

# Stratégies modernes d'identification des composés odorants

Cécilia CASTEL<sup>1</sup>, Katharina BREME<sup>2</sup>, Xavier FERNANDEZ<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire de Chimie des Molécules Bioactives et des Arômes (LCMBA), UMR CNRS 6001, Institut de Chimie de Nice, Université de Nice-Sophia Antipolis, Parc Valrose, 06108 Nice Cedex 2, France

<sup>2</sup> Agroscope Liebefeld-Posieux Research Station ALP, 3003 Berne, Switzerland

## Résumé

Les composés odorants sont partout présents dans notre environnement ; arômes, parfums, odeurs, pollutions sont ainsi des termes couramment employés. Que cela soit pour des raisons de contrôle-qualité, recherche ou sécurité du consommateur et de la population, la caractérisation des odorants est un enjeu majeur des sciences analytiques.

La multiplication des analyses nécessaires a ainsi conduit à de nombreux progrès en chimie analytique. L'automatisation a été grandement améliorée et les limites de détection repoussées. La mise en évidence, la caractérisation et la quantification des composés odorants ont ainsi fortement progressé.

Un composé odorant présent dans un produit ou dans notre environnement est caractérisé par sa concentration, sa note olfactive et son seuil de perception. Bien que les techniques analytiques classiques, en particulier la chromatographie en phase gazeuse, permettent de mettre en évidence et de quantifier les composés odorants, il est bien plus difficile de caractériser l'impact olfactif et le seuil de perception du composé identifié.

L'analyse des composés odorants nécessite donc souvent l'utilisation conjointe de techniques de détection physique et d'analyse sensorielle. Le couplage chromatographie en phase gazeuse/olfactométrie (GC/O) en est l'illustration et représente l'outil incontournable de ce type d'étude.

**Mots clés :** Composés odorants, Extraction, Analyse, Chromatographie en phase Gazeuse, Olfactométrie, couplage GC/Olfactométrie

## Summary

Odorants are ubiquitous in our environment (flavors, fragrances, pollutions...) and their characterization is a major challenge for analytical science whether for quality control, research or consumer safety. The proliferation of analyses has led to many advances in analytical chemistry; automation has been greatly enhanced and the limits of detection have been pushed. The identification, characterization and quantification of odorants have thus greatly increased. An odorant is characterized by its concentration, its odor descriptor and its odor threshold. Conventional analytical techniques, especially gas chromatography, are used to identify and quantify odorants but it is much more difficult to characterize the olfactory impact and the odor threshold of the identified compound. Analysis of odorants therefore often requires the combined use of physical and sensory techniques. The coupling Gas Chromatography/Olfactometry (GC/O) is an illustration and is an essential tool for this type of study.

**Keywords:** Odorants, Extraction, Analysis, Gas Chromatography, Olfactometry, Gas Chromatography/Olfactometry

## Liste et signification des acronymes utilisés dans cet article

AED	Atomic Emission Detector, Détecteur à Emission Atomique
AEDA	Aroma Extract Dilution Analysis, Analyse par Dilutions de l'Extrait Aromatisant
CHARM	Combined Hedonic of Aromatic Response Measurement, Mesure de l'Occurrence de la Réponse Aromatique
CLND	Chemiluminescence Nitrogen Detector, Détecteur Chimiluminescent à l'Azote
D-HS	Dynamic Headspace, Espace de tête Dynamique
ELCD	Electroconductivity Detector, Détecteur à électroconductivité
FD	Flavour Dilution Factor, Facteur de Dilution
FID	Flame Ionization Detector, Détecteur à Ionisation de Flamme
FPD	Flame Photometric Detector, Détecteur à Photométrie de Flamme
GC/MS	Gas Chromatography/Mass Spectrometry, couplage Chromatographie en Phase Gazeuse / Spectrométrie de Masse
GC/O	Gas Chromatography/Olfactometry, couplage Chromatographie en Phase Gazeuse / Olfactométrie
MDGC	Multidimensional Gas Chromatography, Chromatographie en phase gazeuse multidimensionnelle

NIF	Nasal Impact Frequency
NPD	Nitrogen Phosphorus Detector, Détecteur Azote-Phosphore
OSME	Odour Specific Magnitude Estimation, Estimation de l'Intensité Spécifique d'une Odeur
PFPD	Pulsed Flame Photometric Detector, Détecteur à Photométrie de Flamme Pulsée
SCD	Sulphur Chemiluminescence Detector, Détecteur Chimiluminescent au Soufre
SOT	Signal Olfactif Total
TID	Thermoionic Detector, Détecteur Thermoionique
TOF-MS	Time of Flight-Mass Spectrometer, Spectromètre de Masse à Temps de vol
TSD	Thermoionic Specific Detector, Détecteur Thermoionique Spécifique
VIDEO-Sniff	Vocabulary-Intensity-Duration of Elementary Odours perceived by Sniffing, Durée, Intensité et Vocabulaire d'Odeurs Elementaires Perçues par Sniffing

## 1. Introduction

Les composés odorants sont omniprésents dans notre vie quotidienne et jouent un rôle primordial dans nombre de nos actions. Ainsi les composés aromatisants, bien qu'ils ne possèdent généralement aucun rôle nutritif, jouent un rôle décisif sur le choix d'un aliment et sur la satiété. Le parfum permet de donner une identité à un produit quel qu'il soit. Il est donc important que nos produits d'usage quotidien présentent une odeur agréable. Au contraire, les mauvaises odeurs sont pourchassées pour être éliminées ou masquées. L'odeur peut alors devenir une pollution très gênante.

Il est donc très important de pouvoir identifier, qualifier et quantifier les composés odorants qui nous entourent.

D'un point de vue physico-chimique, ces composés doivent être suffisamment volatils pour que leur concentration atteigne leur seuil de perception. En pratique, la masse molaire de ces composés n'excède pas 400 g/mole. Ils sont de nature très variée et sont constitués d'un squelette hydrocarboné qui peut être linéaire, cyclique ou aromatique. Presque toutes les fonctions chimiques portées par ces chaînes sont représentées : alcools, composés carbonylés (principalement les aldéhydes), esters, éthers, phénols et enfin dérivés soufrés, azotés, halogénés et hétérocycles<sup>[1]</sup>.

La grande difficulté dans l'analyse des composés odorants est la dualité fréquente entre seuil de perception et concentration. Il n'est pas rare d'identifier des composés volatils en grande concentration mais très peu odorants et au contraire que des composés présents à l'état de traces présentent des puissances olfactives très importantes.

L'analyse des composés odorants se déroule généralement en trois grandes étapes : l'extraction, l'analyse et le traitement des données. De par le nombre des techniques d'extraction et d'analyse possibles, les stratégies sont très nombreuses.

L'étape d'extraction est capitale car il faut être capable d'extraire de façon exhaustive les composés volatils sans discrimination et en limitant l'extraction des composés non volatils. Le type d'échantillon est alors primordial dans le choix de la technique d'analyse. Pour les échantillons solides et liquides, les techniques d'extraction solide-liquide, liquide-liquide, d'hydrodistillation et d'entraînement à la vapeur sont restées pendant longtemps les techniques de choix. Pour l'extraction des composés odorants atmosphériques, les techniques d'espace de tête dynamique (Dynamic Headspace, D-HS) et de prélèvement à l'aide de sacs adaptés étaient privilégiées<sup>[2]</sup>.

Les techniques d'analyses étant beaucoup plus restreintes, la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS) demeure la technique de choix.

La multiplication des analyses à réaliser et les exigences en termes de limites de détection des composés odorants ont conduit à de nombreux développements dans l'analyse de ces composés. De nombreuses techniques d'extraction/enrichissement, principalement des techniques d'extraction de l'espace de tête, ont vu le jour. Les techniques de chromatographie en phase gazeuse se sont également développées en repoussant sans cesse les limites de détection et les pouvoirs de séparation. Cela a été permis par le développement du couplage GC/Olfactométrie et des techniques de chromatographie à deux dimensions (MDGC : GC-GC et GCxGC), l'amélioration des analyseurs de masse classiques (analyseurs quadripolaires et trappes ioniques) et le développement de l'analyseur de masse à temps de vol (TOF-MS).

Cet article a pour objectif de présenter les derniers développements dans le domaine de la caractérisation des composés odorants, appuyés sur des exemples concrets.

## 2. Extractions / Préparation d'échantillons

Dans le domaine de l'analyse des composés odorants, l'extraction est une étape capitale, généralement longue et source de nombreuses erreurs. Le choix de la méthode d'extraction la plus adaptée est dicté par deux facteurs : la nature de la matrice à étudier et la finalité de l'analyse.

L'objectif est d'obtenir l'échantillon le plus représentatif d'un point de vue olfactif en limitant l'extraction de composés non volatils qui pourraient gêner l'analyse.

