

Université de Montréal

Différenciation du sirop d'érable à défaut de saveur de type bourgeon ($\sqrt{R5}$) du sirop d'érable à saveur sans défaut (REG) à l'aide de SPME-GC/MS et UPLC-QTOF-MS/MS

Par Issraa Beniani

Département de chimie
Faculté des arts et des sciences

Mémoire présenté aux Études supérieures et postdoctorales en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M. Sc.) en chimie

2023/01/08

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Pierre Chaurand
Président-rapporteur

Jean-François Masson
Directeur de recherche

Sébastien Sauvé
Membre du jury

Citations

« *Nanos gigantum umeris insidentes* » - Bernardus Carnotensis

« *If you have a garden and a library, you have everything you need* » - Marcus Tullius Cicero

« *The only thing that you absolutely have to know is the location of the library.* » - Albert Einstein

« *Maple syrup tastes better than honey* » - Quelqu'un, quelque part

« Oui je comprends. Qui a le temps? Qui a le temps? Mais si personne ne prenait son temps, comment ferait-on pour avoir du temps? » - Le Mérovingien, Matrix Reloaded (2003)

Résumé

L'industrie des produits de l'érable est particulièrement importante en Amérique du Nord. Elle est touchée par un phénomène naturel qui se produit en fin de saison de récolte. Il s'agit de l'altération du goût du sirop ; un goût fort désagréable se développe et se nomme goût de bourgeon vu qu'il coïncide au bourgeonnement des feuilles d'érable. Des coûts et du temps sont impliqués à sa récolte et sa production. Cependant, un sirop d'érable avec un goût de bourgeon est vendu à moindre prix. Il constitue donc une perte potentielle d'argent pour les producteurs. Au fil du temps, ils ont appris à se fier à des signes distincts de la nature pour déterminer le début du bourgeonnement. Néanmoins, il est important de le détecter rapidement pour les producteurs et de mieux comprendre les changements moléculaires associés au défaut de saveur de type bourgeon.

Plusieurs travaux sur les produits de l'érable ont été effectués durant le dernier siècle, mais ce n'est que récemment que des projets de recherche sont centrés sur le goût de bourgeon. La détection de celui-ci est certes importante, mais il y est aussi question de mieux connaître la variation de la composition du sirop ou de la sève d'érable, afin de mieux comprendre le phénomène. Tel que décrit dans l'introduction de ce mémoire, on connaît maintenant mieux la composition du sirop d'érable, même que quelques solutions ont été proposées à notre problème, mais beaucoup de questions restent sans réponse que ce mémoire tentera de résoudre.

C'est dans ce contexte que cette étude se pose. En visant à identifier les molécules responsables du défaut de goût de type bourgeon que l'on peut retrouver dans le sirop d'érable, nous espérons aider à mieux cibler le problème et à mieux comprendre le métabolisme et, éventuellement, comprendre comment ce goût se développe. Dans un second temps, la découverte de molécules pas encore rapportées, au meilleur de notre connaissance, comme étant présentes dans le sirop d'érable est aussi visée, sans égard à la classification du sirop. Les travaux de ce mémoire contribueront, ultimement, à trouver une façon d'empêcher la formation de ce goût et surtout un moyen de l'éliminer.

Pour ce, une première partie correspondant à l'analyse des composés volatils a été effectuée par SPME et GC-MS sur 78 échantillons de sirop d'érable. L'analyse statistique des résultats par PCA cible 42 composés et associe chacun d'entre eux au sirop d'érable avec le défaut de saveur ou alors au sirop sans défaut de saveur. Parmi elles, seules 36 ont pu être identifiées par leurs spectres de masse.

La seconde partie correspond à l'analyse des composés non volatils par UPLC-QTOF et UPLC-MS/MS. La méthode a été optimisée pour cibler les molécules relativement apolaires par rapport aux sucres et aux acides aminés présents dans le sirop d'érable. Au total, 20 échantillons de sirop ont été analysés, dont 10 à défaut de saveurs de type bourgeon et 10 sans défaut. Pour cette partie, l'analyse de composantes principales a encore une fois été utilisée pour classer les types de sirop à l'étude selon les composés détectés.

Ainsi, le mémoire avance les connaissances moléculaires liées à l'émergence du défaut de bourgeon dans le sirop d'érable.

Mots-clés : UPLC, GC, Spectrométrie de masse, MSe, MS/MS, Micro-extraction sur phase solide, SPME, COV, Composés organiques volatils, Sirop d'érable, PCA

Abstract

The maple products industry is particularly important in North America. It is affected by a natural phenomenon that occurs at the end of the harvest season. It's the alteration of the taste of the syrup; a very unpleasant taste develops and is called buddy flavour since it coincides with the budding of maple leaves. Costs and time are involved in its harvest and production. When maple syrup is associated with the buddy taste, its commercial value is lower. Therefore, it contributes to a loss of money for producers. Over time, they have learned to rely on distinct signs from nature to determine the onset of budding. However, methods are needed to detect it and research is needed to better understand the molecular changes in maple syrups.

Several research projects on maple products have been carried out during the last century, but it is only recently that research projects have focused on the buddy flavour. They focus on determining the variation in the composition of maple syrup or sap, but also on better understanding of the phenomenon. We now know more than ever about the composition of maple syrup, on top of that some solutions have been proposed to our problem, but many questions remain unanswered and it is obvious that there is still so much to discover.

It is in this context that this study arises. By aiming to identify the molecules responsible for the buddy flavour defects that can be found in maple syrup, we hope to help on targeting the problem and better understanding the metabolism of maple trees and, eventually, how the buddy taste develops. Secondly, it is aimed at discovering molecules not yet reported, to the best of our knowledge, as being present in maple syrup regardless of the classification of the syrup. This will contribute, ultimately, in finding a way to prevent the formation of this taste and a way to eliminate it.

Thus, the first part of this master's thesis corresponds to the analysis of volatile compounds by SPME and GC-MS on 78 maple syrup samples. Statistical analysis of the results targets 42 compounds and associates them with either maple syrup with flavour defects or with maple syrup with regular flavour maple syrup. Among these, 36 molecules could be identified by mass spectrometry. To extract correlations from our data, the principal component analysis (PCA) ensued.

The second part corresponds to the analysis of non-volatile compounds by UPLC-QTOF and UPLC-MS/MS. The method has been optimized to target molecules that are relatively apolar compared to sugars and most of the amino acids present in maple syrup. A total of 20 syrup samples were analyzed, including 10 with bud-like flavour defects and 10 with no defects. For both parts, PCA was once again used to determine which types of syrup under study are the compounds associated with. Taken together, the results presented in this master's thesis advances knowledge on the molecular origins of the buddy flavour defect in maple syrups.

Keywords: UPLC, GC, Mass spectrometry, MSe, MS/MS, Solid phase microextraction, SPME, VOC, Volatile organic compounds, Maple syrup, PCA

Table des matières

Différenciation du sirop d'érable à défaut de saveur de type bourgeon ($\sqrt{R5}$) du sirop d'érable à saveur sans défaut (REG) à l'aide de SPME-GC/MS et UPLC-QTOF-MS/MS.....	I
Citations.....	II
Résumé	III
<i>Abstract</i>	V
Table des matières.....	VII
Liste des tableaux.....	XIV
Liste des figures	XVI
Liste des équations	XXI
Liste des sigles et des abréviations.....	XXII
Remerciements.....	XXIV
1 Introduction.....	1
1.1 Le sirop d'érable.....	1
1.2 Recherches acéricoles	3
1.3 SPME	5
1.3.1 Historique.....	5
1.3.2 Théorie.....	6
1.3.2.1 Adsorption en SPME	7
1.3.2.2 Absorption en SPME	11
1.3.3 Instrumentation.....	19
1.3.3.1 Fibres	20
1.3.3.1.1 DVB/CAR/PDMS.....	24
1.3.4 Application et développement.....	24
1.4 Spectrométrie de masse	25
1.4.1 Historique : Spectrographe parabolique.....	25

1.4.2	Instrumentation, application et théorie	26
1.4.2.1	Quadrupôle.....	29
1.4.2.2	TOF.....	31
1.4.2.3	QTOF	34
1.5	Objectifs	35
2	HS-SPME-GC/MS.....	37
2.1	Partie expérimentale.....	37
2.1.1	Préparation des échantillons.....	37
2.1.2	Méthode SPME-GC-MS.....	37
2.1.3	Traitement de données	38
2.2	Résultats et discussions	40
2.2.1	Optimisation de la méthode	40
2.2.2	Alignement et normalisation.....	41
2.2.3	Filtration des données : Diagramme de Venn et <i>fold change</i>	42
2.2.4	Analyse en composantes principales	46
2.2.4.1	Classification des REG vs $\sqrt{R5}$	47
2.2.4.2	Classification par transmittance	49
2.2.4.3	Biais dans la méthode	53
2.2.5	Apport de saveur	55
2.2.6	Modèle de prédiction.....	61
2.2.7	Covariance	63
2.2.8	Conclusion	66
3	UPLC-QTOF-MS/MS.....	68
3.1	Partie expérimentale.....	68
3.1.1	Préparation des échantillons.....	68
3.1.2	Méthode UPLC-QTOF-MS/MS.....	68
3.1.3	Traitement de données	69

3.2	Résultats et discussion.....	71
3.2.1	Optimisation de la méthode et marqueurs.....	71
3.2.2	Analyse en composantes principales et répétabilité	73
3.2.2.1	Mode négatif.....	73
3.2.2.2	Mode positif.....	77
3.2.3	Filtration des données.....	82
3.2.4	Identification des marqueurs HITs	85
3.2.5	Conclusion	93
4	Conclusion.....	95
4.1	Sommaire des résultats.....	95
4.2	Perspectives de recherche.....	97
4.3	Résumé pour les acériculteurs	98
5	Références.....	99
6	Annexe	i
A.	SPME-GC-MS.....	i
a.	Pyrazine, 2,6-diméthyl- (108.0@17.8).....	i
b.	Pyrazine, 2,5-diméthyl- (108.0@17.7).....	i
c.	Pyrazine, 2-éthyl-6-méthyl- (121.0@19.5).....	ii
d.	Acide 2-furancarboxylique (112.0@22.6).....	ii
e.	Ester bis(2-méthylpropyl) d'acide 1,2-benzènedicarboxylique (149.0@39.6).....	iii
f.	3-Méthylène-2-norbornanone (79.0@25.7).....	iii
g.	Pyrazine, triméthyl- (122.0@20.0)	iv
h.	Phenol, 2,6-bis(1,1-diméthylethyl)- (191.0@36.8).....	iv
i.	Disulfide, diméthyl (94.0@10.2)	v
j.	Pyrazine, 2-éthyl-5-méthyl- (121.0@19.6).....	v
k.	trans-2,3-Epoxydecane (57.0@14.0).....	vi
l.	Bicyclo[2.2.1]heptan-2-one, 1,7,7-triméthyl-, (1R)- (54.0@23.2)	vi

m.	151.0@40.3.....	vii
n.	46.0@41.8	vii
o.	Cyclopropane, 1,1-dichloro-2-(1-ethylpropyl)-2-methyl- (98.0@28.0).....	viii
p.	149.0@41.1.....	viii
q.	Pyrazine, 3-ethyl-2,5-dimethyl- (135.0@20.9).....	ix
r.	Pyrazine, ethyl- (107.0@18.0).....	ix
s.	Cyclopentanone, 2-methyl- (42.0@13.9).....	x
t.	117.0@38.9.....	x
u.	1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-methylpropyl) ester (149.0@40.5).....	xi
v.	149.0@40.1.....	xi
w.	2,3-Dimethyl-5-ethylpyrazine (135.0@21.5)	xii
x.	Cedrol (95.0@35.0).....	xii
y.	Pyrazine, 2,3-dimethyl- (108.0@18.4).....	xiii
z.	60.0@41.7	xiii
aa.	Pyrazine, 3-ethyl-2,5-dimethyl- (135.0@20.9).....	xiv
bb.	9,9-Dimethoxybicyclo[3.3.1]nona-2,4-dione (105.0@29.9)	xiv
cc.	Hexanal, 3,3-dimethyl- (43.0@17.1).....	xv
dd.	(R-(R*,R*))-4-(1,5-Dimethylhexyl)-1-cyclohexenecarboxylic acid (126.0@31.7).....	xv
ee.	3-Pentanol, 2,2-dimethyl- (57.0@17.4).....	xvi
ff.	Bicyclo[2.2.1]heptan-2-one, 1-(bromomethyl)-7,7-dimethyl-, (1S)- (43.0@33.8).....	xvi
gg.	Bicyclo[2.2.1]heptane-1-methanesulfonic acid, 7,7-dimethyl-2-oxo-, (+/-)- (43.0@33.9).....	xvii
hh.	55.0@33.6.....	xvii
ii.	Cyclohexanone, 5-methyl-2-(1-methylethenyl)-, trans- (67.0@27.0).....	xviii
jj.	Cyclohexane, 1,5-dimethyl-2,3-divinyl- (107.0@28.4)	xviii
kk.	2,3'-Bipyridine, 1',3,4,4',5,5',6,6'-octahydro- (43.0@33.1).....	xix
ll.	Pyrazine, tetramethyl- (136.0@21.8).....	xix
mm.	Cyclopentane, 1-acetoxymethyl-3-isopropenyl-2-methyl- (43.0@35.2).....	xx

mn.	Spiro[2.4]heptan-4-one (67.0@21.3)	xx
oo.	1,3-Benzenedicarboxylic acid, 5-(1,1-dimethylethyl)- (207.0@4.4)	xxi
pp.	Uracil, 5-ethyl- (140.0@23.8).....	xxi
B.	UPLC-QTOF-MS/MS.....	xxii
a.	Spectre de mass et chromatographe des HIT	xxii
i.	151.0379 m/z, 3.4778 min	xxii
ii.	231.9665 m/z, 3.5744	xxiii
iii.	247.0638 m/z, 4.6287 min	xxiv
iv.	249.0638 m/z, 5.7829 min	xxv
v.	267.0856 m/z, 4.5408 min	xxvi
vi.	291.9864 m/z, 4.6416 min	xxvii
vii.	329.1368 m/z, 3.9415 min	xxviii
viii.	329.1374 m/z, 3.4017 min	xxix
ix.	329.1381 m/z, 4.1685 min	xxx
x.	341.1085 m/z, 2.2961 min	xxxi
xi.	345.1329 m/z, 3.6311 min	xxxii
xii.	360.0882 m/z, 5.7983 min	xxxiii
xiii.	373.1269 m/z, 4.2932 min	xxxiv
xiv.	373.1285 m/z, 3.9480 min	xxxv
xv.	377.1586 m/z, 3.6756 min	xxxvi
xvi.	377.1587 m/z, 3.4241 min	xxxvii
xvii.	393.1521 m/z, 3.0195 min	xxxviii
xviii.	393.1544 m/z, 2.7210 min.....	xxxix
xix.	403.1373 m/z, 4.1563 min	xl
xx.	407.1340 m/z, 3.7913 min	xli
xxi.	407.1700 m/z, 3.8025 min	xlii
xxii.	409.1483 m/z, 3.3630 min	xliiii

xxiii.	409.1485 m/z, 2.4131 min.....	xliv
xxiv.	463.2164 m/z, 3.9425 min.....	xlv
xxv.	467.1555 m/z, 2.7171 min	xlvi
xxvi.	487.3037 m/z, 3.6924 min.....	xlvii
xxvii.	506.0881 m/z, 2.7201 min.....	xlviii
xxviii.	535.1819 m/z, 4.0009 min.....	xliv
xxix.	539.1785 m/z, 3.6247 min.....	l
xxx.	541.1919 m/z, 3.3648 min	li
xxxi.	545.2011 m/z, 3.5305 min.....	lii
xxxii.	548.1038 m/z, 3.6573 min.....	liii
xxxiii.	551.2134 m/z, 3.9396 mi	liv
xxxiv.	555.2202 m/z, 4.1775 min.....	lv
xxxv.	585.1964 m/z, 3.7525 min.....	lvi
xxxvi.	622.1369 m/z, 3.4178 min.....	lvii
xxxvii.	635.2338 m/z, 3.2558	lviii
xxxviii.	637.2288 m/z, 2.7339 min.....	lix
xxxix.	647.2329 m/z, 3.1835 min.....	lx
xl.	716.1752 m/z, 4.0297 min	lxi
xli.	786.1826 m/z, 4.9041 min	lxii
xlvi.	811.3172 m/z, 4.7377 min	lxiii
xlvi.	845.3073 m/z, 3.5285 min	lxiv
b.	Spectre de mass et chromatographe des composés candidats testés	lxv
i.	Oxypurinol ([M-H] ⁻ = 151,0261494 m/z)	lxv
ii.	2-Methyl-5-nitroaniline ([M+H] ⁺ = 153,0658535 m/z).....	lxvi
iii.	DL-Mandelic acid ([M-H] ⁻ = 151,0400681 m/z).....	lxvii
iv.	Vanillin ([M-H] ⁻ = 151,0400681 m/z).....	lxviii
v.	3- Hydroxyphenylacetic acid ([M-H] ⁻ = 151,0400681 m/z).....	lxix

vi.	Sudan I ([M-H] ⁻ = 247,087687 m/z)	lxx
vii.	Fludioxonil ([M-H] ⁻ = 247,0324578 m/z)	lxxi
viii.	Diflunisal ([M-H] ⁻ = 249,0368744 m/z)	lxxii
ix.	Tricin ([M-H] ⁻ = 329,0666768 m/z)	lxxiii
x.	2-{[6-(Diethylamino)pyridin-3-yl]amino}-5-nitropyridine-3-carboxamide ([M-H] ⁻ = 329,1367625 m/z)	lxxiv
xi.	2-({1-[3-(dimethylamino)-2-hydroxypropyl]-1H-pyrazol-4-yl}amino)-5-nitrobenzonitrile ([M-H] ⁻ = 329,1367625 m/z)	lxxv
xii.	3-(1-{[1-(difluoromethyl)-1H-imidazol-2-yl]methyl}-1,2,3,6-tetrahydropyridin-4-yl)-6-fluoro-1H-indole ([M-H] ⁻ = 345,1332551 m/z)	lxxvi
xiii.	Asiatic acid ([M-H] ⁻ = 487,3428986 m/z)	lxxvii
xiv.	Vardenafil ([M-H] ⁻ = 487,2132987 m/z)	lxxviii

Liste des tableaux

Tableau 1.1 - Code de défauts de saveur ¹³	2
Tableau 1.2 - Intensité du goût ¹³	3
Tableau 1.3 - Propriété de quelques fibres SPME parmi les plus courantes.....	23
Tableau 2.1 - Paramètre de déconvolution effectué sur Agilent MassHunter Qualitative.....	38
Tableau 2.2 - Catégorie de couleur du sirop d'érable.....	38
Tableau 2.3 - Paramètres de l'expérience sur Mass Profiler Professional	39
Tableau 2.4 - Paramètres de l'analyse statistique effectuée sur Mass Profiler Professional : TTest unpaired	39
Tableau 2.5 - Paramètre du modèle de prédiction pour le type de sirop	39
Tableau 2.6 - Listes des 42 composés statistiquement différents entre les classes de sirop 0 et $\sqrt{R5}$; « Les 42 HITs ». Les cases bleues signifient que le composé est plus abondant dans les sirops $\sqrt{R5}$ et les cases rouges sont pour les composés plus abondants dans les sirops REG.	45
Tableau 2.7 - Odeurs ou saveurs associées aux composés HITs de la famille des composés organiques, composés organohétérocycliques, diazines et pyrazines (en rouge sont les HITs associés aux sirops REG et, en bleu, ceux associés aux sirops $\sqrt{R5}$).....	56
Tableau 2.8 - Odeurs ou saveurs associées aux composés HITs de la famille des composés organiques, benzoïdes, benzène et dérivés substitués, acides benzoïques et dérivés et esters d'acide benzoïque (en rouge sont les HITs associés aux sirops REG et, en bleu, ceux associés aux sirops $\sqrt{R5}$).....	56
Tableau 2.9 - Odeurs ou saveurs associées aux composés HITs de la famille des composés organiques, lipides et molécules apparentées aux lipides, lipides de prénil et monoterpénoïdes (en rouge sont les HITs associés aux sirops REG et, en bleu, ceux associés aux sirops $\sqrt{R5}$)	57
Tableau 2.10 - Odeurs ou saveurs associées aux composés HITs de la famille des composés organiques, lipides et molécules apparentées aux lipides, lipides de prénil et sesquiterpénoïde (en rouge sont les HITs associés aux sirops REG et, en bleu, ceux associés aux sirops $\sqrt{R5}$)	57
Tableau 2.11 - Odeurs ou saveurs associées aux composés HITs appartenant à différentes familles de composés.....	58
Tableau 2.12 – Composé HITs sans famille de composés (en rouge sont les HITs associés aux sirops REG et, en bleu, ceux associés aux sirops $\sqrt{R5}$).....	59
Tableau 2.13 - Modèle de prédiction issue du Mass Profiler Professional pour la détermination du type de sirop ; Algorithme arbre à décision sur les 42 HITs.....	61
Tableau 3.1 - Paramètres de la méthode de traitement de données sur MarkerLynx XS	70

Tableau 3.2 - Coordonnées des échantillons de la carte factorielle de l'injection B du mode positif et négatif	81
Tableau 3.3 – Liste des 42 marqueurs HITs issue de l'étude UPLC-QTOF-MS/MS	83
Tableau 3.4 - Listes des composés candidats testés pour l'identification des HITs de l'étude UPLC-QTOF-MS/MS	86
Tableau 3.5 - Hypothèses sur l'identité des HITs ou les composés non validés avec des étalons	91
Tableau 3.6 - Pic en commun entre le HIT 539.1819 et le candidat 2-[3-[4-[1,3-dihydroxy-1-(4-hydroxy-3-méthoxyphényl)propan-2-yl]oxy-3-méthoxyphényl]propoxy]-6-(hydroxyméthyl)oxane-3,4,5-triol	93

Liste des figures

Figure 1.1 - Mécanismes d'extraction lors d'absorption et lors d'adsorption des fibres revêtues (représentation tirée de Górecki, T. et al (1999)) ²⁶	6
Figure 1.2 - Saturation d'analyte sur une fibre SPME au cours de la phase d'extraction (représentation tirée de Seethapathy S. et Górecki T. (2012)) ²⁸	7
Figure 1.3 - Quantité extraite d'un analyte par rapport à sa concentration initiale dans l'échantillon et ce, (a) pour des K_A différents et (b) des $C_{f\max}$ différents (représentation tirée Górecki T. et al. (1999)) ²⁶	9
Figure 1.4 - Quantité extraite d'un analyte ($K_A = 10\ 000$ et $C_{f\max} = 1\ \text{g/L}$) en présence du compétiteur B par rapport à sa concentration initiale dans l'échantillon et ce, (a) pour des K_B différents et (b) des C_{Bs} différents. Dans la figure b, $K_B = 100\ 000$ (représentation tirée de Górecki T. et al. (1999)) ²⁶	10
Figure 1.5 - Structure du polydiméthylsiloxane	11
Figure 1.6 - Structure du polyacrylate	11
Figure 1.7 - Extraction SPME de différents composés par les fibres de $100\ \mu\text{m}$ PDMS et de PA. Les composés sont en ordre décroissant de polarité (de gauche à droite) et l'axe des y correspond à la quantité absolue extraite (représentation tirée de SUPELCO SPME-Adsorption versus Absorption: Which Fiber Is Best for Your Application?) ³²	12
Figure 1.8 - Autre extraction SPME de différents composés par les fibres de $100\ \mu\text{m}$ PDMS et de PA. Les composés sont en ordre croissant de polarité (de gauche à droite) et l'axe des y correspond à la quantité absolue extraite (représentation tirée de SUPELCO SPME-Adsorption versus Absorption: Which Fiber Is Best for Your Application?) ³²	13
Figure 1.9 - Concentration à différents temps de l'équilibration du benzène en HS-SPME sur une fibre PDMS pour un milieu statique (à gauche) (A à 3 s, B à 15 s, C à 30 s et D à 60 s) et un milieu sous agitation (à droite) (A à 3 s, B à 9 s, C à 15 s et D à 21 s) (représentation tirée de Zhang, Z. et Pawliszyn J. (1993)) ³⁴	15
Figure 1.10 - Masse absorbée de benzène à différents coefficients de partage revêtement/phase gazeuse (K_1) en HS-SPME sur une fibre PDMS pour un milieu statique dans la figure de gauche (a) et un milieu sous agitation dans la figure de droite (b) (A à $K_1 = 100$, B à $K_1 = 1000$ et C à $K_1 = 10\ 000$ (représentation tirée de Zhang, Z. et Pawliszyn J. (1993)) ³⁴	15
Figure 1.11 - Masse absorbée de benzène à différents coefficients de partage phase gazeuse/aqueuse (K_2) en HS-SPME sur une fibre PDMS pour un milieu statique pour $K_2 = 10\ 000$ (A à $K_2 = 0.002$, B à $K_2 = 0.02$ et C à $K_2 = 0.2$) (représentation tirée de Zhang, Z. et Pawliszyn J. (1993)) ³⁴	17

Figure 1.12 - Masse absorbée normalisée de benzène pour différents coefficients de partage phase gazeuse/aqueuse (K_2) en HS-SPME sur une fibre PDMS pour un milieu en agitation pour $K_1=10\ 000$ (à gauche) et $K_1=100$ (à droite) (A à $K_2=0.2$, B à $K_2=0.02$ et C à $K_2=0.002$) (représentation tirée de Zhang, Z. et Pawliszyn J. (1993)) ³⁴	17
Figure 1.13 - Comparaison des fibres de PDMS, PA et de CAR pour l'adsorption du 2-méthylisobornéol à différentes températures (représentation tirée de McCallum, R., et al. (1998)) ⁴⁰	19
Figure 1.14 - Compartiment d'un appareil à SPME (représentation tirée Arthur, C. L. et Pawliszyn J. (1990)) ²³	20
Figure 1.15 - Fourchette de poids moléculaires d'analytes pour différentes fibres SPME (représentation tirée de Shirey, R. Selecting the Appropriate SPME Fiber Coating –Effect of Analyte Molecular Weight and Polarity) ⁴²	20
Figure 1.16 - Réponse mesurée d'une extraction de molécules plus larges (ou semi-volatiles) avec différentes fibres SPME (représentation tirée de Shirey, R. Selecting the Appropriate SPME Fiber Coating –Effect of Analyte Molecular Weight and Polarity) ⁴²	21
Figure 1.17 - Structure du chrysène (représentation tirée de PubChem Chrysene) ⁴³	21
Figure 1.18 - Schéma du fonctionnement d'un spectromètre de masse (représentation tirée de Spectrométrie de masse) ⁶²	27
Figure 1.19 - Exemple de spectre issu d'une analyse de l'hexane avec un MS (représentation tirée de Spectrométrie de masse) ⁶⁵	28
Figure 1.20 - Schéma d'un quadrupôle (représentation tirée de Introduction to mass analyzers) ⁶⁶	29
Figure 1.21 - Diagramme de stabilité d'un quadrupôle (représentation tirée de Ion Optics Through the Eyes of SIMION - An ASMS Short Source) ⁶⁷	31
Figure 1.22 - Schéma d'un temps de vol (représentation tirée de Mass Spectrometry) ⁶⁸	32
Figure 1.23 - Schéma d'un temps de vol avec réflectron (représentation tirée de M. Guilhaus et al. (2000)) ⁶⁹	33
Figure 1.24 - Schéma d'un QuanTOF (représentation tirée de Waters Corporation) ⁷¹	35
Figure 2.1 - Diagramme de Venn des entités à travers les blancs (section grise) et l'ensemble des entités issues des blancs et des échantillons de sirop d'érable (section orange).	42
Figure 2.2 - Volcano plot représentant le fold change des 279 entités basées sur l'interprétation comparant les échantillons de type REG et de type $\sqrt{R5}$. Les points rouges représentent les 42 entités qui dépassent les critères de la valeur p ; ils sont regroupés selon leur type dans le tableau 2.6 avec la valeur de leur fold change respectif.....	43
Figure 2.3 – Chromatogramme du pic du composé (5) issu de Enhanced MSD Chemstation, en noir chromatogramme d'un échantillon REG, et en bleu, celui d'échantillon $\sqrt{R5}$	44

- Figure 2.4** - Représentation dans la figure supérieure de la carte factorielle (a) et dans la figure inférieure des loadings (b) de l'analyse des composantes principales sur tous les échantillons de type REG (rouge) et les échantillons de type VR5 (bleu) basée sur les 42 HITs. Chaque couleur des points dans le loading plot représente un composé..... 48
- Figure 2.5** – Carte factorielle comparant selon le type de sirop les échantillons de couleur très foncée (T = 0.0-25.0 %), foncée (T = 26.0-50.0 %) et ambrée (T = 51.0-75.0 %) basée sur les 42 HITs. La figure supérieure (a) a une légende de couleur des points selon la transmittance et la forme des points, selon le type : brun pour couleur très foncée, orange pour couleur foncée, jaune pour couleur ambrée, carré pour type REG et triangle pour type $\sqrt{R5}$. La figure inférieure (b) a une légende de la couleur des points selon le type et la forme des points, selon la couleur du sirop : rouge pour type REG, bleu pour type $\sqrt{R5}$, carré pour couleur très foncée, triangle pour couleur foncée et cercle pour couleur ambrée. 50
- Figure 2.6** - Carte factorielle comparant selon la couleur de sirop les échantillons $\sqrt{R5}$ de couleur très foncée (T = 0.0-25.0 %), foncée (T = 26.0-50.0 %) et ambrée (T = 51.0-75.0 %) basée sur 95 entités issues de l'analyse statistique one way ANOVA (valeur $p < 0.05$) qui a comparé l'abondance des composés selon la couleur du sirop. 51
- Figure 2.7** - Carte factorielle comparant selon la couleur de sirop les échantillons REG de couleur très foncée (T = 0.0-25.0 %), foncée (T = 26.0-50.0 %), ambré (T = 51.0-75.0 %) et doré (T = 76.0-100.0 %) basée sur 66 entités issues de l'analyse statistique one way ANOVA (valeur $p < 0.05$) qui a comparé l'abondance des composés selon la couleur du sirop. 52
- Figure 2.8** - Carte factorielle comparant selon le mois d'analyse des échantillons $\sqrt{R5}$, REG et des blancs basée sur 279 entités, soit l'ensemble des entités détectées excluent ceux présents dans les blancs. Dans la figure du haut (a) en turquoise sont les échantillons analysés au mois d'août, en mauve, ceux du mois septembre et en orange, ceux du mois d'octobre. Les points de forme tirangulaires sont les échantillons $\sqrt{R5}$, les points en forme de carrée sont les échantillons REG et les blancs sont représenté par les ceclcs. Dans la figure du bas (b) les carrés sont les échantillons analysés au mois d'août, les triangles, ceux du mois septembre et les cercles, ceux du mois d'octobre. Les points bleus sont les échantillons $\sqrt{R5}$, les points rouges sont les échantillons REG et les points blancs représentent les blancs. 54
- Figure 2.9** - Boîte à moustaches des abondances relatives du disulfure de diméthyle (9)..... 62
- Figure 2.10** - Boîte à moustaches des abondances relative du 2,3-diméthyl-5-éthylpyrazine (20) 63
- Figure 2.11** - Loadings des 42 HITs avec comme étiquette de données leur numéros associés. Un point de forme et de couleur différentes est utilisé pour représenter les doublons. Pour l'ester bis(2-méthylpropyl) d'acide 1,2-benzènedicarboxylique (5, 18), il s'agit d'un carré bleu, pour la pyrazine, 3-éthyl-2,5-diméthyl- (14, 23), un losange bleu, et pour le 149.0 (13, 19), un triangle bleu..... 64

