

Partenariat Analyse Authenticité Arômes



Focus Analyse du Carbone-14 dans le contrôle de la conformité des arômes naturels

Décembre 2023



www.aromalyse.com



www.betalabservices.com



www.eurofins.fr



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 des méthodes d'analyse dans le contrôle de la conformité des arômes naturels.

1.Qu'est-ce que le carbone-14 ?

2.Analyse du carbone-14 : description des différentes méthodes

2.1. Les Normes (ASTM et ISO)

2.2. Spectrométrie de Masse par Accélération - AMS

2.3. Scintillation liquide

2.4. Couplage GC-AMS

3.Analyse du carbone-14 et conformité réglementaire

1. Qu'est-ce que le carbone-14 ?

Le carbone-14 (^{14}C) est surtout connu pour son utilisation par les archéologues souhaitant dater des objets archéologiques tels que des momies ou des résidus organiques. Cependant, sa radioactivité naturelle permet aussi de déterminer si des produits contenant du carbone sont issus de la biomasse ou dérivés de la pétrochimie.

Le ^{14}C est produit dans l'atmosphère par interaction des rayonnements cosmiques avec les atomes d'azote (Figure 1). Le ^{14}C s'associe ensuite avec des atomes d'oxygène, formant du $^{14}\text{CO}_2$, qui sera respiré par les plantes, entrant ainsi dans leur composition. Les plantes, mangées par des animaux, puis les animaux mangeant des animaux, vont aussi assimiler du ^{14}C dans leur organisme. Ainsi, les molécules à squelette carboné issues d'organismes vivants comportent cette radioactivité naturelle.

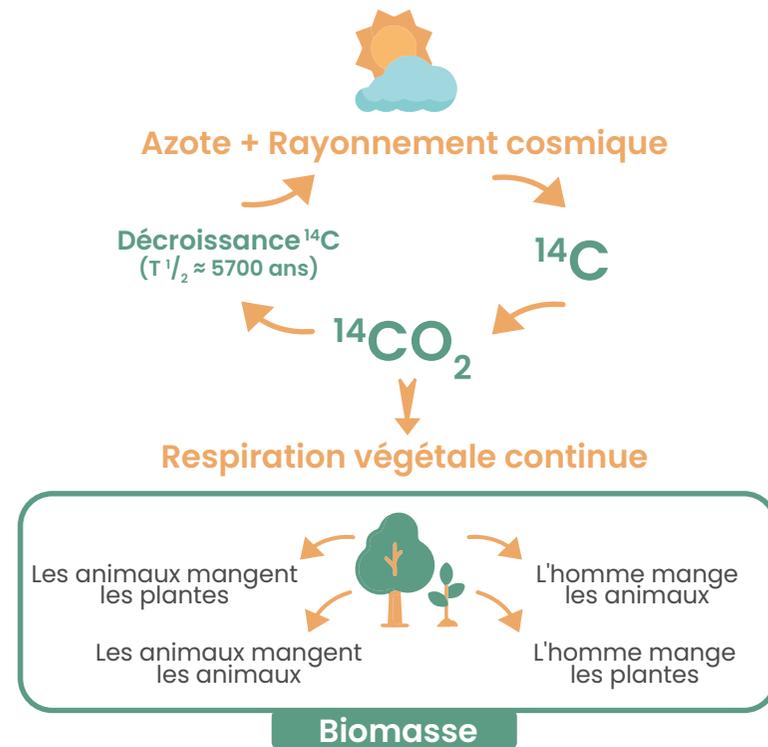


Figure 1. Origine du ^{14}C , produit dans l'atmosphère, et son incorporation dans la biomasse (Source : Beta Analytic)

La biomasse (incluant les plantes, animaux, champignons, algues...) a donc des taux de ^{14}C en équilibre avec ceux présents dans l'atmosphère tant qu'elle est vivante.

A la mort d'un organisme, le ^{14}C étant radioactif, il commence à décroître (Figure 2). Sa demi-vie¹ est de 5730 ans.

