

AUTHENTIFICATION D'EXTRAITS DE RHUMS

**Sophie LAVOINE-HANNEGUELLE, Florent PELLEGRIN, Christine PERICHET *,
Hervé CASABIANCA **,**

***CHARABOT 10 avenue Y. E. Baudouin, 06130 GRASSE.**

****CNRS SCA, Echangeur de Solaize, Chemin du Canal, 69360 SOLAIZE**

RESUME.

Les absolues et extraits de rhum sont des produits concentrés à très haute valeur ajoutée pour les arômes et la parfumerie.

Ces extraits peuvent être obtenus de manière traditionnelle par extraction à l'aide de solvants spécifiques ou bien par le CO₂ à l'état supercritique.

Des études ont été menées sur la composition de ces produits mais peu traitent de leur authentification.

Nous avons entrepris une étude sur les produits du marché et avons observé de grandes disparités. L'étude des profils chromatographiques est une première approche intéressante, mais ce sont les aspects isotopiques qui vont être déterminants.

En effet la canne à sucre, plante de métabolisme C4 produit des métabolites dont les valeurs en $\delta^{13}C$ sont bien particulières. On peut ainsi distinguer un produit pur d'un mélange (composition).

SUMMARY.

Rum absolutes and extracts are with high added value products for flavours and perfumes due to their high level of concentration.

These extracts may be obtained either via traditional way, by solvent extraction or using supercritical CO₂.

Some studies about rums composition have been carried out, but very few about rum extracts authentication.

Our study concerns the analysis of industrial products on the market. The study of chromatographic profiles is a first useful approach, but the isotopic values will be decisive.

In fact, sugar cane, a metabolism "C4" plant, produces metabolites which have very particular $\delta^{13}C$ values. Thus, we can distinguish a pure extract from a mixture (flavoured composition).

L'INTRODUCTION.

I.1. La canne à sucre.

La culture de la canne à sucre est une des premières cultures au monde en terme de volume végétal. Elle s'étend à peu près partout entre le 35^{ème} parallèle nord et le 30^{ème} parallèle Sud. Le Brésil et l'Inde sont les premiers producteurs de canne à sucre suivis par les pays de la région des Caraïbes, en particulier Cuba.

La canne à sucre est un hybride de plusieurs espèces du genre *Saccharum* (*Poaceae*). *Saccharum officinarum* est celle qui a été domestiquée. Elle a ensuite été croisée avec les espèces sauvages (*Saccharum Spontaneum*, *Saccharum Robustum*, *Saccharum Barberi* et *Saccharum Sinense*) pour améliorer son rendement en sucre et sa résistance aux différents climats (1).

La plante est une graminée tropicale et se présente sous la forme d'un grand roseau de 2 à 6 mètres de hauteur, et d'une épaisseur de quelques centimètres. La canne est remplie d'une pulpe dense, et porte de longues feuilles étroites (1m de long) et alternes. La fleur est une panicule, inflorescence composée en grappe.

Le métabolisme de la canne à sucre est décrit dès 1965 par les travaux de HATCH et SLACK (2). Cette graminée tropicale fonctionne selon un cycle de photosynthèse particulier appelé cycle de Hatch et Slack (cf. figure 1).

Chez la plupart des espèces tropicales, on observe deux types de cellules, mésophylliennes et périvasculaires avec des équipements enzymatiques impliqués dans la carboxylation. Sous l'action de la phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPCase), le CO₂ de l'air et le phosphoenolpyruvate contenu dans les cellules du mésophylle produisent l'oxaloacétate qui, réduit, donne le malate ou transaminé, donne l'aspartate. Le métabolisme est dit de type C4 du fait de l'apparition de ces métabolites à quatre atomes de carbone qui permettent le transport du CO₂ des cellules mésophylles vers celles de la gaine. Dans les cellules de la gaine périvasculaire, le malate est clivé sous l'action d'une enzyme, pour donner le CO₂ qui alimentera le cycle de Calvin.

La plupart des plantes tropicales (maïs, coton, citronnelle...) fonctionne selon un métabolisme de type C4, en effet elles ont intérêt à éviter une grande vitesse de photorespiration et pour cela concentrent le CO₂ dans les cellules de la gaine.

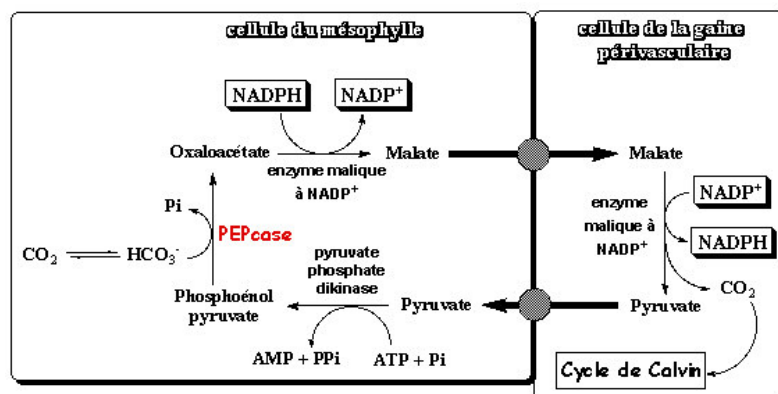


Figure 1: Voie de carboxylation chez les plantes de type C4

La canne à sucre sert de matière première pour de nombreux produits de consommation dont les principaux sont (3):

- le sucre brut et raffiné ;
- la bagasse, résidu fibreux issu de la première étape de production du sucre, source d'énergie sous forme de combustible et de fourrage pour les animaux. Essentiellement composée de cellulose et lignine, elle est également utilisée comme matière première dans la production de papier, de carton ... ;
- la mélasse, résidu obtenu lors de la cristallisation du sucre brut, utilisée directement pour l'alimentation des animaux, la culture des levures, mais essentiellement dans les industries de la distillerie et autres industries de fermentation pour la production de rhum, alcools, vinaigres, levures....

I.2.Production du rhum.

On entend par rhum la boisson spiritueuse obtenue exclusivement par fermentation alcoolique et distillation soit des mélasses ou des sirops provenant de la fabrication du sucre de canne, soit du jus de canne à sucre lui-même, et distillée à moins de 96% vol, de telle sorte que le produit de la distillation présente, d'une manière perceptible, les caractères organoleptiques spécifiques du rhum (4). En règle générale, après distillation le titre alcoolique est compris entre 65 et 78 % vol.