- Figure 2.12** - Loadings des 42 HITs avec comme étiquette de données leur classe. Pour l'ester bis(2-méthylpropyl) d'acide 1,2-benzènedicarboxylique (**5, 18**), il s'agit d'un carré bleu, pour la pyrazine, 3-éthyl-2,5-diméthyl- (**14, 23**), un losange bleu, et pour le 149.0 (**13, 19**), un triangle bleu. Les composés non identifiés sont nommés « ? ». Les zones orange mettent en évidences les diazines, la zone verte, les organo-oxygénés, la zone mauve, les lipides pré-nols et la zone rose, les benzènes et leurs dérivées..... 64
- Figure 2.13** - Loadings des 42 HITs avec comme étiquette de données leur sous-classe. Pour l'ester bis(2-méthylpropyl) d'acide 1,2-benzènedicarboxylique (**5, 18**), il s'agit d'un carré bleu, pour la pyrazine, 3-éthyl-2,5-diméthyl- (**14, 23**), un losange bleu, et pour le 149.0 (**13, 19**), un triangle bleu. Les composés non identifiés sont nommés « ? » et les composés identifiés, mais qui n'ont pas de sous-classe sont nommés « x ». Les zones orange mettent en évidences les diazines, la zone verte, les organo-oxygénés, la zone mauve, les lipides pré-nols et la zone rose, les benzènes et leurs dérivées. 66
- Figure 3.1** – Chromatogramme en mode d'ionisation négative d'un échantillon de sirop $\sqrt{R5}$ 69
- Figure 3.2** – Carte factorielle de la série d'injection A en mode négatif, où t[1] est la composante 1, et t[2], est la composante 2..... 73
- Figure 3.3** – Carte factorielle de la série d'injection B en mode négatif, où t[1] est la composante 1, et t[2], est la composante 2..... 74
- Figure 3.4** – Carte factorielle de la série d'injection C en mode négatif, où t[1] est la composante 1, et t[2], est la composante 2..... 74
- Figure 3.5** – Carte factorielle de la série d'injection A en mode négatif sans les blancs, où t[1] est la composante 1, et t[2], est la composante 2 76
- Figure 3.6** – Carte factorielle de la série d'injection B en mode négatif sans les blancs, où t[1] est la composante 1, et t[2], est la composante 2 76
- Figure 3.7** – Carte factorielle de la série d'injection C en mode négatif sans les blancs, où t[1] est la composante 1, et t[2], est la composante 2 77
- Figure 3.8** – Carte factorielle de la série d'injection B en mode positif, où t[1] est la composante 1, et t[2], est la composante 2..... 78
- Figure 3.9** – Carte factorielle de la série d'injection B en mode positif sans les blancs, où t[1] est la composante 1, et t[2], est la composante 2 78
- Figure 3.10** – Cartes factorielles de la série d'injection B en mode positif sans les blancs où t[1] est la composante 1, et t[2], est la composante 2. La figure du haut représente les échantillons REG et celle du bas, les échantillons $\sqrt{R5}$ 79
- Figure 3.11** – Carte factorielle de la série d'injection B en mode négatif sans les blancs, où t[1] est la composante 1, et t[2], est la composante 2. La figure du haut représente les échantillons REG et celle du bas, les échantillons VR5..... 80

Figure 3.12 - Loading-score bi-plot de l'injection A en mode négatif sans les blancs et les marqueurs présents dans les blancs, où t[1] est la composante 1, et t[2], est la composante 2	82
Figure 3.13 Spectres de masse en tandem du HIT à m/z 345.1329 (en haut) et du composé candidat 3-(1- {[1-(difluorométhyl)-1H-imidazol-2-yl]méthyl}-1,2,3,6-tétrahydropyridin-4-yl)-6-fluoro-1H-indole (à bas)	88
Figure 3.14 - Spectres de masse en tandem du HIT à m/z 151.0379 (en haut) et du candidat acide 3- hydroxyphénylacétique (en bas).....	89
Figure 3.15 ⁸⁵ – Spectre de masse en tandem du HIT à m/z 539.1785 (en haut) et du composé candidat 2-[3- [4-[1,3-dihydroxy-1-(4-hydroxy-3-méthoxyphényl)propan-2-yl]oxy-3-méthoxyphényl]propoxy]-6- (hydroxyméthyl)oxane-3,4,5-triol (en bas).....	92

Liste des équations

Équation 1.1 - Équation d'adsorption de Langmuir, où $[A_{ad}]$ est la concentration du composé A adsorbé, $[S_0]$, est la concentration totale de site actif, K_A , la constante d'équilibre d'adsorption de A, et $[A]$, la concentration du composé A dans la matrice.....	8
Équation 1.2 - Équation d'adsorption de Langmuir revisitée sans compétiteur par Górecki T. et <i>al.</i> (1999) ²⁶	8
Équation 1.3 - Équation d'adsorption de Langmuir revisitée avec présence d'un compétiteur par Górecki T. et <i>al.</i> (1999) ²⁶	8
Équation 1.4 - Équation basée sur la loi d'Henry de la quantité absorbée à l'équilibre d'un analyte en HS, où n est la quantité absorbée de l'analyte, C_0 , la concentration d'analyte initiale dans la phase aqueuse, K_1 et K_2 , les coefficients de partage de l'analyte entre revêtement/phase gazeuse et phase gazeuse/phase aqueuse respectivement, V_1 , V_2 , et V_3 , les volumes du revêtement, phase aqueuse et de phase gazeuse respectivement. ³⁴	14
Équation 1.5 - Équation basée sur la loi d'Henry de la quantité absorbée à l'équilibre d'un analyte en DI, où K est le coefficient de partage de l'analyte entre revêtement/phase aqueuse. Le reste des paramètres sont repris de l'équation 1.4. ³⁴	14
Équation 1.6 - Équation de la deuxième loi de Fick ³⁴	14
Équation 1.7 - Paramètre a , où a est le paramètre lié au potentiel du courant direct, e , la charge, U , le potentiel, w , la fréquence du voltage, r , le rayon entre les électrodes, et m , la masse de l'ion.	30
Équation 1.8 - Paramètre q , où q est le paramètre lié au potentiel du courant alternatif.....	30
Équation 1.9 , où z est la charge de l'ion, e , la charge élémentaire, V , le voltage, m , la masse de l'ion, et v , sa vitesse	31
Équation 1.10 , où il s'agit des mêmes paramètres que l'équation 1.9	32
Équation 1.11 , où t est le temps, et d , la distance à de la trajectoire de vol.....	32
Équation 1.12 , où il s'agit des mêmes paramètres que l'équation 1.9 et 1.11	32

Liste des sigles et des abréviations

CAR	Carboxen
CEF	Extension de fichier <i>CenturionMail Encrypted Package</i> , un fichier de catégorie fichiers de chiffrement
CID	<i>Collision-induced dissociation</i> (Dissociation induite par collision)
CW	Carbowax
CSH	<i>Charged surface hybrid</i> (Hybride à surface chargée)
DI	<i>Direct immersion</i> (Immersion directe)
DVB	Divinylbenzène
DVB-CAR-PDMS	Divinylbenzène-carboxen-polydiméthylsiloxane
D _s	Coefficient de diffusion
ETD	<i>Electron-transfer dissociation</i> (Dissociation par transfert d'électrons)
FC	<i>Fold Change</i>
GC	<i>Gas chromatography</i> (Chromatographie en phase gazeuse)
H	Constante de Henry
HIT, HITs	Molécules possiblement associées à l'un des deux types de sirop à l'étude (REG ou $\sqrt{R5}$)
HS	<i>Headspace</i> (Tête de vial ou Tête de fiole)
IMS	<i>Ion mobility separator</i> (Séparation par mobilité ionique)
LC	<i>Liquid chromatography</i> (Chromatographie liquide)
MALDI	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization</i> (Désorption-ionisation laser assistée par matrice)
MS	<i>Mass spectrometry</i> (Spectrométrie de masse)
MSD	<i>Mass Selective Detector</i> (Detecteur de masse sélective)
MS _e	Méthode d'acquisition de données de spectrométrie de masse en tandem disponible sur certains spectromètres de masse Waters combinant des collisions à basse énergie pour analyser les ions précurseurs et de haute énergie de collision pour analyser leur fragments.
MS/MS	<i>Tandem mass spectrometry</i> (Spectrométrie de masse en tandem)
MPP	<i>Mass Profiler Professional</i>
m/z	Rapport masse sur charge
PA	Polyacrylate

PCA	<i>Principal component analysis</i> (Analyse en composantes principales)
PDMS	Polydiméthylsiloxane
PEG	Polyéthylène glycol
PLS	<i>Partial least squares</i> (Moindres carrés partiels)
PPAQ	Producteurs et productrices acéricoles du Québec
QTOF	<i>Quadrupole Time-of-Flight</i> (Quadrupole-Temps de vol)
UPLC	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i> (Chromatographie liquide à ultra performance)
RT	<i>Retention time</i> (Temps de rétention)
TOF	<i>Time-of-Flight</i> (Temps de vol)
Type $\sqrt{R5}$, type $\sqrt{R5}$	Sirop d'érable avec défaut de goût de bourgeon (code 5) et une intensité d'odeur et de goût est désagréable (\sqrt{R})
Type OK, type REG	Sirop d'érable sans défaut de goûts, sirop de bonne qualité, dit sirop d'érable « Inspecteur OK »
SPME	<i>Solid-Phase Microextraction</i> (Micro-extraction sur phase solide)
SPE	<i>Solid-Phase extraction</i> (Extraction sur phase solide)

Remerciements

Pour commencer, je remercie le Professeur Jean-François Masson de m'avoir donné l'opportunité de faire ma maîtrise dans son groupe de recherche. Ce fut un plaisir de l'avoir comme directeur de recherche et de côtoyer les membres de son groupe tout au long de mes études. Parmi eux je tiens à mentionner Malama Chisanga pour m'avoir aidé dans ce projet, ceux avec qui j'ai travaillé sur le projet Sirop d'érable qui comprennent Juan Manuel Montiel Leon, Keisean Stevenson, Simon Forest et Julien Coutu. Je tiens aussi à mentionner ceux qui m'ont adorablement côtoyé quotidiennement c'est-à-dire Maryam Hojjat Jodaylami, Xin Liu, Wen Liu et Hannah Williams.

Je tiens aussi à remercier ma famille et mes chats qui m'ont beaucoup soutenue durant toutes mes études. Ils ont dû endurer mon stress et mes frustrations. À l'heure où j'écris ce mémoire, mes études touchent à leur fin et je sais qu'ils sont autant sinon plus contents que moi que ça soit terminé.

J'aimerais aussi remercier les membres du Centre régional de spectrométrie de masse, en particulier la directrice du laboratoire de spectrométrie de masse Alexandra Furtos. En plus de leur patience par rapport à mes nombreuses questions et manques de connaissance, elles m'ont apporté des conseils, leurs appuis et leur expertise. Leur encadrement a été essentiel à ce projet et donc à mes études.

Pour finir, je suis reconnaissante de toutes les amitiés formées en cours de route, j'espère que ces liens perdureront. Elles ont été autant sinon plus essentielles à mes accomplissements que tout autre soutien, surtout celles nées durant mon baccalauréat.

1 Introduction

1.1 Le sirop d'érable

Le sirop d'érable est un édulcorant naturel obtenu à partir de la sève d'érable par un processus qui consiste essentiellement en l'évaporation de l'eau contenue dans celle-ci. Son contenu en minéraux et en composés phénoliques qui sont connus pour avoir des pouvoirs antioxydants, font du sirop d'érable une alternative plus nutritive qu'une multitude d'édulcorants disponibles sur le marché. La majorité du sirop d'érable vendu à travers le monde est produit en Amérique du Nord et le Québec en est de loin le principal producteur et importateur fournissant près de 71% de la production mondiale en sirop d'érable.^{1,2} Les États-Unis suivent le Canada, plus précisément les États du Nord-Est tel que Vermont, New York, et Maine. Le reste du Canada, lorsque l'on exclut la province du Québec, ne produit que 8% du sirop d'érable.

De 2003 à 2017, la production a augmenté de 60% au Québec alors qu'aux É.-U. l'état du Vermont a eu une croissance de 254%.³ Cette différence en croissance est due au contrôle de production (quota) exercé au Canada, absent aux États-Unis. Pourtant, 60% des exportations de sirop d'érable du Québec vont aux É.-U., son deuxième plus grand consommateur est l'Union européenne qui constitue 27% de ses exportations. L'exportation totale s'élevait à une valeur de 497 millions de dollars en 2020 et le secteur acéricole continue de prendre de l'ampleur.¹ Il constitue donc au Québec un élément important dans son économie, un marché valant plusieurs centaines de millions de dollars d'où son nom « d'or blond ». ^{4,5} D'ailleurs, pour témoigner de sa valeur, un vol, dit comme « l'un des plus importants de l'histoire [du Canada] », de 2700 tonnes de sirop d'érable estimé à 18 millions de dollars s'est produit de 2011 à 2012.⁶

À l'origine, la récolte consistait à récupérer la sève des érables lorsque celle-ci monte dans l'arbre, chose qui se produit au printemps, à l'aide de chalumeaux et des chaudières. Maintenant, des systèmes plus pratiques sont utilisés pour à relier plusieurs érables directement à l'érablière à l'aide de tubulures. Ce n'est pas de n'importe quel érable qu'elle est récoltée. Il existe de nombreuses espèces, mais ce qui est préféré sur le marché est l'*Acer saccharum* aussi appelé érable à sucre dû au taux de sucre particulièrement élevé par rapport à d'autres espèces du même genre tel que l'*Acer rubrum L.* et l'*Acer saccharinum L.* Notez cependant que ce dernier est parfois utilisé en compagnie de l'*Acer nigrum*.⁷⁻⁹ Une fois la sève récoltée, elle est transformée en sirop. Le procédé n'a que très peu changé depuis les Autochtones des forêts de l'Est, soit avant l'arrivée des colons. À l'époque, une incision était faite à coup de hache pour récolter ensuite l'eau qui en découlait pour la faire bouillir à l'aide de pierres chaudes ou alors dans des marmites chauffées.^{8,10} Depuis, en plus d'un système de récolte plus élaboré, l'introduction du sirop d'érable en conserve pour une longue conservation ainsi que de l'évaporateur a permis de faciliter le travail des

acériculteurs et de contribuer à augmenter la production. Il arrive que l'on concentre en partie l'eau d'érable par osmose inversée au lieu de le faire totalement par ébullition.¹¹

Le processus d'évaporation est terminé lorsque la quantité de solides qui compose la sève passe de 2 à 66%. L'eau, qui est au départ, claire et légèrement sucrée est maintenant un liquide d'une densité de 1,32 g/mL composé à 66 % de solides dont 95 % sont du sucrose et d'une couleur dorée voir brun foncé.^{8,}

¹² Ceci fait du sirop une matrice de 40 à 50 fois plus concentrée en composés organiques et en minéraux que la sève.⁹

Le sirop d'érable est ensuite classé par des vérificateurs de qualité, ce qui en dicte le prix offert au producteur. Les tableaux 1.1 et 1.2 énumèrent les différentes classes pouvant être données selon les PPAQ (Producteurs et productrices acéricoles du Québec).¹³ Cette même organisation gère les prix auxquels le sirop est vendu, chose qui varie d'année en année puisque les conditions climatiques influent sur la qualité et la quantité produite par les arbres, et selon le marché de l'offre et la demande.

Tableau 1.1- Code de défauts de saveur¹³

Type	Code	Description
Défaut d'origine naturelle	1	Bois (√R11), Sève (√R12), Brûlé et surcaramélisé (√R13)
Défaut d'origine microbiologique	2	Moisissure et fermentation
Défaut d'origine chimique (retenue automatiquement et peut être détruit)	3	Trace de résidus ou doute sur la présence d'un contaminant chimique (souvent lié aux produits de lavage ou d'assainissement)
Défaut non identifié	4	Ensemble de mauvais goût non identifiable (√R4 ou CT4), Métal (√R43)
Défaut bourgeon	5	Goût de bourgeon
Sirop filant (retenue automatiquement et peut être détruit)	6	Sirop visqueux qui file de 10 cm (4 po) ou plus

Note. Le tableau est reproduit du code de défauts de saveur présenté par les PPAQ.

Tableau 1.2 - Intensité du goût¹³

Symbole	Intensité
√	Légère trace de goût et d'odeur indésirables
√R	Saveur et odeur désagréables (√R1, √R2, √R4, √R5)
CT	Saveur et odeur fortes et désagréables qui affectent grandement la valeur commerciale du produit (CT1, CT2, CT3, CT4, CT5, CT6)

Note. Le tableau est reproduit du code de défauts de saveur présenté par les PPAQ.

Quand le sirop est classé avec un défaut de saveur 5 et une intensité √R, les impacts économiques sont alors importants pour les acériculteurs. La saveur dite « bourgeon » pour le code 5 (tableau 1.1) provient du fait que sa présence coïncide avec celle du bourgeonnement des feuilles d'érable, évènement qui se produit en fin de saison. Elle est caractérisée par un goût ou senteur de choux ou d'ail ou alors de goût poivrés et maltés, chose qui n'est pas désirable dans le sirop d'érable.^{14, 15} C'est pour cette raison que le sirop dit de type √R5 est vendu à prix beaucoup plus bas ce qui entraîne des pertes d'argent, à savoir jusqu'à 10% des revenus des producteurs.¹⁶ Étant donné qu'il n'y a pas de moyens précis de savoir quand exactement la saison est terminée et que la sève récoltée donnera un sirop de mauvais goût, les producteurs continuent les récoltes avec peu d'indices pour savoir s'ils récoltent un sirop de moindre qualité. Aussi, il est difficile de déterminer la présence de mauvais goût dans la sève, il devient perceptible seulement dans le processus d'évaporation de l'eau, en d'autres mots, quand les concentrations sont plus élevées. Malheureusement, à ce stade l'énergie nécessaire à l'évaporation a déjà été déboursée.

1.2 Recherches acéricoles

Au début de la recherche sur le sirop ou la sève d'érable, il était question de comprendre le changement de couleur et de saveur lors du processus d'évaporation avec l'ambition parallèle de déterminer sa composition. On s'est ensuite intéressé à ce qui fait son bon goût, mais également aux composés ayant des effets bénéfiques sur la santé. C'est plus récemment qu'il a surtout été question de déterminer ce qui cause le défaut de goût de bourgeon aussi nommé *buddy flavor* ou *buddy off-flavor* et d'y remédier.

J. Hortvet en 1904 dans le *Journal of the American Chemical Society* attribua les différentes couleurs au type de sol, au maniement et au processus d'ébullition de la sève ainsi qu'au moment de la saison. Les sirops de début de saison sont en général plus clairs que ceux de fin de saison et ces derniers ont mauvais goût, les sirops de couleur claire sont donc de meilleures qualités. Cependant, on précise que la couleur n'est pas toujours un gage de qualité. On y parle aussi des composés de saveurs comme étant des

composés non volatils puisqu'ils sont présents dans la sève et dans le sirop produit.¹⁷ En 1912, Edson H. A. et al. dans *Micro-Organisms of maple sap* associent la couleur foncée du sirop à la présence éminente de microorganismes.¹⁸

Les explications moléculaires ont commencé à se raffiner à partir du milieu du XXe siècle. En 1954, W. G. Berl et E. Feazel dans le *Journal of Agricultural and Food Chemistry* lient la couleur brune au chromophore issu de composés produits par la dégradation des sucres en milieu basique.¹⁹ En 1956, J. C. Underwood et al. dans le *Journal of Food Science* prouve la présence de triose et suggère que les trioses carbonyles forment des chromophores et des composés de saveur dus à leur réactivité, ce qui les responsabilise de la couleur et la saveur. Compte tenu de cela, la couleur est alors une indication sur la quantité de sucre, plus de sucre implique plus de triose, ce qui entraîne une couleur plus foncée.²⁰ En 1964, A. Leaf dans *Science* mentionne que la quantité de nutriments retrouvée dans le sirop est proportionnelle à ce qu'on retrouve dans la sève excepté pour l'azote puisqu'il se volatilise durant l'ébullition.¹² En 1969, V. J. Filipic et al. dans *Journal of Food Science* parlent de composés aromatiques aromatisants issus probablement d'éthanololyse de matière ligneuse, et de composés organiques également aromatisants dont des acides issus de la dégradation du sucre.²¹ En 1973, N. E. Burt dans le *Journal of Chemical Education* associe le goût de bourgeon aux acides aminés puisque ceux-ci sont en grande quantité en fin de saison. On y lie encore une fois les trioses pour l'origine de composé de saveurs et de couleurs.⁸ On voit que les recherches initiales se concentrent sur les sucres et leurs effets sur la couleur.

D'autres pistes ont ensuite été étudiées. Plus récemment, en 2007, pour D. W. Ball dans le *Journal of Chemical Education*, les acides aminés sont toujours tenus responsables du goût de bourgeon et on y parle d'excès de sodium qui donne un goût salé. Aussi, beaucoup des composés retrouvés dans le sirop sont formés durant la transformation de la sève à partir de celle-ci, ce qui fait du sirop un produit plus complexe. Ball y résume trois possibilités de formation de couleur : par réaction de Maillard, par caramélisation ou par formation de polycarbonate.⁹ En 2018, N'Guyen et al. dans *Scientific Reports* tente d'identifier les processus biologiques et conclut que bien que les composés organiques sulfurés soient possiblement responsables du développement du goût de bourgeon, l'activité microbienne en est aussi un facteur. On y confirme aussi l'augmentation en acides aminés dans la sève au moment du débourrement, mais amoindrit la relation entre ce phénomène et les sirops de classe 5. Sur ce, on y mentionne qu'il y a au moins deux profils d'acides aminés propres au sirop de classe 5 et que donc, cette classe peut être divisée en différents défauts de saveur.²² Finalement, en 2019, Camara et al. dans le *Journal of Food Science* cible les responsables du goût de bourgeon et conclut qu'il s'agit du trisulfure de diméthyle et du disulfure de diméthyle. Basée sur cela, on y propose un traitement de chaleur qui consiste à faire bouillir le sirop d'érable pendant une plus longue période, soit 120 min à une température de 104,5 °C de sorte à se débarrasser de ces composés sulfureux.¹⁴

Malgré ces études, certaines incertitudes demeurent sur la distinction moléculaire entre les sirops d'érable de bon goût et ceux présentant un défaut de saveur de type bourgeon. Notre étude propose de déterminer les composés volatils et non volatils qui se trouvent exclusivement ou alors plus fréquemment abondants dans le sirop d'érable goût de bourgeon. Pour ce, nous comparons le sirop dit régulier que nous classons de sirop 0 ou REG avec le sirop $\sqrt{R5}$. Les composés volatils sont extraits par SPME (micro-extraction sur phase solide), séparés par GC (chromatographie en phase gazeuse) et analysés par MS (spectrométrie de masse). Alors que les composés plus lourds, dits non volatils, sont analysés séparément par ULPC (chromatographie liquide à ultraperformance) et analysés par MS également. La prochaine section détaille les éléments théoriques pour bien comprendre les expériences détaillées dans le mémoire.

1.3 SPME

1.3.1 Historique

La micro-extraction sur phase solide ou SPME a été inventée en 1990 par Janusz Pawliszyn de l'Université de Waterloo en Ontario et a été pour la première fois le sujet d'une publication en 1990 dans le journal *Analytical Chemistry* par Catherine L. Arthur et son inventeur.²³ Elle consiste essentiellement à extraire des composés sur une fibre optique de silice fondue de petit diamètre et d'une longueur de quelques centimètres recouverte de polymère ou non par phénomène d'absorption ou d'adsorption.²⁴

Elle y est présentée comme une alternative avantageuse à la SPE (extraction sur phase solide). En effet, en SPME la matrice est moins contraignante qu'en SPE ; il y a moins de préparation d'échantillons à faire, car si la matrice est complexe il suffit de faire une extraction au-dessus de l'échantillon et ce, qu'il s'agisse d'un liquide ou d'un solide.^{23, 25} De plus, il y a en SPME plusieurs types de fibre de disponibles sans compter celles qui sont en développement. D'ailleurs, dans ce même papier de 1990, il était déjà question d'éventuellement utiliser le carbowax ou le polyacrylate, types de fibre aujourd'hui vendues et utilisées en SPME; à l'époque, elles étaient encore à l'étude. Il y a eu depuis de nouvelles fibres différentes avec des sélectivités différentes disponibles chez plusieurs manufacturiers.

En plus de la fibre de silice fondue, le porte-fibre y était également présenté. De même, la SPME n'utilise pas ou peu de solvant en plus d'utiliser une fibre optique en silice fondue ce qui lui donne l'avantage d'être inerte et abordable comparée à d'autres modes d'extraction.^{23, 24}

S'ensuit alors des expériences testant la SPME avec différents types de composés que l'on pourrait chercher à analyser avec cette méthode tel que l'eau, le benzène, le toluène, et des ions métalliques. Durant les premières années de la SPME, d'autres articles sont publiés dans le but d'expliquer le mécanisme derrière la sorption des analytes sur la fibre. Sa polyvalence n'a fait qu'intéresser de plus en plus de

chercheurs ; depuis sa première publication en 1990, chaque année, il y a une quantité croissante d'articles publiés.

1.3.2 Théorie

Les composés extraits en SPME sont les composés volatils et semi-volatils ce qui inclut les composés benzéniques substitués, les composés organiques chlorés, les hydrocarbures aromatiques polycycliques, les biphényles polychlorés, les pesticides, les phénols, les acides gras, le plomb, le plomb tétraéthyle et les biphényles chlorés non volatils comme nous le décrit Górecki, T et *al.* (1999).²⁶ Elle peut être couplée avec la GC ou la LC (chromatographie liquide).²³ Peu importe le couplage ou le type de fibre utilisé, il y a une première phase de sorption lors de l'extraction et s'ensuit la phase de désorption pour la suite de l'analyse. La fibre est nettoyée pour être prête pour une utilisation subséquente et s'ensuit alors un cycle d'extraction-injection-désorption.²⁷

L'étape de nettoyage au préalable de l'utilisation est précieuse puisqu'elle permet de s'affranchir des composés volatils présents dans l'air qui sont susceptibles d'adhérer à la fibre, ce qui est plus susceptible de se produire lorsque la fibre n'a pas été utilisée depuis un bon moment. Il est également essentiel de s'assurer de la propreté de celle-ci entre les extractions-injections. Elle peut être effectuée en utilisant le GC en exposant la fibre durant un temps suffisant au gaz vecteur neutre. En observant le spectre chromatographique résultant, on permet de mieux déterminer le temps nécessaire du nettoyage en plus de s'assurer de la propreté de la fibre ; ceci correspond à un chromatogramme avec peu ou sans signal.

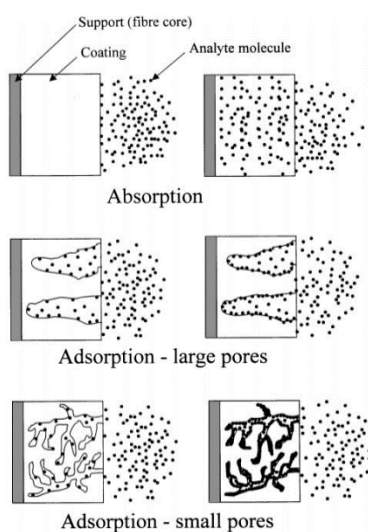


Figure 1.1 - Mécanismes d'extraction lors d'absorption et lors d'adsorption des fibres revêtues (représentation tirée de Górecki, T. et al (1999))²⁶

Le type d'extraction dépend du type de fibre utilisé. Il s'agit d'une absorption pour les fibres recouvertes d'un film de liquide alors que pour les fibres poreuses, il est question d'adsorption (fig. 1.1). Les fibres poreuses sont aussi capables d'absorption, mais le temps nécessaire à ce processus est nettement plus long. C'est le cas de la fibre de divinylbenzène, son coefficient de diffusion D_s permet une absorption après une longue période de temps, mais la désorption en sera difficile.²⁶ C'est pour cela qu'il n'est pas optimal de forcer l'absorption en prolongeant la phase d'extraction. Ceci introduit l'importance du coefficient de diffusion qui sera discuté plus bas.

Qu'il s'agisse d'une absorption ou adsorption, il y a d'abord une phase pré-équilibre nommée région cinétique suivie d'un plateau représentant la région d'équilibre (fig. 1.2), notion également discutée en détail plus tard.²⁸

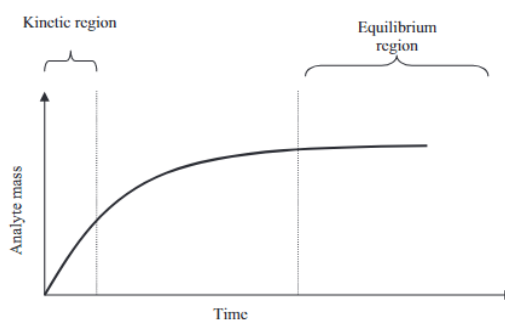


Figure 1.2 - Saturation d'analyte sur une fibre SPME au cours de la phase d'extraction (représentation tirée de Seethapathy S. et Górecki T. (2012))²⁸

Pour que l'extraction soit le plus rentable possible, l'utilisation du mode tête de fiole ou *headspace mode* ou encore espace de tête qui se base sur la constante de Henry (H) est utilisée.²⁹ Il s'agit de concentrer la vapeur de l'analyte dans la tête de la fiole, c'est-à-dire entre le dessus du liquide et le bouchon de la fiole. Ainsi, on retrouve la fibre exposée à une plus grande quantité d'analytes volatils ou semi-volatils possible et contribuant à son extraction. La tête de fiole est appelée *headspace* en anglais, ce qui correspond au sigle HS.³⁰

1.3.2.1 Adsorption en SPME

Comme illustré dans la figure 1.1, l'adsorption implique la présence de pores dans le revêtement de la fibre. Les fibres poreuses, soit les fibres d'adsorption, sont décrites comme étant plus sensibles que les fibres liquides.³¹ Le volume et la surface de la fibre étant fixes, il y a donc également un nombre fixe de pores où des molécules volatiles peuvent venir s'y adsorber, il s'agit donc en réalité d'adsorption

compétitive lorsqu'en présence de différentes molécules. Au début de l'extraction, l'abondance de pores disponibles fait en sorte que leur nombre limité n'est pas ressenti par le taux d'extraction de chacune d'elles; l'extraction est alors linéaire pour un certain temps comme illustré dans la figure 1.2. Cependant, c'est de moins en moins le cas au fur et à mesure que les pores se saturent et la compétition y est de plus en plus forte ce qui favorise certaines molécules par rapport à d'autres. L'abondance supérieure d'un composé dans l'échantillon n'entraîne pas une meilleure extraction de celui-ci, ce sont les composés avec une meilleure affinité à la surface du revêtement de la fibre qui sont favorisés. D'autres facteurs entrent aussi en jeu tel que la matrice de l'échantillon.²⁶

Le modèle d'adsorption de Langmuir est utilisé pour décrire le phénomène d'extraction pour l'adsorption en SPME. Il nous dit qu'à l'équilibre, la concentration de molécule adsorbée est définie par la concentration totale de sites actifs, la constante d'équilibre d'adsorption et la concentration de la molécule dans la matrice, le tout est mis en relation dans l'équation 1.1.

$$[A_{ad}] = [S_0] \frac{K_A[A]}{1 + K_A[A]}$$

Équation 1.1 - Équation d'adsorption de Langmuir, où $[A_{ad}]$ est la concentration du composé A adsorbé, $[S_0]$, est la concentration totale de sites actifs, K_A , la constante d'équilibre d'adsorption de A, et $[A]$, la concentration du composé A dans la matrice.

Celle-ci a été adaptée pour mieux correspondre au phénomène par Górecki T. et *al.* (1999), ce qui nous apporte l'équation 1.2 et 1.3. La première correspond au cas où l'analyte A n'a pas de compétiteur (équation 1.2) et la deuxième, au cas où il y a un compétiteur (équation 1.3), soit le composé B.

$$n = \frac{C_{f \max} K_A V_f + C_{0A} V_s V_A - \sqrt{K_A^2 (C_{f \max} V_f - C_{0A} V_s)^2 + 2K_A V_s (C_{f \max} V_f + C_{0A} V_s) + V_s^2}}{2K}$$

Équation 1.2 - Équation d'adsorption de Langmuir revisitée sans compétiteur par Górecki T. et *al.* (1999)²⁶

$$n_A = \frac{C_{f \max} K'_A V_f + C_{0A} V_s K'_A + V_s (1 + K'_B C_{sB}^\infty) (1 + K_{HA}) + \sqrt{K_A'^2 (C_{f \max} V_f - C_{0A} V_s)^2 + 2K'_A V_s (1 + K'_B C_{sB}^\infty) (C_{f \max} V_f + C_{0A} V_s + aK_{HA} V_f C_{f \max} + aV_s K_{HA} C_{0A}) + V_s^2 (1 + K'_B C_{sB}^\infty)^2 (1 + aK_{HA})^2}}{2K'_A}$$

Équation 1.3 - Équation d'adsorption de Langmuir revisitée avec présence d'un compétiteur par Górecki T. et *al.* (1999)²⁶

Dans ces deux équations, plusieurs paramètres sont mis en relation; n est la quantité extraite à l'équilibre, $C_{f \max}$, la concentration maximum de sites actifs, K_A , la constante d'adsorption de l'analyte A,

V_f , le volume de la fibre ou volume des sites actifs de la fibre, C_{0A} , la concentration initiale de l'analyte A dans l'échantillon, V_s , le volume de l'échantillon, K , le coefficient de partage de l'analyte entre l'échantillon et la fibre, K'_A , le produit de la constante d'adsorption de l'analyte A provenant de la phase gazeuse à l'équilibre (K_{Ah}) et de la constante d'Henry pour l'analyte A (K_{HA}), K'_B , est pour B ce que K'_A , est pour A, C_{sB}^∞ , la concentration de B dans l'échantillon à l'équilibre, et a , le volume de la tête de fiole (V_h) divisé par (V_s).²⁶

Pour mieux comprendre le poids de certains paramètres, voici l'allure que prennent les courbes d'extraction non compétitive (figure 1.3a et 1.3b) pour des valeurs différentes de K_A et $C_{f\max}$ qui sont respectivement, comme expliqué auparavant, la constante d'équilibre d'adsorption de A et la concentration de sites actifs sur la fibre. Comme il s'agit d'un contexte avec absence de compétiteurs, l'équation 1.2 a été utilisée pour dessiner les courbes.²⁶

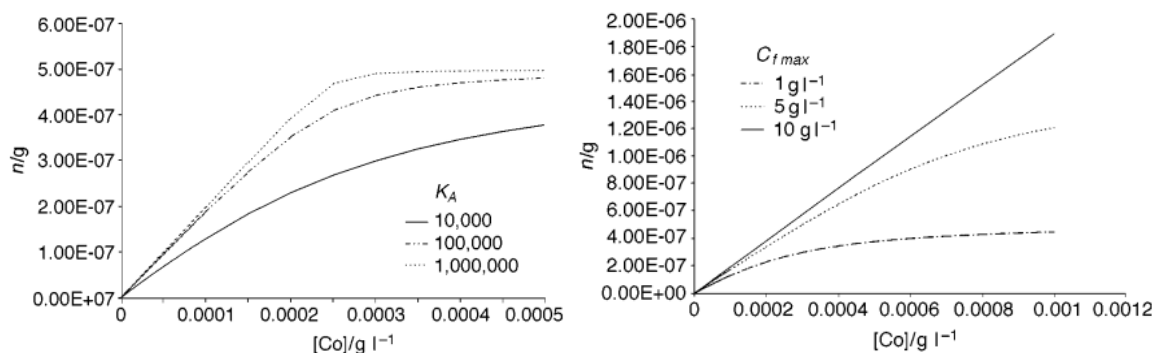


Figure 1.3 - Quantité extraite d'un analyte par rapport à sa concentration initiale dans l'échantillon et ce, (a) pour des K_A différents et (b) des $C_{f\max}$ différents (représentation tirée Górecki T. et *al.* (1999))²⁶

D'abord, il est important de rappeler que la constante d'équilibre d'adsorption K_A représente le rapport entre la quantité d'espèces absorbées et la quantité d'adsorbant sous forme gazeuse ainsi que le nombre de sites d'adsorption libres. Donc un K_A élevé indique qu'une quantité élevée de l'analyte A est adsorbée, et représente donc son affinité à la fibre. C'est pourquoi un plateau est observé pour un K_A d'une valeur de 1 000 000, tous les sites, ou du moins l'écrasante majorité, sont occupés. Avant le plateau, la linéarité est plus prononcée puisque l'analyte A a une capacité élevée d'être adsorbé. Maintenant, pour un K_A de valeur plus faible, les sites requièrent une plus grande quantité d'analyte qui est dans le cas de l'exemple présenté dans la figure 1.3 du cobalt, dans l'échantillon pour atteindre le plateau. En effet, pour une petite constante d'équilibre, il faut une plus grande quantité de A pour qu'il y ait plus de A adsorbé.