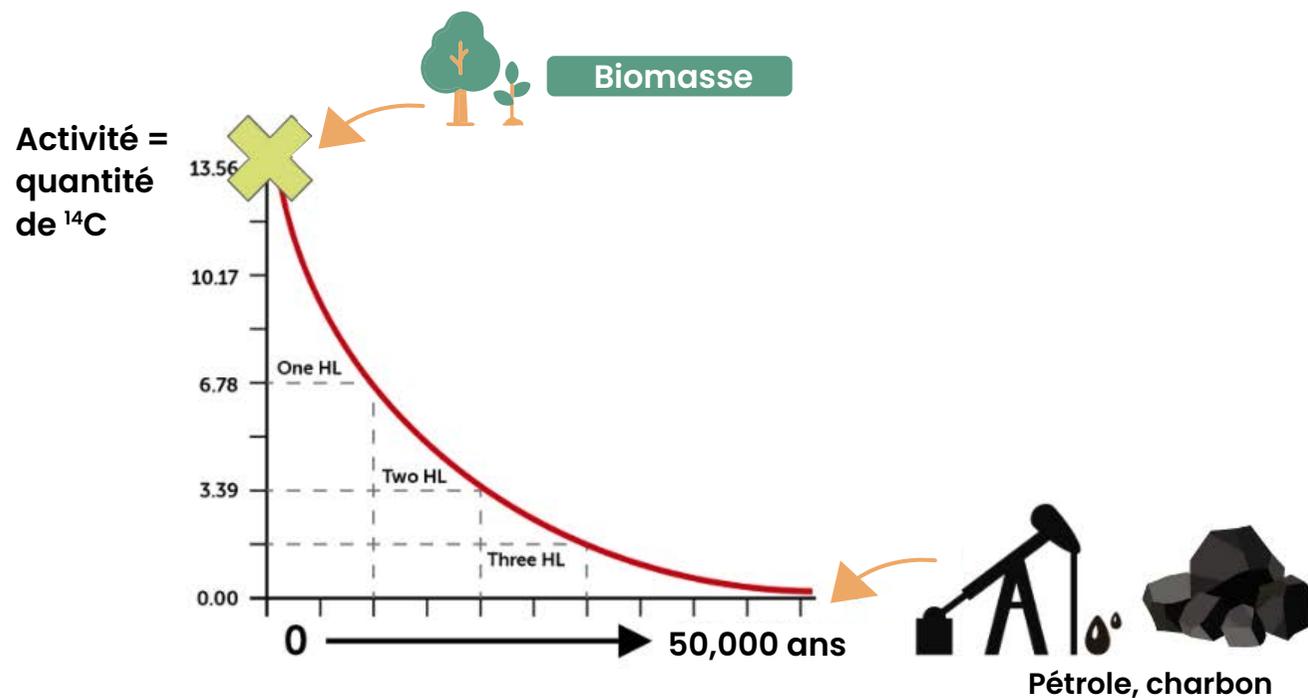


Figure 2 : Décroissance radioactive du ^{14}C en fonction du temps après la mort d'un organisme ; 50 000 ans après la mort d'un organisme, les taux de ^{14}C sont extrêmement faibles (Source : Beta Analytic)

¹ La demi-vie d'un élément radioactif est le temps nécessaire pour que la moitié des atomes se désintègre naturellement. La décroissance radioactive est exponentielle comme illustré en figure 2. Cela ne dépend pas de l'environnement (température, pression) mais c'est une propriété liée à l'élément radioactif - radionucléide - considéré.



Ainsi 50 000 ans après la mort d'un organisme, les quantités de ^{14}C qu'il contient seront si faibles que leur détection devient impossible. C'est pourquoi les sources fossiles (pétrole, charbon), issues d'organismes morts il y a des dizaines ou centaines de millions d'années, ne présenteront aucun signal en ^{14}C .

Dans ce cadre, le pourcentage de carbone moderne ou biosourcé est défini comme la quantité de carbone issu de la biomasse dans un produit par rapport à sa teneur totale en carbone. De façon schématique, elle peut être représentée comme suit (Figure 3) :

$$\begin{array}{c} \text{\% de carbone} \\ \text{moderne ou} \\ \text{biosourcé} \end{array} = \frac{\text{C} \text{ (arbre)}}{\text{C} \text{ (arbre)} + \text{C} \text{ (charbon)} + \text{C} \text{ (pétrole)}} \times 100$$

Synthétique = fossile

Figure 3 : Calcul du pourcentage de carbone moderne dans le cadre de l'analyse du ^{14}C (Source : Beta Analytic)

Pour en savoir plus

Certains effets anthropiques ont modifié les teneurs en ^{14}C dans l'atmosphère :

- Depuis l'avènement de l'ère industrielle, beaucoup de carbone d'origine fossile a été brûlé et donc rejeté dans l'atmosphère, ce qui a conduit à une baisse du niveau global de ^{14}C dans l'atmosphère.
- Les essais nucléaires ont perturbé les teneurs en ^{14}C de l'atmosphère au cours des 7 dernières décennies, car de larges quantités de ^{14}C ont été rejetées dans l'atmosphère (Figure 4).