Dans le cas de l'extraction d'une atmosphère (échantillon gazeux), deux techniques peuvent être utilisées : l'échantillonnage direct ou indirect.

Pour l'échantillonnage direct, l'atmosphère est prélevée à l'aide de seringues à gaz ou de sacs inertes de type Tedlar® puis directement analysée. Cependant, ces techniques sont peu sensibles car l'échantillon est principalement composé d'air et les volumes pouvant être analysés sont généralement limités.

Dans le cas de l'échantillonnage indirect, les composés volatils du gaz sont piégés, le plus souvent par absorption/adsorption et condensation sur une phase absorbante. C'est la technique de l'espace de tête dynamique (D-HS).

Dans le cas d'un échantillon solide ou liquide, les techniques disponibles sont plus nombreuses. Ces différentes techniques sont présentées et discutées dans un dossier consacré à l'analyse des arômes<sup>[3]</sup>. Il est cependant important de retenir que dans le cas d'études de matrices solides ou liquides, il n'existe pas de méthode d'extraction universelle permettant d'extraire tous les composés odorants de façon quantitative et cela en dépit des progrès techniques réalisés ces dernières années. Il est donc important d'utiliser plusieurs techniques d'extraction complémentaires.

Une évaluation sensorielle olfactive de l'extrait par des personnes formées à cette démarche doit être effectuée préalablement à son analyse par GC/O afin de vérifier l'adéquation olfactive entre l'extrait et le produit initial. L'évaluation olfactométrique ultérieure aura pour but de décrire et de caractériser les composés odorants de l'extrait et, par extension, du produit analysé.

Ainsi, l'évaluation de la représentativité odorante des extraits aromatiques est une étape primordiale à ne pas négliger. Les tests de représentativité sont soumis à plusieurs paramètres dépendants principalement de l'état physique de l'extrait (liquide ou gazeux) et de la sécurité sanitaire des juges lors de l'évaluation (toxicité de l'extrait).

Les techniques d'extraction telles que la distillation, sous vide ou à pression atmosphérique, l'extraction-distillation simultanée, l'extraction solide-liquide ou liquide-liquide, sont autant de techniques permettant d'obtenir un extrait sous forme liquide à partir d'une matrice solide ou liquide.

Deux voies d'étude de représentativité d'extraits odorants liquides sont possibles : la redéposition sur mouillettes ou la redéposition sur milieu modèle (liquide ou émulsion). La redéposition de l'extrait sur mouillette nécessite que l'extrait soit contenu dans un solvant pouvant s'évaporer facilement<sup>[4]</sup>. L'extrait peut également être réincorporé dans un milieu modèle neutre sur le plan olfactif. Dans la composition de ces milieux modèles peuvent être intégrés des solvants neutres (propylène glycol, triacétine, citrate de triéthyle, ...), de l'eau, de l'huile, ... La composition de ces systèmes peut être complexifiée par la réalisation de systèmes binaires eau/huile, ternaires eau/huile/éthanol etc., ou bien encore sous forme d'émulsions (crèmes, mousses, ...).

Pour mesurer la représentativité d'un extrait, deux types de tests sont communément employés. Les tests de similarité odorante permettent de noter l'adéquation de la qualité de l'odeur de l'extrait par rapport à celle du produit initial. Une bonne note de similarité correspond à une extraction non sélective. Les tests d'intensité odorante permettent d'établir l'adéquation de l'intensité odorante de l'extrait par rapport à celle du produit initial lorsque la redéposition se fait dans des conditions d'iso-intensité. En effet, l'extrait étant concentré, il faut redéposer une quantité d'extrait correspondant à la même concentration des composés odorants présents dans le produit initial. Ainsi, dans des conditions de redéposition en iso-intensité, plus l'intensité odorante de l'extrait est proche de celle du produit initial, plus l'extraction des composés volatils aura été quantitative.

Dans le cas de l'échantillonnage direct, les tests de représentativité s'avèrent superflus étant donné que l'extrait et le produit initial constituent la même matrice. Cependant, dans le cas d'extraction de l'espace de tête, il demeure nécessaire de s'assurer que l'adsorption des composés volatils sur la phase absorbante a été réalisée quantitativement et de la manière la moins sélective possible. Pour cela, il est nécessaire de récupérer les analytes adsorbés sur les phases absorbantes. Ainsi, le piège, la fibre ou le barreau sont désorbés dans l'injecteur d'un chromatographe puis les composés sont récupérés après leur élution dans des sacs inertes en téflon<sup>[5]</sup>, ou bien dans des seringues en verre<sup>[6, 7]</sup>. Ces méthodes d'investigation de la représentativité d'extraits gazeux ont l'inconvénient principal de requérir un grand nombre d'extractions et

de récupérations pour une évaluation par un nombre de juges suffisant (maximum deux juges par sacs ou seringues à gaz).

La représentativité peut également être évaluée en remplaçant la colonne chromatographique par un capillaire creux et en programmant le four du GC/O à une température élevée (200-250°C, Direct-GC/O)<sup>[8, 9]</sup>. L'absence de séparation chromatographique permet d'évaluer l'ensemble des composés désorbés et de comparer l'odeur perçue par rapport à celle de la matrice<sup>[10]</sup>.

### 3. Identification des composés odorants

#### 3.1. Technique de séparation des analytes volatils : chromatographie en phase gazeuse

L'analyse doit être adaptée aux analytes extraits lors de la préparation de l'échantillon et aux informations recherchées. Si l'on s'intéresse à des composés volatils, la chromatographie en phase gazeuse (GC) est la méthode la plus adaptée. Le large choix d'injecteurs, de colonnes et de détecteurs la rend flexible et bien adaptable au problème analytique en question. De plus, les techniques multidimensionnelles (GCxGC totale et GC-GC conventionnelle) présentent une avancée importante concernant la séparation chromatographique. La chromatographie en phase gazeuse repose, comme toute méthode chromatographique, sur la rétention des analytes sur une phase stationnaire qui s'oppose à l'entraînement de ces derniers par une phase mobile. Cet article n'a pas pour objectif de décrire le principe de la chromatographie en phase gazeuse et l'utilisation de cette technique dans l'analyse des composés odorants, pour cela le lecteur peut se référer à de nombreux ouvrages et revues<sup>[3, 11, 12]</sup>.

#### 3.2. Apport du couplage GC/ Olfactométrie : détection physiologique/sensorielle

Les systèmes de détection physique classiques, qu'ils soient universels ou spécifiques, ne permettent pas d'obtenir la moindre information sur l'odeur et l'impact olfactif des constituants du mélange. Le couplage GC/Olfactométrie (GC/O) utilise le nez humain en tant que détecteur analytique parallèlement à un détecteur physique et permet ainsi de cibler les composés odorants (Figure 1). Il évite l'isolement fastidieux de composés sans intérêt olfactif car seulement une petite partie des constituants d'un extrait naturel contribue réellement à l'odeur de ce dernier<sup>[13-16]</sup>. Cette technique est décrite de façon détaillée dans la littérature spécialisée<sup>[2]</sup>.

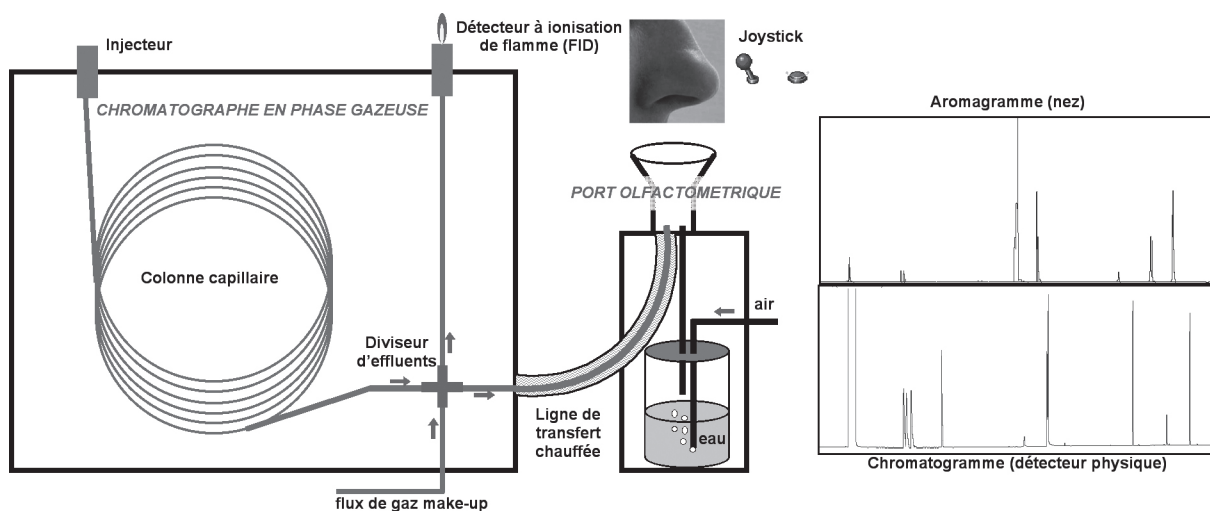


Fig. 1 : Principe du couplage GC/Olfactométrie (13,15)