Pour ce qui est de $C_{f\max}$, on y remarque que pour une quantité relativement grande de sites actifs disponibles, la courbe d'extraction est linéaire. Ceci est logique; plus il y a de pores disponibles, plus il faut

une grande quantité d'analyte pour qu'il y a un phénomène de saturation observable. Or, la valeur de $C_{f\max}$, soit 10 g/L, est nettement supérieure à la concentration la plus haute de cobalt, soit 0.012 g/L. La formation de plateau se fait plus rapidement lorsque la valeur de $C_{f\max}$ diminue.

L'extraction efficace observée est cependant perdue en présence de compétition (figure 1.4a et 1.4b). De la même façon pour A, un K_B plus élevé indique que l'affinité de B avec l'adsorbant est élevée. C'est pourquoi dans la figure 1.4a, plus le K_B est élevé, moins il y a de cobalt extrait. Cela dit, on voit que la courbe a peu dévié lorsque $K_B=K_A$ comparé à quand il n'y a pas de compétiteur B. Dans le cas d'une affinité similaire, il y a peu d'interférence surtout pour de petites concentrations. La déviation est importante seulement si l'affinité de B par rapport à la surface de la fibre est supérieure à celle du composé A. Ceci est logique, si B a plus d'affinité, il délogera ou s'adsorbera plus fortement que A sur la fibre réduisant la quantité de A extraite. Pour le deuxième cas (figure 1.4b), l'extraction de A se fait pour différentes concentrations de B dans l'échantillon pour un K_B supérieur à K_A . Comme attendu, plus la concentration de ce dernier est grande, plus son adsorption est importante et moins A se fait extraire.²⁶ B occupe dans ce cas une forte proportion des sites d'adsorption diminuant l'extraction de A.

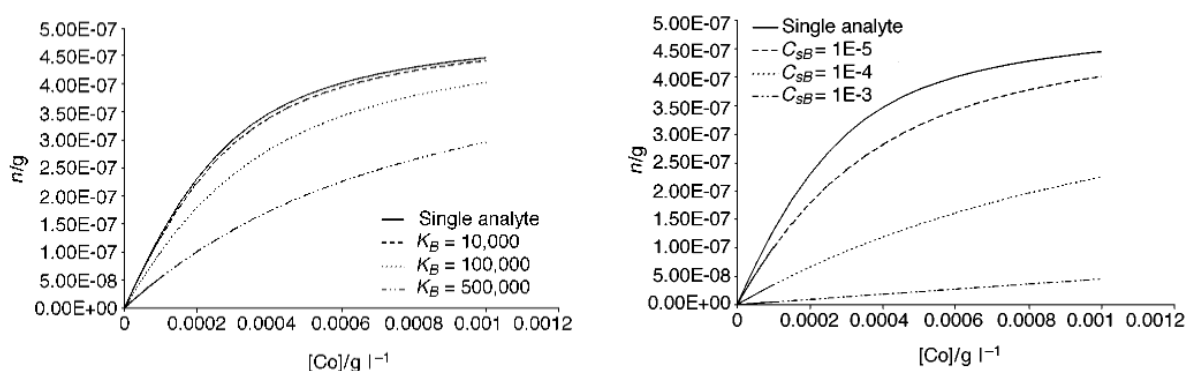


Figure 1.4 - Quantité extraite d'un analyte ($K_A = 10\,000$ et $C_{f\max} = 1$ g/L) en présence du compétiteur B par rapport à sa concentration initiale dans l'échantillon et ce, (a) pour des K_B différents et (b) des C_{SB} différents. Dans la figure b, $K_B = 100\,000$ (représentation tirée de Górecki T. et *al.* (1999))²⁶

Dans cette section, seules des situations simples ont été discutées puisqu'il a été question d'un ou deux composés tout au plus. Dans le cas d'une extraction à partir d'une matrice complexe, comme c'est le cas pour le sirop d'érable, il est plus souvent question d'extraire plusieurs composés à la fois et non un analyte spécifique. Il s'agirait alors de tester différentes fibres pour déterminer quel revêtement de fibre est le plus efficace pour les analytes qui nous intéressent. La quantification d'un analyte spécifique peut se faire, mais il est peu probable qu'il soit individuellement extrait ce qui fait du cas précédemment expliqué où B a largement une meilleure affinité que l'analyte A et est conséquemment quasi exclusivement extrait, moins probable lorsque les composés présents dans l'échantillon sont en grand nombre et de tailles et

polarités diverses. Qu'il s'agisse d'une extraction spécifique ou non spécifique, il s'agira toujours de tester différentes fibres, mais seule la méthode de sélection de la fibre sera différente ; dans le cas de l'extraction non spécifique, il faut une fibre qui extrait le plus de composés possibles et pour une extraction spécifique, il faut une fibre qui extrait le mieux l'analyte spécifique. En bref, l'extraction SPME n'est pas une méthode d'extraction spécifique, mais une identification ainsi qu'une quantification est possible lorsque jumelée à un chromatogramme et un analyseur de masse. Cela dit, une extraction compétitive n'est peut-être alors pas le meilleur choix pour une étude non ciblée puisqu'il faut exclure le moins de composés possible ; l'absorption SPME qui est une extraction non compétitive pourrait mieux correspondre aux extractions non spécifiques.

1.3.2.2 Absorption en SPME

La théorie d'absorption concerne les fibres non poreuses, dont ceux avec un revêtement PDMS (polydiméthylsiloxane) (figure 1.5) et de PA (polyacrylate) (figure 1.6).³²

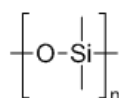


Figure 1.5 - Structure du polydiméthylsiloxane

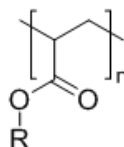


Figure 1.6 - Structure du polyacrylate

Dans le cas de l'absorption, il n'est plus question de surface poreuse, mais de phase liquide d'une certaine épaisseur recouvrant la fibre. Il n'y a donc pas de compétition entre les molécules pour les pores, en revanche, d'autres facteurs entrent en jeu lors de l'extraction. L'épaisseur de la couche liquide permet, lorsque suffisamment large, d'extraire plus de molécules.³²

La polarité joue un rôle important pour l'extraction des analytes ; ils sont mieux extraits par un revêtement de fibre de polarité similaire. Dans la figure 1.7, on voit que pour la plupart des composés extraits, il y a autant d'affinité avec la fibre PDMS qu'avec la fibre de PA, mais pour le chlorure de méthylène et le pentane la différence est indéniable. Notez que la plus polaire des deux fibres, la fibre de PA, extrait le plus polaire des deux composés, ce qui démontre la notion d'affinité par polarité lors d'extraction SPME.³² Pour le reste des composés de la figure 1.7, qu'il s'agisse d'une fibre PDMS ou PA, la différence en quantité absolue extraite est faible.

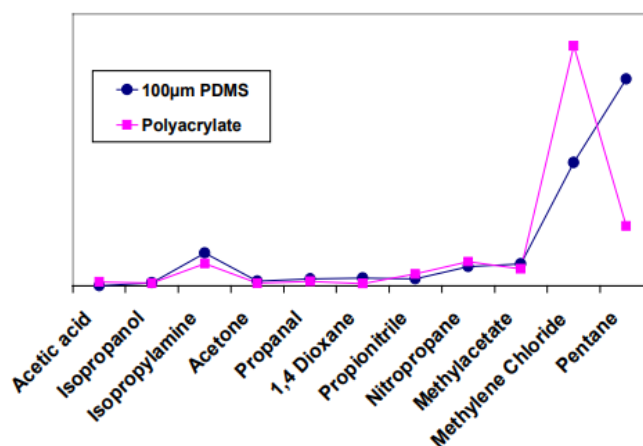


Figure 1.7 - Extraction SPME de différents composés par les fibres de 100 µm PDMS et de PA. Les composés sont en ordre décroissant de polarité (de gauche à droite) et l'axe des y correspond à la quantité absolue extraite (représentation tirée de *SUPELCO SPME-Adsorption versus Absorption: Which Fiber Is Best for Your Application?*)³²

Dans la figure 1.8, on compare l'extraction des mêmes fibres que dans la figure 1.7, soit une fibre PA et une fibre 100 µm PDMS, mais sur des composés différents. L'effet de la polarité de la fibre est bien plus important pour les composés choisis que ceux de la figure 1.7 parce qu'il est question de molécules ayant un poids moléculaire d'au moins 90 g/mol. Ceci pourrait s'expliquer par le fait qu'une molécule plus grosse peut avoir une séparation de charges qui est physiquement plus distancée, ce qui augmente le moment dipolaire.³³ En effet, dans la figure 1.7 le poids moléculaire des composés varie entre 55.08 et 89.09 g/mol alors que dans la figure 1.8, le poids varie entre 92.14 et 498.60 g/mol. L'impact du type de fibre n'est pas proportionnel au poids moléculaire puisque dans les deux figures la différence de quantité absolue extraite n'est pas élevée pour les molécules les plus lourdes. Il s'agit d'un phénomène généralement observé. Par exemple, le pentane et le chlorure de méthylène de la figure 1.7 ont respectivement une masse de 72.15 et 84.93 g/mol et ont une préférence pour un type de fibre, alors que les molécules les plus lourdes, soit le nitropropane (MW = 89.09 g/mol) et le 1,4-dioxane (MW = 88.11 g/mol), ne semble pas avoir une préférence de fibre. Dans la figure 1.8, la molécule qui semble avoir le plus de différence entre les quantités

extraites par la fibre PDMS et la fibre PA, soit l'acénaphthène (MW = 154.21 g/mol) est loin d'être la plus lourde, alors que le 1,3,5-trinitrobenzène (MW = 213.10 g/mol) qui un composé plus lourd a peu de différence entre les quantités absolues extraites des fibres. Pour résumer, la préférence d'une molécule pour une fibre ou pour une autre reste liée à sa polarité, mais observée de façon plus importante pour les molécules plus lourdes. Il est à noter que dû à l'interaction π - π avec des cycles aromatiques, il arrive que la fibre PA absorbe mieux un composé relativement polaire malgré qu'elle soit plus apolaire que la fibre PDMS.³² Il est donc toujours judicieux de tester les fibres sur les analytes visés, spécialement s'il s'agit de composés volatils lourds. Étant un produit naturel, il est attendu que le sirop d'érable contient surtout des composés organiques, soit des composés apolaires et que par conséquent, une fibre apolaire soit privilégiée. Cela dit, sa composition n'étant pas totalement connue, il serait judicieux de ne pas exclure les composés polaires en utilisant une fibre ayant une polarité dite « intermédiaire », chose mentionnée dans une prochaine section. Les composés volatils n'étant pas aussi affectés par le choix de la fibre, c'est une décision qui affectera les composés semi-volatils issus du sirop d'érable.

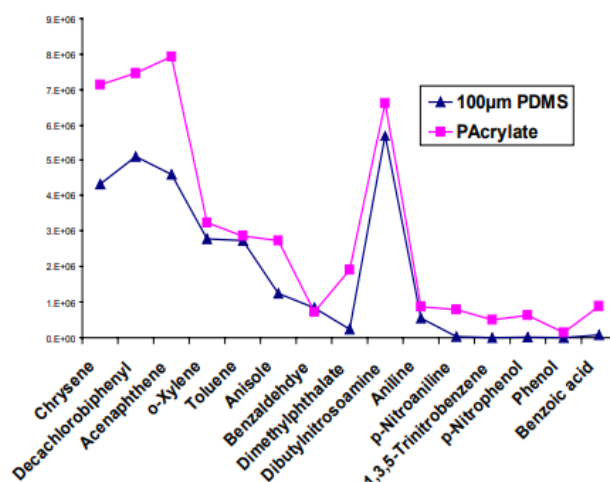


Figure 1.8 - Autre extraction SPME de différents composés par les fibres de 100 µm PDMS et de PA. Les composés sont en ordre croissant de polarité (de gauche à droite) et l'axe des y correspond à la quantité absolue extraite (représentation tirée de *SUPELCO SPME-Adsorption versus Absorption: Which Fiber Is Best for Your Application?*)³²

Les équations précédentes ne peuvent s'appliquer ici, car elles prennent en compte la quantité de pores et elles diffèrent dépendamment s'il s'agit d'extraction HS classique ou d'extraction directe aussi appelée DI-SPME pour *Direct Immersion Solid Phase Microextraction*. En DI-SPME, il ne s'agit plus d'extraire au-dessus du liquide, mais bien de plonger la fibre directement dans le liquide. Si l'on considère l'approche HS comme étant un système à trois composantes (la fibre liquide, la tête de fiole et la phase

aqueuse), alors l'approche DI n'a que deux composantes dues à l'absence d'espace au-dessus du liquide. Les équations ont alors quelques composantes en moins, soit les composantes liées à la tête de fiole.³⁴

$$n = \frac{C_0 V_1 V_2 K_1 K_2}{K_1 K_2 V_1 + K_2 V_3 + V_2}$$

Équation 1.4 - Équation basée sur la loi d'Henry de la quantité absorbée à l'équilibre d'un analyte en HS, où n est la quantité absorbée de l'analyte, C_0 , la concentration d'analyte initiale dans la phase aqueuse, K_1 et K_2 , les coefficients de partage de l'analyte entre revêtement/phase gazeuse et phase gazeuse/phase aqueuse respectivement, V_1 , V_2 , et V_3 , les volumes du revêtement, phase aqueuse et de phase gazeuse respectivement.³⁴

$$n = \frac{C_0 V_1 V_2 K}{K V_1 + K_2 V_3 + V_2}$$

Équation 1.5 - Équation basée sur la loi d'Henry de la quantité absorbée à l'équilibre d'un analyte en DI, où K est le coefficient de partage de l'analyte entre revêtement/phase aqueuse. Le reste des paramètres sont repris de l'équation 1.4.³⁴

La diffusion de l'analyte dans la couche joue également un rôle. Les composés auraient tendance à rentrer et ressortir de la fibre puisqu'ils sont volatils. S'ils sont sujets à sortir de l'échantillon qu'il soit liquide ou solide, ils sont aussi sujets à ressortir de la fibre qui ici, nous le rappelons, est en phase liquide. D'ailleurs, pour ralentir le phénomène de migration vers l'extérieur de la fibre, une fibre de plus large épaisseur est utilisée. Ceci ne s'applique pas aux molécules de grandes tailles, car leur diffusion est suffisamment lente.³² Aussi, en HS, dépendamment de s'il s'agit d'un milieu aqueux en agitation ou non les facteurs liés à la diffusion varient, mais l'équation de base reste la même. Elle régit l'extraction comme le montrent les expériences menées par Z. Zhang et J. Pawliszyn (1993).

$$\frac{\delta C(x,t)}{\delta t} = D \frac{\delta^2 C(x,t)}{\delta x^2}$$

Équation 1.6 - Équation de la deuxième loi de Fick³⁴

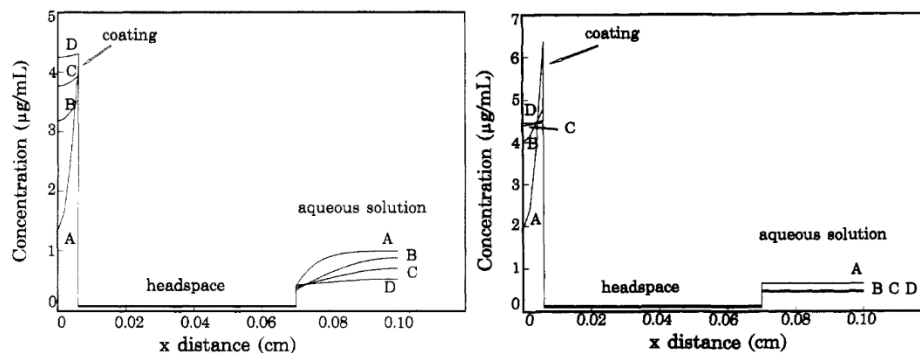


Figure 1.9 - Concentration à différents temps de l'équilibration du benzène en HS-SPME sur une fibre PDMS pour un milieu statique (à gauche) (A à 3 s, B à 15 s, C à 30 s et D à 60 s) et un milieu sous agitation (à droite) (A à 3 s, B à 9 s, C à 15 s et D à 21 s) (représentation tirée de Zhang, Z. et Pawliszyn J. (1993))³⁴

Pour un même composé, l'équilibre se fait plus rapidement en agitation, car elle n'est plus limitée par la diffusion de l'analyte en milieu aqueux (figure 1.9). En agitation l'équilibre est atteint en 21 s alors qu'il faut 60 s pour une phase aqueuse statique. On remarque que dans les deux cas, la concentration n'est pas uniforme dans la couche de polymère. C'est dû à la diffusion dans le revêtement qui est inférieure à celle de la phase gazeuse. La différence de concentration à l'extérieur de la couche et son centre est nettement plus importante en agitation, car la quantité d'analyte dans le HS n'est plus limitée par la diffusion dans l'eau. Il y a donc bien plus d'analytes sous forme gazeuse qui s'accumule à la surface de la fibre par rapport à ceux qui ont eu le temps de diffuser au sein de la couche. Aussi, encore dans les deux cas, la concentration dans le HS est constante, ce qui n'est pas le cas de la fibre et de la solution aqueuse. Cela est dû au fait que la diffusion dans ce compartiment est bien supérieure aux diffusions des deux autres compartiments. Ce qu'on retient de cette partie, c'est que sans agitation $D_{\text{phase gazeuse}} \gg D_{\text{eau}} > D_{\text{fibre}}$ et qu'en agitation $D_{\text{eau}} > D_{\text{phase gazeuse}} \gg D_{\text{fibre}}$.

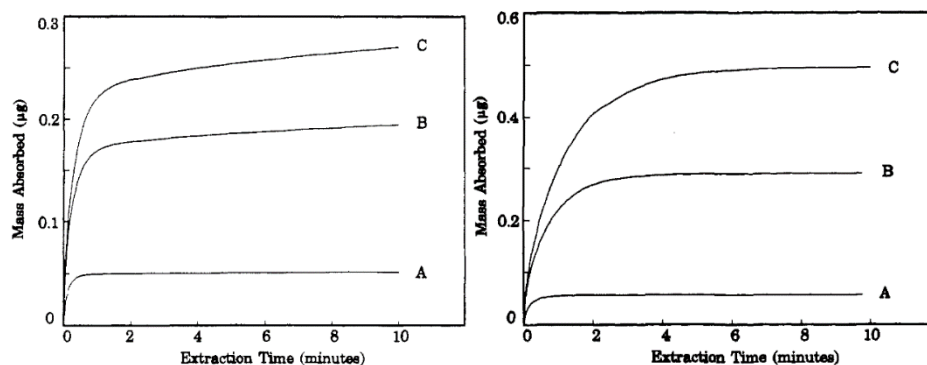


Figure 1.10 - Masse absorbée de benzène à différents coefficients de partage revêtement/phase gazeuse (K_1) en HS-SPME sur une fibre PDMS pour un milieu statique dans la figure de gauche (a) et un milieu sous agitation dans la figure de droite (b) (A à $K_1 = 100$, B à $K_1 = 1000$ et C à $K_1 = 10\,000$) (représentation tirée de Zhang, Z. et Pawliszyn J. (1993))³⁴

L'effet de différents K_1 est illustré dans la figure 1.10. Pour un K_1 élevé, la concentration en analyte dans le revêtement liquide de la fibre est supérieure à celle dans le HS sous forme gazeuse et vice versa. Il y a donc une plus grande quantité d'extrait, tel qu'observé en mode agitation ou en mode statique. En revanche, l'équilibre prend plus de temps à être atteint en statique ; dans le graphique de gauche, les plateaux des courbes C ou B ne sont pas aussi horizontales que celles de droite. En effet, les plateaux ont une pente de plus en grande au fur et à mesure que K_1 augmente dans la figure 1.10a. Cette limitation est due à la diffusion de l'analyte dans l'eau qui est la plus lente.

En statique, les virages que prennent les courbes, c'est-à-dire la section de la courbe entre la région cinétique et la région d'équilibre, sont moins larges et la région d'équilibre est plus rapidement atteinte ce qui est dû à la diffusion dans le HS supérieure à celle de l'eau. Au début de l'extraction, le HS est concentré en analyte, la limitation de la diffusion dans l'eau n'est alors pas ressentie. Cependant, une fois le HS plus ou moins vidé, chose reflétée par la montée rapide avant le plateau, les analytes non absorbés sont retardés par la diffusion de l'eau et arrivent donc à la fibre au compte-goutte. En d'autres mots, la diffusion des molécules dans l'eau étant le facteur limitant, le HS se « vide » des molécules, c'est pourquoi le virage est plus serré dans la figure 1.10a. En agitation, l'eau n'est plus la phase limitante, il s'agit maintenant de la diffusion dans le HS. La différence entre la diffusion des molécules dans la couche de polymère est certes différente de celle en milieu gazeux, mais dû à son petit volume, cette différence est moins ressentie comparé à la différence entre la diffusion en milieu gazeux et aqueux. Le HS ne se vide pas autant, c'est pourquoi les virages sont moins raides et les plateaux sont plus horizontaux ; le flux des analytes de l'eau vers la fibre est plus fluide.

Aussi, en plus d'être le mode permettant d'atteindre la région d'équilibre plus rapidement, le mode agitation extrait une plus grande quantité d'analytes pour un même temps, et ce, pour les courbes B et C, soit pour des K_1 de 1000 et 10 000 respectivement (figure 1.9). En effet, pour un K_1 de 1000 (courbe B) la masse absorbée de la région d'équilibre est d'environ 0.15 μg en mode statique et est d'environ 0.25 μg en mode agitation. Pour un K_1 de 10 000 (courbe C), la masse absorbée en mode statique est d'environ 0.25 μg et en mode agitation, elle est de 0.50 μg . Il semble donc que le mode agitation soit la meilleure option pour l'extraction des composés volatils du sirop d'érable.

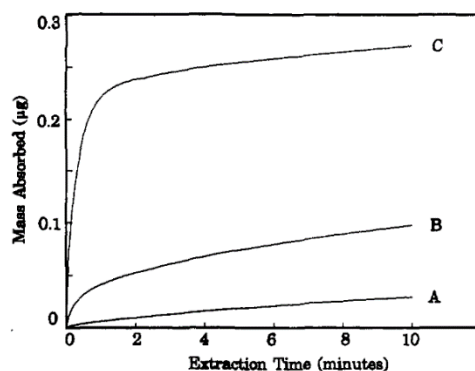


Figure 1.11 - Masse absorbée de benzène à différents coefficients de partage phase gazeuse/aqueuse (K_2) en HS-SPME sur une fibre PDMS pour un milieu statique pour $K_2 = 10\ 000$ (A à $K_2 = 0.002$, B à $K_2 = 0.02$ et C à $K_2 = 0.2$) (représentation tirée de Zhang, Z. et Pawliszyn J. (1993))³⁴

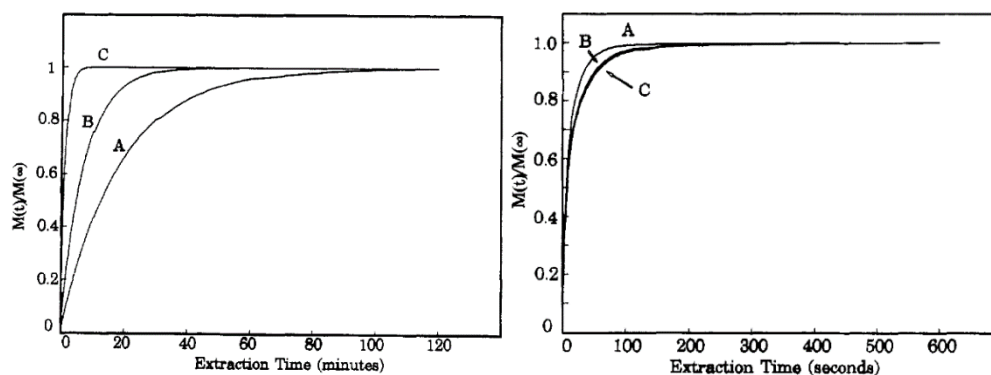


Figure 1.12- Masse absorbée normalisée de benzène pour différents coefficients de partage phase gazeuse/aqueuse (K_2) en HS-SPME sur une fibre PDMS pour un milieu en agitation pour $K_1 = 10\ 000$ (à gauche) et $K_1 = 100$ (à droite) (A à $K_2 = 0.2$, B à $K_2 = 0.02$ et C à $K_2 = 0.002$) (représentation tirée de Zhang, Z. et Pawliszyn J. (1993))³⁴

Passons maintenant à l'effet qu'a le coefficient de partage de l'analyte entre le HS et le milieu aqueux, soit K_2 . Plus la valeur de K_2 augmente et plus la concentration en analyte dans la phase gazeuse augmente. Il y a alors plus d'analytes disponibles à être absorbé. Noter que typiquement la quantité extraite d'un composé organique est négligeable par rapport à celle présente dans la matrice, la concentration d'analyte dans celle-ci reste donc relativement inchangée suite à l'extraction.

En mode statique (fig.1.11), l'allure des courbes reste fort similaire à la figure 1.10 où $K_2 = 0.2$. Donc la courbe C de la figure 1.10a ($K_1 = 10\ 000$ et $K_2 = 0.2$) correspond à la courbe C de la figure 1.11 d'où leur ressemblance. Comme attendu, plus K_2 diminue, moins il y a de masse absorbée par la fibre. Aussi, l'équilibre n'est jamais vraiment atteint par aucune des courbes ce qui peut être induit par un K_1 particulièrement élevé (10 000) ou les valeurs de K_2 basses.

En mode agitation, certes la limitation provient de la diffusion dans le HS, qui comme expliqué, ne devrait pas produire des points de virage aussi raide comme pour la courbe A de la figure 1.12a, mais lorsque K_2 diminue il y a moins d'analyte dans le HS donc il se vide plus rapidement. Le point de virage est atteint plus rapidement.

Alors qu'en est-il pour un K_1 de plus petite valeur, soit une valeur de 100? Il y a dans cette situation moins d'analytes dans la fibre et plus dans le HS, en d'autres mots la capacité de la fibre d'absorber est moindre. Puisqu'il n'est pas nécessaire d'avoir beaucoup d'analytes pour l'absorption afin d'atteindre l'équilibre, la limitation de la diffusion dans le HS est moins ressentie. Plus K_2 diminue, moins il y'a de masse d'absorber au point de virage.

En théorie, s'il s'agit d'une microextraction sur phase solide par immersion directe aussi appelée DI-SPME, il est alors important de considérer l'agitation de l'échantillon. Il ne s'agit plus d'extraire au-dessus du liquide, mais bien de plonger la fibre directement dans le liquide où d'autres phénomènes peuvent entraver à l'extraction. Noter que c'est une approche utilisée pour les molécules polaires particulièrement solubles dans la phase liquide.³⁹ L'agitation continue de l'échantillon lors de l'extraction permet d'éviter de perturber la diffusion des composés au sein de la fibre surtout lorsqu'il s'agit de composés ayant un large coefficient de partage entre le revêtement et la couche aqueuse.^{24, 34} En effet, l'échantillon étant habituellement dilué dans de l'eau, il est fréquent qu'une fine couche statique d'eau recouvre la fibre rendant difficile la migration des composés dans le revêtement de la fibre. Même si elle n'est pas totalement éliminée même lors de forte agitation, elle est nettement moins importante. En plus d'améliorer ce problème, elle permet également de raccourcir le temps pour atteindre l'équilibre pour les composés plus lourds.³⁴

En HS classique, il est aussi possible de raccourcir le temps d'équilibration en réduisant le volume au-dessus du liquide, ce qui peut être fait en utilisant des fioles plus petites. C'est aussi possible en augmentant la température d'extraction, chose qui s'applique également aux fibres d'adsorption comme le montre la figure 1.13.^{34, 40} Pour la fibre de carboxen, de plus grande quantité d'analyte sont extraites en un temps moindre lorsque la température est augmentée de 20 °C.

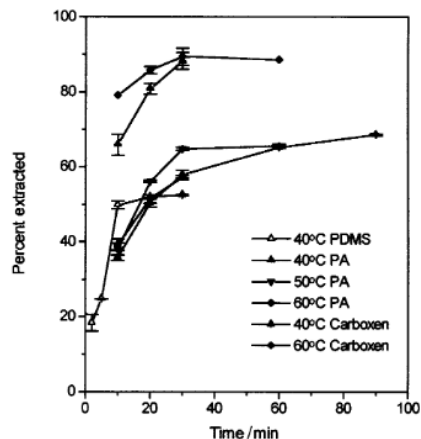


Figure 1.13 - Comparaison des fibres de PDMS, PA et de CAR pour l'adsorption du 2-méthylisobornéol à différentes températures (représentation tirée de McCallum, R., et *al.* (1998))⁴⁰

Dans le cadre de notre recherche, nous visons à effectuer une extraction HS-SPME et non DI-SPME puisque nous cherchons à étudier les composés organiques volatils et semi-volatils. Il sera donc question de faire un montage pour lequel un HS au-dessus de l'échantillon suffisamment grand sera disponible pour y exposer la fibre SPME complètement afin d'extraire le plus de molécules possible. L'échantillon étant plus dense que de l'eau, et donc, plus visqueux que l'eau, la diffusion dans le milieu aqueux sera plus importante que celle démontrée dans les exemples précédents. Aussi, la matrice de l'échantillon est particulièrement complexe, il ne sera pas question d'évaluer la situation selon les coefficients de partages des molécules entre le milieu aqueux et gazeux, autant qu'entre le milieu gazeux et la fibre.

1.3.3 Instrumentation

L'appareil SPME se compose de la fibre et du porte-fibre (ou microsiringue).²⁴ Ce dernier sert essentiellement à contenir la fibre, à la rétracter, à l'exposer et à ajuster la longueur à exposer. Il se compose du baril de siringue, d'une fibre amovible, d'un pistonnet d'un capuchon.²³ Le porte fibre peut être démonté de sorte à interchanger la fibre par une autre.

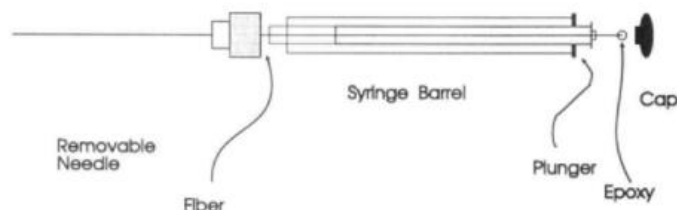


Figure 1.14 - Compartiment d'un appareil à SPME (représentation tirée Arthur, C. L. et Pawliszyn J. (1990))²³

1.3.3.1 Fibres

L'épaisseur de la fibre est un facteur qui concerne plus particulièrement les fibres absorbantes (*e.g.* PDMS) puisque leur capacité à extraire en dépend. L'épaisseur idéale dépend de la taille des molécules, c'est pourquoi plusieurs épaisseurs sont disponibles sur le marché.