Le rhum peut être consommé directement sous forme pure ou en cocktail. Il peut également être utilisé sous forme d'agent aromatisant dans les chocolats, liqueurs, dans les tabacs ou en pâtisserie.

Le type de rhum dépend largement de l'origine de la matière première, du traitement de la matière première, et du mode de fermentation utilisé.

Selon la classification française, on distingue deux types de rhum :

- rhum agricole, issu de la distillation du jus de canne (vesou) après fermentation par ajout de levures ;
- rhum industriel, issu de la distillation de la mélasse (sous-produit obtenu lors de la transformation du vesou en sucre cristallisé brut) après fermentation par ajout de levures;

La fermentation par ajout de levures, processus complexe qui dépend de nombreux facteurs, et les différentes techniques de distillation mises en œuvre, expliquent la production de nombreuses variétés de rhum (3).

La dernière étape correspond au vieillissement. Selon la durée du vieillissement, le rhum sera nommé blanc (3 mois, fûts en inox ou bois), paille ou ambré (1 à 3 ans, fûts en bois), vieux (à partir de 3 ans, fûts en chêne) ou encore hors d'âge (à partir de 7 ans, fûts en chêne).

L'ajout d'eau de source permet de ramener le degré alcoolique selon le souhait.

De manière générale, les rhums possédant un arôme « lourd, gras » subissent des périodes de fermentations longues et sont distillés en alambic. Alors que les rhums caractérisés par un arôme plus « doux, léger » sont produits par des fermentations courtes et une distillation en continu (3).

II. MATERIEL ET METHODES.

II.1. Procédés d'obtention des absolues et extraits.

Le rhum est principalement composé d'éthanol et d'eau, la fraction aromatique n'étant présente qu'entre 1 et 2%. De plus cette fraction est extrêmement volatile, et d'autant plus compliquée à isoler. Ceci rend complexe l'obtention de l'extrait aromatique.

Deux principales méthodes sont utilisées pour l'obtention des extraits de rhum :

- Extraits liquide liquide aux solvants volatils : on utilise généralement le dichlorométhane. Celui-ci décante bien et possède un point d'ébullition bas, permettant d'éviter trop de pertes en composés odorants ;
- Extraits au CO₂ à l'état supercritique : la technologie doit dans ce cas être adaptée au milieu liquide. L'extraction se fait à contre-courant. La récupération de l'extrait aromatique par détente du CO₂ est idéale, on constate peu de pertes des composés volatils et pas de traces résiduelles de solvants indésirables.

Deux échantillons internes et quatre échantillons de fournisseurs différents et issus des deux procédés d'obtention principaux ont été sélectionnés :

- RHUM A : extrait CO₂, échantillon interne ;
- RHUM B : extrait CO₂, échantillon interne ;
- RHUM C : extrait CO₂, échantillon commercial ;
- RHUM D : extrait CO₂, échantillon commercial ;
- RHUM E : absolue, échantillon commercial ;
- RHUM F : absolue, échantillon commercial.

Dans un but principalement économique, ces extraits sont parfois mélangés à des fusels (5), à d'autres matières aromatiques naturelles, ou à des molécules de synthèse. Ils perdent alors le statut « 100% pur et naturel ».

Le challenge de l'analyste consiste à détecter les adultérations possibles afin d'éviter une utilisation frauduleuse des extraits commerciaux.

Des travaux précédemment publiés décrivent des méthodes permettant de différencier différentes marques de rhum (6), des rhums ayant subi des durées de vieillissement variables (7), des rhums d'origines différentes (8,9).

D'autres études portant sur la détection d'adultération dans les rhums et autres boissons alcooliques sont décrites, mettant en œuvre des techniques telles que la spectrométrie infrarouge (10), la chimiométrie (11), la chromatographie ionique (12), ou encore les analyses isotopiques (13,14,15).

Afin de vérifier le statut des différents extraits en notre possession, des analyses GC et GC/MS sont réalisées dans un premier temps au laboratoire. Dans un second temps dans le but d'affiner nos résultats et de conclure sur l'authenticité des échantillons, notre choix se porte sur des analyses isotopiques complétées par des analyses du radiocarbone.

II.2. Analyses chromatographiques: GC et GC/MS.

Conditions pour l'analyse par chromatographie en phase gazeuse (GC/FID) :

Les analyses sont effectuées à l'aide d'un Chromatographe Agilent Technologies HP 6890, équipé comme suit :

- Injecteur :
HP 7673
température : 250°C ;
mode : split 1/50 ;
Les échantillons sont injectés en pur (1µL).

- Colonnes :
Varian CP8741 CP SIL 5CB – 30 m x 250 µm – épaisseur de film 0.25 µm ;
Varian CP8713 CP WAX 52CB – 30 m x 250 µm – épaisseur de film 0.25 µm.

- Four :
température initiale : 40°C, pendant 5 min ;
progression de température : 2°C/min de 40°C à 100°C, puis 5°C/min de 100°C à 240°C, puis isotherme 240°C pendant 27 min.

- Détecteurs :
deux détecteurs à ionisation de flamme ;
température : 270°C ;
débits gazeux : hydrogène – 30mL/min ; air – 300mL/min.

- Gaz vecteur :
hélium ;
pression constante – 16.60 psi.

Conditions pour l'analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS) :

Les analyses sont réalisées par le couplage d'un Chromatographe Agilent Technologies HP 6890 avec un spectromètre de masse Agilent Technologies HP 5972A. Les molécules sont fragmentées par impact électronique à 70 eV. Les analyses couvrent une gamme de masses de 29 à 400 uma.

La ligne de transfert et la source sont à une température de 280°C.

Le chromatographe est muni de deux injecteurs utilisés dans les mêmes conditions que précédemment. Les échantillons sont injectés en pur (1µL).

Les colonnes utilisées sont connectées à la ligne de transfert par un raccord en « T » :

- VARIAN CP 8914 Factor Four VF-1ms – 50m x 250µm – épaisseur de film 0.25µm ;
- VARIAN CP 9207 VF-WAXms Factor Four – 60m x 250µm – épaisseur de film 0.25µm ;

Les conditions opératoires du four sont également identiques aux analyses GC/FID.

