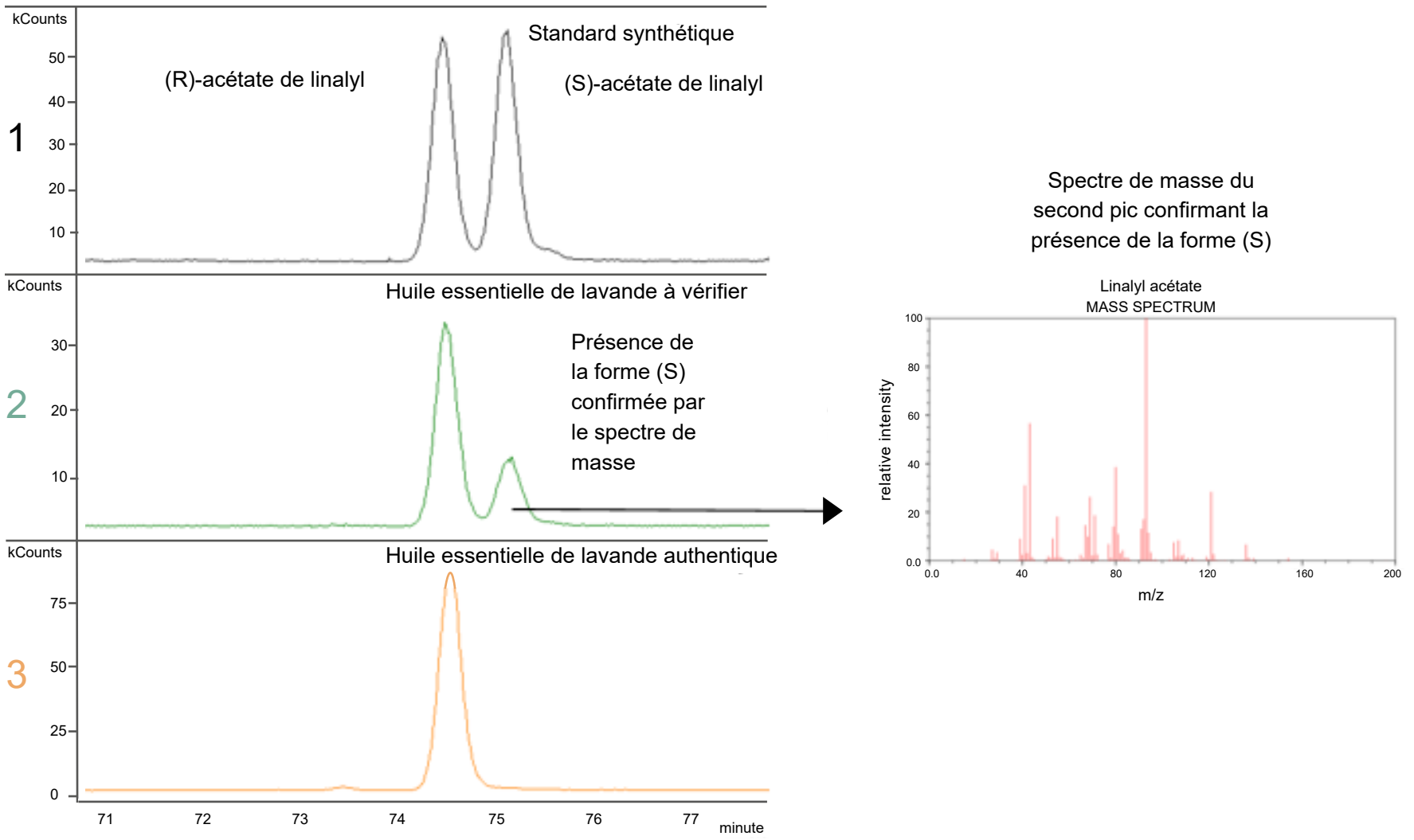


Figure 5. Séparation par chromatographie gazeuse couplée à une spectrométrie de masse des énantiomères (R) et (S) du linalyl acétate : molécule synthétique (courbe 1), huile essentielle de lavande à tester (courbe 2), huile essentielle de lavande authentique (courbe 3)

En fonction de la nature des échantillons à analyser (arôme formulé, huile essentielle, denrée alimentaire, ...) il sera souvent nécessaire de réaliser une **préparation d'échantillon ou extraction** qui a comme objectif de transformer l'échantillon en une forme compatible avec la technique analytique, et éventuellement d'enrichir les composés à analyser de manière à les rendre détectables.

› Cette étape consistera dans un cas simple (huile essentielle, composés cibles présents en quantité suffisante) en une mise en solution dans un solvant approprié tel que le dichlorométhane.