Comme précédemment mentionnées, les fibres absorbantes solubilisent les composés, elles n'ont pas de pores, les composés ne sont donc pas en compétition. La polarité n'est alors pas le facteur dominant dans leur cas et elles permettent en plus d'extraire de plus grande quantité.³² Basé sur des études antérieures, il est conseillé d'utiliser des couches de revêtement plus épaisses pour les molécules de plus haut poids moléculaire. Une couche épaisse demande un temps plus long pour atteindre l'équilibre et entraîne une désorption difficile pour les composés lourds, mais convient parfaitement aux composés plus légers.⁴¹ C'est ce qui est représenté dans la figure 1.15, le poids des molécules restreint la panoplie de fibres adéquates. Notez que le PDMS est disponible sur le marché en plusieurs épaisseurs de revêtement.^{32, 42}

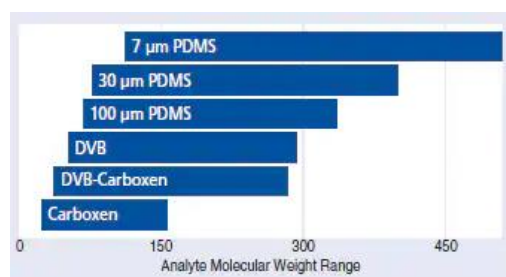


Figure 1.15 - Fourchette de poids moléculaires d'analytes pour différentes fibres SPME (représentation tirée de Shirey, R. Selecting the Appropriate SPME Fiber Coating –Effect of Analyte Molecular Weight and Polarity)⁴²

Dans cette même figure, on voit que la taille des molécules est aussi déterminante pour le type de polymère qui compose la fibre. Cependant, il est à rappeler que les fibres adsorbantes impliquent qu'il y a compétition due à la capacité limitée, donc le choix n'est pas que basé sur la gamme de masse moléculaire à l'étude. Aussi, le choix de la fibre ne s'appuie pas uniquement sur la qualité de son interaction avec

l'analyte, il est aussi important de veiller à ce que l'interaction n'empêche pas la désorption sans quoi il ne peut être quantifié ou identifié. En effet, dans la figure 1.16, le chrysène qui est nettement moins lourd et moins gros que le décachlorobiphényle est extrait en bien moindres quantités par la fibre en carboxen. Pourtant, pour cette même fibre, l'extraction de molécules plus petites comme le dibutylnitrosoamine ou l'acénaphène se fait. La raison en est que l'interaction entre le carbone et les cycles aromatiques du chrysène (fig. 1.17) est bien trop importante pour qu'il soit désorbé thermiquement.⁴²

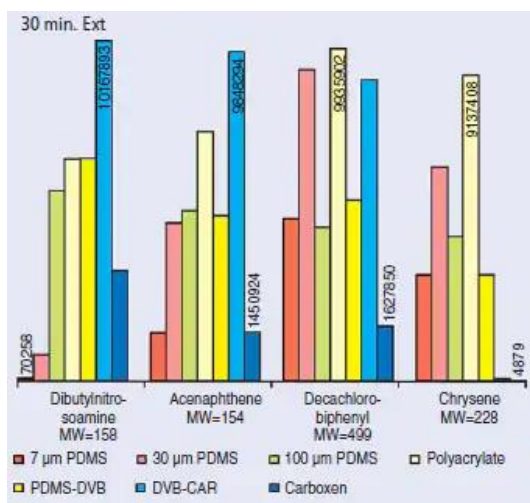


Figure 1.16 - Réponse mesurée d'une extraction de molécules plus larges (ou semi-volatiles) avec différentes fibres SPME (représentation tirée de Shirey, R. Selecting the Appropriate SPME Fiber Coating –Effect of Analyte Molecular Weight and Polarity)⁴²

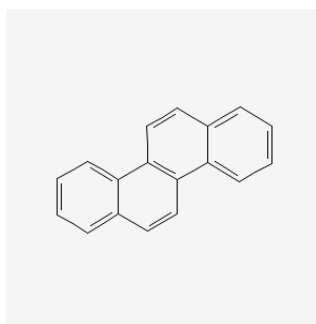


Figure 1.17 - Structure du chrysène (représentation tirée de PubChem Chrysene)⁴³

Pour les molécules avec une masse molaire plus élevée, il est conseillé d'utiliser les fibres absorbantes telles que les fibres de PDMS et de PA.⁴⁴ Avec le PDMS, il y a possibilité de choisir des épaisseurs différentes.

En somme, la polarité de l'analyte est déterminante autant que sa taille pour le choix du polymère. C'est ce qui est illustré dans la figure 1.16. Ici, la fibre 7 µm PDMS extrait mieux l'acénaphène (MW =

154 g/mol) qu'un composé plus lourd, le dibutylnitrosoamine (MW = 158 g/mol). Ceci est expliqué par le groupement polaire présent sur le diéthylnitrosamine. On y voit aussi que le composé le plus lourd, décachlorobiphényle (MW = 499 g/mol), est le composé le mieux extrait par cette même fibre, ce qui suit les études qui stipulent qu'une couche plus mince extrait mieux les composés plus lourds. Ces paramètres sont critiques dans le cadre du projet, le profil des molécules extraites peut changer selon la fibre et donc influencer les résultats obtenus pour le sirop d'érable.

Des jumelages de polymères permettent de profiter du caractère de différentes fibres. La discrimination basée sur la polarité est réduite et la plage de masses moléculaires est plus grande ou alors simplement modifiée (fig. 1.15). Il existe aussi différents squelettes pour les revêtements. En plus d'une fibre de silice fondue, il y a maintenant le StableFlex™, différents alliages de métaux, dont le titane et le nickel, ce qui donne le nitinol.⁴⁵

Le choix de la fibre aura des conséquences sur les résultats puisqu'elle détermine les analytes qui seront prélevés. Or, comme chaque fibre discrimine selon la taille et la polarité des molécules, les composés prélevés seront similaires tandis que ceux exclus pourraient être ce que l'on recherche. Ainsi, la fibre idéale, dans le cas de notre recherche non ciblée, devrait couvrir une gamme de molécules relativement large. La plupart des fibres disponibles sur le marché sont regroupées dans le tableau 1.3, c'est donc entre ces fibres que le choix se pose.

Tableau 1.3 - Propriété de quelques fibres SPME parmi les plus courantes

Sorption	Polymère	Épaisseur (µm)	Polarité	Gamme de masse (g/mol)	Réf.
Absorption (solubilisation) (haute viscosité, liquide, caoutchouteux)	PDMS	7	Non-polaire	125-600	46
	(polydiméthylsiloxane)	30		80-500	
		100		60-275	
	PA (polyacrylate)	85	Polaire	60-300	46
Adsorption	PEG (polyéthylène glycol)	60	Polaire (alcohols)	40-275	42,45,47
	CW/PEG (carbowax/polyéthylène glycol)	50	Polaire	50-400	45
		60		40-275	
		75			
	PDMS/DVB (polydiméthylsiloxane/divinylbenzène)	60	Médium	50-300	32,45,
		65			48,49
	CAR/PDMS (carboxen-polydiméthylsiloxane)	75	Médium	3-225	50
		85			
	DVB/CAR/PDMS (divinylbenzène/carboxen /polydiméthylsiloxane)	50/30	Médium	40-275	32,45,50
	CW/DVB (carbowax/divinylbenzène)	65	Polaire (ou médium)	50-350	32,48,51
	70				

Dans une étude HS-SPME menée en 2012 par Sabik H. et *al.* ciblant la pyrazine et ses dérivées dans le sirop d'érable, le choix de la fibre optimale se fait entre une fibre carboxen/polydiméthylsiloxane (CAR/PDMS) de 85 µm et une fibre carbowax/divinylbenzène (CW/DVB) de 65 µm. La fibre CAR/PDMS a été choisie, car elle relâche le mieux les analytes étudiés.³⁵ Dans l'étude HS-SPME menée en 2019 par Camara M. et *al.* aussi effectué sur des échantillons de sirop d'érable, la fibre utilisée était une fibre divinylbenzène/carboxen/polydiméthylsiloxane (DVB/CAR/PDMS).¹⁴ Aussi, une étude menée cette fois-ci sur le miel, soit un édulcorant naturel haut en sucre, en 2014 par Beitlich N. et *al.*, utilise également une fibre DVB/CAR/PDMS et l'a décrit comme étant le type de fibre le plus performant pour l'extraction des composés volatils du miel.⁵² Contenu de ces travaux, nous testerons sur nos échantillons de sirop d'érable

une fibre DVB/CAR/PDMS et une fibre CAR/PDMS afin de déterminer laquelle extrait le plus de composés organiques volatils.

1.3.3.1.1 DVB/CAR/PDMS

Une attention particulière est portée sur la fibre de DVB/CAR/PDMS puisqu'elle est utilisée dans l'étude présentée dans ce mémoire suite à des tests préliminaires. La DVB/CAR/PDMS est de nos jours la fibre la plus utilisée à cause de sa faculté à retenir les composés volatils et son rendement d'extraction relativement élevé.²⁹ Elle est aussi recommandée pour une extraction de composés volatils lorsqu'on ne désire pas chauffer la matrice.⁵³ La couche de carboxen permet de retenir les molécules de petites tailles (volatils), alors que la couche de DVB retient celles de grandes tailles (semi-volatils). Le PDMS se retrouve dans les deux couches et permet à la fois de contenir le carboxen et d'apporter ses propriétés tel que sa polarité et son habilité d'extraire des molécules de petites tailles comme on peut le voir pour la fibre CAR/PDMS (carboxen/polydiméthylsiloxane) dans le tableau 1.3. Il donne, en autres, une caractéristique apolaire à la fibre et aussi la capacité de retenir les molécules à tailles moyennes. Quant à la non-polarité du PDMS, elle est atténuée par le DVB.⁴²

1.3.4 Application et développement

La SPME est devenue courante dans le milieu de la chimie alimentaire. Similairement à notre étude sur le sirop d'érable, cette méthode a été utilisée dans le passé pour les composés volatils issus d'échantillons de miel d'origines botaniques différentes dans le but de déterminer les composés propres à chacune de ces origines et les composés en commun.⁵⁴ La SPME a également été utilisée pour comparer les profils moléculaires de citrons avant et après maturation.⁵⁵ De nombreuses autres études se servent également de cette méthode.

La polyvalence de la SPME ne fait que s'étendre depuis sa conception. Elle n'est pas exclusivement utilisée pour les aliments ou les plantes, elle est aussi utilisée pour les fluides biologiques tels que la salive. En effet, il est possible, par exemple, d'extraire des composés sulfurés à partir de la salive dans le but de déterminer les molécules liées à la mauvaise haleine.⁵⁶ Elle peut être aussi utilisée pour prélever des composés aéroportés présents dans l'air que nous respirons, des phéromones, des drogues présentes dans l'urine, chose courante en science médico-légale.^{31,57} Les exemples sont donc nombreux. Il existe ainsi plusieurs méthodes d'extraction HS pour les composés volatils, mais la SPME reste l'une des plus abordables.

1.4 Spectrométrie de masse

Un spectromètre de masse simple (MS) ou tandem (MS/MS) étant prévu d'être utilisé dans les deux parties de notre étude sur le sirop d'érable, il va de soi de comprendre la spectrométrie de masse. Nous détaillerons ceux utilisés; QTOF et le quadrupôle. La MS nous servira à identifier les molécules dans l'étude HS-SPME-GC-MS. Les analyses GC-MS étant très reproductibles, l'identification par base de données suffit. Il sera d'abord question d'utiliser la MS pour le traitement de données pour ensuite utiliser la MS/MS pour identifier les composés sélectionnés à l'issue du traitement de données. Ce n'est pas le cas des analyses LC-MS, ce qui inclut UPLC-MS, c'est pourquoi il est nécessaire d'utiliser des spectres issus d'analyses MS/MS pour pouvoir identifier des molécules dont on ignore l'identité.

1.4.1 Historique : Spectrographe parabolique

La spectrométrie de masse est une technique d'analyse qui a évolué depuis sa conception pour devenir un instrument précis pour l'identification et la quantification d'éléments ou de composés. Elle a été conceptualisée par Joseph John Thomson, ce qui lui a permis de découvrir les isotopes 20 et 22 du néon et d'obtenir les premiers spectres des composés N₂, O₂, CO et CO₂.⁵⁸ L'existence des isotopes n'avait jusqu'à jamais été observée.

Les travaux qui ont mené aux spectromètres de masse sont une continuité de la découverte des rayons canaux en 1886 par Eugen Goldstein et l'identification des particules positives des rayons canaux qui sont en fait de l'hydrogène ionisé par son étudiant Wilhelm Wien en 1898. Parallèlement Thomson entame ses travaux sur les rayons cathodiques en s'appuyant sur les travaux de 1895 de Jean Perrin comme en témoigne son travail publié de 1897,⁵⁹ c'est ensuite, en 1905, qu'il s'intéresse sur les rayons positivement chargés.⁶⁰ L'expérience du premier tube cathodique montre que le rayon cathodique est en effet composé de matière chargée négativement. En effet, lorsque le rayon cathodique est dévié vers l'électromètre par un aimant, une charge négative y est mesurée, alors que lorsque le rayon ne l'atteint pas, une charge électrique nettement plus faible et plus irrégulière est mesurée.

La deuxième expérience effectuée était sur un tube cathodique où le rayon passe entre deux plaques de métal générant un champ électrique. Cette expérience a déjà été effectuée auparavant, mais sans succès, car le vide n'avait pas été établi dans le tube, chose que Thomson a faite. Ceci a prouvé qu'il peut y avoir déviation du rayon par champ électrique, une déviation qui s'est produite en direction de l'anode puisqu'il s'agit encore du rayon cathodique. Selon ses dires, il ne pouvait y avoir de déviation due à la conductivité du gaz résiduel dans le tube.

Une autre expérience démontrant cette fois-ci la déflexion des rayons cathodiques par un champ magnétique démontre une déflexion en forme d'éventail. Le champ magnétique dévie le rayon cathodique

perpendiculairement à leur trajectoire, et, au lieu de demeurer un rayon unique, le rayon se sépare en rayons de différentes intensités lumineuses. Le rayon du chemin courbé emprunté par ces rayons filles peut être calculé, la distance entre l'anode et l'arrivée sur le patch phosphorescent étant connue.

Avec chacun des tubes, il effectue plusieurs des séries de tests tels que l'utilisation de différents métaux pour les anodes et cathodes ou alors avec différents gaz et bien d'autres. Ceci permet de répondre à plusieurs questions; par exemple, cela a permis d'affirmer que la séparation en éventail des rayons se produit de la même façon et donne une même déflexion peu importe le gaz contenu dans le tube cathodique. Cependant, le rayon cathodique étant composé d'une seule chose, l'électron, et le rayon anodique étant plus complexes, il se penche sur ce dernier.⁶¹ Donc, de la même façon, chaque particule positive selon son m/z emprunte un chemin parabolique lorsqu'elle est déviée par un champ magnétique. Son m/z peut-être alors déterminé comme expliqué dans la publication de ses travaux en 1913 intitulé *Rays of Positive Electricity* dans le *Proceedings of The Royal Society*.⁶¹ Voici ce qu'on y explique :

« [Prenons un rayon anodique se déplaçant le long de] l'axe x [de sorte à frapper une plaque perpendiculairement à celle-ci. Lorsque le rayon est dévié] par un champ électrique parallèle à l'axe des y , la distance séparant le premier point et [celui résultant de la déviation est donné $y = \frac{e}{mv^2}A$, où e la charge de la particule, m est la masse de la particule, v est la vitesse de la particule], et A , la constante dépendante de la force du champ électrique et de la longueur de la trajectoire de la particule.

[Dans le cas où un champ magnétique est exercé dans le plan y à la place du champ électrique, la déflexion du rayon se fait dans l'axe z ce qui donne $z = \frac{e}{mv}B$, où z est la distance séparant le premier point et celui résultant de la déviation], et B , la quantité dépendante du champ magnétique et de la longueur de la trajectoire de la particule [...].

[Dans le cas où les deux types de champs sont exercés sur le rayon, alors les coordonnées des particules déviées sur la plaque photographique sont $x = 0$, $y = \frac{e}{mv^2}A$, et $z = \frac{e}{mv}B$]. [...] [Donc, si l'on connaît les coordonnées d'une particule, il est possible de calculer sa vitesse ou alors sa charge sur masse.]

»

Ceci établit alors la base des spectromètres de masse, soit l'habileté de séparer des molécules chargées selon leur masse et leur charge.

1.4.2 Instrumentation, application et théorie

Le spectromètre de masse comprend essentiellement 4 compartiments (source d'ionisation, suivie d'un analyseur en masse, d'un détecteur et d'un appareil qui traite le signal), et chacun peut être changé de sorte à répondre au besoin de l'étude. Ceci en fait un outil polyvalent et est donc utilisé, et ce, de plus en

plus depuis les années 80, dans plusieurs domaines, tels que la protéomique, la métabolomique, l'analyse environnementale, l'analyse médico-légale et dans la recherche et le développement de médicaments.

L'échantillon est d'abord injecté dans la source d'ionisation où les composés qu'il contient sont ionisés sous forme gazeuse positivement ou négativement, ainsi, il est possible de les manipuler magnétiquement ou électriquement. L'injection se fait souvent à partir du chromatographe, qu'il s'agisse de chromatographie liquide ou gazeuse, ou autre appareil de séparation, elle peut aussi être directe.

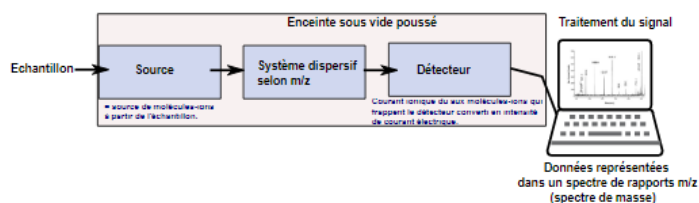


Figure 1.18 - Schéma du fonctionnement d'un spectromètre de masse (représentation tirée de Spectrométrie de masse)⁶²

Il y a plusieurs méthodes d'ionisation, on les classe souvent comme soit une ionisation douce ou forte. La première fragmente peu les composés et est utilisée lorsqu'on cherche à les garder intacts et la seconde a tendance à générer plus de fragmentation. Un exemple de méthode d'ionisation douce est la nébulisation électrostatique (electrospray ionization, ESI). Elle consiste à nébuliser les ions contenus dans le solvant à l'aide d'un voltage et à évaporer le solvant jusqu'à obtenir des ions sous forme gazeuse. Lors de cette technique, l'ionisation se fait par la présence d'acide dans le solvant contenant l'ion. L'ionisation par impact électronique (EI), est une méthode de plus haute énergie et donc une méthode d'ionisation plus forte ou plus dure. Comme le décrit son nom, les molécules sont frappées par des électrons qui sont de haute énergie de sorte à, non seulement les ioniser, mais aussi les fragmenter.⁶³

L'ionisation vise à donner une charge aux molécules pour les analyser subséquentement, soit leur impartir un ratio de masse sur charge (m/z) à mesurer par le spectromètre de masse.⁶⁴ L'analyseur est le cœur du MS puisqu'il sépare les ions selon leur m/z . Parfois il s'agit d'éliminer tous les ions qui ne correspondent pas au m/z recherché comme dans un analyseur quadrupôle où les ions en dehors de la gamme de m/z choisie sont éjectés et n'atteignent donc pas le détecteur. Parfois, il s'agit d'une séparation selon le m/z comme c'est le cas d'un analyseur par de temps de vol où tous les ions atteignent le détecteur en ordre de m/z .

Typiquement le spectre résultant est un spectre représentant des pics étroits dont l'intensité reflète l'abondance du m/z auquel ils sont associés comme le montre la figure 1.19. L'axe des abscisses représente

le m/z et l'axe des ordonnées, le nombre total d'ions (ou le TIC pour *total ion count*). Parfois au lieu de TIC, il s'agit de BPI (*base peak intensity*) ou %BPI, ou bien d'abondance relative ; dans tous les cas, peu importe l'unité, il s'agit d'une représentation de l'abondance.

L'abondance n'est pas ce qui est uniquement utilisé lors de l'identification des molécules en MS ; l'identification repose aussi sur le temps de rétention des composés, excepté dans les cas suivants. Le premier cas est celui où l'on confirme l'identification d'une molécule en dopant un échantillon avec le composé que l'on soupçonne. Si l'intensité du pic à identifier dans le spectre MS augmente suite au dopage de l'échantillon avec le composé soupçonné, c'est qu'il s'agit de notre molécule inconnue. C'est ce que nous tenterons de faire pour confirmer l'identification de nos molécules de l'étude HS-SPME-GC-MS qui sera, dans un premier temps, appuyé sur une base de données. C'est aussi ce que nous ferons pour confirmer l'identification de nos molécules de l'étude UPLC-QTOF-MS/MS qui sera basée sur l'analyse de leur spectre MS/MS que nous comparerons aux bases de données de spectre MS/MS. D'ailleurs, l'intensité relative des pics dans un spectre MS/MS est plus importante qu'en MS lorsqu'il s'agit d'identification ; il s'agit du deuxième cas où l'identification est basée sur l'abondance des pics. En effet, le patron de fragmentation que forme l'abondance des différents pics ainsi que la masse des différents fragments formés est propre à chaque molécule. Dans un spectre MS/MS, un pic avec une grande intensité montre que ce fragment a de la facilité à se former, d'où l'importance de l'abondance pour une identification à partir d'un spectre MS/MS. Notez qu'il arrive que des spectres MS/MS soient quasi identiques lorsque les molécules dont ils sont issus sont structurellement semblables.

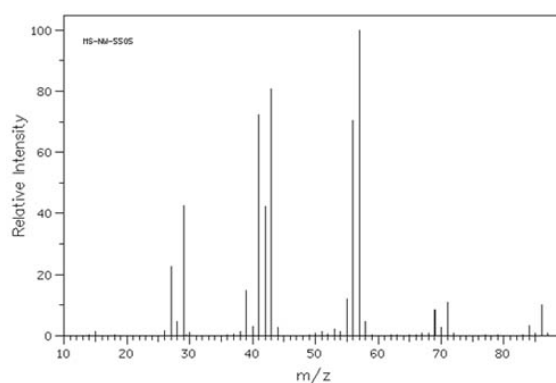


Figure 1.19 - Exemple de spectre issu d'une analyse de l'hexane avec un MS (représentation tirée de Spectrométrie de masse)⁶⁵

1.4.2.1 Quadrupôle

Dans l'étude des composés volatils du sirop d'érable, le quadrupôle est l'analyseur utilisé en GC-MS. Son rôle est d'isoler une marge de m/z choisie, il débarrasse donc des ions plus lourds et plus légers, soit ceux en dehors de la fourchette de masse choisie. Essentiellement, les ions sortant de l'ioniseur passent parallèlement au centre de deux dipôles placés perpendiculairement comme s'il se trouvait aux quatre coins d'un carré imaginaire. Ces pôles sont des tiges cylindriques en métal qui longent le plan z , et c'est au long de ce plan que les ions circulent.

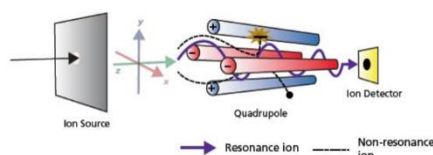


Figure 1.20 - Schéma d'un quadrupôle (représentation tirée de *Introduction to mass analyzers*)⁶⁶

Aux quatre pôles est appliquée une combinaison de courant direct et alternatif, il y a donc un décalage de l'oscillation du voltage alternatif vers des valeurs plus négatives ou plus positives dépendant du voltage associé au courant direct. Pour les pôles associés au voltage positif, il s'agit d'un décalage vers des valeurs positives, ceci implique que le voltage a une valeur positive la plupart du temps, mais, et une valeur négative le reste du temps; l'inverse s'applique aux pôles négatifs. Les pôles de même charge s'opposent dans un même plan. Ici, les pôles positifs se trouvent dans le plan x , et ceux de charge négative, dans le plan y .

Dans le cas où les ions sont positifs et où on ne considère que les pôles positifs dans le plan x - z , la combinaison des courants alternatifs et directs fait en sorte que les ions oscillent au lieu de simplement traverser en ligne droite le quadrupôle dans le cas de courant direct simple en voltage positif. Les ions de plus faible m/z , ayant un momentum plus petit, le court moment où les pôles sont négatifs est suffisant pour les tirer vers les pôles avec une plus grande vitesse. Leur oscillation a alors beaucoup plus d'amplitude que les ions plus lourds puisque leur momentum est plus faible. L'amplitude d'oscillation des ions légers grandit à chaque phase négative, leur trajectoire en est déstabilisée jusqu'à sortir du quadrupôle. C'est ainsi, lorsqu'on choisit une marge de masse m/z à analyser, que les analytes sont isolés des ions légers. Les ions lourds sont dits stables dans ce cas.

Pour ce qui est du plan y - z , le plan où les pôles sont la plupart du temps négatifs, ce sont les ions lourds qui sont éjectés. En effet, la phase positive de ses pôles est trop lourde pour les maintenir au centre, donc tout comme les ions légers dans le plan x - z , leur amplitude augmente de plus en plus et sont donc de

plus en plus déstabilisés au point d'être trop instable pour maintenir leur trajectoire. Ce qui reste quand les ions trop lourds ou trop légers sont éjectés, ce sont les ions avec une masse comprise dans la fenêtre de masse choisie.

Le choix du voltage est important, c'est ce qui définit la fenêtre de masse sur charge des ions à isoler, et établit si un ion passera ou non à travers le quadropôle selon les équations suivantes. L'équation exprimant la valeur « a », est liée au potentiel du courant direct, soit le paramètre « U », alors que la valeur « q », est liée au potentiel du courant alternatif qui est représenté par la « V ».

$$a = \frac{8zeU}{w^2r_0^2m}$$

Équation 1.7 - Paramètre a, où a est le paramètre lié au potentiel du courant direct, e, la charge, U, le potentiel, w, la fréquence du voltage, r, le rayon entre les électrodes, et m, la masse de l'ion.

$$q = \frac{4zeV}{w^2r_0^2m}$$

Équation 1.8 - Paramètre q, où q est le paramètre lié au potentiel du courant alternatif

Les deux équations, lorsque représentées, nous donnent la figure 1.21. On y indique une zone en grisé représentant la zone de stabilité, les ions se trouvant en dehors de cette zone sont éjectés du quadropôle. Comme expliqué, ils peuvent être déstabilisés par les pôles du plan y, à gauche de la zone, ou par les pôles du plan x, à droite de la zone. La courbe linéaire nommée *scan line* est en fait le rapport a/q qui est l'équivalent de $2U/V$, elle est aussi appelée *mass scan line*, soit la ligne de balayage de masse. Les valeurs plus faibles de cette courbe sont associées aux ions plus lourds, et les valeurs plus hautes, des ions plus légers. En augmentant les valeurs de a et q proportionnellement, les masses sont décalées le long de la ligne. Donc, les masses sur charge initialement dans la zone instable se trouvent maintenant dans la zone stable, et celles qui se trouvaient dans la zone stable, se trouvent maintenant dans la zone instable. C'était les ions légers qui étaient initialement stables, ce sont maintenant les ions plus lourds, dits de masse moyenne qui sont maintenant stables. Ce qu'il faut retenir, c'est qu'en augmentant les voltages, la fenêtre de masse sélectionnée se déplace vers des masses plus lourdes.

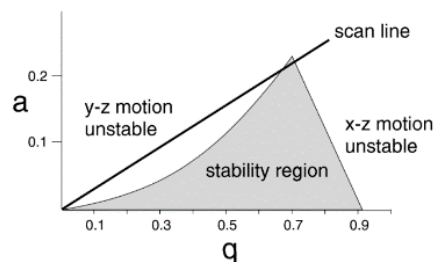


Figure 1.21 - Diagramme de stabilité d'un quadrupôle (représentation tirée de *Ion Optics Through the Eyes of SIMION - An ASMS Short Source*)⁶⁷

La résolution de l'appareil repose sur la proportion de la ligne qui se trouve dans la zone grise (fig. 1.21). Si l'on augmente a sans augmenter q , la pente de la courbe est plus abrupte, la proportion de la ligne dans la zone est par conséquent plus courte. On obtient alors une meilleure résolution, car la marge de masse sélectionnée par le quadrupôle est plus petite, et est donc plus précise. Dans le cas contraire, en diminuant la valeur de a et que q reste inchangé, la pente est alors moins raide et c'est une plus grande proportion du scan *line* qui se trouvera dans la zone. Moins de sélectivité implique une fenêtre de masse plus large ; la résolution souffre alors. Dans la situation extrême où $a = 0$, en d'autres mots dans le cas où il n'y a plus de courant direct, mais qu'un courant alternatif, la ligne longe l'axe des x . Elle est alors complètement dans la région stable, donc tous les ions passent à travers le quadrupôle. Cela peut se révéler utile lorsque l'on cherche à maintenir ou regrouper les ions au centre avant de les transférer, comme c'est le cas pour le quadrupôle central d'un triple quadrupôle qui constitue une cellule de collision.

1.4.2.2 TOF

Un *time-of-flight* (TOF) ou un spectromètre de masse par temps de vol est également un analyseur qui a été utilisé pour l'analyse en LC des composés moins volatils. Son fonctionnement est relativement plus simple que celui d'un quadrupôle. Une fois les molécules ionisées par la source d'ionisation, les ions sont accélérés par un champ électrique généré par une plaque à laquelle un voltage élevé est appliqué. Ce champ ne figure que dans la source. Une fois sortis de celle-ci, les ions parcourent une zone libre de champ.

$$zeV = \frac{mv^2}{2}$$

Équation 1.9, où z est la charge de l'ion, e , la charge élémentaire, V , le voltage, m , la masse de l'ion, et v , sa vitesse

$$v = \sqrt{\frac{2Vze}{m}}$$

Équation 1.10, où il s'agit des mêmes paramètres que l'équation 1.9

$$t = \frac{d}{v}$$

Équation 1.11, où t est le temps, et d, la distance à de la trajectoire de vol

$$\frac{m}{z} = \frac{2eVt^2}{d^2}$$

Équation 1.12, où il s'agit des mêmes paramètres que l'équation 1.9 et 1.11

L'énergie potentielle des ions dans le champ électrique est donnée par leur charge, leur charge élémentaire et le voltage (zeV). Cette énergie se transforme en énergie cinétique lorsqu'ils sont accélérés par le champ électrique. Suivant leur énergie cinétique, les ions parcourent le TOF jusqu'au détecteur ; plus l'ion a une masse faible, plus sa vitesse sera grande. Les ions de petite taille arrivent donc en premier sur le détecteur, car ils prennent moins de temps à parcourir la distance entre la source et le détecteur qui se nomme ici trajectoire de vol (*flight path*). La séparation des ions se fait par « temps » de vol comme le nom l'indique.

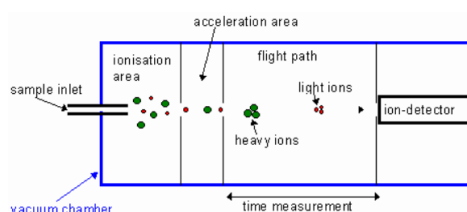


Figure 1.22 - Schéma d'un temps de vol (représentation tirée de *Mass Spectrometry*)⁶⁸

Avant l'invention du réflectron TOF, les analyseurs TOF étaient reconnus pour avoir une résolution faible. Cela était dû au fait que les ions sont dispersés, c'est-à-dire qu'au point de départ, au lieu de partir à une même distance par rapport au détecteur, certains sont plus éloignés de l'entrée de l'échantillon (*sample inlet*) et donc plus proches de la plaque de voltage ce qui correspond à la zone d'accélération (*acceleration area*). Ceux-ci, lorsque le voltage est appliqué, ressentent un champ électrique beaucoup plus fort que ceux qui en sont plus éloignés. Ils ont alors une accélération plus grande que les autres, ce qui vient compromettre l'ordre dans lequel les ions arrivent. L'inverse est vrai pour les ions proches de la sortie de la source ; le

champ électrique y est le moins fort donc leur accélération est plus faible. Ceci contribue aux désordres selon la masse des ions lorsqu'ils arrivent au détecteur.