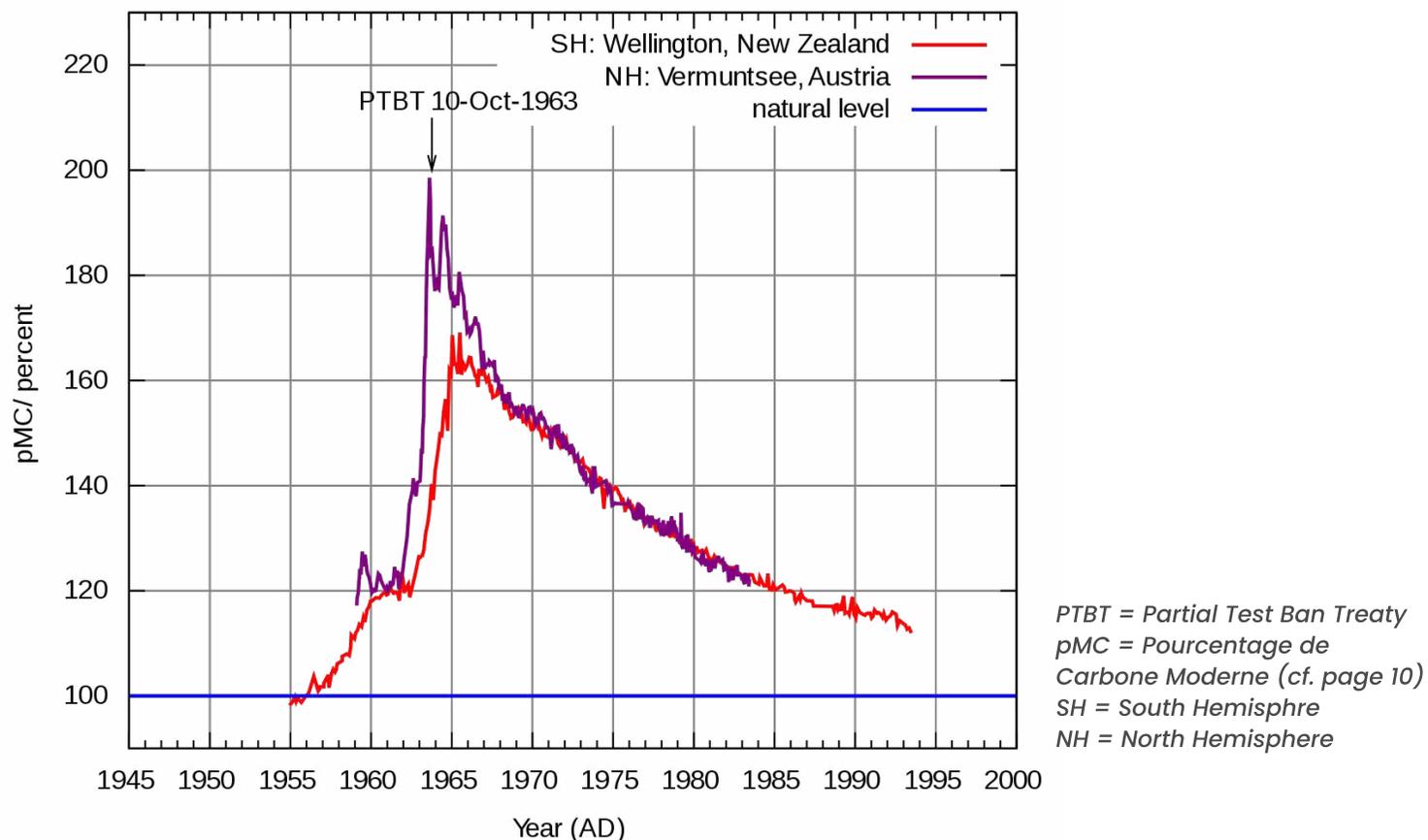


Figure 4 : Influence des essais nucléaires sur les teneurs en $^{14}\text{CO}_2$ atmosphérique dans la seconde moitié du 20ème siècle.