La GC/O permet d'établir un lien entre la composition chimique et l'odeur d'un extrait. De plus, certains des composés contribuant à l'odeur globale sont des composés odorants présents à l'état de traces. En conséquence, ils sont parfois présents à des quantités inférieures aux limites de détection de la plupart des systèmes physiques mais peuvent néanmoins être mis en évidence par le nez humain grâce à leur faibles seuils de perception et à la sensibilité des récepteurs olfactifs humains pour un grand nombre d'odorants<sup>[16]</sup>. La GC/O peut être utilisée en tant que méthode uniquement descriptive (GC/Sniffing), mais peut également fournir des informations sur l'impact olfactif des constituants lorsqu'on suit une méthodologie adaptée. Ces méthodologies sont généralement divisées en trois grands groupes : a) les méthodes de dilution, b) les méthodes de fréquence de détection et c) les méthodes d'intensité. Ces méthodes sont largement décrites dans la littérature<sup>[2, 13, 17-34]</sup> et ne seront pas détaillées ici. Le choix de la méthode dépend des informations que l'on souhaite obtenir, mais également des ressources, surtout humaines, du laboratoire - sachant que

certaines méthodologies nécessitent par définition un panel de « sniffers » de huit à douze personnes<sup>[13]</sup>. De plus, l'analyse d'un extrait est d'une durée comprise généralement entre 30 et 60 minutes et on conseille aux juges de ne pas sentir plus de 20 minutes en continu pour éviter une perte de sensibilité due à la fatigue.

### 3.3. Apport des détecteurs spécifiques

Le détecteur est un élément essentiel de l'analyse et, de nos jours, de nombreux détecteurs sont à la disposition des analystes. On différencie principalement les détecteurs physiques qui comprennent les détecteurs universels tels que le spectromètre de masse (MS) et le détecteur à ionisation de flamme (FID) mais aussi les détecteurs dits spécifiques qui détectent des hétéroatomes, du détecteur physiologique ou sensoriel qui est le nez humain. Les détecteurs spécifiques peuvent contribuer à l'identification d'une molécule. Ils détectent des composés hétéroatomiques et peuvent, dans certains cas, résoudre des co-élutions avec des hydrocarbures majoritaires ou mettre en évidence des composés hétéroatomiques présents en quantités trop faibles pour être détectés par un système universel. Dans le domaine de l'analyse des composés odorants, on s'intéresse particulièrement aux composés soufrés et azotés car ils présentent souvent un impact organoleptique important à très faible concentration.

Le Tableau 1 résume les performances des détecteurs universels et spécifiques au soufre et à l'azote<sup>[11, 35-39]</sup>. La comparaison de la littérature disponible sur les détecteurs spécifiques au soufre montre que pour la détection des composés soufrés, le FPD (flame photometric detector), le PFPD (pulsed flame photometric detector) et le SCD (sulphur chemiluminescence detector) montrent des capacités de détection satisfaisantes à des prix raisonnables. Le FPD et le PFPD sont les détecteurs spécifiques au soufre les plus communément utilisés. Le FPD ne peut être utilisé qu'en mode « soufre » ou en mode « phosphore », mais le PFPD peut être ajusté à un nombre important d'autres éléments. Par contre, la spécificité du PFPD dépend de l'élément : bien qu'il soit très spécifique au soufre, lorsque l'on souhaite détecter l'azote, il vaut mieux faire appel à un détecteur plus spécifique de cet élément, comme par exemple le NPD (nitrogen-phosphorus detector ; aussi appelé thermoionic detector, TID)<sup>[39-41]</sup>. En plus du NPD, le CLND (chemiluminescence nitrogen detector) et l'ELCD (electroconductivity detector) peuvent également être utilisés pour la détection spécifique d'analytes azotés<sup>[42]</sup>. Le détecteur le plus complet car utilisable pour un nombre important d'éléments, est l'AED (atomic emission detector) mais il est aussi le plus complexe en terme d'utilisation et le plus cher<sup>[36, 42]</sup>.

Tableau 1 : Performances des détecteurs universels et spécifiques au soufre et à l'azote

Détecteur	Sensibilité (g/s)	Plage de linéarité	Sélectivité (S/C) ou (N/C) <sup>3</sup>	Prix (k€)
FID	~ 2x10 <sup>-12</sup>	10 <sup>7</sup>	-	~ 4
MS (Scan) <sup>1</sup>	~ 1x10 <sup>-12</sup>	-	-	~ 50
MS (SIM) <sup>2</sup>	~ 20x10 <sup>-15</sup>	10 <sup>7</sup>	-	~ 50
FPD (S)	~ 1x10 <sup>-10</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup> -10 <sup>6</sup>	9-11
PFPD (S)	~ 2x10 <sup>-13</sup>	10 <sup>4</sup>	>10 <sup>5</sup>	10-15
PFPD (N)	~ 10 <sup>-11</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>5</sup> -10 <sup>6</sup>	
SCD (S)	~ 5x10 <sup>-12</sup>	10 <sup>5</sup>	-	15-20
NPD (N)	~ 10 <sup>-13</sup>	>10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup> -10 <sup>5</sup>	~5
CLND (N)	~ 10 <sup>-12</sup>	10 <sup>4</sup> -10 <sup>5</sup>	10 <sup>7</sup>	-
ELCD (N)	~ 10 <sup>-11</sup>	10 <sup>4</sup> -10 <sup>5</sup>	~10 <sup>4</sup>	-
AED (S)	~ 2x10 <sup>-12</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	~ 100
AED (N)	~ 10 <sup>-12</sup>	10 <sup>4</sup> -10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup> -10 <sup>5</sup>	

<sup>1</sup> Mode scan (fullscan). <sup>2</sup> Single Ion Monitoring (SIM).

<sup>3</sup> Sélectivité entre les molécules contenant du soufre, de l'azote ou du carbone

### 3.4. Apport des techniques à deux dimensions : la GC multidimensionnelle GC-GC et GCxGC

La chromatographie en phase gazeuse monodimensionnelle classique (une colonne de séparation) est devenue une technique standard pour la séparation des composés volatils. Mais elle ne donne pas toujours des résultats satisfaisants en termes de résolution. Il y a de nombreuses co-élutions et le pouvoir séparateur est limité. Il est bien évidemment possible d'intervenir sur ces problèmes en utilisant différents types de colonnes, en jouant sur la préparation de l'échantillon et en utilisant des techniques de fractionnement, mais

le développement de techniques multidimensionnelles est aussi une alternative pour améliorer ces points faibles.

La GC multidimensionnelle (MDGC) consiste à coupler deux colonnes chromatographiques ayant des propriétés orthogonales (exemple : une phase apolaire avec une séparation selon la volatilité, la deuxième phase polaire afin de séparer selon la polarité) afin de combiner leurs pouvoirs séparateurs. On différencie la GC-GC de la GCxGC. En GC-GC (ou MDGC conventionnelle, 2DGC conventionnelle), seule une partie du chromatogramme de la première colonne (le « heartcut ») est transférée dans la deuxième dimension. En GCxGC (aussi 2DGC ou GCxGC totale ; en anglais « comprehensive GCxGC »), la totalité des effluents de la première colonne est transférée dans la deuxième dimension (Figure 2)<sup>[43, 44]</sup>.