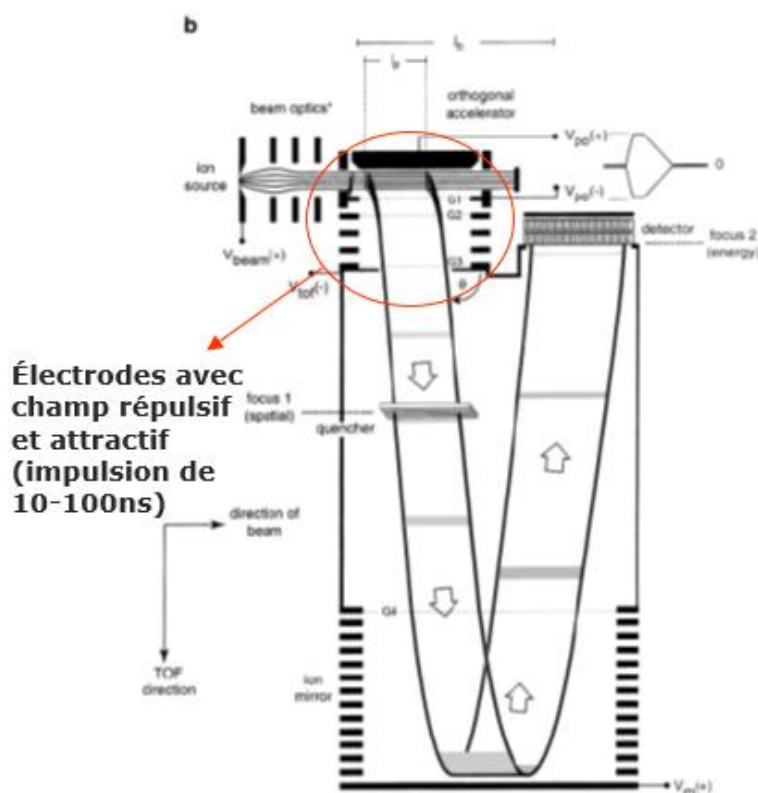


Figure 1.23 - Schéma d'un temps de vol avec réflectron (représentation tirée de M. Guilhaus et *al.* (2000))⁶⁹

Le réflectron TOF corrige ce désordre en appliquant au bout de la trajectoire classique un second voltage de sorte à rediriger les ions vers le détecteur qui se trouve au bout du tube. Ce second voltage est exercé par un dispositif nommé miroir à ions. Tous les ions seront ralentis complètement par ce miroir avant de repartir dans la direction voulue. La différence entre les ions d'énergie nominale ou ceux de plus faible ou de plus forte énergie, c'est que ceux de basse énergie pénètrent moins profondément dans le miroir alors que ceux de plus haute énergie pénétreront plus profondément dans le miroir. Ainsi, ceux qui, dû à leur plus grande accélération avaient parcouru une distance plus grande, repartent au point 0, et il en est de même pour ceux qui, dû à leur faible accélération, avaient parcouru une distance plus courte. Le réflectron permet donc de normaliser les vitesses des ions de même m/z de sorte qu'ils arrivent en même temps au détecteur. Ceci a donc pour conséquence de fortement d'augmenter la résolution en masse et de se fait, d'augmenter la précision sur la mesure de la masse.

1.4.2.3 QTOF

Les deux quadrapôles d'un *quadrupole time-of-flight* (QTOF), ont chacun une fonction différente, l'un sert de séparateur comme c'est le cas d'un quadrapôle classique, et l'autre peut servir de cellule de collision. Vu la présence de deux quadrapôles, cet appareil peut être appelé QqTOF, c'est le deuxième « q » qui fait référence à la cellule de collision. La partie TOF est l'équivalent du troisième quadrapôle d'un triple quadrapôle, la différence est que la résolution est supérieure dans le cas où un TOF est utilisé.

Ceci introduit la notion de fragmentation et de spectrométrie de masse en tandem (MS/MS). Dans son expression la plus simple, la MS en tandem consiste à sélectionner un ion précurseur, de le fragmenter et de mesurer les m/z de l'ensemble des ions fragments produits. L'ion fragmenté porte le nom l'ion précurseur et ses fragments, ions produits. Quand il y a fragmentation, un fragment portant une charge est produit, ce qui constitue notre ion produit, et le second est neutre. Seulement l'ion produit chargé est analysable par le spectromètre de masse. La fragmentation peut être faite sur un ion en particulier comme en MS/MS classique, ou sur l'ensemble des ions injectés, comme en MSe.

La spectrométrie en tandem, consiste à utiliser plus d'un analyseur, souvent deux, séparé par une cellule à collision (compartiment de fragmentation). L'un permet de faire une séparation avant la fragmentation, et le deuxième, après. Cela permet de sélectionner un ion précis pour le fragmenter pour ensuite obtenir un patron de fragmentation d'une seule molécule.

Cependant, dans le cas du QTOF utilisé, il n'y a qu'un seul quadrapôle. Celui-ci est suivi de ce qu'appelle l'entreprise Waters, une entreprise qui fabrique et conceptualise les spectromètres de masse, un *trivave*. Le *trivave* est constitué de trois compartiments : *trap*, *ion mobility separator*, et le *transferer*. Respectivement, ces compartiments permettent de faire une dissociation par transfert d'électrons (ETD), séparation par mobilité ionique (IMS), et une dissociation (fragmentation) induite par collision (CID). Le deuxième compartiment peut ne pas être actif tout comme le QTOF peut être utilisé en mode MS au lieu du mode MS/MS. L'ETD est une forme de fragmentation tout comme l'est le CID. En plus de servir de cellule de collision, le *trivave* donne beaucoup de flexibilité à l'appareil, mais les détails des différentes fonctionnalités qu'il propose ne sont pas ce qui nous intéresse ici.⁷⁰

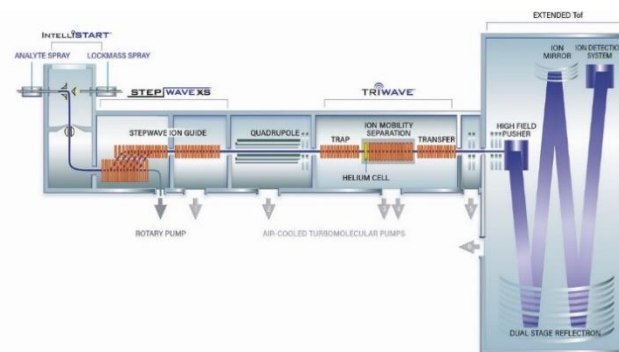


Figure 1.24 - Schéma d'un QuantTOF (représentation tirée de *Waters Corporation*)⁷¹

Les ions finissent par être transférés dans le TOF. Cela dit, ce TOF en mode réflectron a la particularité d'être un QuantTOF. Le QuantTOF possède un miroir à ion en plus du réflectron principal de sorte à faire voler les ions avec une trajectoire en forme de « w », d'où le nom de *dual stage reflection*. Cela permet de rallonger la distance à parcourir sans avoir besoin d'augmenter les dimensions de l'appareil.

Pour notre étude UPLC-QTOF-MS/MS, nous utiliserons le *Waters Synapt G2-S* QTOF-MS (*Waters Corp.*, Milford, MA) qui est en fait un QuantTOF comme celui représenté dans la figure 1.24. C'est un appareil qui a une grande sensibilité et fournit une haute résolution de masse.⁷² Le fait qu'il possède un QTOF nous permet pour la partie MS de l'étude de conserver le plus possible les analytes. En effet, avant de les fragmenter en mode MS/MS pour leurs identifications, il nous faut les sélectionner parmi toutes les molécules issues de nos échantillons détectées par l'instrument à travers un traitement de données, et ce, sous leur forme intacte pour qu'on puisse considérer comme un composé et non un fragment de composé. C'est seulement sur les composés sélectionnés que nous appliquerons une fragmentation MS/MS pour les identifier.

1.5 Objectifs

Comme résumé dans la section 1.1 de ce mémoire, d'importantes pertes économiques dans l'industrie acéricole sont dues au goût de bourgeon qui survient dans le sirop d'érable en fin de saison de récolte de la sève d'érable. Quelques études ont tenté d'identifier les molécules responsables de ces goûts et d'autres cherchent à compléter le profil moléculaire du sirop et de la sève d'érable. C'est dans ce contexte que nous chercherons ici à identifier les molécules responsables du goût de bourgeon ou à confirmer les études précédant la nôtre. Pour ce, nous comparerons les sirops d'érable à goût de bourgeon classés $\sqrt{R5}$ au sirop d'érable régulier, soit sans défaut de saveur, classé REG. Cette comparaison se fera pour les composés organiques volatils à travers une étude SPME-GC-MS, et pour les composés plus lourds apolaires à travers

une étude UPLC-QTOF-MS/MS. Une fois les composés issus de l'étude SPME-GC-MS identifiés par une base de données, ils seront d'abord filtrés par une analyse statistique suivie par une analyse des composantes principales sur lequel nous construirons un modèle de prédiction pour prédire le type de sirop basé sur son profil moléculaire. L'étude UPLC-QTOF-MS/MS se fera en deux temps; une première partie consistera à filtrer les molécules parmi celles détectées au MS et les associés à l'un des deux types de sirop à l'étude et une deuxième partie aura pour but de fragmenter en MS/MS les molécules afin de les identifier. Dans un second temps, nous chercherons également à découvrir des molécules jamais rapportées auparavant comme faisant partie de la composition du sirop d'érable afin de contribuer à compléter son profil moléculaire que cela soit au niveau des composés volatils ou des composés plus lourds.

En associant des molécules au défaut de saveur de type bourgeon, il sera possible dans de prochains projets de recherche de confirmer nos résultats ou alors de trouver un moyen de les détecter directement dans la sève. L'étape suivante sera la mise en pratique de cette méthode de détection et d'évaluer avec quelle exactitude il est possible de déterminer à quel moment le défaut de goût lié au bourgeonnement se manifeste. Ainsi, cela évitera aux acériculteurs de subir les retombées économiques liées au processus d'évaporation et à la classification de la sève récoltée.

2 HS-SPME-GC/MS

2.1 Partie expérimentale

2.1.1 Préparation des échantillons

Notez que tous les échantillons proviennent des récoltes du printemps 2021 et qu'ils nous ont été fournis directement par différents acériculteurs de la province de Québec en collaboration avec la PPAQ et le Centre ACER. Ils ont été classés, évalués et étiquetés préalablement à cette expérience par le Centre ACER.

Dans une fiole à espace de tête (ou tête de fiole) de 10 mL (Restek Corporation, Bellefonte, PA), 3.80 ± 0.02 g de sirop d'érable y sont déposés. À cela, 5 μ L d'une solution de 1000 ppm de pyrazine-d4 (étalon interne) dilué dans l'eau Milli-Q sont ajoutés suivis de 2 mL d'une solution d'eau Milli-Q saturée en NaCl (*Millipore Sigma*, Oakville, ON). La fiole est fermée et mélangée avant d'être déposée dans un bain-marie chauffé à 60 °C pendant au moins 10 min avant la phase d'extraction. Le blanc est préparé de la même façon exceptée qu'au lieu du sirop d'érable, il s'agit de 3 mL d'eau Milli-Q.

La seringue du porte-fibre SPME perce ensuite le bouchon pour y exposer complètement la fibre SPME de 1 cm au-dessus du liquide dans la tête de fiole. Pour ce, le porte-fibre est ajusté à 1,2 cm d'exposition de la tige de métal contenant la fibre. L'extraction se fait par une exposition dans la tête de fiole pour une durée de 40 min. Une fois terminée, la fibre est d'abord rétractée avant de retirer le porte-fibre. Des tests préalables ont été effectués pour déterminer le type de fibre le plus approprié. Dans notre cas, il s'agit d'une fibre 50/30 μ m DVB/CAR/PDMS de *Millipore Sigma*, soit une fibre avec un revêtement divinylbenzène carboxen polydiméthylsiloxane.

2.1.2 Méthode SPME-GC-MS

Le porte-fibre est ajusté à 4 cm pour l'introduction dans le port d'injection du GC-MS. L'exposition de la fibre est ainsi complète et dure 2 min dans l'entrée du GC (*inlet*) tenu à 250 °C et en *splitless mode* (mode sans division). L'analyse GC-MS se fait avec l'hélium comme gaz vecteur (1.0 mL/min) durant 42,5 min dans une colonne de silice fondue *SUPELLOWAX 10* de 30 m x 0.25 mm; 0.5 μ m installés dans un GC *Agilent Technologies 6890N Network GC System* couplé avec un *Agilent Technologies 5973 Network Mass Selective Detector*. Pour ce qui est du gradient de la température du four : la température est maintenue à 40°C pendant 3 min, ensuite elle varie de 5 °C/min jusqu'à 200 °C puis à 8 °C/min jusqu'à 240 °C où elle est maintenue pendant 10 min. La température de la ligne de transfert MSD (*Mass Selective Detector*) en *scan mode* est réglée à 280 °C, l'ionisation par impact électronique est faite à 70 eV à une température de 230 °C. Le MSD était réglé pour une gamme de m/z entre 30 et 300.

Entre chaque analyse, la fibre est nettoyée en utilisant le GC; le gaz vecteur entraîne continuellement pendant 5 min les molécules restées adsorbées sur la fibre. De la même façon, avant chaque série d'extractions, la fibre est conditionnée par un nettoyage dans le GC pour une durée de 30 min.

2.1.3 Traitement de données

Les données recueillies ont d'abord été traduites en format CEF pour pouvoir être traitées sur *Agilent MassHunter Qualitative*. Une déconvolution a été effectuée sur les données avec les paramètres présentés dans le tableau 2.1.

Tableau 2.1 - Paramètre de déconvolution effectué sur *Agilent MassHunter Qualitative*

Settings	<i>Resolution</i>	100
	<i>Spectrum peak threshold</i>	0
	<i>SNR threshold</i>	2
Extracted window	<i>Left m/z delta</i>	0.3
	<i>Right m/z delta</i>	0.7
	<i>m/z delta units</i>	AMU
Component shape	<i>Sharpness threshold</i>	25%
Compound filters	<i>Absolute area</i>	5000 counts
	<i>Relative area</i>	1%

Ensuite un projet a été ouvert sur *Mass Profiler Professional* (ou MPP) pour la suite du traitement de données. Chaque échantillon a été associé à l'une des classes de couleur du sirop d'érable en se basant sur le tableau 2.2, à sa transmittance exacte, à son groupe de transmittance ($T \geq 50\%$ ou $< 50\%$), au type de sirop (soit 5 pour $\sqrt{R5}$ ou 0) et à son numéro d'échantillon. Plusieurs tests ont été effectués pour aboutir aux paramètres permettant d'avoir le plus de composés possibles tout en évitant la répétabilité des composés (tableau 2.3). L'ajustement a été particulièrement important au niveau de la tolérance de temps de rétention (*retention time tolerance*) car pour des temps de rétention plus petits, plusieurs composés se répétaient.

Tableau 2.2 - Catégorie de couleur du sirop d'érable

Couleur	Goût	Transmittance (%)
Très foncé	Prononcé	0.0-25.0
Foncé	Robuste	26.0-50.0
Ambré	Riche	51.0-75.0
Doré	Délicat	76.0-100.0

Tableau 2.3 - Paramètres de l'expérience sur *Mass Profiler Professional*

Alignment Parameters	<i>Retention time tolerance</i>	0.45 min
	<i>Match Factor</i>	0.3%
Normalization Criteria	<i>Internal Standard</i>	84.0@14.51
	<i>Baseline Options</i>	<i>Baseline to median of all samples</i>

Chaque entité a été identifiée à l'aide du logiciel ID Browser basé sur la base de données *NIST05a.L*. Les paramètres pour le test statistique sont dans le tableau 2.4.

Tableau 2.4 - Paramètres de l'analyse statistique effectuée sur *Mass Profiler Professional* : TTest unpaired

Input Parameters	<i>Exclude missing values form calculation of fold change and p-value</i>	No
Select Test	<i>Condition 1</i>	0 (type REG)
	<i>Condition 2</i>	5 (type $\sqrt{R5}$)
	<i>Select test</i>	<i>TTest unpaired</i>
p-value Computation		<i>Asymptotic</i>
Multiple Testing Correction		<i>Storey with Bootstrapping</i>
Results	<i>corrected p-value cut-off</i>	0.05

Les paramètres du modèle de prédiction de type de sirop basé sur les composés résultants du test statistique sont regroupés dans le tableau 2.5.

Tableau 2.5 - Paramètre du modèle de prédiction pour le type de sirop

Input Parameters	<i>Entity list</i>	(Liste des mêmes 42 entités issue du test-t)
	<i>Interpretation</i>	Type (type de sirop ; soit type REG ou $\sqrt{R5}$)
	<i>Class prediction algorithm</i>	<i>Decision Tree</i>
Validation Parameters	<i>Pruning method</i>	<i>None</i>
	<i>Goodness function</i>	<i>Gini</i>
	<i>Leaf impurity</i>	5
	<i>Leaf impurity type</i>	<i>Global</i>
	<i>Validation type</i>	<i>N-Fold</i>
	<i>Number of folds</i>	3
	<i>Number of repeats</i>	10
	<i>Attribute Fraction at</i>	1

2.2 Résultats et discussions

Dans cette section, nous mènerons une analyse comparative sur les composés organiques volatils extraits du sirop d'érable sans défaut de saveurs, que nous nommerons le sirop REG, et le sirop de goût de bourgeon classé $\sqrt{R5}$. La technique SPME-GC-MS permet une étude non ciblée visant à déterminer les composés organiques volatils qui peuvent potentiellement être responsables du goût de bourgeon. Pour ce, plusieurs échantillons de sirop d'érable de type REG et type $\sqrt{R5}$ des producteurs locaux ont été analysés selon les manipulations décrites dans la section précédente, soit respectivement 78 et 31 pour un total de 109 échantillons.

Dans un premier temps, nous exerçons une série de filtrations sur l'ensemble des entités extraites incluant des tests statistiques de sorte à obtenir une liste regroupant les entités statistiquement plus abondantes dans l'un des deux types de sirop à l'étude. Ces entités seront nommées les entités HITs, la liste qui les regroupe se nommera donc la liste de HIT. Notez que ce qu'on entend par « entité », c'est un composé détecté par l'analyse GC-MS, c'est-à-dire une masse sur charge associée à un temps de rétention.

S'ensuit une analyse des composantes principales (PCA) sur les échantillons pour appuyer la liste des HITs. Il sera aussi question d'analyser le patron issu de la PCA en prenant en compte le classement de couleur des échantillons, mais aussi l'usure des instruments. Par l'usure des instruments, nous entendons que les instruments utilisés tels que la fibre SPME et la colonne chromatographique sont sujets à perdre de leur efficacité à travers le temps dû à leur utilisation. C'est pourquoi, en plus de classer les échantillons selon leur type de sirop, ils seront également classés par le mois au cours duquel ils ont été analysés. L'analyse PCA se terminera par une étude du patron des entités HITs pour déterminer les composés covariants dans le sirop d'érable.

En cours de route, nous regrouperons les caractéristiques olfactives, soit l'odeur ou la saveur, des HITs et tenterons de déterminer parmi eux les composés qui sont associés à un goût désagréable. Ces données seront basées sur diverses bases de données et permettront de mieux cerner parmi les HITs ceux responsables du goût d'ail ou de choux associé au goût de bourgeon.

La section se terminera par la présentation d'un modèle de prédiction basé sur un algorithme d'arbre à décision. Ce modèle est une seconde manière de valider les entités HITs comme étant les entités responsables du goût de bourgeon chez les sirops $\sqrt{R5}$. Une conclusion résumera les hypothèses posées pour ce qui pourrait être en cause du goût de bourgeon et les découvertes faites pour ce qui est de la composition du sirop d'érable.

2.2.1 Optimisation de la méthode

Le développement de la méthode a d'abord déterminé la fibre SPME idéale à utiliser. Pour nos premiers tests, 20 échantillons de sirop d'érable ont été utilisés; la moitié d'entre eux était de type $\sqrt{R5}$, et l'autre moitié, de type REG. Ils n'ont pas été sélectionnés par transmittance, leur catégorie de couleur (présenté dans le tableau 2.2) est donc aléatoire, cependant ils sont tous du Québec et de la même saison de récolte : hiver-printemps 2019. Noter que ces 20 échantillons ne figurent pas parmi les 109 échantillons utilisés pour générer nos résultats, à savoir l'ensemble des entités détecté dans le sirop d'érable mentionné dans la section suivante et les traitements de données effectués sur celle-ci.

Pour la sélection de la fibre SPME idéale pour notre étude, une comparaison des fibres DVB/CAR/PDMS et CAR/PDMS a été effectuée. Les données récoltées ont d'abord été normalisées selon l'étalon interne séparément; les données issues de la fibre CAR/PDMS n'ont pas été normalisés avec ceux de la fibre DVB/CAR/PDMS. S'ensuit une filtration des données qui inclut l'application de tests statistiques sur l'ensemble des entités détectées. Le nombre d'entités résultant de l'extraction utilisant la fibre DVB/CAR/PDMS a été comparé à celui résultant de l'extraction où la fibre CAR/PDMS a été employé. Plus d'entités statistiquement plus abondantes dans l'un des types de sirop à l'étude ont été détectées par la fibre DVB/CAR/PDMS, soit 10 entités de plus que la fibre CAR/PDMS.

Un étalon interne est utilisé pour la normalisation et c'est la pyrazine-d₄ qui a été choisie pour jouer ce rôle. Il a déjà été mentionné à plusieurs reprises dans des travaux précédents que le sirop d'érable contient plusieurs dérivées de pyrazine, or, pour que l'effet de la matrice sur notre étalon interne soit similaire à celui subi par les molécules qui la compose, nous avons choisi un composé présent dans celle-ci. Pour qu'il soit distingué de la pyrazine au MS, nous avons choisi une version deutérée de la molécule : pyrazine-d₄.

Il a été question de modifier la quantité d'étalons interne ajoutée aux échantillons. Au départ, ce n'était pas 5 μ L de pyrazine-d₄ à 1000 ppm qui étaient ajoutés lors de la préparation des échantillons, mais 2 μ L. Le signal de l'étalon interne sur le chromatogramme était peu visible, donc la quantité fut augmentée pour être certain qu'il soit considéré par le *Mass Profiler Professional* (MPP). Le MPP est le logiciel sur lequel tout traitement de données a été effectué, sauf pour la déconvolution ayant été faite sur *Agilent MassHunter Qualitative*.

Une fois les méthodes d'extraction et de traitement de données optimisées, s'ensuit alors l'analyse de 78 échantillons de sirop de type $\sqrt{R5}$ et 31 de type REG selon les manipulations décrites dans la partie expérimentale.

2.2.2 Alignement et normalisation

Les données issues de l'analyse GC-MS subissent d'abord un alignement puis une normalisation. L'alignement des données consiste à choisir une fenêtre de temps de rétention (*retention time tolerance*) et

un facteur de correspondance (*match factor*). La fenêtre de temps de rétention permet d'aligner et de regrouper les composés non identifiés provenant d'échantillons différents ensemble lorsque leur temps de rétention se trouve à l'intérieur de cette fenêtre. Le facteur de correspondance est le score de similarité que les spectres MS de ces deux composés doivent avoir au minimum pour être considérés comme identiques. Ces deux paramètres ont été choisis de sorte à générer le plus d'entités possible tout en s'assurant que le pic de l'étalon interne soit visible par le MPP à travers tous les spectres GC et MS fournis. Le nombre total d'entités est alors de 328. S'ensuit la normalisation qui a été faite selon l'étalon interne, la pyrazine-d₄, qui correspond à l'entité 84.0@14.5. Les entités, avant d'être identifiées, sont notées ainsi : m/z@RT, où m/z est la masse sur charge et RT, le temps de rétention. L'alignement permet alors d'éviter de compter le même composé plus d'une fois lorsqu'il se retrouve dans plus d'un échantillon. La correction de la ligne de base (baseline) des spectres a été faite sur la médiane de tous les échantillons, ce qui revient à soustraire à chaque échantillon l'abondance médiane des composés à travers tous les échantillons. Ceci permet alors d'empêcher les composés à abondance élevée d'exercer une influence disproportionnée sur les résultats d'analyse de regroupement et de covariance.

2.2.3 Filtration des données : Diagramme de Venn et *fold change*

Les 328 entités générées à la suite de l'alignement des données et la normalisation sont dans cette section filtrées dans le but d'obtenir une liste d'entités plus restreinte. La filtration se fait dans le but de trouver les molécules qui sont plus abondantes dans les sirops d'érable $\sqrt{R5}$ ou les sirops d'érable REG.

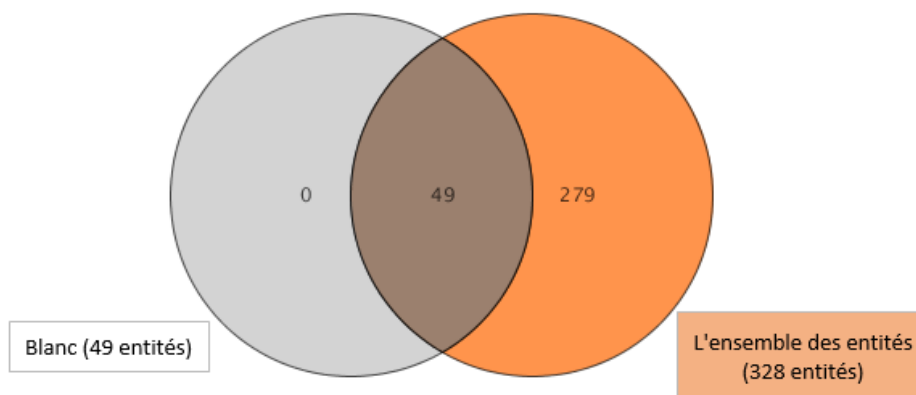


Figure 2.1 - Diagramme de Venn des entités à travers les blancs (section grise) et l'ensemble des entités issues des blancs et des échantillons de sirop d'érable (section orange).

La première étape de filtration est une exclusion des entités que l'on retrouve dans les blancs des 328 entités qui comprennent les entités retrouvées dans les blancs et celles retrouvées dans les échantillons de sirop d'érable. Pour cela, nous avons construit le diagramme de Venn de la figure 2.1. La section orange regroupe les entités générées à partir d'échantillons de sirop des deux types ainsi que des blancs; comme expliqué, la normalisation s'est effectuée sur leurs données. La section grise regroupe les entités générées à partir de la normalisation effectuée sur les blancs uniquement. Les blancs ayant été utilisé pour généré les entités de la section orange, il est normal qu'il n'y pas d'entité qui se trouve en dehors de la section orange.

Cette façon de procéder nous permet de facilement créer une nouvelle liste d'entités qui exclue celles présentes dans les blancs. Nous nous retrouvons alors avec une liste filtrée de 279 entités.

Dans le MPP, les analyses comparatives demandent qu'on se base sur une interprétation. Une interprétation permet de poser ce que l'on cherche à comparer selon les paramètres des échantillons, soit les paramètres que nous avons associés à nos échantillons tels que la transmittance ou le type de sirop associé. L'interprétation suivante compare les échantillons de type REG à ceux de classe $\sqrt{R5}$.

La deuxième filtration utilise l'analyse statistique utilisant le test-t indépendant avec, comme seuil, une valeur p (*p-value*) de 0.05. La correction de tests multiples (*multiple testing correction*) *Storey with Bootstrapping* a été utilisée; la correction de tests multiples consiste essentiellement à éliminer les faux positifs. Le *fold change* (FC) est aussi calculé pour chacune des entités et le tout est représenté par le graphique volcan (*volcano plot*) de la figure 2.2. Dans le côté droit du graphique volcan, se trouve les composés qui sont plus abondants dans les sirops de type REG, ceux qui le sont dans les sirops de type $\sqrt{R5}$ se trouvent à gauche.

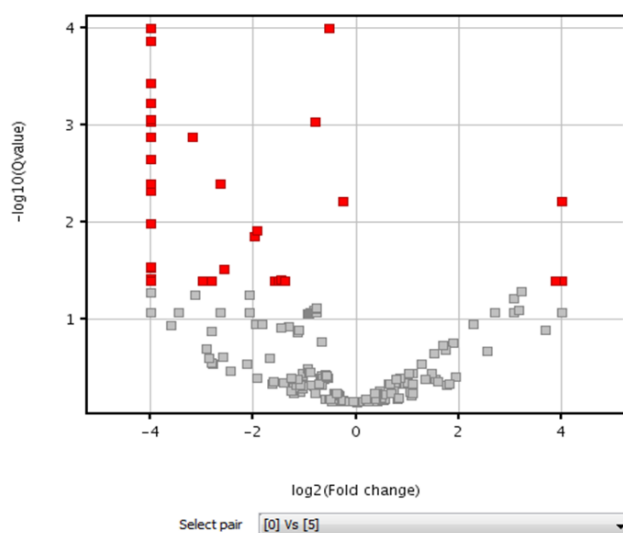


Figure 2.2 - *Volcano plot* représentant le *fold change* des 279 entités basées sur l'interprétation comparant les échantillons de type REG et de type $\sqrt{R5}$. Les points rouges représentent les 42 entités qui dépassent les critères de la valeur p ; ils sont regroupés selon leur type dans le tableau 2.6 avec la valeur de leur *fold change* respectif.

Une valeur de \log_2FC négative signifie que le composé assigné a généralement une abondance plus élevée dans un sirop classé $\sqrt{R5}$ alors qu'une valeur positive signifie une abondance plus accrue dans un sirop classé sans défaut de goût. Chose que nous avons vérifiée qualitativement sur les chromatogrammes. Voici l'exemple du composé **(5)** dans la figure 2.3. Notez que les HITs sont désormais associés au numéro qui leur a été attribué dans le tableau 2.6. Il se peut parfois qu'au lieu de les nommer par leur nom et leur numéro, qu'on les nomme par leur numéro seulement ; ce numéro sera toujours écrit entre parenthèse et en gras comme c'est le cas pour le composé **(5)** que l'on vient de mentionner. Aussi, à partir de maintenant, la couleur rouge est assignée aux composés (ou valeurs) associés au type REG et la couleur bleue au type $\sqrt{R5}$, et ce, pour le reste de ce mémoire.

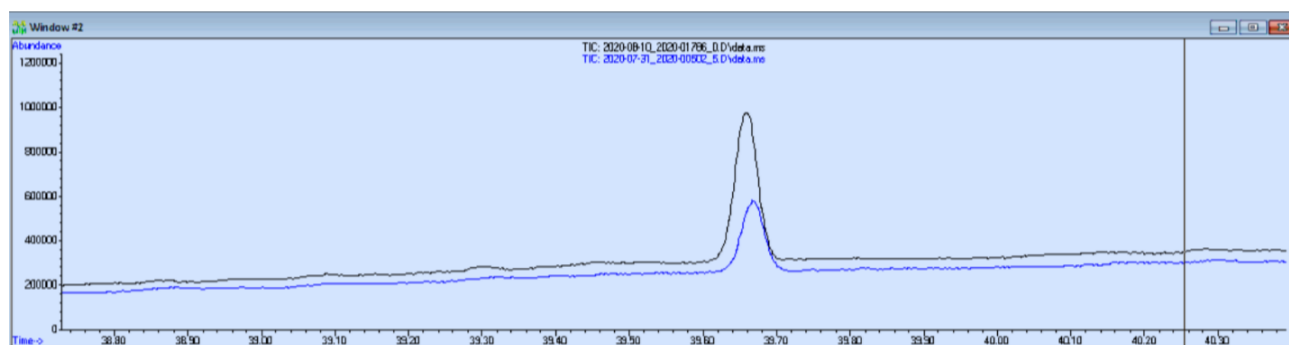


Figure 2.3 – Chromatogramme du pic du composé (5) issu de *Enhanced MSD Chemstation*, en noir chromatogramme d'un échantillon REG, et en bleu, celui d'échantillon $\sqrt{R5}$

Tableau 2.6 - Listes des 42 composés statistiquement différents entre les classes de sirop 0 et $\sqrt{R5}$; « Les 42 HITs ». Les cases bleues signifient que le composé est plus abondant dans les sirops $\sqrt{R5}$ et les cases rouges sont pour les composés plus abondants dans les sirops REG.

#	Nom du composé	log ₂ FC	#	Nom du composé	log ₂ FC
1	Pyrazine, 2,6-diméthyl-	-2,99	22	Pyrazine, 2,3-diméthyl-	-7,09
2	Pyrazine, 2,5-diméthyl-	-3,99	23	Pyrazine, 3-éthyl-2,5-diméthyl- 20.9	-1,99
3	Pyrazine, 2-éthyl-6-méthyl-	-4,72	24	9,9-Diméthoxybicyclo[3.3.1]nona-2,4-dione 29.9	-2,65
4	Acide 2-furancarboxylique	-2,82	25	Acide (R-(R*,R*))-4-(1,5-diméthylhexyl)-1-cyclohexèncarboxylique	-1,98
5	Ester bis(2-méthylpropyl) d'acide 1,2-benzènedicarboxylique 39.6	-0,52	26	Bicyclo[2.2.1]heptan-2-one, 1-(bromométhyl)-7,7-diméthyl-, (1S)-	-6,20
6	3-Méthylène-2-norbornanone	-5,60	27	Acide 7,7-diméthyl-2-oxo-bicyclo[2.2.1]heptane-1-méthanesulfonique, (+/-)-	-6,26
7	Pyrazine, triméthyl-	-6,04	28	55.0@33.6	-4,74
8	Phénol, 2,6-bis(1,1-diméthyléthyl)-	-0,79	29	Cyclohexanone, 5-méthyl-2-(1-méthyléthényl)-, trans-	-3,97
9	Disulfure, diméthyle	-9,64	30	Cyclohexane, 1,5-diméthyl-2,3-divinyl-	-4,15
10	Pyrazine, 2-éthyl-5-méthyl-	-4,25	31	2,3'-Bipyridine, 1',3,4,4',5,5',6,6'-octahydro-	-2,58
11	trans-2,3-Époxydécane	-4,56	32	Pyrazine, tetraméthyl-	-1,93
12	Bicyclo[2.2.1]heptan-2-one, 1,7,7-triméthyl-, (1R)-	-7,82	33	Cyclopentane, 1-acétoxyméthyl-3-isopropényl-2-méthyl-	-1,39
13	149.0@41.1	-4,56	34	Spiro[2.4]heptan-4-one	-1,39
14	Pyrazine, 3-éthyl-2,5-diméthyl-	-9,59	35	60.0@41.7	-0,25
15	Pyrazine, éthyl-	-6,93	36	Uracil, 5-éthyl-	-0,25
16	Cyclopentanone, 2-méthyl-	-1,51	37	46.0@41.8	-1,58
17	117.0@38.9	-6,80	38	Acide 1,3-benzènedicarboxylique, 5-(1,1-diméthyléthyl)- 4.4	-0,25
18	Ester bis(2-méthylpropyl) d'acide 1,2-benzènedicarboxylique 40.5	-6,70	39	Cyclopropane, 1,1-dichloro-2-(1-éthylpropyl)-2-méthyl-	-3,19
19	149.0@40.1	-4,40	40	151.0@40.3	5,17
20	2,3-Diméthyl-5-éthylpyrazine	-10,71	41	Hexanal, 3,3-diméthyl-	5,55
21	Cédrol	-1,47	42	3-Pentanol, 2,2-diméthyl-	3,88

Dans le tableau 2.6, la plupart des composés jugés comme ayant une quantité différente entre les deux types sont plus abondants dans les échantillons de type $\sqrt{R5}$, et ce, systématiquement. Je dis systématiquement parce que cette même analyse statistique a été effectuée sur différentes listes d'entités ainsi qu'avec différents paramètres pour chaque étape du traitement de données, et ce, avec/sans filtrage des composés présent dans les blancs ; peu importe les circonstances, les composés les plus significatifs semblent se trouver surtout dans les échantillons $\sqrt{R5}$. La liste représentée dans le tableau 2.6 sera parfois référée à la liste des « 42 HITs » à partir de maintenant.