La figure montre le ratio $^{14}\text{C} / ^{12}\text{C}$ par rapport au niveau naturel dans le CO_2 atmosphérique en fonction du temps.

Source : https://en.wikipedia.org/wiki/Bomb_pulse#/media/File:Radiocarbon_bomb_spike.svg

2. Analyse du carbone-14 : description des différentes méthodes

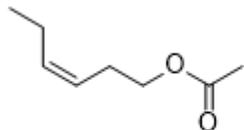
2.1. Les Normes (ASTM et ISO)

Plusieurs normes encadrent les analyses du ^{14}C permettant de déterminer le pourcentage de carbone issu de sources naturelles (biomasse) par rapport au carbone issu de sources fossiles (synthèse chimique) des arômes alimentaires, additifs alimentaires, parfums, cosmétiques, compléments alimentaires, ainsi que d'autres composés chimiques des aliments, médicaments et boissons.

Les résultats indiquent le pourcentage d'atomes de carbone issus de la bio-

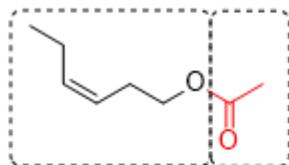
masse et non le pourcentage massique du produit qui est biosourcé (Figure 5). Ces normes ne permettent pas de différencier les différents types de sources naturelles (plantes, animaux ou matériel microbiologique) ni une origine botanique, mais uniquement si le matériau est dérivé de la biomasse ou de source pétrochimique, ou les deux. Ainsi ces méthodes n'ont pas pour objectif de déterminer l'impact environnemental, l'origine géographique ou la performance et la fonctionnalité d'un produit.

(Z)-3-hexenyl acetate



Formule chimique : $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{O}_2$
Poids moléculaire : 142.1980
Analyse élémentaire :
C, 67.57; H, 9.92; O, 22.50

Carbone naturel Carbone fossile



Les atomes de carbone de la fonction acétate étant d'origine fossile, alors le pourcentage de carbone moderne (ou biosourcé) de cette molécule est de 75%.

Figure 5. Calcul du pourcentage de carbone moderne d'une molécule par analyse du ^{14}C .



- La plus ancienne norme est la [ASTM D6866](#), élaborée aux Etats-Unis. La norme ASTM D6866 est l'une des normes pour déterminer le contenu biosourcé de solides, liquides ou gaz, en utilisant le ^{14}C . Ces méthodes de test s'appliquent à tout produit contenant des composés à base de carbone qui peuvent être brûlés en présence d'oxygène pour produire du CO_2 gazeux, et s'appliquent aussi aux échantillons gazeux.

Les résultats sont reportés comme fraction de la teneur en carbone organique total (COT) d'un matériau, ce qui veut dire que le carbone inorganique (les carbonates) éventuellement présents sont enlevés par bain d'acide avant les analyses.

- La [norme ISO 16620-2](#) est une norme internationale, élaborée par l'Organisation internationale de normalisation, décrivant une méthode permettant de déterminer la teneur biosourcée d'échantillons solides, liquides et gazeux en utilisant l'analyse au ^{14}C . Un rapport d'analyse ISO 16620-2 pour un échantillon d'arôme ou de parfum indique le pourcentage de carbone biosourcé comme fraction du carbone total (CT) ou carbone organique total (COT) dans un matériau envoyé pour analyse. Le résultat CT représente tout le carbone présent dans le matériau, à la fois organique et inorganique.

- Au niveau européen, il existe les normes NF EN 16640 et NF EN 16785-1, cependant ces dernières ne sont a priori pas utilisées dans l'analyse d'arômes mais plutôt pour celle des bioplastiques.

Ces normes sont globalement équivalentes à l'exception de la partie relative à la préparation des échantillons. Elles définissent une erreur absolue de ± 2 à 3% liée à l'historique de leurs mises en place. Le principal critère de choix entre ces différentes normes repose sur la prise en compte ou non des carbonates. Dans le cas des arômes, peu de différences sont attendues sur ce point contrairement au cas des produits à base de bois ou contenant des carbonates. Ce choix peut aussi être orienté par le besoin de répondre à certains labels qui privilégient une norme en particulier.