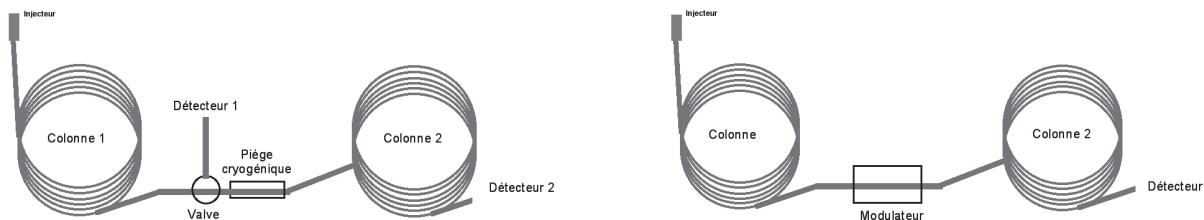


Fig. 2 : Principe de la 2DGC conventionnelle (GC-GC, à gauche) et de la 2DGC totale (GCxGC, à droite)

Étant donné qu'en GCxGC, la totalité des analytes est transférée dans la deuxième dimension, la deuxième colonne doit être courte : il faut qu'elle donne un jeu de données complet pendant l'éluion d'un seul signal de la 1<sup>ère</sup> colonne. Cela ne laisse généralement qu'environ 5 s. Il faut alors également un détecteur rapide ( $> 50$  Hz) pour gérer le flux d'informations. Même si le détecteur FID est souvent utilisé, l'idéal est un spectromètre de masse pour l'identification structurale. Des spectromètres de masse à temps de vol (TOF-MS) et quadripolaire (qMS) à scan rapide sont généralement utilisés<sup>[43, 45]</sup>. Les données des deux colonnes sont combinées pour donner un couple de coordonnées pour chaque composé. Le chromatogramme résultant est une carte 2D avec sur l'axe x les temps de rétention de la 1<sup>ère</sup> colonne, et sur l'axe y les temps de rétention de la 2<sup>ème</sup> colonne (Figure 3)<sup>[43]</sup>.

Les techniques MDGC augmentent considérablement la capacité séparatrice  $n$  du système. Par exemple : pour une colonne GC « normale »,  $n = 1\ 100$  ; pour une colonne courte (2<sup>ème</sup> dimension GCxGC),  $n = 35$ . Ainsi les capacités de séparation sont :

- pour la 1DGC  $n_{tot} = 1\ 100$ ,
- pour la MDGC conventionnelle  $n_{tot} = n_1 + n_2 = 2\ 200$ ,
- pour la GCxGC  $n_{tot} = n_1 \times n_2 = 1\ 100 \times 35 = 38\ 000$  car les deux colonnes travaillent indépendamment et la capacité totale devient ainsi le produit des capacités des deux colonnes individuelles.

Ces techniques permettent de résoudre un grand nombre de co-élutions et d'approfondir l'analyse sans soumettre l'échantillon à des traitements chimiques. Bien qu'elles soient onéreuses et complexes, en particulier la GCxGC, leur utilisation pour l'étude des composés odorants est de plus en plus fréquente car nombreux de ces composés sont présents à l'état de traces dans les matrices odorantes et sont difficiles à mettre en évidence. En couplant les résultats de la MDGC à une autre source d'information (par exemple à la GC/Olfactométrie), la puissance des techniques peut être pleinement exploitée.

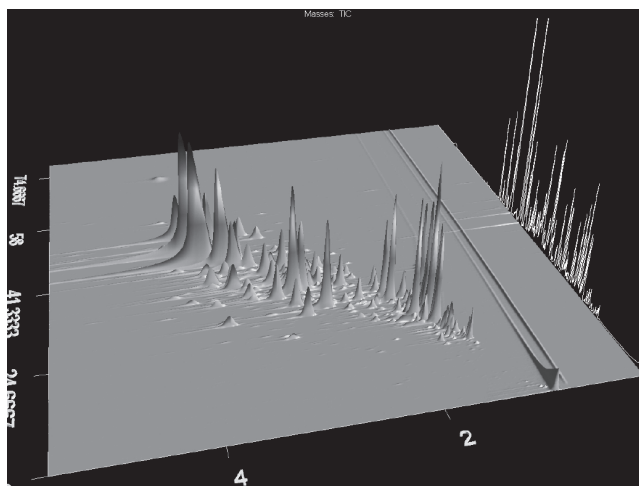


Fig. 3 : Exemple d'un chromatogramme 2D obtenu par GCxGC/MS-TOF. © CNRS Photothèque Emmanuel Perrin

## 4. Exemples d'applications

### 4.1 Apport de la GC/O

Le 1er exemple d'application a été choisi afin d'illustrer l'apport du couplage chromatographie en phase gazeuse/olfactométrie dans la recherche de composés odorants. Il s'agit d'une étude portant sur les composés aromatisants d'olives de table. Les principaux résultats obtenus sur un extrait d'olives de table noires sont reportés dans le Tableau 2. Les composés indiqués représentent un pourcentage relatif important dans le chromatogramme et/ou ont un impact olfactif important.

Tableau 2 : Principaux résultats obtenus sur l'extrait d'olives de table

Composé <sup>a</sup>	IR <sup>b</sup> HP-1	Odeur <sup>c</sup>	% ± S.D. <sup>d</sup> (ppb m/m) <sup>e</sup>	Facteur de dilution	Méthode d'identification <sup>f</sup>
3-méthylbutanol	718	-	2,2 (1245)	-	MS, RI, Std
octane	800	-	7,8 ± 0,1 (4453)	-	MS, RI, Std
2-méthylbutyrate d'éthyle	835	fruité, fruit rouge	0,1 (65)	256	MS, RI, Std, Odeur
(Z)-3-hexenol	836	herbe coupée, fruité	0,1 (75)	16	MS, RI, Std, Odeur
styrène	874	-	2,5 (1406)	-	MS, RI, Std
phénol	956	-	6,1 (3502)	-	MS, RI, Std
guaiacol	1056	phénolé, herbacé, forêt	23,1 ± 0,1 (13155)	128	MS, RI, Std, Odeur
2-phényléthanol	1083	fruité, sucré, floral	4,6 (2628)	4	MS, RI, Std, Odeur
vératrole	1111	fruité, citronné	1,2 (692)	32	MS, RI, Std, Odeur
(E)-2-décenal	1237	herbacé, gras, citronné, piquant	7,8 (4549)	8	MS, RI, Std, Odeur
β-damascénone	1361	fruité, fruit exotique, acidulé	0,1 (46)	64	MS, RI, Std, Odeur
isoeugénol	1416	fruité, poudré, épicé	0,1 (54)	64	MS, RI, Std, Odeur
α-farnésène	1495	-	3,6 (2040)	-	MS, RI, Std

<sup>a</sup> Les composés sont listés dans l'ordre d'élution sur la colonne HP-1 ; <sup>b</sup> Indice de rétention sur la colonne HP-1.

<sup>c</sup> Descripteurs principaux donnés par les juges. <sup>d</sup> Pourcentages relatifs avec S.D. = déviation standard ; <sup>e</sup> semi-quantification par étalonnage interne. <sup>f</sup> Méthode d'identification : MS = spectre de masse; RI = comparaison des indices de rétention du composé avec la littérature ; odeur = comparaison des descriptions odorantes des juges avec la banque GC/O construite au laboratoire ; Std = injection du composé de référence en GC/MS et GC/O.

Le pouvoir olfactif, représenté par le facteur de dilution, a été déterminé à l'aide de la méthode AEDA par GC/O. On constate que des composés comme l'octane et le phénol présents à 6-8 % ne vont pas avoir d'influence sur le profil organoleptique. Ils ne sont pas sentis par les juges. Par contre, le 2-méthylbutyrate d'éthyle qui n'est présent qu'à 0,1 % a un facteur de dilution de 256. Il s'agit du composé ayant le plus fort impact dans l'extrait étudié par cette méthode GC/O, il présente une note fruit rouge caractéristique. Les composés présents majoritairement peuvent avoir aussi un impact olfactif important sur l'extrait étudié, c'est le cas du guaiacol, présent à environ 23 %, et qui présente un facteur de dilution de 128 et une odeur phénolée, herbacée, de forêt. L'influence des composés sur le profil organoleptique de l'extrait dépend énormément des seuils de perception. La Figure 4 représente en haut le chromatogramme obtenu par GC-FID et en bas les facteurs de dilution obtenus par GC/O-AEDA. Elle illustre bien l'apport du couplage GC/O qui permet de déterminer les composés qui ont un réel impact organoleptique.