2.2.4 Analyse en composantes principales

Dans cette section, nous utilisons l'analyse des composantes principales (PCA) pour valider la liste des 42 HITs issue de la filtration. Nous étudierons aussi les patrons représentés dans les graphiques issus de la PCA pour mieux comprendre nos résultats. Pour ce, il nous faut comprendre comment ils sont construits et comment lire un graphique PCA.

La PCA permet de réduire les dimensions pour les données qui ont un grand nombre de dimensions, ce qui est justement notre cas. Pour expliquer ce qu'on entend par dimension, prenons en exemple 2 échantillons. Pour chacun de ces échantillons, la composition est faite des mêmes molécules dont la quantité varie entre les deux. La première dimension vient du premier échantillon, soit la dimension S1 où chaque composé a une abondance connue. Cette dimension est linéaire et il en est de même pour la dimension du deuxième échantillon, soit la dimension S2. Lorsque les deux échantillons sont comparés, les deux dimensions sont combinées de sorte à générer un graphique plan avec comme axe des x, la dimension S1, et l'axe des y, la dimension S2. Chaque point de ce graphique représente un composé où ses coordonnées sont les abondances qu'il ont dans les dimensions S1 et S2 pour leurs coordonnées x et y. La combinaison d'une troisième dimension génère un graphique en trois dimensions, mais ceci se complique quand il y a plusieurs échantillons comme c'est le cas dans notre étude.

Dans le cas d'un graphique en deux dimensions, la composante principale représentant la variabilité la plus importante est tracée sur l'étendue de l'éparpillement le plus important de composés; elle est appelée composante principale 1 (P1). La composante principale 2 (P2) représente la deuxième plus importante variabilité, et ainsi de suite pour le reste des composantes principales. C'est toujours sur les deux plus importantes variabilités dans les données que les PCA sont construites, soit sur P1 et P2. Essentiellement, les PCA génèrent deux représentations : les *scores* aussi dit *score plot* (carte factorielle) et les *loadings* aussi dit *loading plot*. Dans une carte factorielle, les échantillons sont représentés en un patron reflétant leur similarité en termes de covariance de leurs composés, ils sont alors à proximité, ou leur différence, dans ce cas ils sont éloignés. Un loading plot représente, dans notre cas, les composés sur lesquels la carte factorielle est construite. La proximité des composés représente leur covariance à travers les composés. La position qu'ils possèdent sur le graphique est liée aux échantillons dans lesquelles ils sont le plus abondants. Les *loadings* sont responsables du patron observé dans les cartes factorielles et peuvent être associés à des spectres ou à la réponse instrumentale.

2.2.4.1 Classification des REG vs $\sqrt{R5}$

Comme mentionné, nous cherchons ici à valider la liste des 42 HITs. En effet, si les composés regroupés dans cette liste sont ce qui a de plus différents entre le profil moléculaire des sirops $\sqrt{R5}$ et des sirops REG, nous devrions observer deux regroupements d'échantillons distincts où dans l'un se trouve les échantillons $\sqrt{R5}$ et dans l'autre, les échantillons REG. Une autre possibilité de patron qui validerait nos résultats serait une distance entre d'un côté les échantillons de sirop REG et de l'autre, les échantillons de sirop $\sqrt{R5}$. La différence avec le cas précédent est que les échantillons ne sont pas regroupés entre eux, mais qu'il y est une distance plus importante entre les échantillons de types différents qu'entre les échantillons du même type. Ce deuxième cas permet les échantillons de même type à avoir des différences qui pourraient être dues à d'autres facteurs tels que la transmittance, la possibilité de biais systématique lors des analyses ou alors de sa provenance. Lorsqu'on parle de « provenance », nous tenons compte du fait que la variation de température, les conditions climatiques locales, la qualité du sol, le soin que porte l'acériculteur à l'arbre peuvent influencer la composition de la sève et donc, celle du sirop d'érable. Pour cela, basée sur les composés résultant de l'analyse statistique et des paramètres du tableau 2.4, une analyse en composantes principales a été effectuée (fig. 2.4).

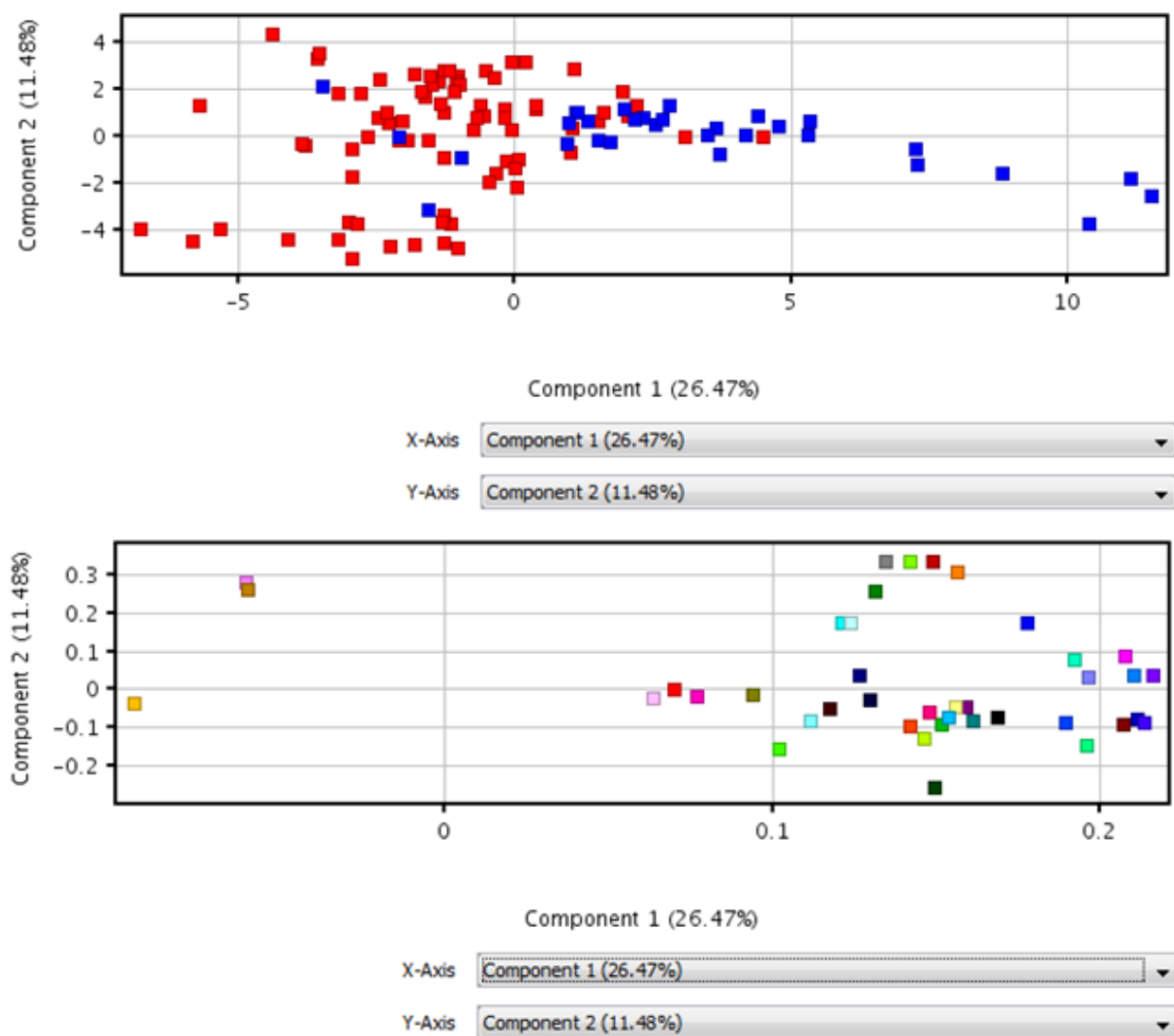


Figure 2.4 - Représentation dans la figure supérieure de la carte factorielle (a) et dans la figure inférieure des *loadings* (b) de l'analyse des composantes principales sur tous les échantillons de type REG (rouge) et les échantillons de type VR5 (bleu) basée sur les 42 HITs. Chaque couleur des points dans le *loading plot* représente un composé.

La carte factorielle (figure 2.4a) montre que les échantillons REG se trouvent en majorité dans le côté gauche du graphique, soit à gauche de l'ordonnée à l'origine. Quant aux échantillons VR5, ils se trouvent majoritairement à droite de l'ordonnée à l'origine. Il y a donc un certain degré de regroupement selon le type. Selon la composante 1 (composant 1), les échantillons VR5 sont plus éparpillés que les échantillons REG. Effectivement, les sirops VR5 s'étendent sur plus de 15 unités sur l'échelle de l'axe des x, alors que les sirops REG s'étendent sur environ 10 unités de l'axe. Ceci n'est pas le cas si l'on regarde

l'éparpillement selon la composante 2 (component 2); les échantillons $\sqrt{R5}$ sont moins éparpillés que les échantillons REG.

La proximité entre plusieurs échantillons de type $\sqrt{R5}$ et REG, témoigne soit que la composition du sirop d'érable régulier, c'est-à-dire sans défaut de goût, est parfois fort similaire à ceux avec le défaut de saveur bourgeon, soit qu'un certain nombre de composés sont retrouvés dans les deux types de sirops ou soit la méthode utilisée pour générer la liste d'entités sur laquelle le PCA est construit n'est pas assez sévère. Pour le troisième cas, il nous faudrait restreindre la liste de composés sur laquelle on construit la carte factorielle. Ceci peut être accompli en diminuant la valeur p , soit le seuil de sélection du graphique volcan (figure 2.2). Toutefois, le diagramme de Venne de la figure 2.1 indique qu'il s'agit de l'un des deux premiers cas puisqu'il montre que les sirops $\sqrt{R5}$ ont 58 composés en commun avec les sirops REG.

Dès lors, plusieurs questions se posent dont les suivantes ; se pourrait-il que ce rapprochement soit dû au fait que ceux concernés proviennent du même producteur ou se pourrait-il qu'ils aient la même classe de couleur. S'ils proviennent en effet du même producteur, cela impliquerait que les propriétés du sol, de la météo locale et du maniement du sirop priment sur l'effet du bourgeonnement sur la composition du sirop. Cette question est vite écartée, car en plus d'avoir été choisis au hasard, les échantillons ne sont pas étiquetés selon leur provenance.

Malgré cette proximité, on observe que la majorité des échantillons de type REG se retrouve du côté gauche de l'axe des ordonnées, et que les types $\sqrt{R5}$ sont à droite de l'axe. Il en est de même pour les *loadings* ; le côté gauche regroupe 151.0@40.3 (**40**), hexanal, 3,3-diméthyl- (**41**) et 3-pentanol, 2,2-diméthyl- (**42**). Ces composés étant du même côté que la plupart des points rouges sont donc en plus grande abondance dans les sirops de type REG, chose également exprimée par leur $\log_2 FC$ (tableau 2.6). Ceci est aussi vrai pour les *loadings* du côté gauche par rapport aux sirops de type $\sqrt{R5}$.

Pour en revenir à la question (deux paragraphes plus hauts) qui propose que le chevauchement des deux types soit à cause de la transmittance similaire des échantillons se trouvant dans l'enchevêtrement, nous avons construit d'autres PCA dans le but d'y répondre. Ils sont discutés dans la section suivante.

2.2.4.2 Classification par transmittance

Dans cette section nous répondons à la question posée dans la section précédente : est-ce que l'enchevêtrement des échantillons REG et $\sqrt{R5}$ dans la carte factorielle construite sur les 42 HITs (figure 2.4) est dû à leur transmittance. En d'autres mots, ces échantillons sont-ils de même classe de couleur ou alors de classe de couleur adjacentes? Si oui, est-ce que d'autres échantillons $\sqrt{R5}$ et REG de mêmes classes de couleurs se trouvent ailleurs. Pour cela, nous avons construit une carte factorielle qui se base sur les mêmes HITs que ceux de la figure 2.4, soit les 42 HITs. Cependant, les échantillons de la classe de couleur

dorée (76.0 à 100.0 % de transmittance) sont exclus puisqu'il n'y a aucun échantillon $\sqrt{R5}$ de cette classe parmi nos échantillons. Le MPP ne permet pas de générer une carte factorielle s'il n'y a pour cette classe que des échantillons REG de couleur dorée et aucun $\sqrt{R5}$ de la même couleur. Bref, ceci nous donne la figure 2.5.

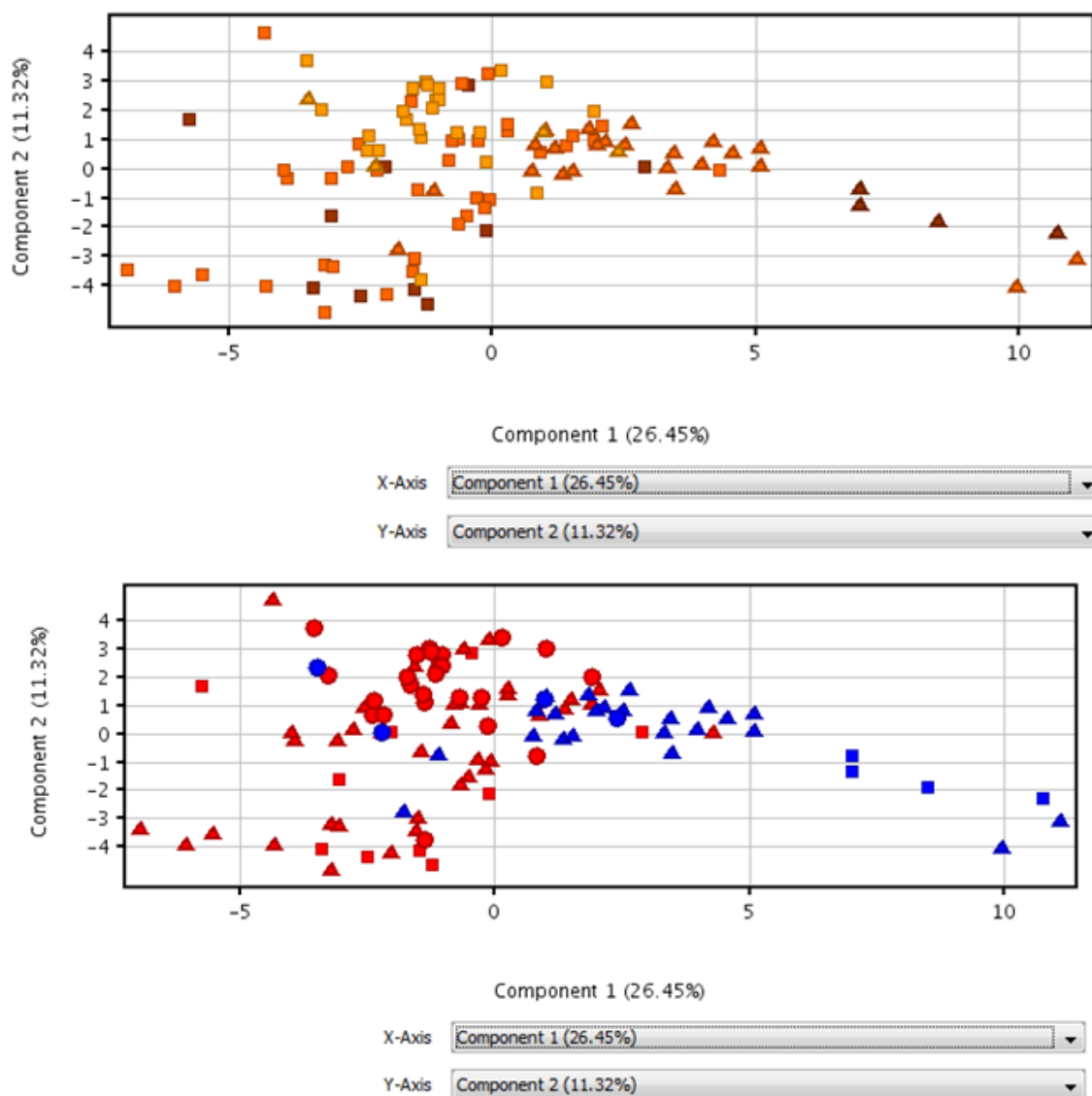


Figure 2.5 – Carte factorielle comparant selon le type de sirop les échantillons de couleur très foncée (T = 0.0-25.0 %), foncée (T = 26.0-50.0 %) et ambrée (T = 51.0-75.0 %) basée sur les 42 HITS. La figure supérieure (a) a une légende de couleur des points selon la transmittance et la forme des points, selon le type : brun pour couleur très foncée, orange pour couleur foncée, jaune pour couleur ambrée, carré pour type REG et triangle pour type $\sqrt{R5}$. La figure inférieure (b) a une légende de la couleur des points selon le type et la forme des points, selon la couleur du sirop : rouge pour type REG, bleu pour type $\sqrt{R5}$, carré pour couleur très foncée, triangle pour couleur foncée et cercle pour couleur ambrée.

Il est possible d'observer, dans la figure 2.5, que les échantillons REG et $\sqrt{R5}$ de l'enchevêtrement sont soit de couleur foncée ou ambrée, des couleurs qui sont adjacentes sur l'échelle de transmittance puisqu'elles incluent respectivement les échantillons de transmittance entre 26.0-50.0 % et 51.0-75.0 %. Puisque ces deux gammes de transmittance sont voisines, nous pouvons considérer que les échantillons de l'enchevêtrement sont de transmittance similaire. Cela dit, les échantillons de ces mêmes gammes de transmittance se retrouvent partout à travers le graphique, et ce, qu'ils soient de type REG ou $\sqrt{R5}$. L'enchevêtrement n'est donc pas dû à la transmittance, c'est-à-dire la couleur du sirop d'érable.

La question sur le lien entre l'enchevêtrement des deux regroupements d'échantillons et la transmittance maintenant répondu, nous pouvons nous pencher sur les autres observations faites sur la figure 2.4a. La première étant celle constatant l'éparpillement des échantillons $\sqrt{R5}$ selon l'axe des x. Est-ce que le fait qu'ils ne soient pas regroupés ensemble serait en lien avec la transmittance? Aussi, est-ce que leur patron est déterminé par la transmittance des échantillons? Pour commencer à répondre à ces questions, nous pouvons d'abord revoir la figure 2.5a; les échantillons $\sqrt{R5}$ les plus à gauche du graphique sont des échantillons de couleur foncée ou très foncée. Ceux se trouvant le plus à droite sont de couleur plus claire, soit de couleur foncée ou ambré. Il y a donc une tendance de regroupement selon la transmittance au sein des échantillons de type $\sqrt{R5}$ qui ressort. Ce regroupement par transmittance est mis en évidence dans la PCA suivante (figure 2.6).

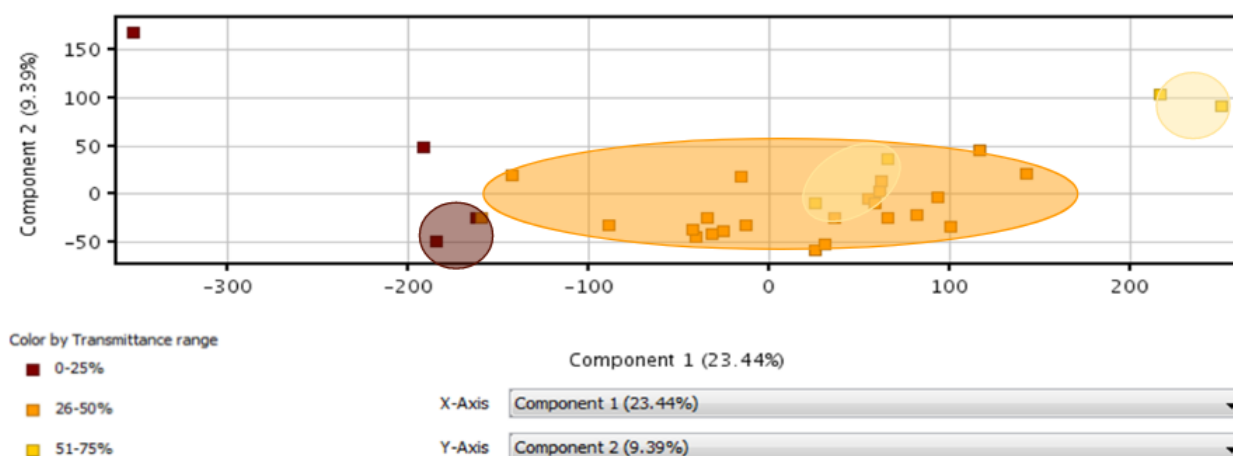


Figure 2.6 - Carte factorielle comparant selon la couleur de sirop les échantillons $\sqrt{R5}$ de couleur très foncée ($T = 0.0-25.0\%$), foncée ($T = 26.0-50.0\%$) et ambrée ($T = 51.0-75.0\%$) basée sur 95 entités issues de l'analyse statistique *one way ANOVA* (valeur $p < 0.05$) qui a comparé l'abondance des composés selon la couleur du sirop.

La carte factorielle de la figure 2.6 représente les échantillons $\sqrt{R5}$ uniquement et a été construite à partir des entités différentes en abondance entre les différentes gammes de transmittance, soit entre les différentes gammes de couleurs. On y voit que les échantillons de couleur très foncée sont distancés de

ceux qui sont de couleur ambre. Les échantillons de couleur foncée sont éparpillés au milieu et servent de pont entre les deux. Voilà qui met en évidence le regroupement des échantillons selon la couleur bien qu'ils soient de même type. Ceci explique aussi pourquoi les échantillons $\sqrt{R5}$ ne sont pas éminemment regroupés entre eux.

Une deuxième observation avait été faite précédemment selon laquelle les échantillons REG étaient particulièrement éparpillés selon l'axe des y. La figure 2.5a illustre un dégradé de couleur le long de l'axe des y pour les échantillons REG; les échantillons ambrés se trouvent généralement dans la partie supérieure du graphique alors que les échantillons très foncés se situent plus souvent dans la partie inférieure du graphique. Les échantillons foncés sont, comme pour les échantillons $\sqrt{R5}$, tout le long de l'axe, mais surtout au milieu. Pour mettre en évidence ce gradient de couleur au sein de sirop REG, une autre carte factorielle a été construite (figure 2.7)

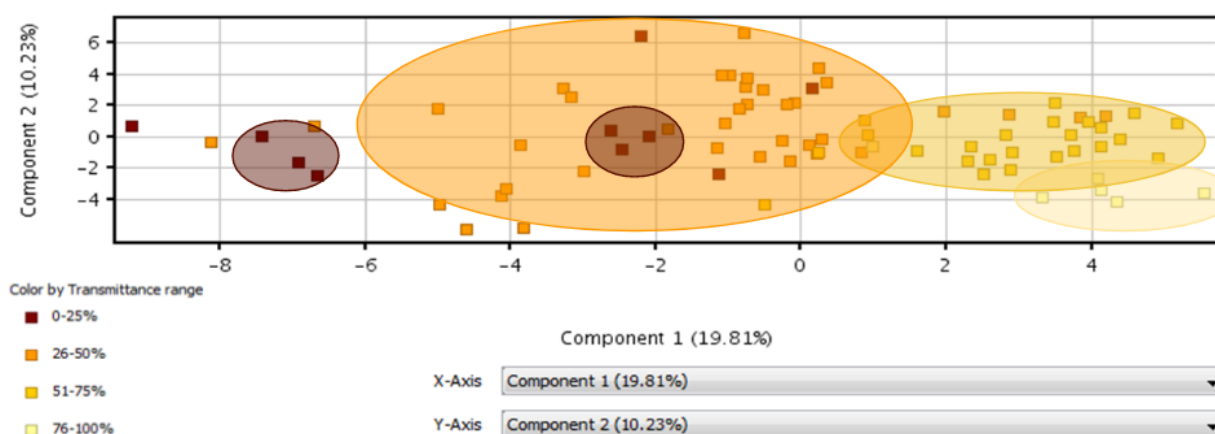


Figure 2.7 - Carte factorielle comparant selon la couleur de sirop les échantillons REG de couleur très foncée (T = 0.0-25.0 %), foncée (T = 26.0-50.0 %), ambrée (T = 51.0-75.0 %) et dorée (T = 76.0-100.0 %) basée sur 66 entités issues de l'analyse statistique *one way ANOVA* (valeur $p < 0.05$) qui a comparé l'abondance des composés selon la couleur du sirop.

La carte factorielle de la figure 2.7 représente uniquement les échantillons REG et a été construite à partir des entités qui sont différentes en abondance entre les différentes gammes de transmittance, soit entre les différentes gammes de couleurs. On y retrouve le même patron de dégradé de couleur observé au sein des échantillons $\sqrt{R5}$ dans la figure 2.6, excepté que cette fois des échantillons dorés sont inclus. Ils respectent, comme attendu, l'évolution de la couleur des échantillons de très foncé à doré.

Des figures 2.6 et 2.7, nous observons autre chose : la variation de la composante 1 est plus importante pour le sirop $\sqrt{R5}$ (23.44 %) que pour le sirop REG (19.81 %). Ceci ajoute une explication au patron observé dans la figure 2.5. En effet, l'axe des x étant toujours associé à la composante 1, soit la composante exprimant le plus de variation à travers les échantillons, il est logique que dans la figure 2.5 le

dégradé de couleur des échantillons $\sqrt{R5}$ soit selon l'axe des x et que celui des échantillons REG, selon l'axe des y.

2.2.4.3 Biais dans la méthode

Nous avons mentionné dans la section 2.2.4.1 la possibilité que d'autres facteurs puissent être responsables du patron de la proximité des certains échantillons $\sqrt{R5}$ avec des échantillons REG tel qu'un biais systématique survenu lors de l'analyse sur plusieurs semaines des échantillons. En effet, l'utilisation de la même fibre SPME ou de la même colonne de GC pendant une période trop longue peut affecter leur sensibilité et la sélectivité. Nous tenterons donc de vérifier s'il y a un biais ou non par l'analyse de composantes principales en incluant parmi les paramètres le mois au cours duquel l'échantillon a été analysé.

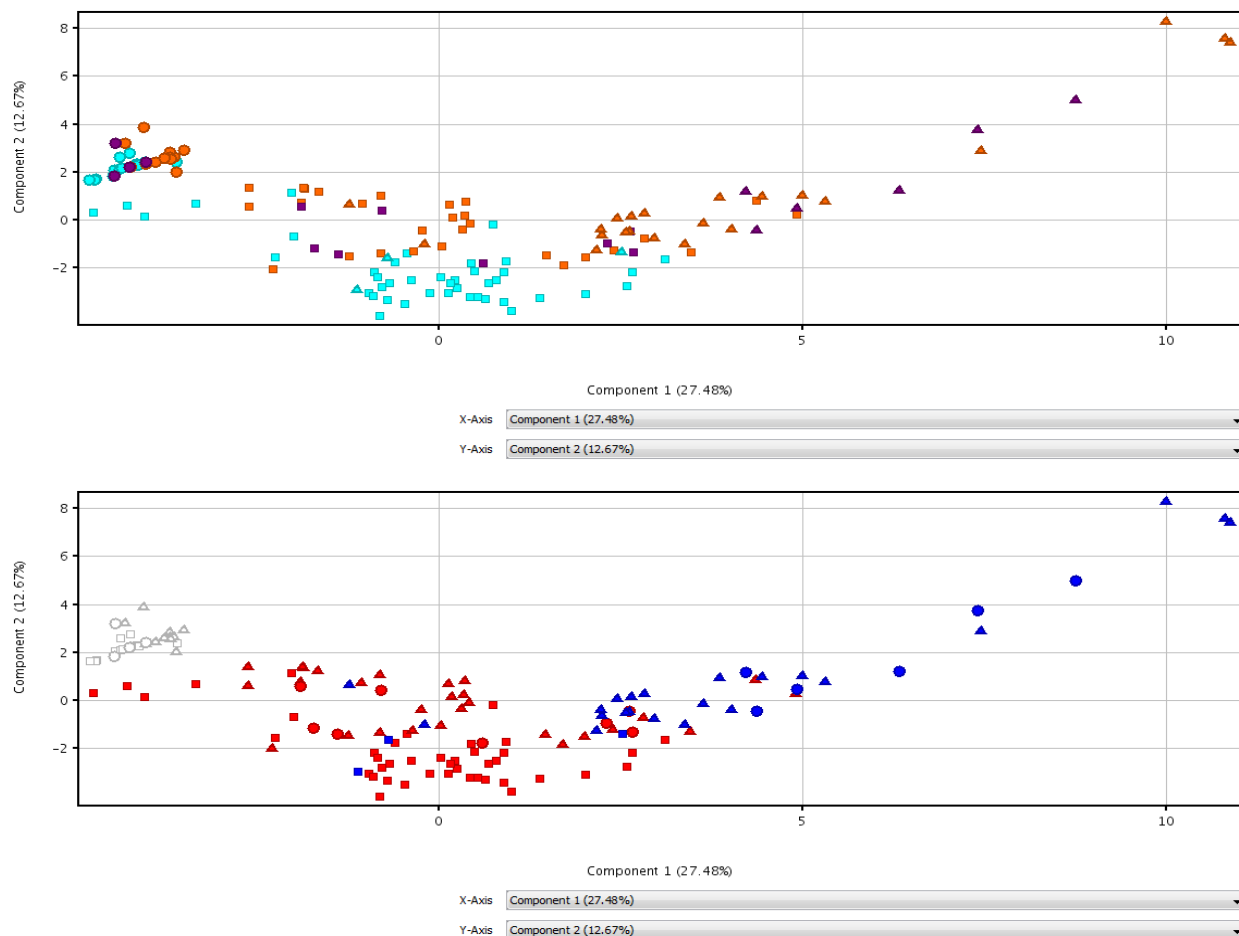


Figure 2.8 - Carte factorielle comparant selon le mois d'analyse des échantillons $\sqrt{R5}$, REG et des blancs basée sur 279 entités, soit l'ensemble des entités détectées exclut ceux présents dans les blancs. Dans la figure du haut (a) en turquoise sont les échantillons analysés au mois d'août, en mauve, ceux du mois septembre et en orange, ceux du mois d'octobre. Les points de forme triangulaires sont les échantillons $\sqrt{R5}$, les points en forme de carré sont les échantillons REG et les blancs sont représenté par les cercles. Dans la figure du bas (b) les carrés sont les échantillons analysés au mois d'août, les triangles, ceux du mois septembre et les cercles, ceux du mois d'octobre. Les points bleus sont les échantillons $\sqrt{R5}$, les points rouges sont les échantillons REG et les points blancs représentent les blancs.

La figure 2.8 représente une carte factorielle incluant les échantillons $\sqrt{R5}$ et REG ainsi que les blancs. Elle est basée sur les 42 HITs et compare les échantillons selon leur type et le mois au cours desquels ils ont été analysés. Selon le patron des échantillons de la figure 2.8a, il semble effectivement qu'il y a un regroupement selon le mois puisque les échantillons analysés au cours du mois d'août se trouvent dans la partie inférieure du graphique. Cependant, tous les échantillons analysés au mois d'août sont de type REG, il s'agit donc d'un regroupement selon le type. Ceci est d'ailleurs mis en évidence dans la figure 2.8b, les échantillons $\sqrt{R5}$ se trouvent du côté droit, les échantillons REG se situent au milieu et les blancs sont distinctement regroupés entre eux à gauche du graphique.