L'hélium est utilisé comme gaz vecteur à pression constante (21.91 psi).

L'identification des constituants est basée sur la comparaison des spectres de masse avec ceux de références pures contenus dans une bibliothèque de spectres commerciale (HP, NBS75K Library) et dans des bibliothèques internes construites à partir de références pures.

Les extraits sont injectés sur deux colonnes de polarités différentes, afin de confirmer la présence des molécules identifiées.

Enfin, la comparaison des indices de rétention calculés sur les deux colonnes à ceux décrits dans la littérature et dans une banque de données interne permet la confirmation de l'identification. Le calcul des indices de rétention se fait par injection d'un mélange d'alcane de C5 à C30.

II.3. Analyses isotopiques.

Les analyses sont réalisées sur un système GC/C/SMRI VG Isoprime équipé comme suit :

- Injecteur :
mode : split 1/20 ;
Les échantillons sont injectés dilués dans le pentane distillé (concentration dépendant de la quantité de la substance ciblée).
- Colonne :
INNOWAX – 50m x 200µm – épaisseur de film 0.5µm ;
- Four :
température initiale : 50°C, pendant 5 min ;
progression de température : 4°C/min de 40°C à 245°C, puis isotherme 245°C pendant 20 min ;
- Gaz vecteur :
Hélium ;
Débit constant – 1.4mL/min.
- Four à combustion constitué de granules d'oxyde de cuivre (CuO) à 850°C.
- Elimination de l'eau de combustion par passage sur membrane de Naflon.

Ce type d'analyse repose sur le fait que la valeur des rapports $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ varie d'une plante à l'autre. Le CO_2 de l'air a une abondance en ^{13}C constante, mais lorsqu'il est absorbé par la plante lors du mécanisme de photosynthèse, il se produit un fractionnement des isotopes du carbone.

Ce fractionnement dépend de la nature de la plante, mais aussi de facteurs géographiques et climatiques. Ainsi, un produit naturel peut présenter un facteur d'enrichissement isotopique différent selon son pays d'origine et un facteur d'enrichissement différent de ce même produit obtenu par voie de synthèse. Une analyse isotopique peut donc permettre de différencier chaque type de produit.

Les facteurs d'enrichissement isotopique sont calculés de la manière suivante (16):

$$\delta^{13}\text{C} = ((^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{échant}} / (^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{réf}} - 1) \times 1000$$

Les variations de $\delta^{13}\text{C}$ étant très faibles, le résultat est toujours multiplié par un facteur 1000. Le rapport $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ est calculé par rapport à celui d'une référence internationale : le Pee Dee Belemnite (carbonate de fossile marin du Crétacé).

II.4. Analyse du radiocarbone.

Une analyse du ^{14}C est effectuée comme suit :

L'extrait de rhum est en premier lieu distillé deux fois afin d'éliminer l'eau avant d'être brûlé en présence d'oxygène de façon à obtenir du gaz carbonique.

Celui-ci est ensuite transformé en carbure de lithium (Li_2C_2) à 650°C en présence de lithium. Le carbure de lithium est hydrolysé pour former de l'acétylène qui est finalement transformé en benzène par trimérisation.

Le benzène liquide formé est transféré dans des flacons en verre, additionné d'un liquide scintillant (butyl-PBD+bis-MSB) et placé dans des compteurs à scintillation liquide Packard instrument (mesures multiples sur différents modèles). Le mélange scintillant se présente sous forme de poudre et non de liquide. Le flacon de verre est pesé après ajout du liquide scintillant puis le benzène transféré est pesé très exactement, l'activité étant exprimée en désintégrations par minute et par gramme (dpm/g)

Le compteur enregistre les désintégrations du ^{14}C de l'échantillon au cours d'une mesure de plusieurs jours. Le résultat final est obtenu par comparaison avec un échantillon standard qui représente l'activité actuelle (celle de 1950, année de référence ^{14}C).

Pour connaître le taux de radiocarbone annuel depuis les années 50, on peut mesurer l'activité ^{14}C sur des matières végétales comme par exemple des cernes de croissance d'arbre ou des coquilles de noix fraîches qui reflètent bien la teneur en ^{14}C dans l'atmosphère. A partir de ces valeurs, on établit, une courbe de référence qui permet de déterminer l'âge de l'échantillon.

III. RESULTATS ET DISCUSSIONS.

III.1. Comparaison des compositions.

L'arôme des boissons alcooliques est constitué de nombreux composés organiques volatils et non-volatils. Ces composés donnent un goût et une odeur typique à ces boissons. La plupart des molécules responsables de l'arôme sont volatiles. L'arôme caractéristique et la composition chimique sont étroitement liés au procédé de fabrication. La fermentation est l'étape principale dans le développement des arômes. La distillation peut également largement affecter la proportion des composés récupérés. L'étape de maturation influence aussi l'arôme du rhum en ajoutant de nouveaux composés formés par réactions chimiques, pendant que d'autres composés sont évaporés. L'arôme final est donc lié à toutes les étapes du processus de fabrication, ce qui rend complexe la comparaison des compositions des différents extraits analysés, extraits de même origine mais, ayant subi des procédés de fabrication et d'extraction différents.

<i>Famille Chimique</i>	RHUM A	RHUM B	RHUM C	RHUM D	RHUM E	RHUM F
<i>esters</i>	62,95	58,76	44,65	76,81	75,13	57,45
<i>alcools</i>	21,59	24,39	48,65	9,96	7,65	26,3
<i>acétals</i>	10,03	10,58	4,35	9,32	10,62	0,92
<i>acides</i>	2,46	1,93	0,2	0,41	0,18	0,78
<i>aldéhydes</i>	0,92	0,92	0,56	1,04	0,49	0,17
<i>phénols</i>	0,30	0,28	0,31	0,13	0,97	1,14
<i>cétones</i>	0,28	0,31	0,48	0,17	0,22	tr
<i>furanes</i>	0,18	0,25	0,13	0,29	0,39	0,78
<i>soufrés</i>	0,27	0,11	0,14	0,04	0,08	0,03
<i>azotés</i>	-	-	-	tr	0,26	0,24
<i>autres</i>	0,20	0,28	0,06	0,35	0,33	0,41

tr : composés présents à l'état de traces

- : non détecté.