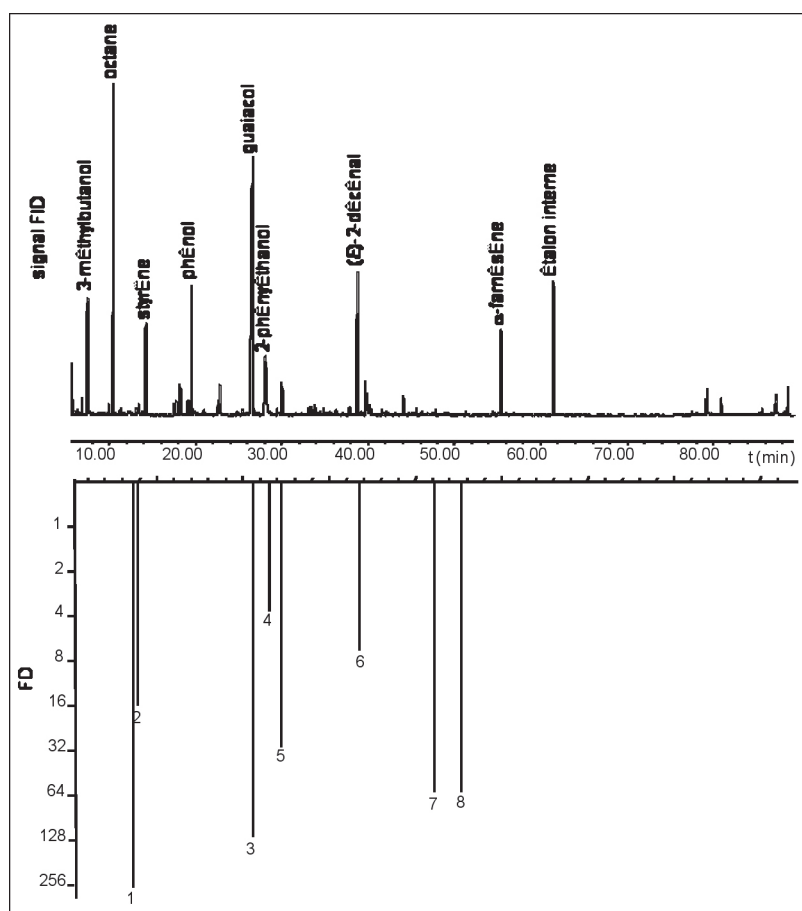


Figure 4 : Chromatogramme (en haut) et principaux résultats AEDA (en bas) de l'extrait d'olives de table noires. 1 : 2-méthylbutyrate d'éthyle ; 2 : (Z)-3-hexenol ; 3 : guaiacol ; 4 : 2-phényléthanol ; 5 : vérotrole ; 6 : (E)-2-décenal ; 7 : β-damascénone ; 8 : isoeugénol.

#### 4.2. Apport des détecteurs spécifiques (TSD, AED, PFPD)

Pour illustrer l'apport des détecteurs spécifiques dans le processus d'identification des composés odorants, nous avons choisi une étude portant sur l'arôme d'un fruit de mer : le violet. Cette étude a pour but de rechercher des composés aromatiques caractéristiques du produit et possédant des seuils de perception très faibles<sup>[15, 46]</sup>.

Le violet (*Microcosmus sulcatus*), également appelé figue de mer, est un fruit de mer consommé cru autour de la Méditerranée, au Chili et au Japon (Photo 1). Cette denrée alimentaire peu courante a été choisie pour ses qualités organoleptiques puissantes et caractéristiques des produits de la mer. Il développe un arôme frais aux notes « marine » et « iodée ».

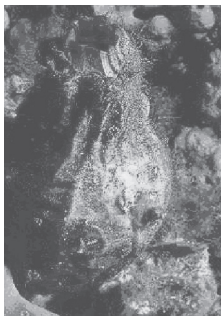


Photo 1 : Violet dans son environnement naturel

L'analyse GC/MS et FID de différents extraits de violet met en évidence plusieurs centaines de constituants tandis que l'étude GC/Olfactométrie permet de déterminer la présence de seulement 29 zones odorantes à l'aide de différentes méthodes (Sniffing, AEDA, CHARM, NIF, OSME). Ces résultats sont présentés dans le Tableau 3 dans lequel les pourcentages OSME et CHARM obtenus sont reportés. Les 29 zones odorantes peuvent être classées en deux groupes principaux : les odeurs marines, fraîches ou végétales et les odeurs viandées, souvent souffrées. Les zones odorantes 2 et 3 décrites par « poisson, crustacé » et « marin, violet

» présentent les valeurs OSME et CHARM les plus élevées, les composés responsables de ces notes aromatiques sont donc considérés comme les plus importants au niveau aromatique. D'autres composés contribuent de manière significative à l'arôme de violet, notamment la zone odorante 17 décrite « métallique » et les zones 9 et 12 décrites « soufré, viandé ».

L'identification des différents composés d'impact organoleptique est réalisée par l'utilisation de différentes techniques d'analyse ainsi que par l'étude de différents extraits de violet.

Dans cette étude, les détecteurs spécifiques (TSD, AED et PFPD) ont permis de révéler ou de confirmer la présence de composés azotés, arséniés et soufrés.

Par exemple, pour la zone odorante 3, l'utilisation de l'AED permet de confirmer la présence d'un atome d'arsenic dans la molécule responsable de l'odeur « marin, violet » très caractéristique du fruit de mer. Par la suite, une analyse en spectrométrie de masse haute résolution et l'injection du composé standard a permis d'identifier la triméthylarsine comme étant responsable de cette odeur. L'analyse par AED a également permis de détecter un autre composé arsénié correspondant à la zone odorante 23 « frais, marin ». De la même façon, les analyses en GC-PFPD ont permis de mettre en évidence la présence de composés soufrés ayant un impact important dans le profil organoleptique de l'extrait de violet et qui n'avaient pas pu être détectés et identifiés par GC/MS. C'est le cas, par exemple, pour le disulfure de diméthyle et le 3-méthylbut-2-énethiol (zones odorantes 6 et 9) qui ont été détectés par l'analyse par GC-PFPD et identifiés par comparaison des indices de rétention et des descripteurs olfactifs de la littérature et par injection du composé standard.

### 4.3. Apport de la GCxGC

L'exemple d'application suivant permet d'illustrer l'apport des techniques bidimensionnelles dans l'identification de composés à impact organoleptique. Nous allons montrer plus particulièrement l'intérêt de la chromatographie en phase gazeuse bidimensionnelle totale couplée à un spectromètre de masse à temps de vol (GCxGC/MS-TOF). Cette étude porte sur l'étude d'une absolue (extrait aux solvants) de cresson d'Inde, dans le but de rechercher des composés aromatiques caractéristiques du produit et possédant des seuils de perception très faibles<sup>[47]</sup>.

Le cresson d'Inde appelé encore *Nasturtium* ou capucine (*Tropaeolum majus* L.) fait partie de l'ordre des Brassicales (Photo 2). C'est une plante ornementale annuelle mais elle est également comestible (fleurs, feuilles, graines) et est généralement consommée en salade ou en soupe.

L'extrait de cresson d'Inde a été choisi pour son odeur soufrée et alimentaire inhabituelle ainsi que pour la présence de composés azotés et soufrés qui sont souvent à fort impact organoleptique.



Photo 2 : Cresson d'Inde

Zone odorante	IR <sup>a</sup>	Description olfactive	OSME en % <sup>b</sup>	CHARM en % <sup>c</sup>	Composés identifiés	Méthode d'extraction <sup>e</sup>	Méthode d'identification <sup>f</sup>
1	<500/640	souffré, pourri	3,1	0,1	méthanthiol	HSSE, VHS	MS, PFPD, GC/O
2	502/815	poisson, crustacé	11,8	24,9	triméthylamine	US, HSSE, VHS	MS, TSD, GC/O
3	554/742	marin, violet	9,2	22,5	triméthylarsine	US, SPME, VHS	MS, HR, AED, GC/O
4	594/990	beurre	0,3	-	butane-2,3-dione	HSSE	MS, GC/O
5	650/-	souffré, gaz	3,8	1,3	NI <sup>d</sup>	-	-
6	733/1089	souffré, caoutchouc	6,6	2,1	disulfure de diméthyle	F, HSSE	PFPD, GC/O, MS
7	759/1321	vert, métallique	2	1,6	pent-2(Z)-énol	US	MS, GC/O
8	804/1639	fromage	2,5	0,5	acide butyrique	US, RE, SPME, HSSE, VHS	MS, GC/O
9	807/1122	souffré, viande fumée	5,1	7,2	3-méthylbut-2-énethiol	-	PFPD, GC/O
10	816/-	toasté	0,8	-	NI souffré	-	GC/O, PFPD
11	843/1388	vert, herbe	1,9	-	hex-3(Z)-énol	US, F, VHS	MS, GC/O
12	852/1284	viandé, noisette	7,3	7,9	2-méthyl-3-furanethiol	-	GC/O
13	885/1262	métallique, pomme de terre	2,8	1,7	hept-4(Z)-énal	-	GC/O
14	890/1450	toasté	0,9	-	furfurylthiol	-	GC/O
15	900/1361	grillé, riz	3,4	0,2	2-méthylthiazolidine	US	MS, GC/O, PFPD
16	959/1315	champignon	3,3	1,0	oct-1-én-3-one	-	GC/O
17	965/1490	métallique	5,2	14,9	octa-1,5(Z)-dién-3-ol	US, F, SPME, VHS	MS, GC/O
18	1020/1220	menthe	0,8	-	eucalyptol	F, SPME, HSSE	MS, GC/O
19	1028/-	caoutchouc, souffré	1,7	-	NI souffré	-	GC/O, PFPD
20	1056/-	grillé, phénolique	3,8	6,1	p-crésol	HSSE	MS, GC/O
21	1065/1780	grillé	1,5	-	2-acétyl-2-thiazoline	-	GC/O
22	1073/-	porc grillé	7,1	1,7	NI	-	-
23	1110/2206	frais, marin	2,1	1,2	NI souffré arsénié	US, F	MS, PFPD, AED, HR, GC/O
24	1127/1589	vert, gras, melon	0,6	-	nona-2,6(E,Z)-diénal	-	GC/O
25	1153/1750	vert, fruité, melon d'eau	0,4	-	nona-2,6(E,Z)-diénol	F, VHS	MS, GC/O
26	1161/-	frais	0,9	-	NI	-	-
27	1167/-	herbacé, menthe	1,4	-	NI	-	-
28	1230/-	vert, poisson, frais	4,1	1,9	NI	-	-
29	1247/2302	viandé	5,6	3	5-(2-hydroxyéthyl)-4-méthylthiazole	US, RE	MS, PFPD, GC/O