La Spectrométrie de Masse par Accélérateur – AMS, référée comme la méthode B dans la norme ASTM, est la technologie la plus avancée pour obtenir des résultats de haute précision. La scintillation liquide est une seconde méthode permettant d'analyser les teneurs en ^{14}C ; elle est moins précise mais bien plus accessible (pour le comptage direct) à mettre en œuvre et moins coûteuse à utiliser en routine.

2.2. Spectrométrie de Masse par Accélération - AMS

L'échantillon est examiné afin d'être ali-quoté (c'est-à-dire sous-échantillon-né) de la façon la plus optimale possible. L'échantillon est ensuite testé pour la présence de carbonates grâce à de l'acide chlorhydrique si requis, car plusieurs normes demandent à ce que les carbonates, aussi appelés carbone inorganique, soient enlevés avant l'analyse. Si des carbonates sont détectés, ils sont éliminés avec de l'acide phosphorique. Le matériel est placé dans un environne-ment constitué à 100% d'oxygène et brûlé à 800°C afin que tout le C soit converti en CO₂. Le CO₂ est ensuite réduit en graphite en utilisant un catalyseur métallique.

L'échantillon est placé dans un Spectro-mètre de Masse par Accélération (Figure 6), dans lequel le contenu en ¹⁴C est me-suré et ensuite corrigé du fractionnement isotopique. Le ratio isotopique mesuré est ensuite comparé au ratio d'un standard moderne de valeur connue (NIST-4990c, acide oxalique). Le résultat est multiplié par le facteur actuel de correction (mis à jour régulièrement) afin de déterminer le pourcentage de carbone biosourcé.

Plusieurs standards pour des vérifications de qualité sont mesurés en même temps que l'échantillon et reportés séparément dans un rapport d'assurance qualité.



Figure 6. Spectromètre de masse par Accélération.

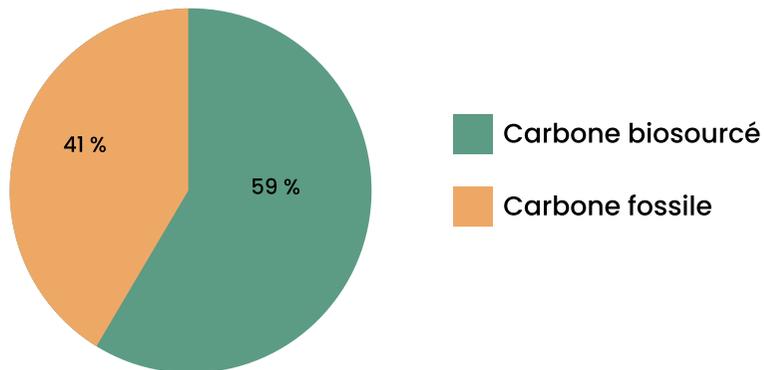


La limite de détection est exprimée en pourcentage de carbone moderne² (pMC) et dépend des laboratoires.

Les résultats sont faciles à interpréter : ils sont en effet donnés en pourcentage du carbone (total ou organique seulement) qui est biosourcé (Figure 7). Ce pourcentage de carbone moderne est compris entre 0 et 100%.

RESULTAT : X_B^{TC} 59% de carbone biosourcé
(trace d'origine synthétique dans le matériau analysé)

Pourcentage de carbone moderne (pMC) 58.59 +/- 0.16 pMC
Facteur de correction atmosphérique (REF) 100.0; = pMC/1.000



RESULTAT : X_B^{TC} 99% de carbone biosourcé (statistiquement cohérent avec une origine entièrement naturelle, aucune trace d'origine synthétique)

Pourcentage de carbone moderne (pMC) 98.86 +/- 0.23 pMC
Facteur de correction atmosphérique (REF) 100.0; = pMC/1.000

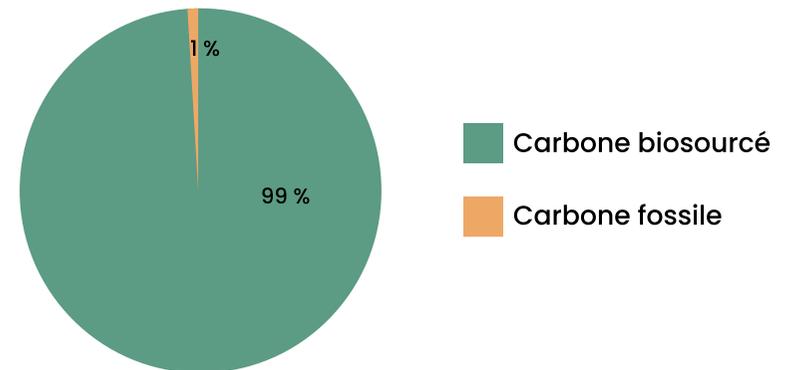


Figure 7 : Exemples de résultats obtenus avec la méthode de Spectrométrie de masse par accélération selon le standard ISO 16620-2:2019

