

# Repousser les limites de

L'utilisation croissante d'ingrédients naturels ainsi que la montée en puissance des exigences réglementaires intensifient le besoin d'authentification et de traçabilité des matières premières tout au long de la chaîne d'approvisionnement.

Une méthode classique pour certifier l'origine d'une matière première est la mesure du rapport isotopique par spectrométrie de masse (irm-MS ou IRMS). Cependant, celle-ci fournit seulement la moyenne ou la quantité globale de la composition isoto-

pique lourde d'une molécule. Par conséquent, un seul paramètre est exploitable.

La limite de cette méthode connue est due à la manière dont elle procède : les échantillons doivent être introduits dans le spectromètre de masse sous forme de gaz purs et simples, comme le CO<sub>2</sub>. Même si les informations récupérées sont toujours valables, des détails subtils manqueront.

Le Professeur Gérald Remaud, co-responsable du groupe Résonance Magnétique, Isotopomique, Métabolomique, Monitoring (MIMM) du laboratoire CEISAM à Nantes (**Photo**), est un expert de l'analyse des rapports isotopiques. Avec son équipe, il a développé une méthode pour évaluer le rapport isotopique intramoléculaire d'un élément à l'aide de la spectrométrie RMN (Résonance Magné-

tique Nucléaire). Celle-ci associe également l'irm-MS et surmonte les limites de la spectrométrie de masse.

## ► Une nouvelle méthode d'analyse

L'utilisation de la RMN, couplée à l'irm-MS, donne accès à une approche d'analyse plus fine grâce à sa double propriété intrinsèque : la séparation du signal à chaque site de la molécule et la quantification de la quantité de noyaux résonnants sous le pic. Ainsi, si la molécule contient cinq atomes de carbone, il y aura cinq paramètres au lieu d'un. La discrimination est beaucoup plus élevée. Cependant, pour mettre en œuvre cette approche pour le <sup>13</sup>C, il faut établir des conditions de RMN du <sup>13</sup>C pour atteindre la

## Authentication: new standards

*The growing use of natural ingredients and increasing impact of regulatory requirements are intensifying the need for effective authentication and traceability of raw materials throughout the supply chain.*

Usually, the source of a raw material is certified by means of isotope ratio mass spectrometry (irm-MS or IRMS). However, this only provides the average or overall amount of the heavy isotope composition for a molecule, resulting in a single useable parameter.

*The limit of this known method is due to its procedure: samples have to be inserted into the mass spectrometer as pure, simple gases, such as CO<sub>2</sub>. While the data recovered will still be valid, they will not include the fine details.*

*Professor Gérald Remaud, co-leader of the group Résonance Magnétique, Isotopomique, Métabolomique, Monitoring (MIMM) at the CEISAM Institute in Nantes (**Photo**), is an expert in the analysis of isotope ratios. With his team, he has developed a method for assessing the intramolecular isotope ratio of an element using NMR (Nuclear Magnetic Resonance) spectrometry. This method also combines irm-MS and overcomes the limitations of mass spectrometry.*

## ► A novel analysis technique

*The use of NMR, coupled with irm-MS, enables a finer, more accurate analysis thanks to its dual intrinsic properties: signal separation at each molecule site and quantification of the number of resonant nuclei in the area under the peak. Thus, a molecule with five carbon atoms will provide five parameters instead of one. The discrimination is much higher. However, to implement this approach for <sup>13</sup>C, the conditions for <sup>13</sup>C NMR need to be established to achieve target accuracy – approx. 1‰ for natural abundance isotope applications. This presents a real challenge for an NMR spectroscopist who has to recognize a variation in peak intensity of just 0.1%. However,*

# l'authentification

précision cible – de l'ordre de 1 ‰ pour les applications isotopiques à l'abondance naturelle. Cela représente un véritable défi pour un spectroscopiste RMN : distinguer une variation de l'intensité du pic de seulement 0,1 ‰. Toutefois, les recherches ont démontré que cela était possible, une fois les réglages appropriés effectués.