<sup>a</sup> IR : indices de rétention déterminés sur colonnes HP-1 et HP-Innowax en utilisant une série d'alcane linéaires C<sub>5</sub>-C<sub>22</sub>

<sup>b</sup> OSME : odour specific magnitude estimation

<sup>c</sup> CHARM : combined hedonic of aromatic response

<sup>d</sup> NI : composé non identifié

<sup>e</sup> US : extraction au dichlorométhane assistée par ultrasons ; RE : extraction à l'éther diéthylique ; F : fractionnement sur colonne de gel de silice ; HSSE : Headspace sorptive extraction (extraction par adsorption de l'espace de tête sur un barreau) ; VHS : Vacuum Headspace (espace de tête sous vide) ; SPME : Solid Phase Microextraction (microextraction en phase solide)

<sup>f</sup> MS : spectrométrie de masse ; HR : spectrométrie de masse à haute résolution ; PFPD : détecteur à photométrie de flamme pulvérisée ; TSD : détecteur thermique ; AED : détecteur à capture d'électrons

Tableau 3 : Composés aromatisants du violet

L'absolue de cresson d'Inde a été analysée après extraction par espace de tête dynamique (D-HS) sur un système GC/O multiposte à huit voies (8W-GC/O). Ce système permet de réduire le temps d'analyse et d'obtenir des résultats fiables en utilisant un panel de huit juges en une seule analyse. La méthodologie GC/O utilisée est le VIDEO-Sniff (Vocabulary-Intensity-Duration of Elementary Odours by Sniffing) et les données sont enregistrées avec le logiciel AcquiSniff®. Les aromagrammes individuels sont enregistrés et additionnés pour donner l'aromagramme global des huit juges, appelé Signal Olfactif Total (SOT) qui peut être visualisé en utilisant les pôles olfactifs. Ces pôles sont obtenus en regroupant le vocabulaire descriptif utilisé par les juges en dix classes au maximum.

Pour l'absolue de cresson d'Inde, neuf pôles olfactifs ont été déterminés et la Figure 5 montre les 47 zones odorantes qui sont le plus intensément et le plus généralement perçues par les juges selon les pôles.

Seuls les pôles dominants « fruité-floral » (en gris) et « soufré » (en noir) sont représentés sur la Figure 5 et seules les zones odorantes correspondantes ont été reportées dans le Tableau 4.

Parmi les 17 zones odorantes de ces deux pôles, huit composés ont été identifiés directement par l'analyse en chromatographie en phase gazeuse monodimensionnelle couplée à un spectromètre de masse quadripolaire. Il s'agit des pics n° 5, 6, 8, 14, 20, 23, 24 et 28. Cette identification a été confirmée pour la plupart par comparaison des indices de rétention et des descriptions odorantes des juges avec ceux de la littérature ainsi que par injection du composé standard. A ce stade de l'étude, les neuf autres zones odorantes, parmi lesquelles les zones n° 7 et 34 qui ont le plus d'impact par VIDEO-Sniff, correspondent à des composés inconnus. C'est l'utilisation de la chromatographie en phase gazeuse bidimensionnelle couplée à un spectromètre de masse à temps de vol (GCXGC/MS-TOF) qui va permettre d'identifier ces neuf zones.

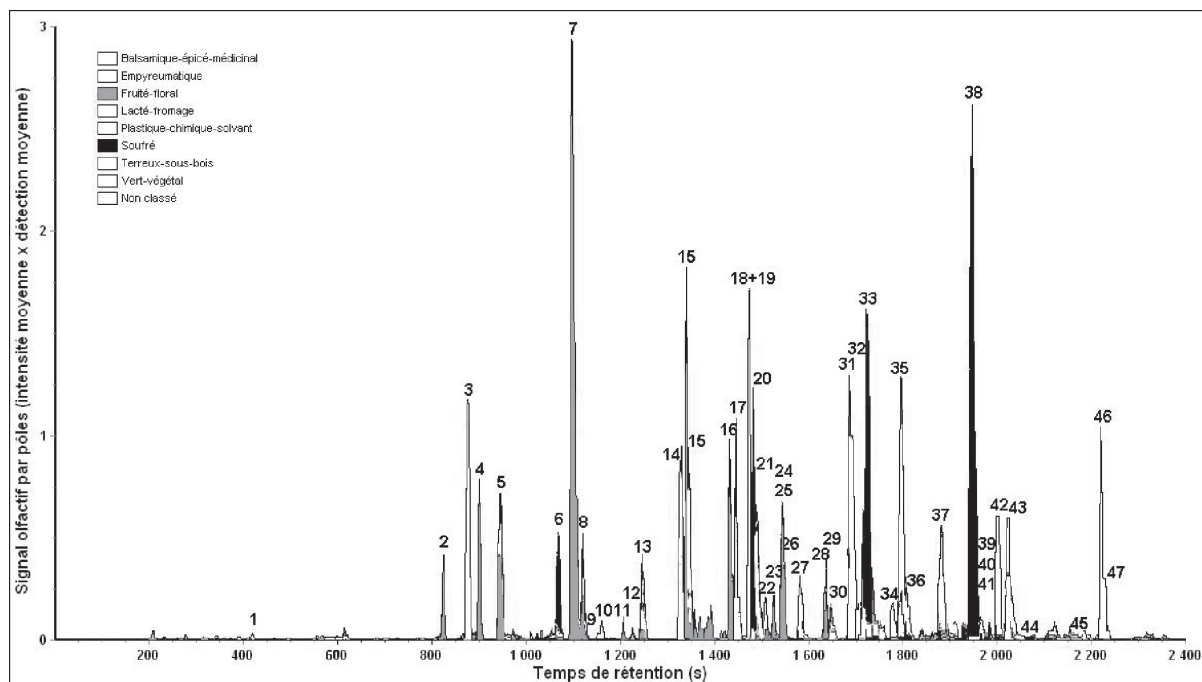


Fig. 5 : Moyenne du signal olfactif par pôles ( $\overline{OSC}_{int \times dét}$ ) pour l'absolue de cresson. Le partage du signal olfactif total moyen en neuf pôles montre les zones de l'aromagramme appartenant à chaque pôle olfactif.

N° pic <sup>a</sup>	IR <sup>b</sup> RTX-5	IR <sup>b</sup> HP-20M	Composé <sup>c</sup>	Odeur <sup>d</sup>	Intensité moyenne <sup>e</sup>	Fréquence de détection <sup>f</sup> sur 16 %	Méthode d'identification <sup>g</sup>
2	758	1106	(E)-pent-2-éнал	fruité	2,0	8	TOF, IR, Odeur, Std
4	784	-	hexan-2-one	fruité	2,5	10	TOF, IR, Odeur, Std
5	798	1089	hexanal	vert, pomme, herbe coupée	2,3	12	MS, IR, Odeur, Std
6	839	1120	disulfure d'éthyle et de méthyle	souffré, plastique, chou, rance	3,5	11	MS, IR
7	849	-	(E)-hex-2-éнал	fruité	3,3	15	TOF, IR, Odeur, Std
8	856	1345	(Z)-hex-3-éнал	pomme, herbe coupée	2,9	11	MS, IR, Odeur, Std
14	926	1188	disulfure de diéthyle	souffre, chou	3,4	13	MS, IR, Odeur, Std
16	963	-	2-propylthiophène	fruité, floral, chimique, chrysanthème,	2,4	13	TOF, IR, Std
20	978	1291	(E)-hept-2-éнал	terre	3,9	15	TOF, IR, Odeur, Std
22	990	1337	trisulfure de diméthyle	fromage, souffré, chou, pourri	2,4	8	MS, IR, Odeur, Std
23	994	1212	2/3-thiophène-carboxaldéhyde	pomme de terre, souffré	1,8	9	TOF, IR, Odeur, Std
24	1000	-	hexanoate d'éthyle	dissolvant, fruité	3,1	11	MS, IR, Odeur, Std
25	1002	-	octanal	agrumes, vert	3,6	7	MS, IR, Odeur, Std
28	1034	1174	acétate de (Z)-hex-3-éныle	agrumes, vert	2,2	10	TOF, IR, Odeur, Std
29	1037	1810	limonène	fruité-agrumes, chimique, plastique	2,3	12	MS, IR, Odeur, Std
33	1066	-	alcool benzylique	fruité, floral, chimique, menthe, plastique	4,3	15	TOF, IR, Odeur, Std
38	1153	1464	2-butythiophène	fermenté, champignon, chou, souffré, alliace	3,9	15	TOF, IR
			trisulfure de diéthyle	alliace, chou, souffré, piquant, moutarde	3,9	15	TOF, IR, Odeur, Std