Tableau 1 : Composition (% GC/FID - colonne polaire) par famille chimique des extraits de rhum analysés.

Le profil chromatographique partiel de l'échantillon A est présenté en annexe 1. Le tableau 1 ci-dessus présente la composition globale par familles chimiques des différents échantillons

analysés. Les résultats détaillés, issus des analyses GC/FID et GC/MS, sont reportés en annexe 2.

Environ une centaine de composés sont identifiés dans les différents extraits étudiés. La plupart des molécules ont déjà été décrites dans les rhums selon la littérature (7,17,18,19). Seule une dizaine de composés ne sont pas reportés de ce type de matrice, mais sont toutefois décrits dans la nature (17).

Globalement, les esters constituent la famille chimique prédominante (45% à 77%), la plupart étant des esters d'éthyle, en particulier l'acétate d'éthyle, composé majoritaire dans tous les cas. On détecte également des esters de 3-méthyl-1-butyl ou encore de phényléthyl.

Les esters se forment par action des levures au cours de la fermentation ou bien par estérification des acides gras en présence de grandes quantités d'éthanol durant la maturation (7, 18).

Dans l'extrait C les alcools correspondent à la famille chimique majoritaire (~ 50%), ce qui est dû en particulier à la quantité importante de 3-méthylbutanol et 2-méthylbutanol. Le 2-méthylpropanol se trouve également dans des quantités plus importantes. Les autres extraits contiennent entre 7% et 26% d'alcools.

Les acétals représentent également une classe importante (4% à 11%), excepté dans l'extrait F où moins de 1% d'acétals sont identifiés. Dans cette classe on retrouve essentiellement des composés d'interaction entre l'éthanol et les aldéhydes, générés en particulier au cours des phases de distillation (7, 18).

Les autres classes, moins conséquentes en terme quantitatif, peuvent jouer un rôle primordial au niveau qualitatif. En effet, parmi elles, des molécules ayant un faible seuil de perception, bien que contenues à l'état de trace, interviennent sûrement de façon importante dans l'élaboration de l'arôme global (cas de certaines cétones, des composés soufrés et des composés azotés).

Les extraits de rhum analysés possèdent des compositions complexes, comprenant de nombreuses molécules qui contribuent à l'arôme. On constate que les proportions entre les molécules dans les différents extraits sont très variables et certains composés sont présents à l'état de trace.

La grande disparité entre les résultats obtenus ne permet pas de conclure quant à une potentielle adultération des extraits analysés. Seul l'extrait C peut paraître suspect avec un taux anormalement élevé d'alcools tels que 3-méthylbutanol, 2-méthylbutanol et 2-méthylpropanol, alcools majoritaires des huiles de fusel (5), qui pourrait traduire une adultération.

III.2. Analyses isotopiques.

Les données isotopiques constituent un potentiel remarquable donnant des informations précieuses sur les métabolismes mais aussi sur la reconnaissance d'un millésime, d'une origine géographique, botanique et surtout synthétique, hémi synthétique ou naturelle puisque la molécule de synthèse aura une « histoire » très différente de la molécule naturelle.

Le rapport isotopique $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ des molécules organiques est directement relié au type de métabolisme C3 (20), C4 (2) ou CAM (21). En effet, au cours du fractionnement isotopique naturel, les enzymes intervenant dans les différents types de métabolisme (ex : PEPCase pour C4), n'ont pas la même sélectivité vis-à-vis du ^{13}C (22). Les effets isotopiques lors de l'assimilation du CO_2 ont été mesurés et interprétés pour les différents métabolismes végétaux. En 1984, IVLEV propose une interprétation à l'appauvrissement en ^{13}C causé lors de l'assimilation photosynthétique du CO_2 , expliquant une assimilation préférentielle

$^{12}\text{CO}_2$ par rapport au $^{13}\text{CO}_2$ (23). Ainsi les plantes du type C4 ont des taux en ^{13}C compris entre -7‰ et -19‰, et celles de type C3 entre -22‰ et -32‰.

Une étude bibliographique reporte un article traitant de la teneur en isotopes stables du rhum et des principaux alcools de bouche (13). Cette étude porte sur le $\delta^{13}\text{C}$ de l'éthanol contenu dans les boissons alcoolisées, elle décrit des valeurs $\delta^{13}\text{C}_{\text{ETHANOL}}$ de l'ordre de -13‰ pour la canne à sucre.

$\delta^{13}\text{C}$	RHUM A	RHUM B	RHUM C	RHUM D	RHUM E	RHUM F
Ethanol	-21,86	-20,28	-10,72	-10,08		
Acétate d'éthyle	-13,93	-13,95	-14,45	-13,14	-15,71	-30,92
Propanoate d'éthyle				-18,51	-21,01	
Butanoate d'éthyle			-25,84			
2-méthylpropanol			-22,97			
Propanol	-8,80	-8,92		-16,37		-27,43
Acétate d'isoamyle	-13,83	-13,97	-23,48			-34,23
3-méthylbutanol	-9,19	-9,2	-30,42	-13,48	-13,96	-27,96
Lactate d'éthyle				-12,75	-13,58	-13,54
Caprylate d'éthyle	-13,65	-13,74	-30,69			
Caprate d'éthyle	-12,37	-12,33	-29,48	-16,09		
Laurate d'éthyle	-12,61	-12,86	-26,31	-15,76		
Myristate d'éthyle			-25,61	-13,08		

Tableau 2 : $\delta^{13}\text{C}$ pour quelques composés identifiés dans les extraits de rhum (moyenne de plusieurs mesures).

Le tableau 2 ci-dessus présente les résultats obtenus par GC/SMRI.

Les valeurs $\delta^{13}\text{C}_{\text{ETHANOL}}$ sont conformes au métabolisme des plantes C4 pour les extraits C et D. Par contre elles semblent légèrement élevées pour les extraits A et B, qui sont toute fois les seuls dont la pureté et la naturalité soit sûre à 100 %. En effet, des analyses isotopiques effectuées sur la matière première engagée lors de l'extraction CO_2 pour l'obtention des extraits A et B, donnent des valeurs $\delta^{13}\text{C}$ de l'ordre de -12‰, cohérentes avec le mécanisme de décarboxylation de la canne à sucre. La diminution de la valeur du $\delta^{13}\text{C}$ sur l'éthanol peut alors être attribuée au fractionnement isotopique qui se produit probablement au cours de l'extraction : 90% de l'éthanol est éliminé durant le procédé.