La signature isotopique finale dépend des matières premières ainsi que des procédés de fabrication. Au cours de tout processus physique (distillation, chromatographie), chimique ou biochimique (réaction enzymatique), une sélection entre les molécules portant du  $^{12}\text{C}$  par rapport à celles portant du  $^{13}\text{C}$  peut se produire. L'effet isotopique existe donc en raison d'un comportement cinétique ou d'équilibre favorisant le  $^{13}\text{C}$  ou le  $^{12}\text{C}$ . Grâce au profil isotopique

(rapport  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ), il est possible d'identifier les changements dans l'origine du matériau et les processus. Ainsi, différents lots de production, issus de molécules naturelles ou synthétiques, peuvent être comparés entre eux pour valider leur qualité et authenticité. Une base de données importante et fiable est nécessaire afin d'établir des valeurs de référence et de développer une méthode d'analyse précise et reproductible.

## ► L'exemple concret de la vanilline

La vanille est largement utilisée comme arôme et parfum. Elle compte plus d'une centaine d'espèces, mais seules trois

commerciallement pertinentes : *Vanilla planifolia*, *Vanilla tahitensis* et *Vanilla pompona* <sup>(1)</sup>.

La production des gousses nécessite des conditions de croissance très spécifiques et un traitement fastidieux après la récolte, d'où sa grande valeur économique. Madagascar est le principal fournisseur de vanille dans le monde, même si l'Indonésie, la Papouasie-Nouvelle-Guinée et l'Ouganda augmentent leurs productions. En 2016, moins de 1 ‰ de la production mondiale de vanilline provenait des gousses de vanille <sup>(2)</sup>. En 2020, le prix au kilogramme affichait 250 \$. Un chiffre découlant à la fois d'un faible volume de production et d'une forte appétence. Les gousses de vanille contiennent générale-

*research has shown that this is possible once the appropriate adjustments are made.*

*The final isotopic signature depends on the raw materials as well as the manufacturing processes. During any physical (distillation, chromatography), chemical or biochemical (enzymatic reaction) process, a selection between molecules carrying  $^{12}\text{C}$  and those carrying  $^{13}\text{C}$  can occur. The isotopic effect therefore exists due to a kinetic or equilibrium behaviour favouring  $^{13}\text{C}$  or  $^{12}\text{C}$ . The isotopic profile ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  ratio) can be used to identify changes in the origin of the material and the processes. This allows different production batches, from natural or synthetic molecules, to be compared against each other to validate their quality and authenticity. This requires a*

*large and reliable database to establish reference values and to develop an accurate and reproducible method of analysis.*

## ► The specific example of vanillin

*Vanilla is widely used as a fragrance and flavouring. While there are over a hundred species, only three are commercially relevant: *Vanilla planifolia*, *Vanilla tahitensis* and *Vanilla pompona* <sup>(1)</sup>.*

*Production of the beans requires highly specific growing conditions and laborious post-harvest processing, hence its high economic value. Most*

*of the world's vanilla is supplied by Madagascar, although production is increasing in Indonesia, Papua New Guinea and Uganda. In 2016, less than 1 ‰ of global vanillin production came from vanilla beans <sup>(2)</sup>. In 2020, the price per kilogram was \$250 due to the combined effect of low production volumes and high palatability. Vanilla beans typically contain 1-2 ‰ vanillin. To meet the demand, other sources have been developed <sup>(3)</sup> with two important categories: synthetic or biosynthetic vanillin. The latter is obtained by bioconversion of natural raw materials and is labelled a "natural flavouring" under EU Regulation 1334/2008 <sup>(4)</sup>. The synthetic version*



PLATEFORME RMN DU LABORATOIRE CEISAM À NANTES.  
NMR PLATFORM AT THE CEISAM INSTITUTE IN NANTES.

## Une collaboration avec l'expert de l'analyse : Eurofins

### Working with the analytics specialist: Eurofins

Face à la complexité de cette matrice, le spécialiste français de l'analyse et le laboratoire de chimie de Nantes Université (CEISAM) ont travaillé ensemble, dans le cadre d'un projet de recherche. Celui-ci est axé sur le développement d'une méthode analytique capable de détecter une adultération avancée dans les ingrédients de vanille et produits aromatisés.

*Given the complexity of this matrix, the French analytical specialist and the Nantes University chemistry institute (CEISAM) joined forces in a research project aimed at developing an analytical method capable of detecting advanced adulteration in vanilla ingredients and flavoured products.*

ment entre 1 à 2 % de vanilline. Pour répondre à la demande, d'autres sources ont été développées<sup>(3)</sup> avec deux classes importantes : la vanilline synthétique ou biosynthétique. Cette dernière

est obtenue par bioconversion de matières premières naturelles, se voyant attribuer le label « arôme naturel » selon le Règlement européen 1334/2008<sup>(4)</sup>. La version synthétique est produite à partir de

(matières premières fossiles, et son coût de production est le plus bas. Compte tenu de la différence des prix entre ces sources de vanilline et du contexte économique, le défi est lancé depuis des décennies, entre les fraudeurs et les laboratoires de contrôle, visant à détecter les adultérations avancées dans les ingrédients de vanille et les produits aromatisés.