<sup>a</sup> Numéro du pic dans la Figure 5. <sup>b</sup> Indice de rétention sur la colonne RTX-5 du système 8W-GC/O et sur colonne HP-20M. <sup>c</sup> Les composés sont listés dans l'ordre d'éluion sur la colonne RTX-5. <sup>d</sup> Descripteurs principaux donnés par les juges. <sup>e</sup> Moyenne des intensités données par les 16 juges (sur une échelle allant de 1 à 5). <sup>f</sup> Fréquence de détection donnée sur 16 juges. <sup>g</sup> Méthode d'identification : TOF = spectre de masse obtenu par GC GC/MS-TOF ; MS = spectre de masse obtenu par GC/q-MS ; IR = comparaison des indices de rétention du composé avec la littérature ; odeur = comparaison des descriptions odorantes des juges avec la banque GC/O construite au laboratoire ; Std = injection du composé de référence en GC/MS et GC/O. <sup>TOF</sup> : Tentative d'identification = pas de détection par MS et/ou pas d'injection du composé de référence.

Tableau 4 : Liste des composés odorants identifiés dans les pôles « fruité-floral » et « souffré » de l'absolue de cresson

Le chromatogramme bidimensionnel obtenu est présenté sur la Figure 6 et montre, selon l'axe des ordonnées, la séparation obtenue sur la 2<sup>ème</sup> colonne (2<sup>ème</sup> dimension). Cette meilleure séparation va permettre de résoudre les co-élutions empêchant l'identification des composés et d'approfondir l'analyse sans soumettre l'échantillon à des fractionnements supplémentaires. De plus, le couplage avec le spectromètre de masse à temps de vol encore plus sensible que le spectromètre quadripolaire classique va permettre d'identifier les composés en très faibles quantités.

Par exemples, pour les deux zones ayant le plus d'impact organoleptique par VIDEO-Sniff, la zone n° 7 avec une fréquence de détection de 94 % et un consensus descriptif de 100 % (fruité) a été attribuée au (*E*)-hex-2-éнал. Ce dernier était présent en trop faible quantité pour être détecté et identifié directement par GC/MS. Pour la zone n° 38, il s'agit du trisulfure de diéthyle avec une fréquence de détection de 94 % et un très bon consensus des descripteurs à 87 % (alliacé, soufré, chou, piquant, moutarde). Ce composé a nécessité l'utilisation de la 2DGC pour être mis en évidence car il élue directement après un autre composé et sa détection par GC/MS est empêchée par une ligne de base élevée.

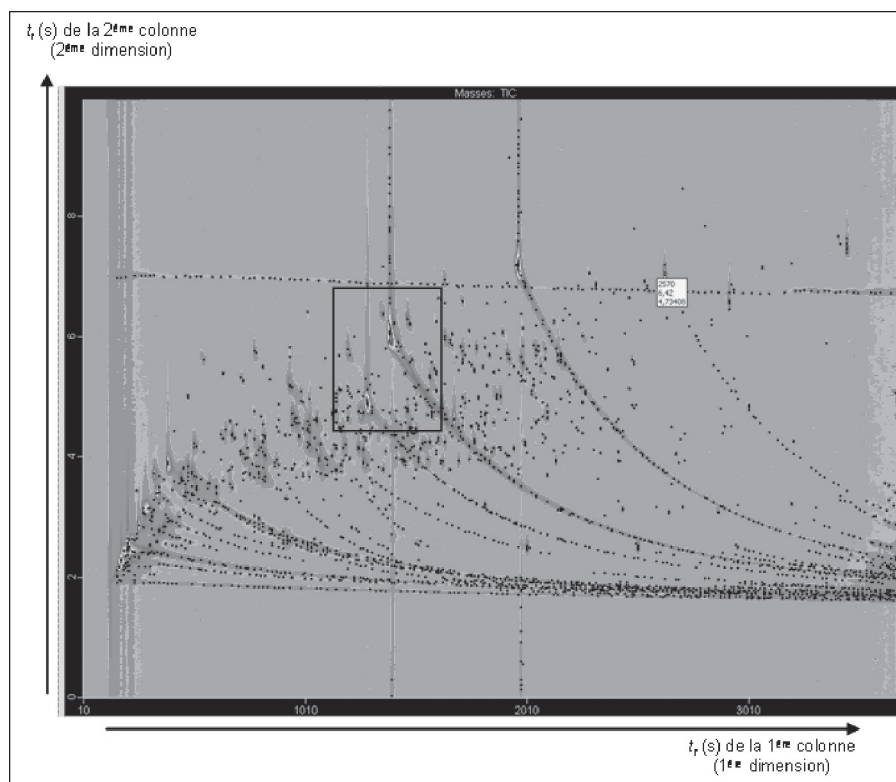


Fig. 6 : Chromatogramme GCxGC/MS-TOF de la partie volatile de l'absolue de cresson d'Inde

## 5. Conclusion

Les avancées technologiques de ces dernières années permettent d'aller de plus en plus loin dans la recherche de composés odorants. Les techniques d'extraction sont nombreuses et permettent d'obtenir des extraits représentatifs de la matrice à étudier. De plus, le couplage GC/Olfactométrie et les différentes méthodes associées sont au cœur de ce type de recherche et permettent de déterminer les composés ayant un réel impact organoleptique sur l'extrait étudié. Enfin, les techniques d'analyse de plus en plus performantes permettent d'identifier les composés souvent présents à l'état de traces.

## 6. Références bibliographiques

- [1] **Fernandez, X.; Kerverdo, S.; Duñach, E.; Lizzani-Cuvelier, L.** Les hétérocycles dans la chimie des arômes. *Actualité Chimique* 2002, 252, 4-14.
- [2] **Fernandez, X.; Breme, K.; Varlet, V.** Couplage Chromatographie en phase gazeuse/olfactométrie (GC/O) et applications. In *Techniques de l'Ingénieur*, Editions T.I. : Paris, France, 2009; pp. 1-18.
- [3] **Fernandez, X.; Cabrol-Bass, D.** Analyse des arômes. In *Techniques de l'Ingénieur*, Editions T.I. : Paris, France, 2007; pp. 2-22.