En conséquence les valeurs isotopiques de l'éthanol ne doivent pas être prises en compte dans cette étude.

Suite à cette constatation, plusieurs molécules clés, identifiées dans les extraits en quantités importantes, ont été ciblées afin de mesurer les différents $\delta^{13}\text{C}$.

Dans les extraits A et B, toutes les autres molécules sélectionnées donnent des résultats qui tendent à confirmer l'authenticité des extraits (-8.8 à -13.93‰).

En se basant sur la naturalité des extraits A et B, il est clair que les rhums C et F possèdent de grosses anomalies isotopiques sur quasiment l'ensemble des molécules cibles, ce qui pourrait signifier un ajout de ces molécules issues de la pétrochimie ou d'une plante de type C3. En particulier, la valeur -30.42‰ pour le 3-méthylbutanol dans l'extrait C tend à confirmer la première hypothèse émise après les analyses chromatographiques, dans laquelle il était suspecté un ajout de cet alcool par addition de fusel.

Ces observations permettent de dire que les extraits C et F ne sont pas purs, et qu'il y a ajout de molécules soit issues de métabolisme de type C3, soit synthétiques.

Concernant les extraits commerciaux D et E, les résultats sont moins évidents. En effet, les différences de $\delta^{13}\text{C}$ sont moins marquées et demeurent dans la fourchette des résultats pour

les substances issues d'un métabolisme de type C4. Toute fois, si on considère que A et B sont purs et naturels, on observe tout de même un appauvrissement isotopique sur le propanol, le 3-méthylbutanol et sur les esters d'acides gras dans l'extrait D et sur l'acétate d'éthyle et le 3-méthylbutanol dans l'extrait E. De plus, les valeurs obtenues pour le propanoate d'éthyle semblent également élevées pour que ce dernier provienne uniquement de la canne à sucre.

Afin de finaliser nos conclusions, des analyses du radiocarbone et des analyses globales du ratio isotopique sont effectuées. Pour des raisons de disponibilité des échantillons seuls les rhums A, E et F sont analysés.

III.3. Analyse du radiocarbone et ratio isotopique global.

	RHUM A	RHUM E	RHUM F
Activité en radiocarbone (dpm/g)	14,44	14,63	7,27
Ratio isotopique $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ (‰)	-14,54	-18,3	-27,15

Tableau 3 : Activité en radiocarbone et ratio isotopique global mesurés sur 3 échantillons d'extraits de rhum.

Du fait des expériences thermonucléaires des années 60, les matières organiques d'origine entièrement naturelle ont actuellement (2006) une teneur en radiocarbone qui se situe autour de 14.40 dpm/g, soit environ 240 Bq/kg. Celles qui sont préparées à partir de produits chimiques provenant des pétroles n'ont plus de radiocarbone. De ces faits, les produits qui ont une valeur intermédiaire sont obligatoirement des mélanges de produits naturels et de synthèse (24).

Ainsi, les extraits A et E dont les résultats sont donnés dans le tableau 3 ci-dessus, possèdent une teneur en radiocarbone très proche de celle de l'atmosphère actuelle, et compte tenu des marges statistiques, peuvent être considérés comme d'origine naturelle.

Par contre, l'extrait F est très certainement un mélange d'environ 50% de produit de synthèse et 50% de produit naturel.

Sur la base de l'observation du ratio isotopique global obtenu pour l'extrait E, il est possible de penser que celui-ci, bien que naturel semble également être adultéré par des produits naturels issus d'un métabolisme de type C3. La valeur observée pour l'extrait F confirme l'adultération déjà pressentie.

IV. CONCLUSION.

Notre étude porte sur la recherche d'adultération d'extraits de rhum. Afin d'améliorer la robustesse de la démarche d'analytique lors de la recherche d'adultération, nous avons complété l'étude chromatographique, trop complexe pour aboutir à une conclusion sûre, par une étude isotopique et une étude partielle du radiocarbone. L'originalité réside dans le fait que les analyses isotopiques ne sont pas concentrées uniquement sur l'éthanol, mais également sur d'autres molécules clés identifiées dans les extraits. Ainsi, il est possible pour chaque échantillon de déterminer si la molécule cible est bien issue du métabolisme de la canne à sucre. Par ailleurs, cela permet également de s'affranchir de l'effet isotopique de procédé qui peut survenir du fait d'une concentration alcoolique importante.

De cette façon, il a été possible de déterminer avec certitude que les 4 échantillons commerciaux en notre possession ne peuvent conserver leur statut « pur et naturel », contenant très certainement des molécules issues soit de la pétrochimie, soit des molécules issues de métabolismes de type C3.

Cette démarche s'avère donc judicieuse malgré le type d'analyses mis en œuvre, du fait des enjeux économiques engendrés par l'adultération des extraits de rhum.