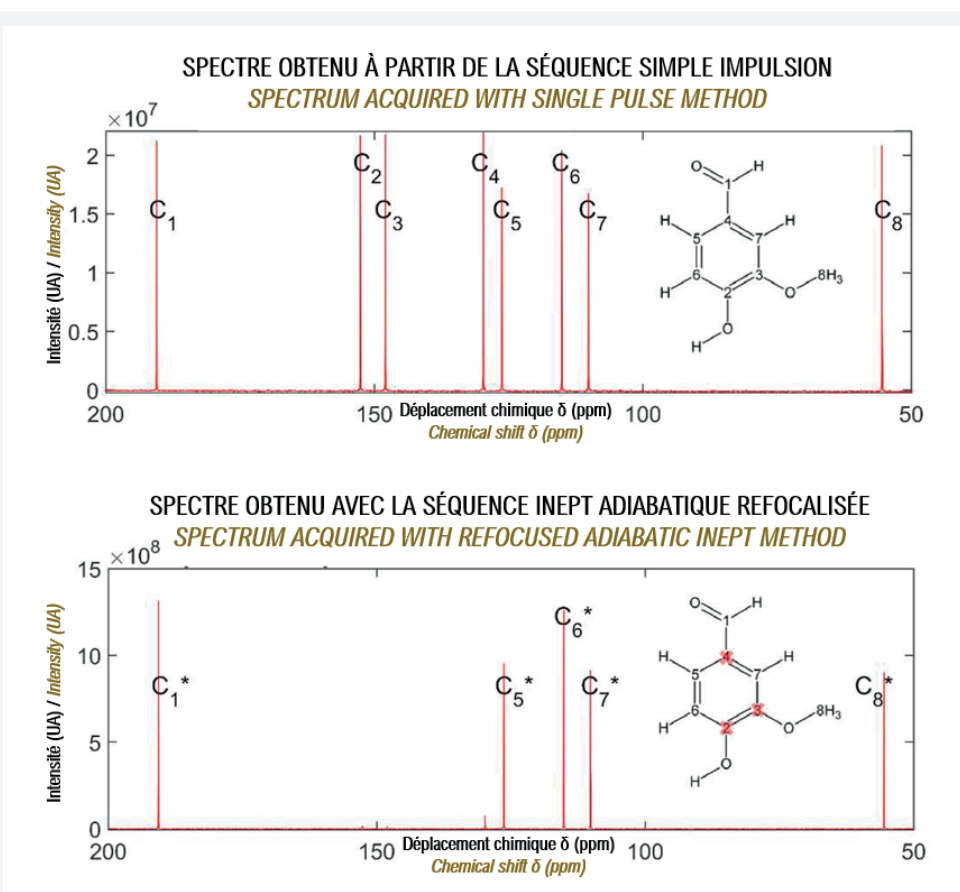
### ► Le couplage irm-MS et RMN pour authentifier la vanilline

Ce problème d'authentification a dû être abordé en utilisant des méthodes isotopiques, car l'analyse de la composition échoue la plupart du temps à identifier les précurseurs de molécules. La vanilline (en tant que molécule pure) est couramment utilisée comme ingrédient et aucun indice de composition concernant sa source ne subsiste après les processus indus-

*is produced from fossil raw materials and has the lowest production cost. Given the price difference between these sources of vanillin and the economic context, for decades, quality control labs have been battling fraudsters who challenge them to detect advanced adulterations in vanilla ingredients and flavoured products.*

### ► Pairing irm-MS with NMR to authenticate vanillin

*This authentication issue had to be addressed using isotopic methods, as compositional analysis generally fails to identify the precursor molecules. Vanillin (as a pure molecule) is commonly used as an ingredient, but advanced industrial purification processes leave no compositional clues regarding its source. Where authenticity is concerned, individual numerical values are not as important as*