› Dans des cas complexes (aliments riches en matières grasses, composés cibles présents à l'état de traces), l'extraction sera plus élaborée et pourra par exemple comprendre une distillation sous vide poussé.

Fréquemment, des méthodes d'extraction utilisées dans le contexte d'une analyse non chirale de composés d'arômes d'une matrice donnée conviendront également en amont d'une analyse chirale. La chromatographie gazeuse bi-dimensionnelle, associant une colonne achirale en première dimension, et une colonne chirale en deuxième dimension, permettront d'augmenter de manière considérable la sélectivité de l'analyse et ainsi de déterminer un ratio énantiomérique même dans les cas les plus défavorables (analyse de traces en présence de nombreux interférents).

Une **méthode valide d'analyse chirale doit démontrer sa sélectivité** (la capacité à distinguer les énantiomères du ou des composés marqueurs), **sa spécificité** (l'absence d'interférence par d'autres composés présents), et **l'absence de formation d'artéfacts** (notamment par une racémisation pendant la préparation d'échantillon, l'extraction ou la séparation chromatographique). Cette validation peut être conduite par l'analyse d'échantillons authentiques et/ou de composés de référence énantiopurs et est spécifique à chaque composé analysé.

2.3. Stabilité des ratio énantiomériques

Dans la nature, les substances aromatisantes se présentent généralement sous forme de mélanges de leurs énantiomères. Un énantiomère est généralement prépondérant au sein d'un matériau naturel.

Par exemple : d-carvone dans le carvi, l-carvone dans la menthe verte.

Cependant, il existe également des exemples de mélanges racémiques naturels.

Par exemple : acide tartrique racémique dans le raisin, citronellal dans l'eucalyptus citronné, gamma-octalactone dans la framboise.

Prenons un cas concret : Le linalol se trouve très majoritairement sous sa forme (R)-(-)- dans l'huile essentielle de bergamote extraite à froid, dans l'huile essentielle de basilic ou de lavande officinale, alors que dans l'huile essentielle d'orange douce et dans la fraise (MP brute), l'énantiomère (S)-(+)- prédomine très largement. Dans des fruits (MP brutes) comme l'abricot, l'ananas, le cassis ou la framboise, un mélange plus ou moins proche du racémat peut être observé.

En soumettant de la bergamote ou de la lavande officinale à une hydrodistillation, qui implique un chauffage plus ou moins prolongé à haute température, la formation de quantités non négligeables du (S)-(+)-linalol est observée. Par ailleurs, la présence d'un milieu acide tel qu'un jus d'agrumes peut favoriser la racémisation du linalol. En revanche, d'autres composés chiraux sont plus difficiles à racémiser ; ainsi, la configuration du bêta-pinène n'est pas impactée par un traitement thermique ou par la présence d'un acide faible (type jus de fruits, pH environ 3).

2.4. Construction d'une base de données

La détermination des excès énantiomériques (ou des rapports énantiomériques) fait partie de l'arsenal des techniques dont dispose l'analyste pour parvenir à émettre un avis sur la naturalité des molécules aromatisantes (lorsque celles-ci sont chirales). Cependant, la mesure d'un excès énantiomérique n'est pertinente qu'à partir du moment où l'analyste dispose de référentiels, communément appelés bases de données.

Ainsi, quand le référentiel interne est inexistant, soit parce que le laboratoire démarre cette activité ou bien que la molécule n'était pas suivie jusque-là, l'analyste est contraint de se référer aux études scientifiques qui ont été publiées dans la littérature.

Dans le cas de molécules isolées, une simple détermination du pouvoir rotatoire peut permettre de vérifier si la molécule possède l'activité optique attendue (une molécule racémique n'aura aucune activité sous lumière polarisée). Dans le cas où la molécule est présente dans un arôme ou dans un extrait, la seule clé sera souvent apportée par la chromatographie énantiosélective, souvent gazeuse (GC), parfois liquide (LC) ou même encore en phase supercritique (SFC).

Aussi, la littérature scientifique internationale regorge de données concernant l'analyse de chiralité pour un éventail très vaste de molécules chirales naturelles. L'analyste se trouve donc face à une information abondante qui n'est pas toujours facile à trier. Se référer à des auteurs qui ont fait leurs preuves dans le domaine est souvent une façon de s'assurer que les "données externes" prises en compte puissent servir de référence aux analyses à réaliser en interne.

L'Annexe 1 propose une liste d'auteurs à laquelle le lecteur pourra se référer dans son éventuelle recherche bibliographique. Par la suite, il est évident qu'un laboratoire a grand intérêt à se constituer sa propre base de données, basée à la fois sur des données sûres de la littérature mais surtout sur ses propres analyses accumulées tout au long de son activité de contrôle.