- [4] **Van Gemert, L. J.** Coordination of sensory and instrumental analysis. In *Isolation, separation and identification of volatile compounds in aroma research*, Akademie-Verlag: Berlin, 1981; pp. 240-258.
- [5] **Hallier, A.; Courcoux, P.; Serot, T.; Prost, C.** New gas chromatography-olfactometric investigative method, and its application to cooked *Silurus glanis* (European catfish) odor characterization. *J. Chromatogr. A* 2004, *1056*, 201-208.
- [6] **Selli, S.; Rannou, C.; Prost, C.; Robin, J.; Serot, T.** Characterization of aroma-active compounds in rainbow trouts (*Oncorhynchus mykiss*) eliciting an off-odor. *J. Agric. Food. Chem.* 2006, *54*, 9496-9502.
- [7] **Poinot, P.; Grua-Priol, J.; Arvisenet, G.; Rannou, C.; Semenou, M.; LeBail, A.; Prost, C.** Optimisation of HS-SPME to study representativeness of partially baked bread odorant extracts. *Food Res. Int.* 2007, *40*, 1170-1184.
- [8] **Rega, B.; Fournier, N.; Guichard, E.** Solid Phase Microextraction (SPME) of orange juice flavor: Odor representativeness by direct gas chromatography olfactometry (D-GC-O). *J. Agric. Food Chem.* 2003, *51*, 7092-7099.
- [9] **Dury-Brun, C.; Fournier, N.; Pernin, K.; Guichard, E.; Voilley, A.** A new approach to studying sponge cake aroma after storage in treated paper and plastic packaging by direct gas chromatography-olfactometry (D-GC-O). *Flavour Frag. J.* 2007, *22*, 255-264.
- [10] **Breme, K.; Schlichtherle-Cerny, H.; Eugster-Meier, E.; Dubois, A.; Braun, M.** Evaluation of Odour Representativeness of HeadSpace-Solid Phase MicroExtraction Extracts of a Fruit Yoghurt Drink by Direct-GC-Olfactometry, *Conference proceedings of the 9<sup>th</sup> Wartburg Symposium on Flavor Chemistry and Biology, Eisenach, Germany*, submitted.
- [11] **Tranchant, J.** Chromatographie en phase gazeuse. In *Techniques de l'Ingénieur*, 4<sup>th</sup> ed.; Editions T.I. Masson: Issy-les-Moulineaux, France, 1996; pp. 1-27.
- [12] **Arpino, P.; Prévôt, A.; Serpinet, J.; Tranchant, J.; Vergnol, A.; Witier, P.** *Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse*. 4<sup>ème</sup> ed.; Masson: Paris, 1995; pp 700.
- [13] **Delahunty, C. M.; Eyres, G.; Dufour, J.-P.** Gas chromatography-olfactometry. *J. Sep. Sci.* 2006, *29*, 2107-2125.
- [14] **Pollien, P.; Fay, L. B.; Baumgartner, M.; Chaintreau, A.** First attempt of odorant quantitation using gas chromatography-olfactometry. *Anal. Chem.* 1999, *71*, 5391-5397.
- [15] **Senger, P.** Contribution du couplage GC/O à l'identification de substances odorantes dans les matrices naturelles. Application à l'étude de l'arôme de violet (*Microcosmus sulcatus*). Thèse de Chimie, Université de Nice-Sophia Antipolis, 2005.
- [16] **Lee, S.-J.** Finding key odorants in foods: Gas chromatography olfactometry (GC/O). *Food Sci. Biotechnol.* 2003, *12*, 597-602.
- [17] **Acree, T. E.; Barnard, J.; Cunningham, D. G.** A procedure for the sensory analysis of gas chromatographic effluents. *Food Chem.* 1984, *14*, 273-286.
- [18] **Grosch, W.** Determination of potent odorants in food by aroma extract dilution analysis (AEDA) and calculation of odour activity values (OAVs). *Flavour Frag. J.* 1994, *9*, 147-158.
- [19] **Le Guen, S.; Prost, C.; Demaimay, M.** Critical comparison of three olfactometric methods for the identification of the most potent odorants in cooked mussels (*Mytilus edulis*). *J. Agric. Food Chem.* 2000, *48*, 1307-1314.
- [20] **Patton, S.; Josephson, D. B.** A method for determining significance of volatile flavor compounds in food. *J. Food Sci.* 1957, *22*, 316-318.
- [21] **Van Ruth, S. M.** Methods for gas chromatography-olfactometry: A review. *Biomol. Eng.* 2001, *17*, 121-128.
- [22] **Kamadia, V. V.; Yoon, Y.; Schilling, M. W.; Marshall, D. L.** Relationships between odorant concentration and aroma intensity. *J. Food Sci.* 2006, *71*, 193-197.
- [23] **Frijters, J. E. R.** A critical analysis of the odour unit number and its use. *Chem. Senses* 1978, *3*, 227-233.
- [24] **Grosch, W.** Evaluation of the key odorants of foods by dilution experiments, aroma models and omission. *Chem. Senses* 2001, *26*, 533-545.
- [25] **Grosch, W.; Kerscher, R.; Kubickova, J.; Jagella, T.** Aroma extract dilution analysis versus aroma extract concentration analysis. In *Gas chromatography-olfactometry. The state of art*, ACS: Washington, 2001; pp. 138-147.

- [26] **Pollien, P.; Ott, A.; Montigon, F.; Baumgartner, M.; Munoz-Box, R.; Chaintreau, A.** Hyphenated headspace-GC-sniffing technique: The "SNIF" method. *Riv. Ital. EPPOS* 1997, 126-135.
- [27] **d'Acampora Zellner, B.; Dugo, P.; Dugo, G.; Mondello, L.** Gas chromatography-olfactometry in food flavour analysis. *J. Chromatogr. A* 2008, 1186, 123-143.
- [28] **Debonneville, C.; Orsier, B.; Flament, I.; Chaintreau, A.** Improved hardware and software for quick gas chromatography-olfactometry using CHARM and GC-"SNIF" analysis. *Anal. Chem.* 2002, 74, 2345-2351.
- [29] **Berdagué, J. L.; Tournayre, P.; Cambou, S.** Novel multi-gas chromatography-olfactometry device and software for the identification of odour-active compounds. *J. Chromatogr. A* 2007, 1146, 85-92.
- [30] **da Silva, M. A. A. P.; Lundahl, D. S.; McDaniel, M. R.** The capability and psychophysics of Osme: A new GC-olfactometry technique. *Dev. Food Sci.* 1994, 35, 191-209.
- [31] **Bernet, C.; Dirninger, N.; Claudel, P.; Etievant, P.; Schaeffer, A.** Application of finger span cross matching method (FSCM) by naive assessors for olfactometric discrimination of Gewürztraminer wines. *Lebensm. Wiss. Technol.* 2002, 35, 244-253.
- [32] **Chaintreau, A.; Debonneville, C.; Orsier, B.; Flament, I.** Speeding-up GC-olfactometry for routine CHARM, FSCM and GC-"SNIF" analysis, *Flavour Research at the Dawn of the Twenty-First Century, Proceedings of the Weurman Flavor Research Symposium, 10<sup>th</sup>, Beaune, France*, 548-551.
- [33] **Berdagué, J. L.; Tournayre, P.** "The VIDEO-Sniff(r) method, a new approach for the "vocabulary-intensity-duration" study of "elementary odours". In *Flavour Research at the Dawn of the Twenty-First Century*: Paris, 2002; pp. 514.
- [34] **Serot, T.; Prost, C.; Visan, L.; Burcea, M.** Identification of the main odor-active compounds in musts from French and Romanian hybrids by three olfactometric methods. *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49, 1909-1914.
- [35] **Filippi, J. J.; Fernandez, X.; Dunach, E.** Volatile organosulfur compounds (VOSCs) in flavor chemistry. *Sci. Aliments* 2007, 27, 23-46.
- [36] **Yan, X.** Detection by ozone-induced chemiluminescence in chromatography. *J. Chromatogr. A* 1999, 842, 267-308.
- [37] **van Stee, L. L. P.; Brinkman, U. A. T.; Bagheri, H.** Gas chromatography with atomic emission detection: A powerful technique. *Trends Anal. Chem.* 2002, 21, 618-626.
- [38] **Eiceman, G. A.; Gardea-Torresdey, J.; Overton, E.; Carney, K.; Dorman, F.** Gas chromatography. *Anal. Chem.* 2002, 74, 2771-2780.
- [39] **Cheskis, S.; Atar, E.; Amirav, A.** Pulsed-flame photometer: A novel gas chromatography detector. *Anal. Chem.* 1993, 65, 539-555.
- [40] **Bartle, K. D.; Myers, P.** The history of gas chromatography. *Trends Anal. Chem.* 2002, 21, 547-557.
- [41] **Brody, S. S.; Chaney, J. E.** Flame photometric detector. Application of a specific detector for phosphorus and for sulfur compounds sensitive to subnanogram quantities. *J. Gas Chromatogr.* 1966, 4, 42-46.
- [42] **Pandya, R. N.; Peppard, T. L.** Review of analytical methodologies for volatile nitrogen heterocycles in food. *ACS Sym. Ser.* 2002, 826, 114-131.
- [43] **Qian, M. C.; Burbank, H. M.; Wang, Y.** Preseparation techniques in aroma analysis. In *Sensory-directed flavor analysis*, CRC Press: Boca Raton, USA, 2006; pp. 111-154.
- [44] **Eyres, G.; Marriott, P. J.; Dufour, J.-P.** The combination of gas chromatography-olfactometry and multidimensional gas chromatography for the characterisation of essential oils. *J. Chromatogr. A* 2007, 1150, 70-77.
- [45] **Mondello, L.; Tranchida, P. Q.; Dugo, P.; Dugo, G.** Comprehensive two-dimensional gas chromatography-mass spectrometry: A review. *Mass Spectrom. Rev.* 2008, 27, 101-124.
- [46] **Senger-Emonnot, P.; Rochard, S.; Pellegrin, F.; George, G.; Fernandez, X.; Lizzani-Cuvelier, L.** Odour active aroma compounds of sea fig (*Microcosmus sulcatus*). *Food Chem.* 2006, 97, 465-471.
- [47] **Breme, K.** *Analyse d'extraits naturels parfumants par GC/Olfactométrie: Application à des extraits de Brassicales et d'Astérales (French Edition)*. Éditions Universitaires Européennes ed.; Saarbrücken, Germany, 2010; pp 280.