FIGURE

VUE COMPARATIVE DU SPECTRE <sup>13</sup>C DÉCOUPLÉ ACQUIS AVEC (EN HAUT) LA MÉTHODE À IMPULSION UNIQUE ET (EN BAS) LA MÉTHODE INEPT ADIABATIQUE REFOCALISÉE UTILISANT LE TRANSFERT DE POLARISATION 1J. LES SITES SONT NUMÉROTÉS PAR ORDRE DÉCROISSANT DE DÉPLACEMENT CHIMIQUE.  
COMPARATIVE VIEW OF <sup>13</sup>C DECOUPLÉ SPECTRUM ACQUIRED WITH (TOP) SINGLE PULSE AND (BOTTOM) REFOCUSED ADIABATIC INEPT METHOD USING 1J POLARIZATION TRANSFER. SITES ARE NUMBERED IN DECREASING CHEMICAL SHIFT ORDER.

triels de purification avancée. Dans le domaine de l'authenticité, les valeurs numériques individuelles ne sont pas aussi importantes que le profil isotopique global de la molécule. Une approche omique utilisant des données spectrales RMN isotopiques primaires peut être mise en place à partir d'outils chimiométriques conduisant à la méthodologie isotopomique. L'amplitude relative de la composition isotopique spécifique au site a été calculée pour chaque site, en considérant tous les échantillons de la base de données. Cela donne lieu à des protocoles RMN très performants en termes de quantité utilisée et/ou de durée d'analyse. Des techniques sophistiquées comme le transfert de polarisation (*via* la séquence d'impulsions INEPT (**Figure**)) ou la RMN à deux dimensions (2D HSQC)

ont ensuite été mises en place. Il faut garder à l'esprit que la répétabilité estimée à court terme est environ 20 fois (5 %) inférieure à l'amplitude isotopique des sites. La précision de la méthode développée est donc suffisante pour identifier la source d'un nouvel échantillon de vanilline inconnu en comparant le profil isotopique obtenu après régression à une base de données existante. L'approche développée a été validée selon la norme NF V03-110 et appliquée en routine, en incluant un échantillon de référence dans chaque session analytique afin d'assurer la stabilité de la méthode. Chaque mesure a été reportée dans des chartes de contrôle (une par site) et a confirmé les valeurs de répétabilité précédemment déterminées sur une période de 6 mois. En conclusion, il est possible

*the molecule's overall isotopic profile. An omics method using NMR spectral data on primary isotopes can be set up using chemometric tools paving the way to an isotopomic approach. The relative amplitude of the site-specific isotopic composition was calculated for each site, taking account of all samples in the database. This provides highly efficient NMR protocols in terms of quantity used and/or analysis time. Sophisticated techniques such as polarisation transfer (*via* the INEPT pulse sequence (**Figure**)) or two-dimensional NMR (2D HSQC) were then implemented.*

*Note that the estimated short-term repeatability is about 20 times (5%) lower than the isotopic amplitude of the sites. The accuracy of the developed method is therefore sufficient*

*to identify the source of a new unknown vanillin sample by comparing the isotopic profile obtained following regression analysis using an existing database. The developed approach was validated according to NF V03-110 and applied routinely, including a reference sample in each analytical session to ensure the stability of the method. Each measurement was reported in control charts (one per site) and confirmed the repeatability values previously determined over a period of 6 months.*

*It is therefore possible to calculate all position-specific isotopic compositions, even those that are not observed with acceptable accuracy. Like the conventional approach, the stability of the method has been proven, but using fewer samples and with a shorter analysis time.*



**8<sup>th</sup> SPIM**  
Skin Physiology International Meeting

**THE BEST SKIN PHYSIOLOGY CONGRESS IN THE WORLD**

**NOVEMBER 3<sup>rd</sup> & 4<sup>th</sup>, 2022**  
Palais des Congrès, Vichy (France)

**4 TOPICS**

- > MECHANOBIOLOGY
- > IMMUNOSENESCENCE
- > EMERGING CONCEPTS IN SKIN BIOLOGY
- > NEUROINFLAMMATION & MICROCIRCULATION

**SPIM AWARDS 2022**

100% FREE OF CHARGE  
Travel, accommodation, etc...

**JUNIOR SCIENTISTS "PHD STUDENTS / POST-DOCTORAL RESEARCHERS"**

Apply for the SPIM Awards and win up to **€15,000** to carry out your research !