Aussi, de manière à ce que cette base de données interne soit maintenue et utilisée avec pertinence par l'analyste, il est recommandé que chaque résultat soit rigoureusement consigné avec toute la traçabilité nécessaire.

Chaque laboratoire aura son propre fonctionnement mais il est d'usage que les accumulations de résultats d'analyse chirale sur une molécule dans un ingrédient, une matrice ou un arôme, servent à établir une norme interne au laboratoire, en exprimant la moyenne des valeurs mesurées et son écart-type. Un intervalle de tolérance est généralement défini en utilisant cette valeur moyenne autour de 2 fois l'écart-type. Toute valeur mesurée en dehors de cet intervalle de tolérance doit servir d'alerte à l'analyste.

3. Chiralité et conformité réglementaire

Au niveau européen, c'est le Règlement (CE) n°1334/2008 qui établit les exigences réglementaires relatives aux arômes et à certains ingrédients alimentaires possédant des propriétés aromatisantes.

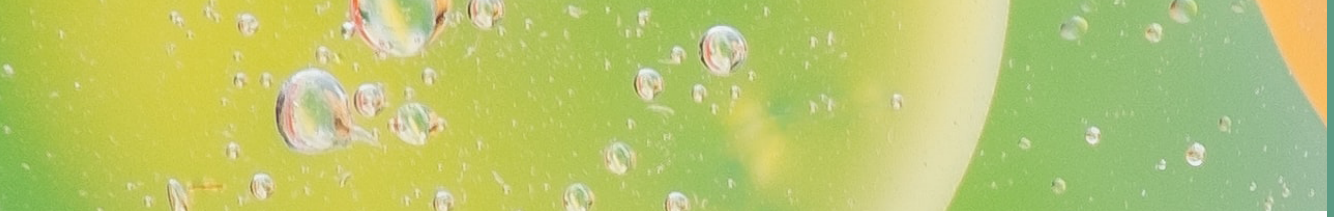
La conformité réglementaire des arômes à statut naturel est multifactorielle comme détaillé dans le document intitulé « **Contrôles analytiques et conformité réglementaire des arômes naturels** » rédigé par P3A.
La détermination du ratio énantiomérique de substances présentes dans les matériaux sources d'arômes est un élément permettant d'obtenir des indices quant à cette conformité réglementaire.

Ainsi l'analyse chirale peut permettre d'émettre des doutes, d'identifier des incohérences dans les dénominations d'arômes, notamment lorsque des ratios énantiomériques différents de ceux connus dans la nature sont relevés.

Cela dit, une analyse chirale à elle seule ne suffit pas à conclure positivement ou négativement sur la naturalité d'un arôme. Il convient de coupler cette analyse avec :

› D'autres techniques d'identification de molécules (analyse isotopique, analyse du ^{14}C, détection de la présence d'adultérant non détectable en chromatographie gazeuse ou d'impuretés de synthèse, etc.)

› Une évaluation des garanties de la conformité établie par le producteur de l'arôme en termes de procédés, de formulation, ...



Dans le cas des arômes naturels de X, l'analyse de la partie majoritairement issue de la source X (minimum 95%) devrait permettre de retrouver la distribution énantiomérique de cette source. Concernant la partie non issue de la source (maximum 5%), sous réserve de la naturalité des process/composés, toute distribution énantiomérique est réglementairement possible. *Ainsi les résultats d'une analyse chirale d'un arôme naturel de X dans son ensemble peuvent ne pas refléter parfaitement la distribution énantiomérique de la source sans pour autant que l'arôme soit non conforme.*

Dans le cas des arômes naturels (relevant de l'Article 16.6 du Règlement « Arômes » et donc ne faisant pas référence à une source), la conformité réglementaire de l'arôme est bien plus difficile à apprécier à travers de l'analyse chirale. En effet, l'analyse chirale permet surtout de déterminer si les constituants de l'arôme sont bien en relation avec la source nommée.

Annexe 1

Liste d'auteurs de référence sur l'analyse chirale (non exhaustive)

A. MOSANDL
P. SCHREIER
H. CASABIANCA
L. MONDELLO
C. BICCHI
L. SCHILIPILLITI
A. KRÜGER

Partenariat Analyse Authenticité Arômes

P3A

Aromalyse
EXPERT CHEMICAL ANALYSIS & MUCH MORE
www.aromalyse.com

BETA
www.betalabservices.com

eurofins
www.eurofins.fr

SNIAA
Syndicat National des Ingrédients Aromatiques Alimentaires
www.sniaa.org