² pMC signifie pourcentage de carbone moderne. Il s'agit du pourcentage de ¹⁴C mesuré dans l'échantillon par rapport à un standard moderne de référence (NIST 4900C).

2.3. Scintillation liquide

La scintillation liquide est basée sur la détection des rayonnements ionisants produits par les atomes radioactifs lors de leur désintégration. Dans le cas du carbone-14, on détecte une particule bêta, ici il s'agit d'un électron (Figure 8).



Figure 8 : Réaction de désintégration du ${}^{14}\text{C}$.

Le rayonnement libéré lors de la désintégration du noyau va venir exciter le solvant, qui émettra en retour des photons (scintillation) qui seront captés par un photomultiplicateur au niveau du détecteur (Figure 9). La radioactivité présente dans l'échantillon sera donc mesurée indirectement, et exprimée par rapport à la norme actuelle de 13,6 désintégrations par minute par gramme de carbone pour un carbone 100% biosourcé.



Figure 9 : Appareil typique de scintillation liquide.

Deux méthodes sont couramment employées dans les laboratoires :

- **Méthode normée (ASTM) :**

Il s'agit de la méthode mise au point initialement par les géologues et archéologues, et acceptée par la communauté internationale. Celle-ci vise à récupérer le carbone des molécules étudiées pour le transformer en une molécule observable en scintillation liquide (sans artéfact ou perturbation de mesure). Le principe consiste donc à réaliser la combustion de la molécule étudiée, récupérer le CO₂ qui en est issu puis de le réduire sous forme de carbure de lithium puis d'acétylène. En dernière étape, l'acétylène est transformé en benzène par trimérisation (réaction de Kekulé), qui sera la molécule dont la radioactivité sera mesurée en scintillation liquide (Figure 10).

- **Approche pragmatique : le comptage direct**

Cette approche consiste à détecter la radioactivité du ¹⁴C au sein même des molécules sans avoir à les brûler comme présenté dans le paragraphe ci-dessus. La mesure est réalisée en utilisant le même type d'équipement que la méthode normée. Cette méthode présente l'avantage d'être beaucoup moins demandeuse

en temps de préparation et de manipulation, mais elle ne pourra pas convenir à certaines molécules. Entre autres, les produits colorés et/ou fortement conjugués ainsi que certaines fonctions chimiques seront tout bonnement incompatibles avec la méthode de comptage direct. En effet, on dit qu'en présence de ces particularités structurales/chromatiques (conjugaison/coloration) ou bien avec des aldéhydes (par exemple), on observe un véritable "quench" du signal. En d'autres termes, l'échantillon inhibe lui-même les particules bêta que libèrent ses propres atomes de ¹⁴C. Généralement, un comptage direct (exprimé en coups par minute) doit s'accompagner d'une valeur de transmittance du signal (tSIE) qui permet de jauger de la validité de la mesure. Dans le cas où les molécules conduisent à un quench du signal, il est donc nécessaire d'utiliser la méthode normée (combustion/conversion en benzène) ou alors d'avoir recours à l'AMS.

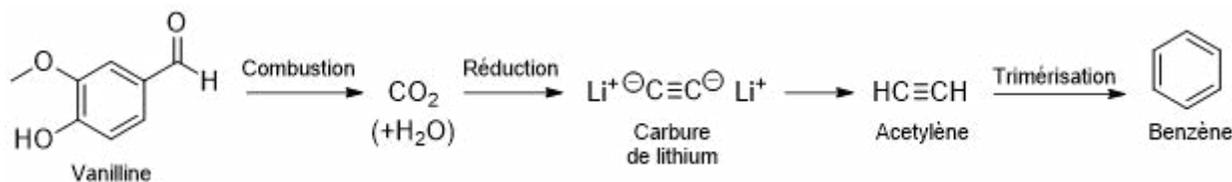


Figure 10 : Préparation de l'échantillon (ici, la vanilline) en vue d'une détection du ¹⁴C par scintillation liquide.