Register now on **www.skin-meeting.com**

## Références

<sup>(1)</sup> Leyva, V. E., Lopez, J. M., Zevallos-Ventura, A., Cabrera, R., Canari-Chumpitaz, C., Toubiana, D., & Maruenda, H. (2021). NMR-based leaf metabolic profiling of *V. planifolia* and three endemic Vanilla species from the Peruvian Amazon. *Food Chemistry*, 358. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129365>

<sup>(2)</sup> Grand View Research. (2017). Vanillin market analysis Accessed: November 2020. <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/vanillin-market>.

<sup>(3)</sup> Gallage, N. J., & Lindberg Møller, B. (2015). Vanillin-bioconversion and bioengineering of the most popular plant flavor and its *de novo* biosynthesis in the vanilla orchid. *Molecular Plant*, 8(1), 40–57. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2014.11.008>

<sup>(4)</sup> European Parliament and the Council of the European Union. (2008). Regulation (EC) No 1334/2008. Official Journal of the European Union, 34–50. L 354/34(1334) <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=CELEX%3A32008R1334> Accessed: November 2020.

de calculer toutes les compositions isotopiques spécifiques à une position, même celles qui ne sont pas observées avec une précision acceptable. La stabilité de la méthode a été démontrée, comme cela a été le cas avec l'approche classique, mais en utilisant moins d'échantillons et avec un temps d'analyse plus court.

### ► Perspectives de la méthode d'analyse

L'avantage de la RMN combinée aux méthodes de profilage isotopique irm-MS réside dans son importante capacité discriminatoire. La RMN du <sup>13</sup>C isotopique

augmente le nombre de paramètres de discrimination, ce qui accroît la capacité de différencier les échantillons. « *En raison de l'omniprésence des isotopes, cette technologie pourrait avoir des applications réellement étendues dans les domaines : pharmaceutique pour la traçabilité des lots de fabrication y compris des molécules synthétiques ; la paléontologie pour identifier l'origine géographique d'objets historiques, entre autres ; l'agriculture pour étudier le devenir d'un polluant et bien d'autres* », explique le Pr Remaud.

Les résultats de recherche de Nantes Université attirent de plus en plus le regard des industriels.

Plus de 350 projets collaboratifs et de R&D signés en 2021 attestent de cette attractivité. En effet, Nantes Université s'appuie sur Capacités, sa filiale d'ingénierie dédiée à la valorisation de la recherche, pour mener des projets innovants mobilisant le savoir-faire des laboratoires. Ainsi, des équipes d'ingénieurs-docteurs, encadrées par des chercheurs et hébergées au sein des laboratoires, épaulent les services de R&D des entreprises. ■

**Natalia Pingard**  
Responsable marketing  
Sciences du vivant  
*Marketing manager Life sciences*  
CAPACITÉS SAS

## L'avantage de la RMN combinée aux méthodes de profilage isotopique irm-MS réside dans son importante capacité.

*The advantage of combining NMR with irm-MS isotope profiling methods lies in its high discriminatory capability.*

### La recherche nantaise au service de l'industrie Nantes research committed to serving industry

Capacités, la filiale d'ingénierie de Nantes Université, travaille en lien direct avec les scientifiques des laboratoires de recherche, au profit des entreprises.

*Capacités, the engineering subsidiary of Nantes University, works directly with scientists in research labs for the benefit of businesses.*

- 350 projets de R&D par an / *R&D projects per year.*
- 150 équipements de mesure et essai / *measurement and testing equipment.*
- 100 collaborateurs / *employees.*  
[deveco@capacites.fr](mailto:deveco@capacites.fr)

### ► Outlook for this analysis technique

*The advantage of combining NMR with irm-MS isotope profiling methods lies in its high discriminatory capability. Isotopic <sup>13</sup>C NMR increases the number of discriminatory parameters, thus increasing the ability to differentiate samples. "Isotopes are found everywhere, so this technology could have really wide applications in several fields such as pharmaceuticals for batch traceability including synthetic molecules; palaeontology to identify the geographic origin of historical objects, among others; agriculture to study the fate of a pollutant, to name just a few," explains Pr Remaud.*

*Nantes University's research findings are increasingly attracting the attention of industry, as evidenced by the signing of over 350 collaborative and R&D projects in 2021. Nantes University relies on Capacités, its engineering subsidiary dedicated to research development, to carry out innovative projects that mobilise lab-based expertise and know-how. As such, teams of doctoral engineers, supervised by researchers and hosted at the labs, support R&D Departments at businesses. ■*