REMERCIEMENTS

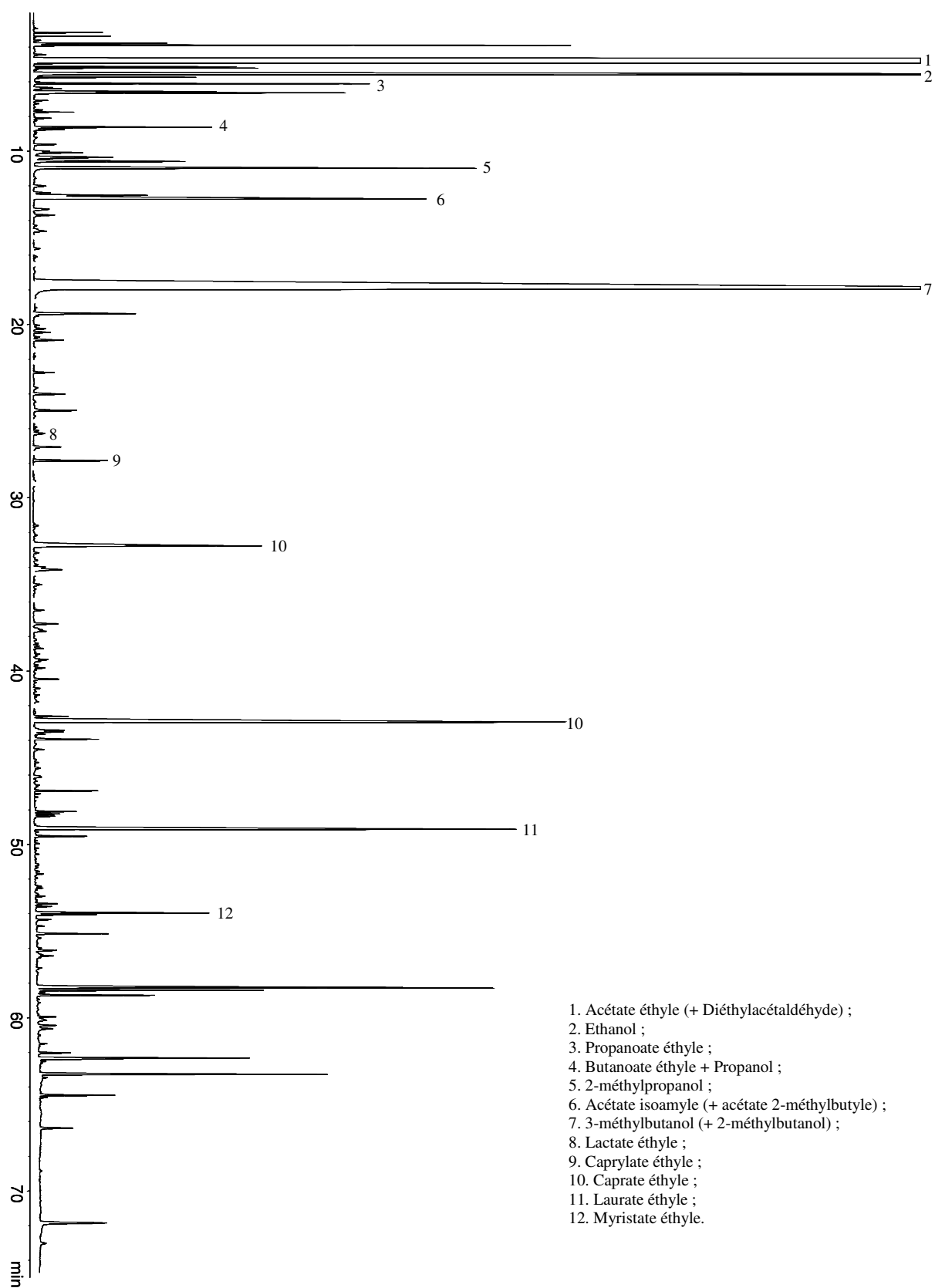
Remerciements à Madame Christine Oberlin du Laboratoire du carbone 14, UMR5138 CNRS l'Université Claude Bernard Lyon I, pour la réalisation des analyses du carbone 14.

BIBLIOGRAPHIE

1. Grivet, L.; Arruda, P. Sugarcane Genomics : Depicting the Complex Genome of an Important Tropical Crop. *Current Opinion in Plant Biology*. **2002**, *5* (2), 122-127.
2. Hatch, M.; Slack, C. R. Photosynthesis by Sugar Cane Leaves. A New Carboxylation Reaction and the Pathway of Sugar Formation. *Biochem. J*. **1966**, *101*, 103-111.
3. Maza Gomez, S. Rum Aroma Descriptive Analysis. Thesis Ph. Louisiana University, U.S.A., 2001, 154 pp.
4. Règlement (CEE) N° 1576/89 du Conseil, du 29 mai 1989, établissant les règles générales relatives à la définition, et à la désignation et à la présentation des boissons spiritueuses.
5. Patil, A. G.; Koolwal, S. M.; Butala, H. D. Fusel Oil : Composition, Removal and Potential Utilization. *International Sugar Journal*. **2002**, *104* (1238), 51-58.
6. Herranz, A. ; de la Serna, P. ; Barro, C. ; Martin-Alvarez, P. Multivariate Statistical Methods Applied to the Differentiation of Rum Brands. *J. Sci. Food Agric*. **1990**, *51*, 555-560.
7. Pino, J. A. Characterization of rum using solid-phase microextraction with gas chromatography-mass spectrometry. *Food Chem*. **2007**, *104*, 421-428.
8. Moreira Sampaio, O.; Reche, R. V.; Franco, D. W. Chemical Profile of Rums as a Function of their Origin. The Use of Chemometric Techniques for their Identification. *J. Agric. Food Chem*. **2008**, *56* (5), 1661-1668.
9. Smajda, J.; Sing, A.; Gaydou, E. M. Differentiation of Reunion Aged Rums by Physical and Chemical Parameters. *Lebensm.-Wiss. U.-Technol*. **1994**, *27* (2), 133-41.
10. Pontes, M. J. C.; Santos, S. R. B.; Araujo, M. C. U. ; Almeida, L. F. ; Lima, R. A. C. ; Guaião, E. N. ; Souto, U. T. C. P. Classification of Distilled Alcoholic Beverages and Verification of Adulteration by Near Infrared Spectrometry. *Food Research International*. **2006**, *39* (2), 182-189.
11. Da Costa, R. S.; Santos, S. R. B.; Almeida, L. F.; Nascimento, E. C. L. ; Pontes, M. J. C.; Lima, R. A. C. ; Simoes, S. S.; Araujo, M. C. U. A Novel Strategy to Verification of Adulteration in Alcoholic Beverages Based on Schlieren Effect Measurements and Chemometric Techniques. *Microchemical Journal*. **2004**, *78* (1), 27-33.
12. Lachenmeier, D. W.; Attig, R.; Frank, W.; Athanasakis, C. The Use of Ion Chromatography to Detect Adulteration of Vodka and Rum. *Eur. Food Res. and Technol*. **2003**, *218* (1), 105-110.