2.4. Couplage GC-AMS

Dans sa version normée (ASTM), la scintillation liquide fournit le même type de résultat que l'AMS en permettant de remonter à une teneur en ^{14}C par gramme de carbone total (ou de carbone organique total). Le comptage direct, bien qu'avantageux dans sa pratique quotidienne, ne devrait servir qu'à donner une indication sur l'origine biosourcée ou fossile de la molécule sans pour autant pouvoir estimer correctement le pourcentage de carbone naturel par rapport au carbone d'origine fossile. Selon le jargon du domaine, l'échantillon est jugé "chaud" (radioactif donc naturel), ou bien il est "froid" (complètement éteint, donc d'origine fossile).

L'AMS mesure directement les isotopes du ^{14}C quand la scintillation liquide les mesure indirectement ; l'AMS est donc plus précise et souvent favorisée par les réglementations. La scintillation liquide demande des tailles d'échantillons plus grandes que l'AMS.

Dans le cas d'échantillons complexes (préparations aromatisantes, arômes formulés...), les méthodes décrites plus haut peuvent être couplées avec une préparation d'échantillons et de séparation.

Ainsi les échantillons sont d'abord extraits et/ou hydrolysés pour solubiliser les composés organiques. Puis diverses techniques de séparation sont employées : chromatographie gazeuse (GC), chromatographie liquide à haute résolution (HPLC), ...

La chromatographie liquide à haute résolution (HPLC) est utilisée principalement pour les composés polaires non volatils tels que les sucres, les acides aminés, les lipides polaires et les polyamines. Ainsi dans le cas des arômes, on privilégie la chromatographie gazeuse (GC).

Le pouvoir séparatif de la chromatographie en phase gazeuse permet d'isoler une molécule cible de manière à la transformer en gaz élémentaire par l'intermédiaire d'un four de combustion ou de pyrolyse. Ce gaz est ensuite injecté directement dans un système AMS. Ce couplage permet ainsi de déterminer le teneur en carbone biosourcé de chaque pic obtenu par la séparation en chromatographie gazeuse (GC), donc de chaque élément d'échantillons complexes. Il est entendu qu'une bonne séparation des différents éléments d'un échantillon complexe doit être vérifiée pour pouvoir correctement interpréter les résultats de l'AMS.