Aussi, parmi les blancs, il s'avère que de gauche à droite se trouvent ceux analysés en août, en septembre et en octobre; ils sont regroupés en ordre dans le temps. Ceci est aussi observé de bas en haut au sein des échantillons REG, mais pas pour les échantillons $\sqrt{R5}$. De plus, pour les échantillons, il ne s'agit pas de regroupement net. D'ailleurs, le regroupement selon le type se fait le long de l'axe de la composante 1 (27.48 %) qui compte pour une variance plus importante que celle de la composante 2 (12.67 %). Or, le regroupement observé verticalement pour les échantillons REG se fait selon l'axe de la composante 2. Nous concluons que l'effet provenant de l'usure des matériaux sur nos échantillons de sirop d'érable est faible et qu'il n'affecte pas nos résultats puisque le regroupement selon le type est éminent et que celui selon le mois est infime.

Pour conclure l'analyse PCA, il y a en effet une différence en matière d'abondance de certains composés entre les sirops classés $\sqrt{R5}$ et ceux classés sans défaut de goût. Au fur et à mesure qu'on avance dans la saison des récoltes, c'est à dire, au fur et à mesure que la couleur des sirops d'érable s'intensifie, ce qui différencie les types de sirop devient de plus en plus lié à ce qui diminue la transmittance. Aussi, il y a un enchevêtrement entre les deux types de sirop, chose qui ne semble pas être causée par l'usure des instruments ni la transmittance.

2.2.5 Apport de saveur

Dans cette section, notre attention se porte les 42 HITs. Il sera question de regrouper à partir de la littérature les goûts ou les odeurs de chacun d'entre eux afin de cerner lequel ou lesquels possèdent un goût ressemblant à celui du sirop de bourgeon, à savoir un goût d'ail ou de choux.

Comme vous l'aurez remarqué, plusieurs composés de la liste des 42 HITs (tableau 2.6) n'ont pas pu être identifiés par le *ID Browser*, ils ne pourront pas être étudiés pour leur contribution de saveur qu'elle soit bonne ou mauvaise. C'est malheureusement incommode pour les entités associées au type REG, car cela les réduit à 2 composés ; le reste est associé au type $\sqrt{R5}$, soit 35 entités type $\sqrt{R5}$, ce qui revient à 36 HITs identifiés. Ils sont malgré cela inclus dans les tableaux suivants et sont, cette fois-ci, regroupés par famille de composé en plus d'être associés à leur numéro qui sera mis en parenthèse et écrit en gras dans cette section et dans le reste de ce mémoire.

De plus, des composés reviennent deux fois dans la liste ce qui peut être dû à une fenêtre de temps de rétention pas assez large (choisi lors de l'étape d'alignement; section 2.2.2) : l'ester bis(2-méthylpropyl) d'acide 1,2-benzènedicarboxylique (**5, 18**), la pyrazine, 3-éthyl-2,5-diméthyl- (**14, 23**) et le 149.0 (**13, 19**), et ce, à deux temps de rétention différents. Ceci réduit encore une fois la liste pour un total de 34 entités.

Tableau 2.7 - Odeurs ou saveurs associées aux composés HITS de la famille des composés organiques, composés organohétérocycliques, diazines et pyrazines (en rouge sont les HITS associés aux sirops REG et, en bleu, ceux associés aux sirops √R5)

#	Nom du composé	Odeur
1	2,6-Diméthylpyrazine (<i>Pyrazine, 2,6-dimethyl- or 2,6-Dimethylpyrazine</i>)	noisette/café ⁷⁴
2	2,5-Diméthylpyrazine (<i>Pyrazine, 2,5-dimethyl- or 2,5-Dimethylpyrazine</i>)	terreux/pomme de terre ⁷⁴
3	2-Éthyl-6-méthylpyrazine (<i>Pyrazine, 2-ethyl-6-methyl- or 2-Ethyl-6-methylpyrazine</i>)	pomme de terre rôtie ⁷⁴
7	Pyrazine, triméthyl- (<i>Pyrazine, trimethyl- or 2,3,5-Trimethylpyrazine</i>)	odeur de noix rôtie/pomme de terre au four ⁷⁴
10	Pyrazine, 2-éthyl-5-méthyl (<i>Pyrazine, 2-ethyl-5-methyl- or 2-Ethyl-5-methylpyrazine</i>)	odeur de noisette/ rôti/herbe ⁷⁴
14	Pyrazine, 3-éthyl-2,5-diméthyl- (<i>Pyrazine, 3-ethyl-2,5-dimethyl- or 3-Ethyl-2,5-dimethylpyrazine or 2-Ethyl-3,6-dimethylpyrazine or 3,6-Cocoa pyrazine</i>)	noisette grillée/chocolaté/sucré/odeur boisée ⁷⁴
15	Pyrazine, éthyl- (<i>Pyrazine, ethyl- or 2-Ethylpyrazine</i>)	odeur de moisi/de noisette/de beurre de cacahuète ⁷⁴
20	2,3-Diméthyl-5-éthylpyrazine (<i>2,3-Dimethyl-5-ethylpyrazine or 5-Ethyl-2,3-dimethylpyrazine</i>)	arôme de cacao profondément torréfié ⁷⁴
22	Pyrazine, 2,3-diméthyl (<i>Pyrazine, 2,3-dimethyl- or 2,3-Dimethylpyrazine</i>)	odeur de noisette/cacao ⁷⁴
23	Pyrazine, 3-éthyl-2,5-diméthyl- (<i>Pyrazine, 3-ethyl-2,5-dimethyl- 20.913332 or 3-Ethyl-2,5-dimethylpyrazine or 2-Ethyl-3,6-dimethylpyrazine or 3,6-Cocoa pyrazine</i>)	noisette grillée/chocolaté/sucré/odeur boisée ⁷⁴
32	Pyrazine, tétraméthyle (<i>Pyrazine, tetramethyl- or 2,3,5,6-Tetramethylpyrazine</i>)	odeur de moisi/fermenté/café ⁷⁴

Tableau 2.8 - Odeurs ou saveurs associées aux composés HITS de la famille des composés organiques, benzoides, benzène et dérivés substitués, acides benzoïques et dérivés et esters d'acide benzoïque (en rouge sont les HITS associés aux sirops REG et, en bleu, ceux associés aux sirops √R5)

#	Nom du composé	Odeur
5	Ester bis(2-méthylpropyl) d'acide 1,2-benzènedicarboxylique (<i>1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-methylpropyl) ester 39.641907 or Diisobutyl phthalate</i>)	légère odeur d'ester ⁷⁷
18	Ester bis(2-méthylpropyl) d'acide 1,2-benzènedicarboxylique (<i>1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-methylpropyl) ester 40.518757 or Diisobutyl phthalate 1,2-</i>)	légère odeur d'ester ⁷⁷

Tableau 2.9 - Odeurs ou saveurs associées aux composés HITS de la famille des composés organiques, lipides et molécules apparentées aux lipides, lipides de prénil et monoterpénoïdes (en rouge sont les HITS associés aux sirops REG et, en bleu, ceux associés aux sirops √R5)

#	Nom du composé	Odeur	Sous-classe
6	3-Méthylène-2-norbornanone (3-Methylene-2-norbornanone or 3-Methylidenebicyclo[2.2.1]heptan-2-one or 2-Norbornanone, 3-methylene-)	-	Monoterpénoïdes bicycliques
12	Bicyclo[2.2.1]heptan-2-one, 1,7,7-triméthyl-, (1R)- (Bicyclo[2.2.1]heptan-2-one, 1,7,7-trimethyl-, (1R)- or Camphor or 2-Camphonone)	arôme diffusif chaud / mentholé / presque éthéré ⁷⁴	Monoterpénoïde, Bicyclique
26	Bicyclo[2.2.1]heptan-2-one, 1-(bromométhyl)-7,7-diméthyl-, (1S)- (Bicyclo[2.2.1]heptan-2-one, 1-(bromomethyl)-7,7-dimethyl-, (1S)- or 1-(Bromomethyl)-7,7-dimethylbicyclo[2.2.1]heptan-2-one or 10-Bromocamphor)	-	Monoterpénoïdes bicycliques
27	Acide 7,7-diméthyl-2-oxo-bicyclo[2.2.1]heptane-1-méthanesulfonique, (+/-)- (Bicyclo[2.2.1]heptane-1-methanesulfonic acid, 7,7-dimethyl-2-oxo-, (+/-)- or camphorsulfonic acid or (7,7-Dimethyl-2-oxobicyclo[2.2.1]heptan-1-yl)methanesulfonic acid or d-Camphorsulfonic acid)	-	Monoterpénoïdes bicycliques
29	Cyclohexanone, 5-méthyl-2-(1-méthyléthényl)-, trans- (Cyclohexanone, 5-methyl-2-(1-methylethenyl)-, trans- or Menthone)	odeur de menthe ⁷⁴	Monoterpénoïdes de menthane
33	Cyclopentane, 1-acétoxy-méthyl-3-isopropényl-2-méthyl- (Cyclopentane, 1-acetoxymethyl-3-isopropenyl-2-methyl- or (3-Isopropenyl-2-methylcyclopentyl)methyl acetate)	-	Monoterpénoïdes monocycliques

Tableau 2.10 - Odeurs ou saveurs associées aux composés HITS de la famille des composés organiques, lipides et molécules apparentées aux lipides, lipides de prénil et sesquiterpénoïde (en rouge sont les HITS associés aux sirops REG et, en bleu, ceux associés aux sirops √R5)

#	Nom du composé	Odeur	Sous-classe
21	Cédrol (<i>Cedrol</i>)	arôme doux/fruity/cèdre ⁷⁴	Cedran et isocedrane sesquiterpénoïde
25	Acide (R-(R*,R*))-4-(1,5-diméthylhexyl)-1-cyclohexènegarboxylique ((R-(R*,R*))-4-(1,5-Dimethylhexyl)-1-cyclohexenecarboxylic acid or (SDBS No.: 34104) or 4-(1,5-Dimethylhexyl)-1-cyclohexene-1-carboxylic acid)	-	-

Tableau 2.11- Odeurs ou saveurs associées aux composés HITs appartenant à différentes familles de composés

#	Nom du composé	Odeur	Familles de composés ⁷³
4	Acide 2-furoïque (2-Furancarboxylic acid or 2-Furoic acid)	inodore, goût terreux acide/caramélisé ⁷⁵	Composés organiques, Composés organohétérocycliques, Furanes, Acide furoïque et dérivés, Acides furoïques
8	Phénol, 2,6-bis(1,1-diméthyléthyl)- (Phenol, 2,6-bis(1,1-diméthylethyl)- or 2,6-Di-tert-butylphenol)	Inodore ⁷⁹	Composés organiques, Benzénoïdes, Benzène et dérivés substitués, Phénylpropanes
9	Disulfure, diméthyle (Disulfide, dimethyl)	semblable à l'oignon ⁷⁴ odeur d'ail ⁸⁰ odeur désagréable ⁸¹ chou cuit ⁸²	Composés organiques, Composés organosoufrés, Disulfures organiques, Disulfures de dialkyle
11	trans-2,3-époxydécane (trans-2,3-epoxydecane or Oxirane, 2-heptyl-3-methyl-, trans- or 2-Heptyl-3-Methyloxirane)	-	Composés organiques, Composés organohétérocycliques, Epoxydes
16	Cyclopentanone, 2-méthyl- (Cyclopentanone, 2-methyl- or 2-Methylcyclopentanone or 3-Methyl-2-cyclopentanone)	-	Composés organiques, Composés organiques oxygénés, Composés organooxygénés, Composés carbonylés, Cétones, Cétones cycliques
24	9,9-Diméthoxybicyclo[3.3.1]nona-2,4-dione (9,9-Dimethoxybicyclo[3.3.1]nona-2,4-dione 29.9 or Bicyclo[3.3.1]nonane-2,4-dione, 9,9-dimethoxy-)	-	Composés organiques, Composés organiques oxygénés, Composés organooxygénés, Éthers, Acétals, Cétals
30	Cyclohexane, 1,5-diméthyl-2,3-divinyl- (Cyclohexane, 1,5-diméthyl-2,3-divinyl- or 1,5-Diméthyl-2,3-divinylcyclohexane)	-	Composés organiques, Hydrocarbures, Hydrocarbures insaturés, Oléfines, Oléfines cycliques
31	2,3'-Bipyridine, 1',3,4,4',5,5',6,6'-octahydro- (2,3'-Bipyridine, 1',3,4,4',5,5',6,6'-octahydro- or Hystrine)	-	Composés organiques, Composés organohétérocycliques, Pyridines et dérivés, Hydroxyridines, Tétrahydroxyridines
34	Spiro[2.4]heptane-4-one (Spiro[2.4]heptan-4-one or Spiro[2.4]heptan-7-one)	-	Composés organiques, Composés organiques oxygénés, Composés organooxygénés, Composés carbonylés, Cétones
41	Hexanal, 3,3-diméthyl (Hexanal, 3,3-diméthyl- or 3,3-Diméthylhexanal)	-	Composés organiques, Composés organiques oxygénés, Composés organooxygénés, Composés carbonylés, Aldéhydes, Aldéhydes à chaîne moyenne
42	3-Pentanol, 2,2-diméthyl- (3-Pentanol, 2,2-diméthyl- or 2,2-Diméthyl-3-pentanol)	-	Composés organiques, Composés organiques oxygénés, Composés organooxygénés, Alcools et polyols, Alcools secondaires

Tableau 2.12 – Composé HITs sans famille de composés (en rouge sont les HITs associés aux sirops REG et, en bleu, ceux associés aux sirops $\sqrt{R5}$)

#	Nom du composé
13	149.0@41.080444
17	117.0@38.866005
19	149.0@40.135006
28	55.0@33.6427
35	60.0@41.69
36	Uracile, 5-éthyl- (Uracil, 5-ethyl-)
37	46.0@41.752
38	Acide 1,3-benzènedicarboxylique, 5-(1,1-diméthyléthyl)- (1,3-Benzenedicarboxylic acid, 5-(1,1-dimethylethyl)- 4.42)
39	Cyclopropane, 1,1-dichloro-2-(1-éthylpropyl)-2-méthyl- (Cyclopropane, 1,1-dichloro-2-(1-ethylpropyl)-2-methyl-)
40	151.0@40.25806

Dans les tableaux 2.7 à 2.10, les HITs sont regroupés selon leur famille de composés. Les familles de composés pour lesquelles il n'y a qu'un HIT sont toutes regroupées dans le tableau 2.11 et les composés HITs pour lesquels il n'a pas été possible de déterminer la famille de composés, ce qui naturellement inclue les HITs non identifiés, sont regroupés dans le tableau 2.12. Dans ces mêmes tableaux sont regroupé les odeurs des HITs identifiés pour tenter de déterminer ceux responsables de l'odeur ou du goût désagréable qui caractérise le sirop d'érable avec défaut de saveur de type $\sqrt{R5}$, odeur et saveur décrite comme similaire à celle de l'ail ou de l'oignon. Malheureusement, quelques informations au niveau des propriétés organoleptiques n'ont pu être trouvées dans la littérature.

Le premier pas a été de voir si l'un de nos HITs est un composé avec un impact important au niveau du goût chez l'ail ou l'oignon. Nous avons trouvé que l'ail comprend parmi ses composés plusieurs sulfides dont le trisulfure de diméthyle qui est responsable de son arôme.⁸³ Ce dernier ne figure pas parmi nos HITs, mais le composé sulfuré suivant y figure : disulfure de diméthyle (**9**). Il est fort semblable au trisulfure de diméthyle et a aussi une odeur et un goût d'ail ou désagréable en plus d'être de la même famille. Le trisulfure de diméthyle n'est peut-être pas présent dans notre liste, mais il l'a été dans des modèles paramétriques antérieurs. Il n'est alors visible que parfois, alors que le disulfure de diméthyle (**9**) est beaucoup plus consistant à travers nos différents modèles ; c'est peut-être parce que le trisulfure de diméthyle se retrouve parfois masqué par la ligne de base lors de la normalisation ce qui impliquerait qu'il a un signal relativement faible. Il se pourrait aussi que son abondance entre les deux types de sirop ne soit pas suffisamment différente, et soit donc exclue lors du test-t. D'ailleurs, son $\log_2 FC$ est de -1.2018, une valeur proche de 0 ce qui indique que les quantités entre les deux types sont proches l'une de l'autre relativement au disulfure de diméthyle (**9**) qui a un $\log_2 FC$ de -9,640072. Aussi, quand il parvient à être présent dans la liste d'entités résultante, il est systématiquement associé au type $\sqrt{R5}$. On conclut que tout comme le disulfure de

diméthyle **(9)**, il est non seulement présent dans les sirops analysés, mais qu'il est en plus associé au type $\sqrt{R5}$ comme c'est le cas dans nos analyses statistiques tests.

Pour déterminer si c'est le disulfure de diméthyle **(9)** ou le trisulfure de diméthyle qui est le plus présent dans le sirop $\sqrt{R5}$, il faut éviter de se fier sur le FC. En effet, le FC compare les quantités entre les deux types et ne représente pas l'abondance relative aux autres composés. Pour répondre à cette question, nous sommes allées regarder les intensités enregistrées à travers les sirops $\sqrt{R5}$ et le trisulfure de diméthyle est en effet de faible abondance ce qui confirme l'hypothèse selon laquelle il est parfois masqué par la ligne de base dépendamment du nombre d'échantillons ou des paramètres. Donc, pour l'odeur d'ail que l'on peut sentir à partir du sirop bourgeon provient surtout du disulfure de diméthyle **(9)** et beaucoup moins du trisulfure de diméthyle.

Notez que ces deux composés ont été également associés au goût de bourgeon dans une l'étude de 2019 de Camara et *al.* Dans cette même étude, on mentionne le 2,5-diméthylpyrazine **(2)** et le 2,6-diméthylpyrazine **(1)**.¹⁴ Ces derniers ont une odeur similaire à celle de la pomme de terre et du café respectivement (tableau 2.7). Ce genre d'odeur n'est communément pas désagréable, mais peuvent avoir un impact sur le goût ou l'odeur du sirop d'érable. Une façon de mesurer ceci serait de tester les propriétés organoleptiques de sirops dopés. Ainsi, une prochaine étude impliquant des goûteurs de sirop d'érable pourrait être envisagée, dans laquelle des échantillons de sirop d'érable de type REG seraient dopés de chacun des HITS (séparément). Ainsi ceux classés $\sqrt{R5}$ à la suite du dopage sont responsables du goût, car nous rappelons qu'être plus abondant dans les types 5 n'implique pas être responsable du goût de bourgeon.

Pour les autres composés associés à une odeur (tableau 2.7-2.11), ils ont une odeur qui semble désirable, tel que l'odeur d'ester de l'ester bis(2-méthylpropyl) d'acide 1,2-benzènedicarboxylique **(5, 18)** ou la pyrazine, 3-éthyl-2,5-diméthyl- **(14, 23)** avec son odeur de chocolat/noix grillé. Comme mentionné, le mieux serait de faire tester aux goûteurs des sirops dopés pour confirmer l'ampleur de leur contribution, mais aussi si elle est réellement positive ; à faible dose, chacun semble avoir une contribution positive, mais toutes ces odeurs à concentration élevée peuvent devenir désagréables par un effet synergique.

L'abondance ou alors le FC n'est pas ce qui fait d'une odeur ou une saveur un aspect dominant, mais bien la valeur du seuil d'odeur aussi appelé *odor threshold value* (OTV) qui correspond à la quantité nécessaire pour que l'odeur ou la saveur soit perceptible. Un même seuil existe pour les saveurs et il s'agit du seuil de saveur aussi appelée *flavor threshold value* (FTV). La valeur de l'OTV et de la FTV est propre à chaque composé ce qui implique que pour certains d'entre eux, il faut une quantité plus élevée pour que leur goût soit perçu ou dominant.⁸⁴ Ces seuils sont aussi appelés des seuils rétronasal (*retronasal threshold*) et peuvent être déterminés par des goûteurs professionnels. Cela nous amène à réaliser que les composés ayant une forte odeur désagréable ne sont nécessairement pas aussi désagréables au goût puisque l'OTV d'un composé ne correspond pas à la même quantité que son FTV. En conclusion, il n'est pas possible de

déterminer quels HITs sont responsables du goût de bourgeon sans se pencher sur leur FTV et leur OTV. En effet, l'impact au niveau du goût et de l'odeur ne reflétant pas la quantité, il se peut qu'un autre HIT retrouvé en plus faible quantité dans le sirop $\sqrt{R5}$ puisse fortement contribuer à son odeur nauséabonde. L'attention a été portée sur le disulfure de diméthyle (**9**), car une odeur d'ail lui est associée, mais il se pourrait très bien que parmi les HITs qui ne sont pas associés à une odeur se trouve d'autres composés au goût d'ail. De plus, la situation se complique lorsqu'il s'agit d'un mélange de différents saveurs ou odeurs, car certaines se complètent et d'autres forment de mauvais assortiments. C'est pourquoi nous insistons sur des tests de sirop dopé par des goûteurs de sirop d'érable professionnel.

2.2.6 Modèle de prédiction

Pour mettre en pratique notre liste et valider nos résultats, un modèle de prédiction d'arbre à décision a été construit. Il est basé sur les 42 HITs et permet de prédire le type de sirop selon l'exactitude citée dans le tableau 2.13.

Tableau 2.13 - Modèle de prédiction issue du *Mass Profiler Professional* pour la détermination du type de sirop ; Algorithme arbre à décision sur les 42 HITs

	Type REG prédit	Type $\sqrt{R5}$ prédit	Exactitude de la prédiction (%)
Type REG	75	3	96
Type $\sqrt{R5}$	8	23	74
		Exactitude globale (%)	90

Lors de la construction du modèle de prédiction, il a été question d'optimiser les paramètres de sorte à obtenir de meilleur pourcentage d'exactitude globale (*overall accuracy*). Pour le paramètre *leaf impurity*, lors qu'il est de 5, l'arbre de décision comprend le disulfure de diméthyle (**9**) et l'ester bis(2-méthylpropyl) d'acide 1,2-benzènedicarboxylique (**5**, **18**), mais s'il est de 10, il est davantage simplifié et ne comprend que le HIT (**9**). Le *leaf impurity* consiste à simplifier l'arbre décisionnel de sorte à réduire le nombre de décisions possibles; une valeur de *leaf impurity* plus élevée demande une plus grande simplification. On comprend alors que c'est le disulfure de diméthyle (**9**) qui caractérise le mieux les sirops $\sqrt{R5}$ par rapport au sirop régulier, et ce, alors qu'il n'est pas le composé avec la valeur absolue la plus grande de FC. Notez que les prédictions sont basées sur les quantités seulement. Ce qui était attendu c'était que l'arbre à décision soit réduit au HIT 2,3-diméthyl-5-éthylpyrazine (**20**), puisque étant le composé avec

le plus grand FC en valeur absolue, il a le plus de différence en termes de quantité entre les deux types de sirop ce qui, selon nous, lui attribue le plus de poids au sein de l'arbre à décisionnel. Au lieu de cela, c'est le composé avec la deuxième plus grande valeur absolue de FC qui l'emporte, le disulfure de diméthyle (9). C'est peut-être que bien que la différence soit plus grande pour le composé (20), elle n'est pas aussi constante à travers les échantillons comparés au composé (9). D'ailleurs, lorsque l'on regarde les boîtes à moustache des abondances relatives (figures 2.9 et 2.10) des deux composés, il y a plus d'aberrations pour le composé (20) que pour le composé (9) ; il y en a 2 pour le composé (9) et 6 pour le composé (20). Par « aberration », nous faisons référence aux points dans les graphiques de boîtes à moustaches qui représentent les valeurs d'abondance relative non incluses dans les boîtes à moustaches, car elles sont trop éloignées du reste des valeurs. De surcroît, lorsque le modèle n'est construit qu'avec le composé (9), les exactitudes de prédiction sont exactement les mêmes alors que le modèle construit qu'avec le composé (20) est moins exact. En effet, le modèle de prédiction du composé (20) est de 91% d'exactitude pour les échantillons de type REG, 58% d'exactitude pour les sirops de type $\sqrt{R5}$ pour une exactitude globale de 82%.

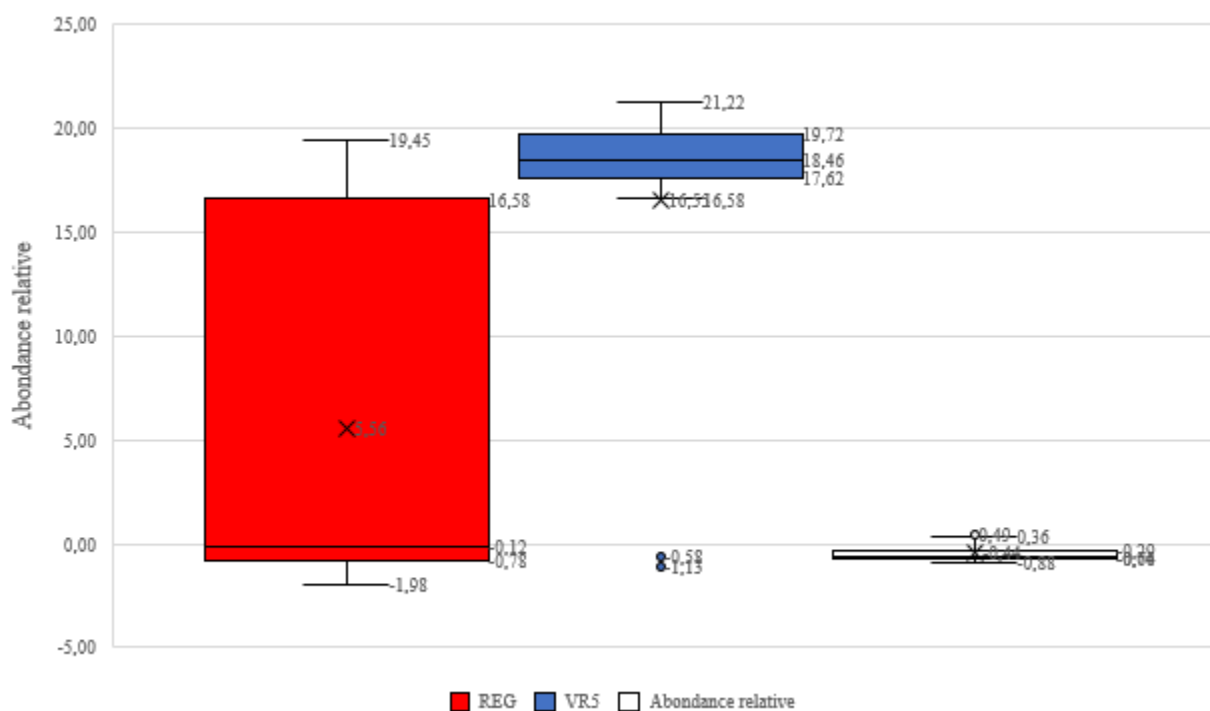


Figure 2.9 - Boîte à moustaches des abondances relatives du disulfure de diméthyle (9)

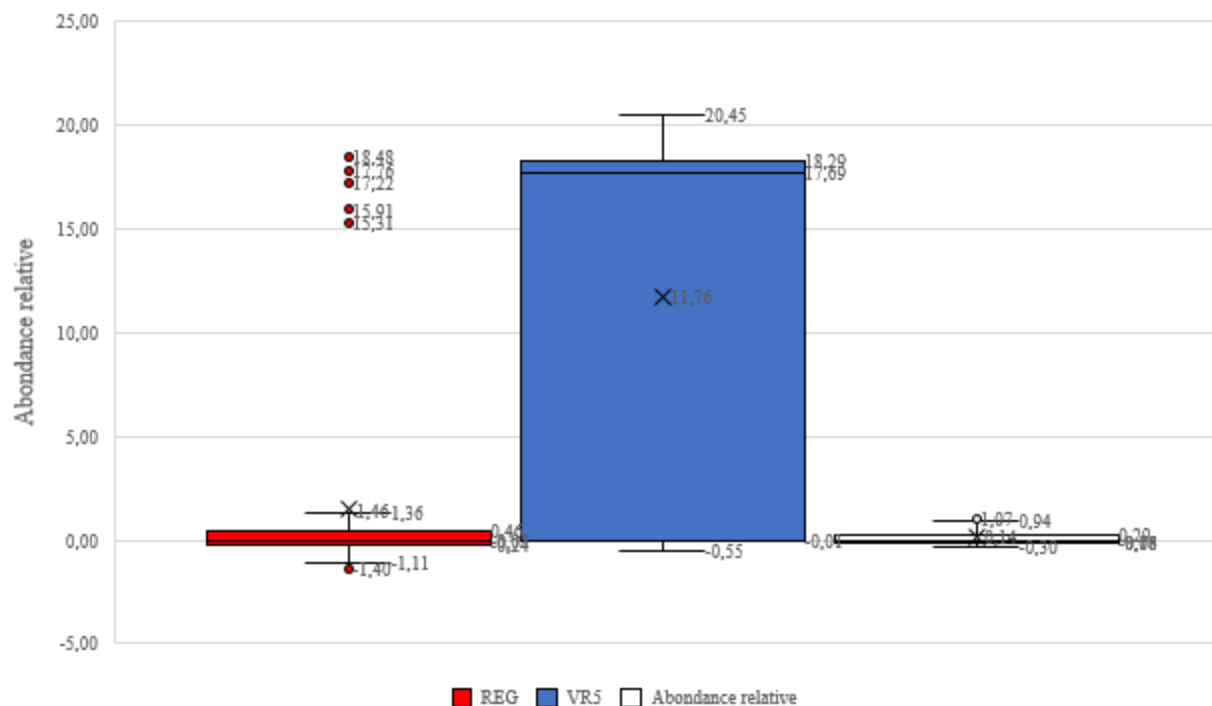


Figure 2.10 - Boîte à moustaches des abondances relative du 2,3-diméthyl-5-éthylpyrazine (20)

Pour confirmer le disulfure de diméthyle (9) comme étant le composé le plus important dans ce qui différencie les deux types en termes de composition, d'autres modèles de prédictions ont été effectués sur différents composés et à chaque fois le pourcentage global d'exactitude était inférieur. Cela dit, la composition ne reflète pas directement le profil de goût puisqu'elle ne tient pas compte du seuil d'odeur ou de saveur. C'est donc avec réserve que nous présentons le disulfure de diméthyle (9) comme important responsable du goût de bourgeon.

2.2.7 Covariance

Passons maintenant à la covariance de chacun des HITs. Sachant qu'une covariance implique que l'abondance varie en concomitance à travers les échantillons, des composés covariants pourraient impliquer qu'ils sont issus d'une même réaction ou voir d'une même voie métabolique. Nous nous appuyons sur les *loadings* de la figure 2.4 que nous reproduirons sur *OriginPro 8.5* et les familles de composé dont les HITs sont issus (tableau 2.7-2.12) de sorte à mieux supporter nos réflexions.

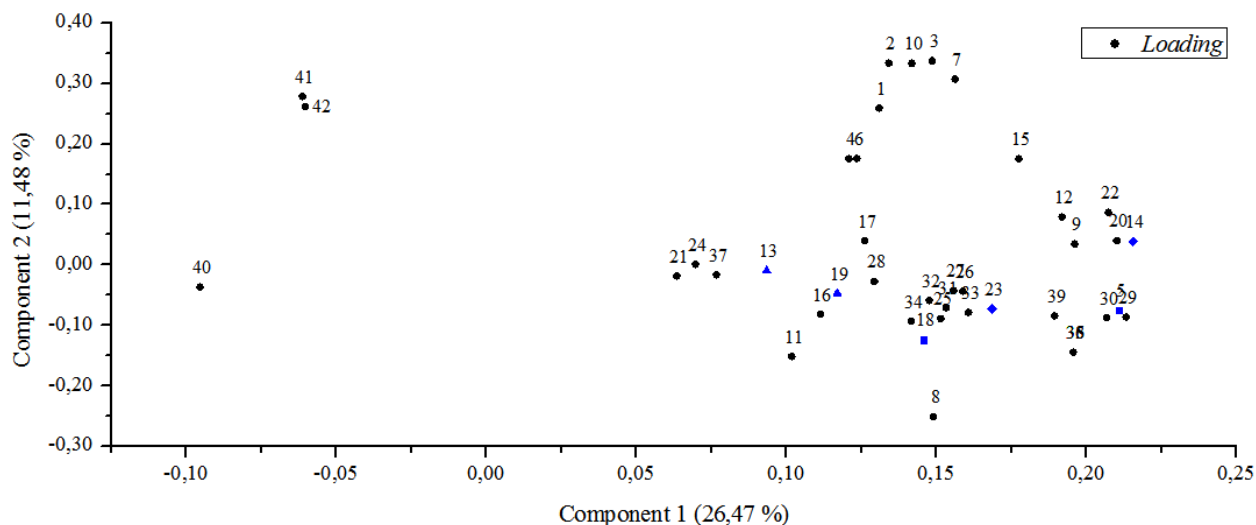


Figure 2.11 - Loadings des 42 HITs avec comme étiquette de données leur numéros associés. Un point de forme et de couleur différentes est utilisé pour représenter les doublons. Pour l'estér bis(2-méthylpropyl) d'acide 1,2-benzènedicarboxylique (**5**, **18**), il s'agit d'un carré bleu, pour la pyrazine, 3-éthyl-2,5-diméthyl- (**14**, **23**), un losange bleu, et pour le 149.0 (**13**, **19**), un triangle bleu.