-
13. Bricout, J.; Ménoret, Y. Stable Isotope Content of Rum and of the Principal Alcohols. *Ann. Technol. Agric.* **1975**, *24* (3-4), 247-254.
 14. Lamoureux, C. Isotopic Analyses at the Customs Laboratory. *Actualite Chimique.* **2003**, (8-9), 31-33.
 15. Kinton, V. R.; Ammann, J. Determination of Authenticity of Sake by $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ Isotope Ratio Analysis. Abstracts of Papers, 234th ACS National Meeting, Boston, MA, United States, August, **2007**, (2007), 19-23.
 16. Smith, B. N.; Epstein, S. $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ Ratio for Higher Plant. *Plant Physiol.* **1971**, *47*, 380-384.
 17. Nijssen, L., M. ; Visscher, C. A. ; Maarse, H. ; Willemsens, L. ; Boelens, M. 1996, Volatile Compounds in Food. Qualitative and Quantitative Data Zeist : TNO Nutrition and Food Research Institute.
 18. Nykänen, L., Nykänen, I. Rum Flavour. In *Flavour of Distilled Beverages: Origin and Development*; Piggott, J., Ed.; Ellis Horwood: Chichester, 1983, pp 49-63.
 19. Pino, J. A. Studies on Volatile Constituents of Sugar Cane Spirits. *Alimentaria.* **1999**, *301*, 119-122.
 20. Calvin M. The Photosynthetic Carbon Cycle. *J. Chem. Soc.* **1956**, 684, 1895-1915.
 21. Osmond, C. B. Crassulacean Acid Metabolism : A Curiosity in Context. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **1978**, *101*, 103-111.
 22. O'Leary, M. H. Carbon Isotopes in Photosynthesis. *BioScience.* **1988**, *38* (5), 328.
 23. Ivlev, A. A. Mechanism Governing the Appearance of Carbon Isotope Effects during Photosynthetic Assimilation of CO_2 . *Plant. Physiol.* **1984**, *1*, 605.
 24. Mongereau, N., Evin, J. Les Applications du Radiocarbone et l'Expertise. *C. E. J.* **1993**, *5* (3-4), 105-110.

ANNEXE 1 : Profil chromatographique GC/FID partiel du Rhum A (colonne polaire).



Chromatogramme partiel Rhum A, colonne Varian CP8713 CP WAX 52CB – 30 m x 250 μm – épaisseur de film 0.25 μm .

**ANNEXE 2 : Composés identifiés par GC/MS dans 6 échantillons d'extraits de rhum
(% aire GC/FID - colonne polaire).**

Molécules identifiées	IR ^a	RHUM A	RHUM B	RHUM C	RHUM D	RHUM E	RHUM F
Acétylaldéhyde	697	0,06	0,04	0,12	0,25	< 0,02	0,05
Sulfure de diméthyle	755	0,11	0,03	-	-	-	-
Propanal	786	-	-	< 0,02	0,03	-	-
2-méthylpropanal	800	0,29	0,27	0,21	0,33	-	-
Formiate d'éthyle	822	0,80	0,54	0,76	1,03	-	< 0,02
Acétate d'éthyle	876	49,07	40,79	33,91	69,83	67,64	40,23
Diéthylacétal acétylaldéhyde	880	8,42	8,56	3,85	8,14	9,69	0,67
Butan-2-one	896	-	-	-	-	-	-
2-méthylbutanal	915	0,22	0,24	0,07	0,16	0,16	-
3-méthylbutanal	918	0,27	0,3	0,11	0,21	0,23	-
Ethanol	922	4,91	5,25	3,52	5,71	0,24	1,21
Diéthylacétal propanal	933	0,22	0,2	0,18	0,42	0,27	0,11
Propanoate d'éthyle	943	0,47	0,43	0,23	2,12	1,19	4,23
2,3-butanedione	976	-	-	-	-	-	-
Acétate de propyle	977	0,46	0,43	0,23	0,69	1,71	0,67
Diéthylacétal butanal	987	0,56	0,71	0,13	0,27	0,24	0,14
Acétate d'isobutyle	1010	0,07	0,08	-	< 0,02	0,04	0,09
Butanoate d'éthyle	1025	0,26	0,29	1,14	0,18	< 0,02	0,1
Propanol	1026	-	0,12	0,6	2,13	4,29	0,5
2-méthylbut-3-èn-2-ol ^b	1026	0,08	0,07	0,08	0,13	0,15	-
Propanoate de propyle	1041	-	-	-	-	0,04	0,04
2,3-pentanedione	1044	-	0,05	-	-	0,08	-
Isovalérate d'éthyle	1060	-	-	-	< 0,02	-	-
Disulfure de diméthyle ^b	1070	0,07	0,03	-	< 0,02	< 0,02	-
Formiate d'isoamyle	1070	0,13	-	0,08	-	-	0,33
Acétate butyle	1070	-	-	-	-	< 0,02	-
Diéthylacétal 2-méthylbutanal	1178	0,28	0,37	0,05	0,13	0,1	-
Diéthylacétal 3-méthylbutanal	1184	0,46	0,62	0,08	0,19	0,17	-
2-méthylpropanol	1099	1,35	1,39	3,13	0,43	0,44	0,61
Pentan-2-ol	1115	-	-	-	-	-	-
Pent-3-èn-2-one	1120	0,28	0,26	0,48	0,17	0,14	-
Acétate de 2-méthylbutyle	1116	-	-	-	-	0,08	-
Acétate d'isoamyle	1125	1,46	1,87	1,55	0,08	0,13	3,81
Valérate d'éthyle	1130	0,04	0,04	-	0,03	-	-
Butanol	1139	0,06	0,06	0,06	0,1	0,16	0,8
Propanoate d'isoamyle	1180	-	-	-	-	-	0,73
Limonène	1196	-	-	-	0,03	0,1	-
3-méthylbutanol	1203	14,91	17,3	40,97	1,06	1,6	22,5
2-méthylbutanol	1218	-	-	-	-	-	-
Caproate d'éthyle	1232	0,30 ^c	0,39 ^c	0,12	0,12 ^c	0,1	0,04
3-méthylbut-3-èn-1-ol ^b	1243	-	< 0,02	0,03	0,03	0,08	0,09
Styrène	1252	-	0,05	-	-	-	-
Pentanol	1249	0,04	0,1	0,05	0,09	0,08	-
2-méthyltetrahydrofuran-3-one	1245	0,12	0,09	0,06	0,09	0,06	0,12
Diéthylacétal 3-éthoxypropanal	1300	0,10	0,12	0,06	0,17	0,15	-
2,5-diméthylpyrazine	1302	-	-	-	< 0,02	0,05	0,06