3. Analyse du carbone-14 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.

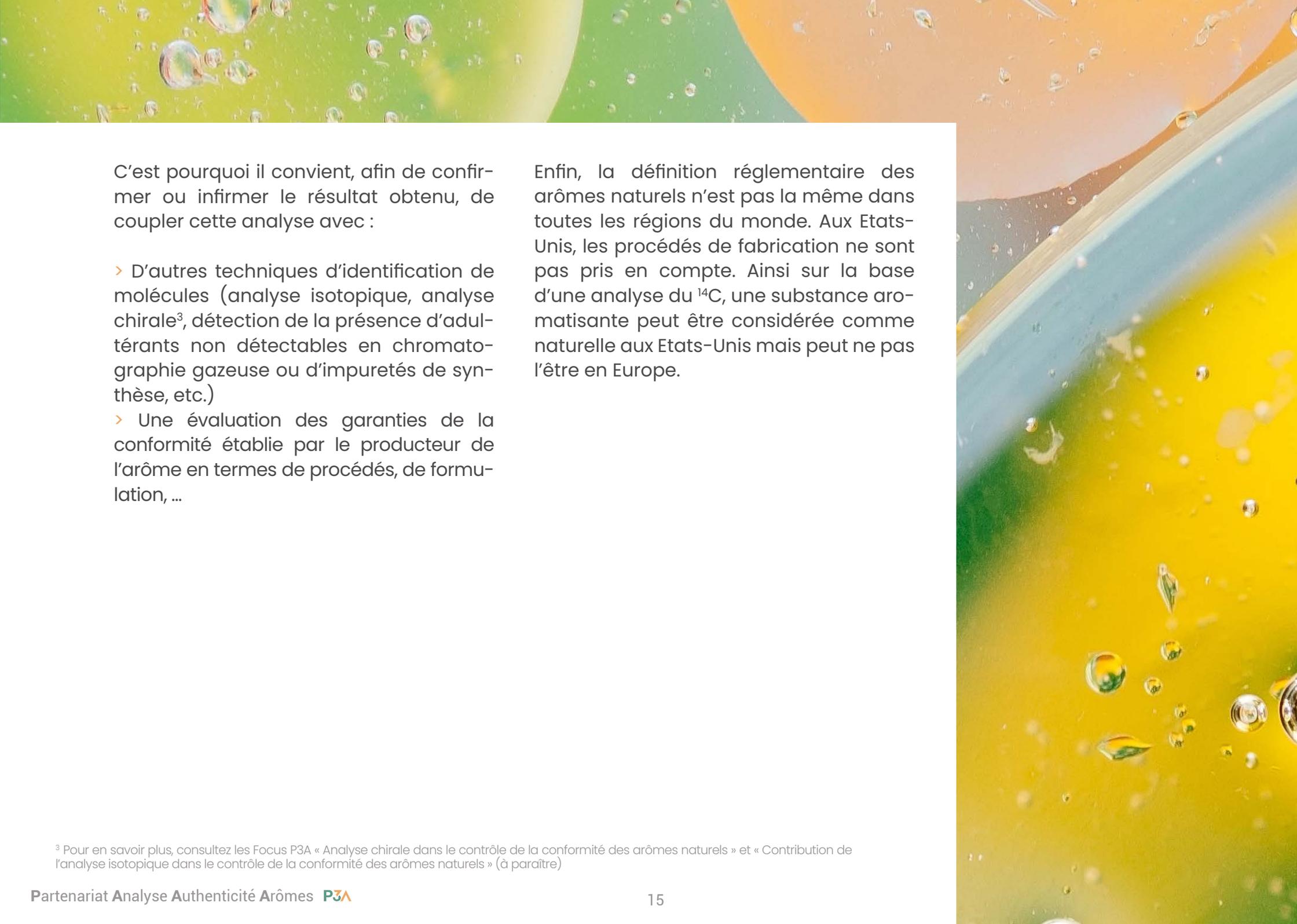
La conformité réglementaire des arômes à statut naturel est multifactorielle comme détaillé dans le document intitulé « **Contrôles analytiques et conformité réglementaire des arômes naturels** » rédigé par P3A.

La détermination du pourcentage de carbone moderne par l'analyse du ^{14}C permet de connaître le pourcentage d'atomes de carbone biosourcé d'une molécule. Cette méthode permet donc d'obtenir un indice important sur la conformité de certains ingrédients aromatiques tels que les substances aromatisantes. En effet, seule la partie aromatisante de l'arôme est prise en considération par la réglementation dans l'évaluation de la naturalité d'un arôme.

Les solvants supports des arômes et les solvants d'extraction peuvent être d'origine fossile sans pour autant remettre en cause la naturalité de l'arôme en lui-même.

De plus, l'obtention d'un résultat indiquant 100% de carbone biosourcé ne garantit pas la conformité réglementaire d'un arôme naturel. En effet, certains procédés, non autorisés dans la fabrication d'arômes naturels (Règlement (CE) n°1334/2008) tels que des réactions d'oxydation ou d'hydrogénation mais aussi certaines réactions chimiques impliquant des précurseurs naturels ou des catalyseurs non biologiques (non autorisés par le Règlement (CE) n°1334/2008) n'impliquent ou ne modifient pas les atomes de carbone.





C'est pourquoi il convient, afin de confirmer ou infirmer le résultat obtenu, de coupler cette analyse avec :

- > D'autres techniques d'identification de molécules (analyse isotopique, analyse chirale³, détection de la présence d'adulterants non détectables 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, ...

Enfin, la définition réglementaire des arômes naturels n'est pas la même dans toutes les régions du monde. Aux Etats-Unis, les procédés de fabrication ne sont pas pris en compte. Ainsi sur la base d'une analyse du ¹⁴C, une substance aromatisante peut être considérée comme naturelle aux Etats-Unis mais peut ne pas l'être en Europe.

³ Pour en savoir plus, consultez les Focus P3A « Analyse chirale dans le contrôle de la conformité des arômes naturels » et « Contribution de l'analyse isotopique dans le contrôle de la conformité des arômes naturels » (à paraître)

Partenariat Analyse Authenticité Arômes

P3A



www.aromalyse.com



www.betalabservices.com



www.eurofins.fr



www.sniaa.org