2,6-diméthylpyrazine	1311	-	-	-	-	0,1	0,03
3-méthylbut-2-èn-1-ol (Prénol) ^b	1326	-	-	0,02	-		-
Heptan-2-ol	1304	0,13	0,16	0,04	0,13	0,08	0,19
Lactate d'éthyle	1359	0,06	0,05	0,17	0,21	2	2,57
Heptanoate d'éthyle	1325	< 0,02	< 0,02	-	-	-	-
Hexanol	1353	0,10	0,11	0,12	0,12	0,08	-
2-éthyl-6-méthylpyrazine	1394	-	-	-	< 0,02	< 0,02	-
cis 3-héxèno	1382	-	< 0,02	< 0,02	< 0,02	0,04	-
2-éthyl-3-méthylpyrazine	1410	-	-	-	< 0,02	< 0,02	-
Triméthylpyrazine	1415	-	-	-	< 0,02	< 0,02	-
Caprylate d'éthyle	1430	1,10	1,5	0,85	0,05	0,13	0,07
Acide acétique	1431		-	-	0,08		0,14
Furfural	1462	-	0,09	0,03	0,09	0,21	0,29
2-acétylfurane	1498	0,03	0,03	0,04	0,06	0,12	0,18
Benzaldéhyde	1510	0,07	0,07	0,03	0,06	0,08	0,12
2-méthyltetrahydrothiophèn-3-one ^b	1538	-	< 0,02	-	-	-	-
Acide propanoïque	1541	-	-	-	0,04	-	-
Diméthylsulfoxyde	1560	0,06	-	-	< 0,02	-	-
3-(méthylthio)propanoate d'éthyle ^b	1560	0,03	0,03	< 0,02	-	0,06	0,03
5-méthylfurfural	1561	0,03	0,04	< 0,02	0,05		0,06
Lactate d'isoamyle	1562	-	-	-	-	-	0,33
Néomenthol	1587	0,03	0,04	0,02	0,04	0,05	0,17
Acide butanoïque	1618	-	-	-	< 0,02	-	-
Menthol	1613	0,09	0,11	< 0,02	0,24	0,11	0,14
Caprate d'éthyle	1641	2,68	3,85	1,73	0,14	0,2	0,18
Benzoate d'éthyle	1647	< 0,02	-	< 0,02	0,04	0,05	0,09
Caprylate d'isoamyle	1647	0,07	0,09	0,03	-	-	-
Alcool furfuryle	1669	-	-	-	-	-	0,13
Succinate de diéthyle	1690	0,16	0,21	0,12	0,13	0,13	0,12
Acétate de benzyle	1747	-	< 0,02	< 0,02	< 0,02	0,04	0,04
Salicylate de méthyle	1771	0,14	0,18	0,03	0,07	0,05	0,08
Acétate de phényléthyle	1826	0,09	0,12	-	< 0,02	< 0,02	-
Damascénone	1823	0,08	0,08	0,04	0,04	0,07	0,1
Acide Caproïque	1833	< 0,02	< 0,02	< 0,02	< 0,02	0,07	0,04
Guaïacol	1845	< 0,02	< 0,02	< 0,02	< 0,02		0,11
Laurate d'éthyle	1841	1,80	2,61	1,05	0,25	0,26	0,36
Caprate d'isoamyle	1849	0,11	0,16	-	-	-	-
Alcool benzylique	1862	-	-	-	-	0,19	0,26
Alcool phényléthyl	1890	< 0,02	0,03	< 0,02	< 0,02	0,17	0,14
Créosol	1959	0,03	0,04	< 0,02	< 0,02	0,15	0,14
Phénol	1981	-	-	-	-	0,07	0,03
Acétylpyrrole ^b	1988	-	-	-	< 0,02	0,11	0,15
4-éthylguaïacol	2012	0,05	0,05	0,04	0,03	0,16	0,2
p-créosol	2034	-	-	-	-	< 0,02	0,17
Myristate d'éthyle	2034	0,42	0,6	1,2	0,21	0,34	0,36
Acide caprylique	2048	0,14	0,12	0,08	0,06	-	0,11
Laurate d'isoamyle	2057	0,05	0,07	-	-	-	-
Dihydroeugénol	2134	0,19	0,19	0,27	0,1	0,42	0,38
Eugénol	2151	0,03	< 0,02	< 0,02	< 0,02	0,04	0,06
4-éthylphénol	2165	< 0,02	< 0,02	< 0,02	< 0,02	0,06	0,05
Pentadécanoate d'éthyle	2170	0,05	0,08	0,04	0,03	0,05	-
Palmitate d'éthyle	2244	1,59	2,36	0,69	0,76	1,29	1,55

Acide Caprique	2270	0,41	0,54	0,03	0,06	< 0,02	0,14
Hexadécénoate d'éthyle	2285	0,30	0,43	0,07	0,09	0,17	0,15
t,t-Farnésol	2353	0,05	0,07	0,03	0,03	0,05	-
Caprylate de phényléthyle	2370	0,05	0,04	-	-	-	-
Stéarate d'éthyle	2460	0,11	0,12	0,09	0,04	0,13	0,08
Acide laurique	2488	0,63	0,82	0,03	0,04		-
Oléate d'éthyle	2474	0,20		0,08	0,17	0,21	0,22
Linoléate d'éthyle	2556	0,77	1,1	0,39	0,41	0,69	0,72
Linoléate d'éthyle	2607	0,25	0,33	0,09	0,13	0,17	0,12
Acide myristique	2699	0,51	0,14	-	0,06	0,06	0,03
Acide palmitique	2899	0,63	0,31	0,06	0,07	0,12	0,36
Acide Hexadécénoïque	2945	0,14	-	-	-	-	-

- : non détecté ;

a : indice de rétention calculés sur colonne polaire Varian CP8713 CP WAX 52CB – 30 m x 250 µm – épaisseur de film 0.25 µm ;

b : non décrite dans le rhum (17);

c : coélution avec composé non identifié.