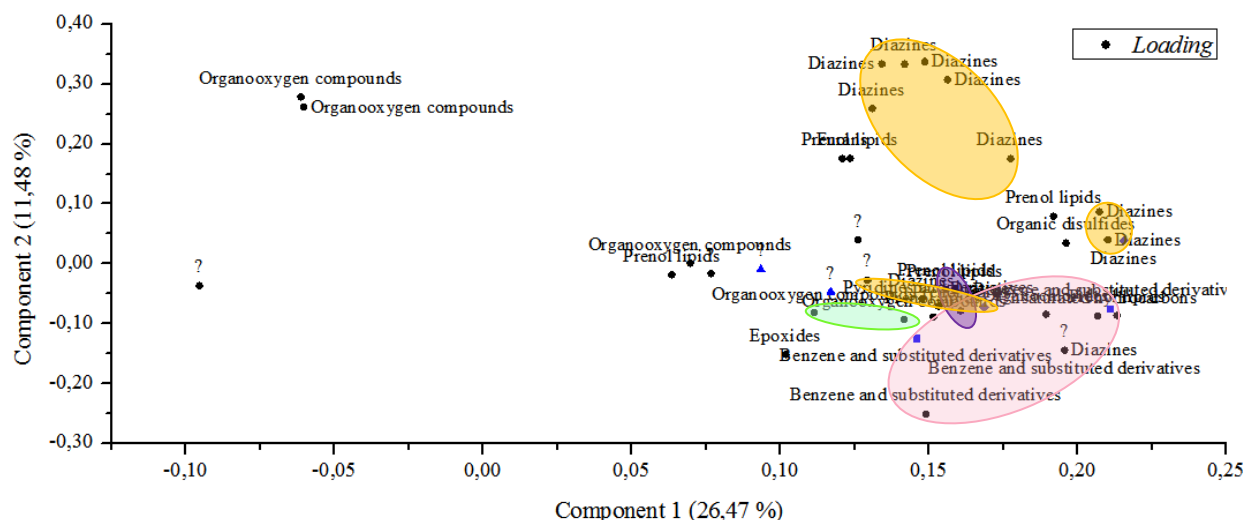


Figure 2.12 - *Loadings* des 42 HITs avec comme étiquette de données leur classe. Pour l'estér bis(2-méthylpropyl) d'acide 1,2-benzènedicarboxylique (**5**, **18**), il s'agit d'un carré bleu, pour la pyrazine, 3-éthyl-2,5-diméthyl- (**14**, **23**), un losange bleu, et pour le 149.0 (**13**, **19**), un triangle bleu. Les composés non identifiés sont nommés « ? ». Les zones orange mettent en évidences les diazines, la zone verte, les organo-oxygénés, la zone mauve, les lipides préneols et la zone rose, les benzènes et leurs dérivées.

La figure 2.11 qui représente nos HITs en les associant à leur numéro nous servira ici de référence. Nous avons choisi de ne pas inclure dans les étiquettes de données le numéro avec la famille du composé pour alléger les figures 2.12 et 2.13.

Pour commencer, on remarque dans la figure 2.12 qui représente nos composés selon leur classe, que les diazines (cercles orange) ont tendance à se regrouper entre eux. Leur division en trois groupes ne s'explique pas par leur sous-classe, car il s'agit tous de pyrazine (fig. 2.13).

Il y figure aussi des regroupements pour les organo-oxygénés (cercles verts), les lipides pré-nols (cercle mauve) et les benzènes et leurs dérivées (cercle rose), mais à chaque fois ce n'est pas parfaitement regroupé. Il y a parfois plus d'un regroupement comme c'est le cas pour les diazines et parfois, ce qui n'est pas regroupé est éparpillé.

Pour les composés organo-oxygénés, le regroupement de gauche de la figure 2.12 comprend des composés de différentes sous-classes (carbonyle ou alcools et polyols) dans la figure 2.13 alors que celui du quadrant inférieur droit comprend que des carbonyles. S'il y a regroupement d'organo-oxygénés, cela semble se produire selon la classe et non la sous-classe qu'ils sont à chaque fois relativement rapprochés.

Pour ce qui est de la classe « benzène et leurs dérivées », ils sont composés des sous-classes phénylpropane et acides benzoïques et leurs dérivées, mais dans la fig. 2.13, ces derniers sont plus rapprochés entre eux ; le phénylpropane se trouvant plus bas est plus isolé. Aussi, il y figure un doublon qui n'est pas regroupé ce qui remet en cause leur covariance. À partir du moment où un composé se répète avec un temps de rétention si similaire, par rapport à la fenêtre de rétention posée dans les paramètres, il s'agit d'un pic trop large ou alors dont le temps de rétention varie trop. Ce qui était alors attendu, c'est qu'il y ait covariance, mais il est fort probable que la séparation de ce pic n'est pas consistante, surtout si l'on considère qu'il se déplace à travers les spectres des échantillons. Bref, les composés « benzènes et leurs dérivées » se situent dans le même quadrant du graphique.

Pour finir, les lipides pré-nols qui sont regroupés sont tous des monoterpénoïdes, mais il y a deux autres monoterpénoïdes qui sont isolés du groupe, donc ce n'est pas selon leur sous-classe qui les regroupe. Il y a aussi un autre lipide pré-nol isolé de sous-classe sesquiterpénoïde.

En conclusion, les composés de même classe ou sous-classe sont covariants, mais ce n'est ni consistant ni exclusif. En effet, ils ne sont pas complètement regroupés entre eux et souvent, des composés de classe ou sous-classe différente les accompagnent. Aussi, il y a des covariances plus synchronisées que d'autres puisqu'il y a des regroupements plus étroits que d'autres. Les covariances observées sont donc dues à d'autres liens qui relient les composés concernés sauf pour ce qui est des pyrazines ou diazines.

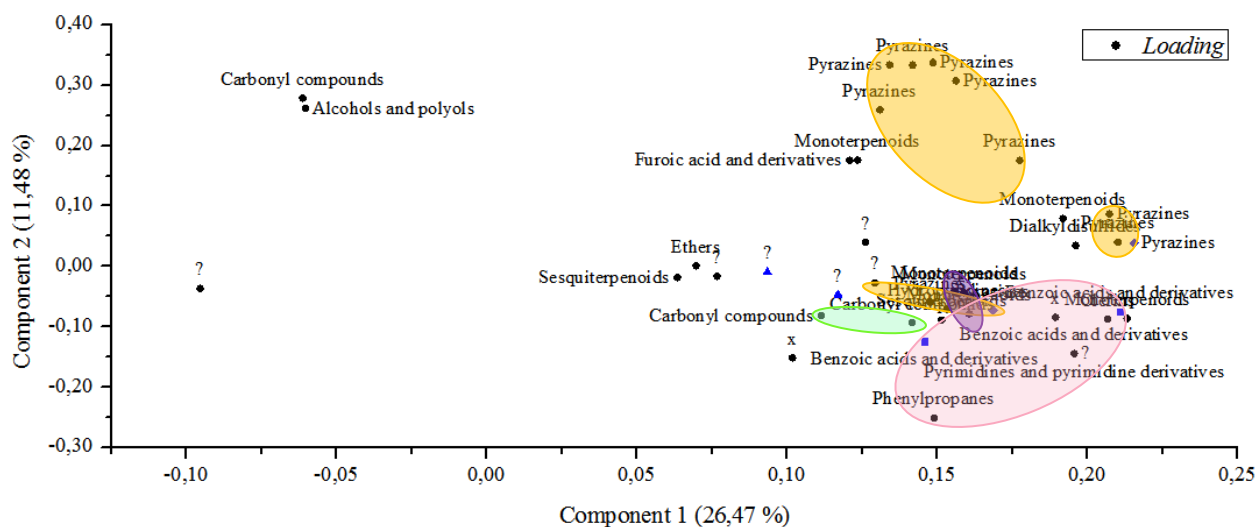


Figure 2.13 - Loadings des 42 HITs avec comme étiquette de données leur sous-classe. Pour l'ester bis(2-méthylpropyl) d'acide 1,2-benzènedicarboxylique (**5, 18**), il s'agit d'un carré bleu, pour la pyrazine, 3-éthyl-2,5-diméthyl- (**14, 23**), un losange bleu, et pour le 149.0 (**13, 19**), un triangle bleu. Les composés non identifiés sont nommés « ? » et les composés identifiés, mais qui n'ont pas de sous-classe sont nommés « x ». Les zones orange mettent en évidences les diazines, la zone verte, les organo-oxygénés, la zone mauve, les lipides pré-nols et la zone rose, les benzènes et leurs dérivées.

2.2.8 Conclusion

Les données démontrent que l'analyse par composantes principales permet de séparer les sirops REG et $\sqrt{R5}$ et qu'il a un effet de regroupement selon la classe de transmittance des sirops d'érable. Une série de composés, principalement associés aux sirops $\sqrt{R5}$, furent détectés à des intensités différentes selon la classe de sirops. Parmi ceux-ci, les composés suivants n'ont pas été répertoriés dans le sirop d'érable auparavant à notre connaissance: acide 2-furoïque (**4**), ester bis(2-méthylpropyl) d'acide 1,2-benzènedicarboxylique (**5, 18**), 3-méthylène-2-norbomanone (**6**), phénol, 2,6-bis(1,1-diméthyléthyl)- (**8**), trans-2,3-époxydecane (**11**), bicyclo[2.2.1]heptan-2-one, 1,7,7-triméthyl-, (1R)- (**12**), cyclopentanone, 2-méthyl- (**16**), 2,3-diméthyl-5-éthylpyrazine (**20**), cédrol (**21**), 9,9-diméthoxybicyclo[3.3.1]nona-2,4-dione (**24**), acide (R-(R*,R*))-4-(1,5-diméthylhexyl)-1-cyclohexènedicarboxylique (**25**), bicyclo[2.2.1]heptan-2-one, 1-(bromométhyl)-7,7-diméthyl-, (1S)- (**26**), acide 7,7-diméthyl-2-oxo-bicyclo[2.2.1]heptane-1-méthanesulfonique, (+/-)- (**27**), cyclohexanone, 5-méthyl-2-(1-méthyléthényl)-, trans- (**29**), cyclohexane, 1,5-diméthyl-2,3-divinyl- (**30**), 2,3'-bipyridine, 1',3,4,4',5,5',6,6'-octahydro- (**31**), cyclopentane, 1-acétoxyméthyl-3-isopropényl-2-méthyl- (**33**), spiro[2.4]heptan-4-one (**34**), uracil, 5-éthyl- (**36**), acide 1,3-benzènedicarboxylique, 5-(1,1-diméthyléthyl)- (**38**), cyclopropane, 1,1-dichloro-2-(1-éthylpropyl)-2-méthyl- (**39**), hexanal, 3,3-diméthyl- (**41**) et 3-pentanol, 2,2-diméthyl- (**42**). Ces composés pourraient être associés aux défauts de saveur, mais l'information n'est pas entièrement disponible quant aux odeurs et

goûts de chacun des HITs. Ceci nous empêche donc de conclure sur la nature des composés réellement responsables du goût de bourgeon. Leur valeur de OTV, FTV et autres valeurs organoleptiques serait essentielles pour tirer ces conclusions. Cependant, il nous a été possible dans cette section de trouver, complémentairement aux études antérieures sur le sujet, des composés propres au sirop classé $\sqrt{R5}$ et au sirop régulier. C'est un pas non négligeable, car cela permettra de mieux comprendre les réactions métaboliques et non métaboliques responsables de la composition du sirop.

3 UPLC-QTOF-MS/MS

3.1 Partie expérimentale

3.1.1 Préparation des échantillons

Dans un tube *ependorf*, 500±2 mg de sirop d'érable ont été pesés puis dilués avec 1000 µL d'eau de qualité HPLC. Ensuite, 2 µL de L-tryptophane-2,3,3-d₃ à 1000 ppm HCl 0,1 M et de L-tyrosine-d₄ à 1000 ppm HCl 0,1 M sont ajoutés. Le tout est mélangé pendant 1 min puis extrait avec une cartouche *SPE Oasis HLB 3 cc Vac Cartridge* 60 mg. La cartouche est d'abord conditionnée avec 2 mL de MeOH et 2 mL de 10% MeOH dans de l'eau de qualité HPLC. Le dépôt de sirop est déposé et ensuite lavé avec 2 mL 10% MeOH dans de l'eau de qualité HPLC. L'élution se fait par 2 mL de MeOH et l'extrait élué est ensuite séché par un jet d'azote. Une fois secs, les résidus séchés sont dilués dans 200 µL de méthanol. Une fois tous les résidus solubilisés, le tout est dilué dans 200 µL d'eau de qualité HPLC.

Pour la préparation des blancs, au lieu de 500±2 mg de sirop, c'est 500 µL d'eau de qualité HPLC qui est utilisée. Aussi, les échantillons de sirop et de blanc sont préparés en triplicata.

3.1.2 Méthode UPLC-QTOF-MS/MS

L'analyse UPLC a été effectuée en utilisant un système Waters ACQUITY UPLC qui comprend un gestionnaire d'échantillons (*Sample Manager*, SM), un gestionnaire de solvant binaire (*Binary Solvent Manager*, BSM). La colonne utilisée pour la séparation est la *Acquity UPLC CSH C18* (2.1 x 75 mm, 1.7 µm) et elle a été maintenue à 40 °C. La phase mobile A est composée d'eau de qualité LC-MS avec 2% (v/v) d'acide acétique et la phase mobile B est composée d'acétonitrile avec 2% (v/v) d'acide acétique. L'élution a été faite avec un débit de 0.500 mL/min : 1% B (0–1 min), 1–80% B (1–9 min), 80% B (9–11 min), 80-1% B (11–11.2 min), 1% B (11.2–15 min). L'échantillonneur automatique a été maintenu à 12 °C, le mode d'injection choisi est le mode boucle partielle (*partial loop*), le volume d'injection est de 5 µL et l'acquisition été d'une durée de 15 min. Lors de certaines analyses MS/MS, le volume d'injection a parfois été de 10 µL ; pour les analyses en mode MSe, le volume a toujours été de 5 µL. Pour le contrôle qualité, une solution de 5 ppm de vanilline de Sigma-Aldrich Canada Co. (Oakville, ON, CA) a été utilisée pour s'assurer de la consistance des analyses.

Les spectres de masse ont été générés avec un *Waters Synapt G2-S QTOF-MS* (*Waters Corp.*, Milford, MA). La source avait un voltage capillaire de 3,00 kV et une température de 150 °C. La température de désolvatation était de 400 °C et le flux du gaz de désolvatation était de 1000 L/h. La pression du gaz de nébulisation était de 7,0 bars.

En mode MSe, l'acquisition s'est fait sur 15 min avec les paramètres suivants : source d'ionisation ES en mode négatif et positif, gamme de m/z allant de 30 à 3000 Da avec un temps de scan de 0,3 sec. Les paramètres d'énergie de collision, pour la fonction 1 (basse énergie), pas d'énergie de collision pour la trappe ionique et pour le transfert. Pour la fonction 2 (haute énergie), rampe d'énergie de collision de transfert allant de 20 à 50 V et pas de voltage pour rampe d'énergie de collision de la trappe ionique.

En mode MS/MS, l'acquisition était également de 15 min. La source était une source d'ionisation ES en mode négatif et positif. La gamme de m/z analysée diffère, elle était de 50-1000 Da, aussi et le scan time était de 1 sec. Pour le contrôle de l'énergie de collision de la trappe ionique, la rampe pour l'énergie de collision passait de 10 à 60 V. Toutes les données ont été acquises par le logiciel *MassLynx V4.1* (Waters Co., Milford, MA, USA). Les échantillons ont d'abord été analysés en MSe, le mode MS/MS a été exercé seulement sur les m/z considérés comme importants après le traitement de données.

3.1.3 Traitement de données

Tous les chromatogrammes de chaque groupe d'échantillons d'injection ont été traités sur *MarkerLynx XS* pour obtenir les listes respectives de toutes les m/z avec leur temps de rétention, chaque élément des listes recueilli est appelé *marker*. Les paramètres de la méthode pour le traitement de données sont regroupés dans le tableau suivant.

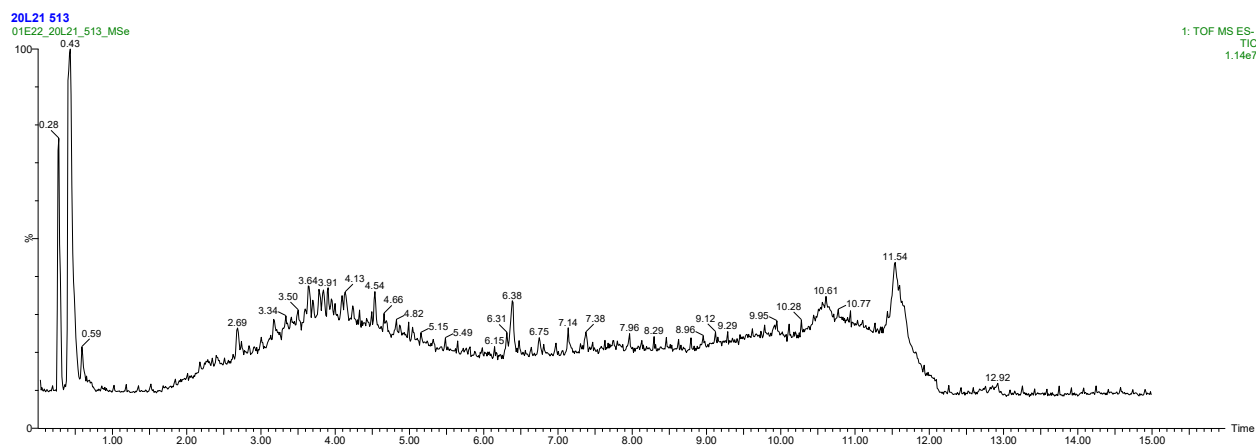


Figure 3.1 – Chromatogramme en mode d'ionisation négative d'un échantillon de sirop $\sqrt{R5}$

Tableau 3.1 - Paramètres de la méthode de traitement de données sur *MarkerLynx XS*

<i>Method</i>	<i>Property</i>	<i>Value</i>		
<i>Method parameters</i>	<i>Function</i>	1		
	<i>Analysis Type?</i>	Peak Detection		
	<i>Initial Retention Time</i>	0.60		
	<i>Final Retention Time</i>	10.00		
	<i>Low Mass</i>	50.00		
	<i>High Mass</i>	900.00		
	<i>XIC Window (Da)</i>	0.03		
	<i>Use relative retention time?</i>	NO		
	<i>Apex Track Peak Parameters</i>	<i>Peak Width at 5% Height (seconds)</i>	1.00	
		<i>Peak-to-Peak Baseline Noise</i>	0.00	
	<i>Apply Smoothing?</i>	NO		
	<i>Collection Parameters</i>	<i>Marker Intensity threshold (counts)</i>	1000	
		<i>Mass window</i>	0.03	
		<i>Retention time window</i>	0.10	
	<i>Noise elimination level</i>	6.00		
	<i>Deisotope data?</i>	YES		
	<i>Replicate % Minimum</i>	66.00		
<i>Internal standards</i>	<i>Int Std</i>	<i>Name</i>	Int Std	
		<i>Formula</i>	-	
		<i>Mass (Da)</i>	0.0000	
		<i>Mass Window (\pm Da)</i>	0.000	
		<i>Retention time of the internal standard</i>	0.00	
		<i>Allowable error in the retention time value</i>	0.00	
		<i>Number of results (maximum 20)</i>	20	
<i>Elemental composition method</i>	<i>Imported Method</i>	<i>Results sorted by</i>	Mass error	
		<i>Mass tolerance</i>	5.0 mDa	
		<i>Mass mode</i>	Monoisotopic	
		<i>Electron state</i>	Even electron ion	
		<i>Double bond equivalence range</i>	-1.5 – 50.0	
		<i>Elements</i>	C	0-500
			H	0-1000
			N	0-2
O	0-30			
S	0-1			

Chaque échantillon est associé à sa classification avant d'effectuer une analyse en composantes principales (PCA) sur *EZ info*, un outil disponible dans *MarkerLynx*. Les composés sont répartis entre sirop avec défaut de goût et sirop sans défauts, et ce, à l'aide des cartes factorielles obtenues. Seuls les composés qui se répètent plus d'une fois sont retenus pour la suite des analyses. C'est-à-dire que si un composé est retrouvé dans au moins deux injections, alors il est considéré comme un composé responsable des différences entre les deux types de sirop ciblé. Par « jour d'injection » ou « groupe d'injection », on entend les échantillons préparés le même jour et injectés le même jour sous un même étalonnage de l'appareil et utilisant les mêmes solvants. Les *marqueurs* retenus sont ceux qui se répètent à travers les injections au sein du même type de sirop.

3.2 Résultats et discussion

Dans cette section, nous mènerons une analyse comparative sur les composés organiques non volatils extraits du sirop d'érable sans défaut de saveurs (REG), et le sirop de goût de bourgeon classé $\sqrt{R5}$. La technique UPLC-QTOF-MS permet une étude non ciblée visant à déterminer les composés organiques non volatils qui peuvent potentiellement être responsables du goût de bourgeon. Pour ce, plusieurs échantillons de sirop d'érable de type REG et type $\sqrt{R5}$ des producteurs locaux ont été analysés selon les manipulations décrites dans la section précédente, soit 10 échantillons pour chacun des types de sirop pour un total de 20 échantillons.

Dans un premier temps, nous résumerons les optimisations de notre méthode d'analyse. Ensuite, nous génèrerons une liste de marqueurs à partir de *MarkerLynx* qui subira une série de filtrations incluant la PCA de sorte à obtenir une liste regroupant les marqueurs plus abondants dans l'un des deux types de sirop à l'étude. Ce qu'on entend par marqueurs sont les composés détectés par l'analyse UPLC-MS, c'est-à-dire m/z associé à un temps de rétention. Ces marqueurs seront nommés les marqueurs HITs, la liste qui les regroupe se nommera donc la liste de HIT, comme c'était le cas dans la section précédente.

S'ensuit une analyse des composantes principales (PCA) pour s'assurer de la répétabilité des résultats et ainsi valider la liste des marqueurs HITs. Contrairement à l'étude menée sur les données acquises par SPME-GC-MS, c'est l'analyse de composantes principales qui contribue à générer les HITs et non l'inverse comme c'était le cas pour notre étude des composés volatils.

La section se terminera par l'identification de ces HITs en comparant leur patron de fragmentation issue d'une analyse UPLC-MS/MS avec des spectres MS/MS issus de différentes banques de données. Pour chacun des composés que nous n'avons pas réussi à identifier, nous résumerons les hypothèses posées pour chacun d'entre eux dans un tableau. Ainsi nous donnons la possibilité à d'autres de s'appuyer sur nos réflexions pour l'identification des composés non volatils responsable du goût de bourgeon dans le sirop d'érable.

3.2.1 Optimisation de la méthode et marqueurs

Étant encore une fois une étude non ciblée, il a fallu s'engager dans une direction particulière. En effet, dans une étude non ciblée, il s'agit de couvrir le plus de composés possible. C'était d'ailleurs le cas pour notre étude des composés volatils ; lors de l'optimisation, la fibre choisie pour l'extraction était la fibre qui a extrait le plus de composés HITs, soit la fibre DVB/CAR/PDMS. Or, malgré l'utilisation de cette fibre SPME, il reste des composés qui n'ont pu être extraits ou alors qui n'ont pas été extraits en quantité suffisante pour être détectés par GC-MS. Couvrir une plus grande gamme de molécules volatiles

impliquerait l'utilisation de différentes fibres SPME, et donc, de différentes colonnes chromatographiques, ce qui demanderait plus de moyens et plus de temps. Il en est de même pour toutes études non ciblées.

La matrice liquide étant plus complexe que la composition des composés organiques volatils, il est alors plus difficile d'entreprendre d'analyser la totalité des composés qui s'y trouve. En effet, leurs polarités ainsi que leurs masses varient grandement, c'est pourquoi il a été question de restreindre la marge de composé à couvrir. Dès lors, la méthode de préparation comprend une étape où les composés polaires et les composés apolaires sont séparés. La partie polaire contient surtout des sucres et des acides aminés, subséquemment, c'est vers l'extrait apolaire que l'étude est dirigée, car l'analyse des acides aminés et des sucres a été réalisée par Juan Manuel Montiel-Léon dans une étude non publiée et nous anticipons que la fraction apolaire sera plus indicatrice des composés organoleptiques. Dès lors, au niveau du chromatographe, il nous est imposé d'utiliser une colonne chromatographique apolaire pour qu'il y ait rétention, d'où l'utilisation de la colonne *Acquity UPLC CSH C18* (2.1 x 75 mm, 1.7 μ m).

Les spectres MSe issue de l'analyse UPLC-MS ont été traités par *MarkerLynx* de sorte à générer une liste de tous les composés (*markers*) présents à travers tous les échantillons. Il est possible de montrer l'abondance à travers les échantillons de chacun des *marqueurs* que nous appellerons ici marqueurs. Cependant, il n'a pas été possible d'utiliser l'étalon interne pour la normalisation dû à des problèmes techniques, donc la répétabilité des données a été assurée en faisant des triplicatas pour chacun des échantillons de sirop et il en a été de même pour les blancs. D'ailleurs l'étalon interne est le L-tryptophane-2,3,3-d₃. Il a été choisi parce que la version non deutérée de ce composé est présente dans le sirop d'érable. Aussi, il est relativement apolaire pour un acide aminé, donc il a pu être détecté par UPLC-MS malgré l'étape d'extraction qui consiste à se débarrasser des composés polaires.

Une liste de marqueurs a été générée pour chaque série d'injections. Une série d'injection comprend un nombre égal d'échantillons $\sqrt{R5}$ et REG d'injecter en série dans l'UPLC-QTOF. Puisqu'il y a à chaque fois un nombre énorme de marqueurs, soit environ 3000 marqueurs pour chaque série, il est plus simple et plus informatif d'effectuer encore une fois des PCA, chose possible avec l'extension *EZ* (ou *Umetrics*) de *MassLynx*. Les PCA sont discutés dans la section suivante.

Notez que les échantillons de sirop proviennent de la récolte 2020 et non celle de 2019 comme c'était le cas pour l'étude SPME-GC-MS. Reste qu'il s'agit toujours de sirop d'érable produit et classé au Québec.

3.2.2 Analyse en composantes principales et répétabilité

3.2.2.1 Mode négatif

Il y a trois séries d'injections au total nommées A, B et C; la série A inclut les triplicatas de 2 échantillons $\sqrt{R5}$ et ceux de 2 échantillons REG, la série B inclut les triplicatas de 3 échantillons $\sqrt{R5}$ et 3 échantillons REG et la série C, inclut les triplicatas de 5 échantillons $\sqrt{R5}$ et 5 échantillons REG. Une quatrième série d'injection, nommée D, incluant les triplicatas de 8 échantillons pour chaque type de sirop, a été exclue parce qu'elle n'a pas pu être traitée par *MarkerLynx*. Une liste de marqueurs n'a pas à pu être générée pour cette série. Voici donc les cartes factorielles des séries d'injections A, B et C en mode négatif que nous appellerons aussi A négatif, B négatif et C négatif respectivement. Ils ont été construits sur leur liste de marqueurs respective.

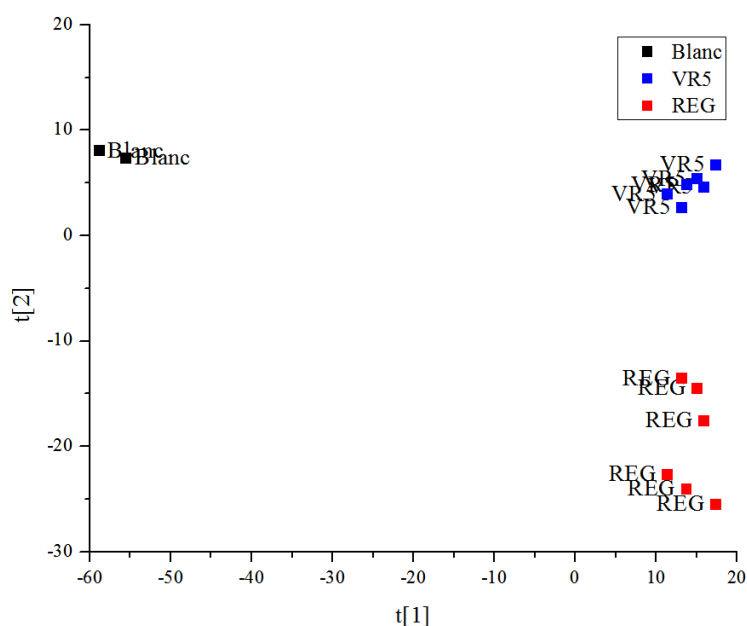


Figure 3.2 – Carte factorielle de la série d'injection A en mode négatif, où t[1] est la composante 1, et t[2], est la composante 2

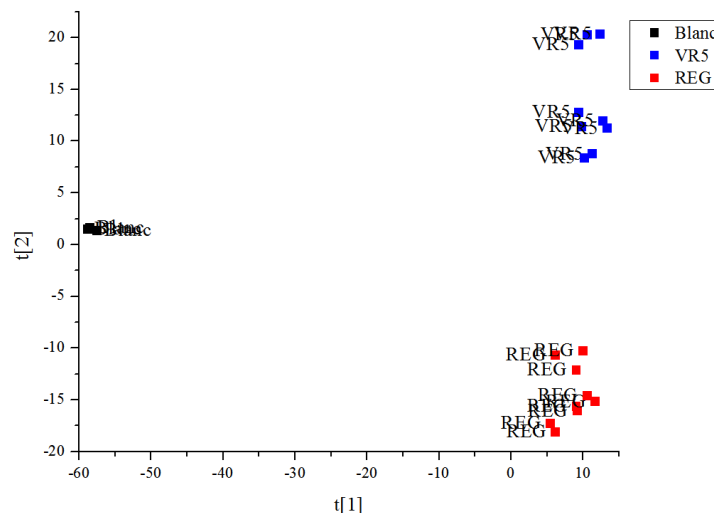


Figure 3.3 – Carte factorielle de la série d’injection B en mode négatif, où $t[1]$ est la composante 1, et $t[2]$, est la composante 2

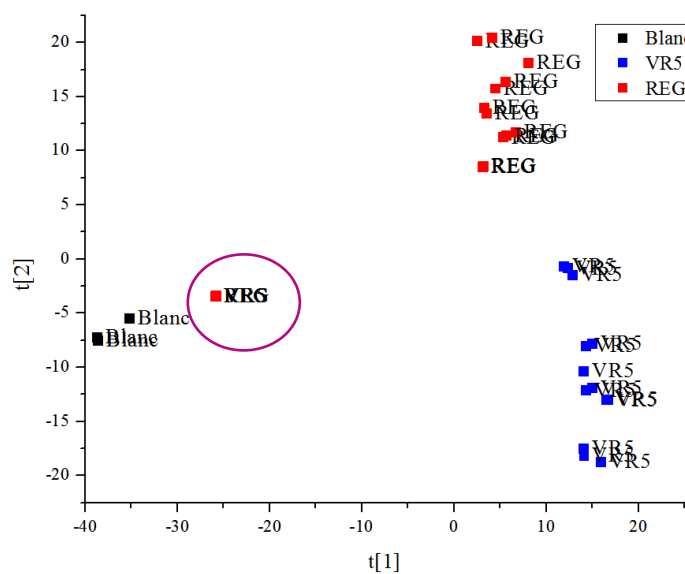


Figure 3.4 – Carte factorielle de la série d’injection C en mode négatif, où $t[1]$ est la composante 1, et $t[2]$, est la composante 2

Dans chacune des cartes factorielles des figures 3.2 à 3.4, nos échantillons sont séparés des blancs. Il y a non seulement une différence importante entre les échantillons et les blancs, mais aussi entre les deux types de sirops que nous comparons. Aussi, il est noté que la distance entre le regroupement des échantillons des deux types est moins grande que celle entre les échantillons et le regroupement des blancs. Ceci est attendu ; il s’agit peut-être de types de sirops différents, reste qu’il s’agit de sirops d’érable dans les deux cas ce qui est relativement très différent de la composition de l’eau.

Comme la normalisation selon l'étalon interne n'a pu être appliquée sur les marqueurs, c'est donc seulement sur la répétabilité des données que nous nous sommes appuyés pour valider nos résultats. Pour cela, il faut vérifier que les triplicatas sont regroupés ; une proximité des triplicatas prouve que la précision des quantités mesurées par MS. Pour commencer, il y a une répétabilité pour les triplicatas de blanc puisqu'ils sont à proximité des uns des autres, et ce, pour les trois injections. Cependant elle n'est pas parfaite, et l'est encore moins pour les injections A et C (figures 3.2 et 3.4). En effet, idéalement, les triplicatas d'un échantillon ou d'un blanc auraient exactement les mêmes coordonnées dans une carte factorielle. Or, ceci semble être plus ou moins le cas pour l'injection B (figure 3.3) puisque les blancs de cette injection sont un par-dessus l'autre. Le manque de répétabilité au sein des blancs pour l'injection A et C pourrait être le reflet d'une différence au niveau des quantités injectées de l'étalon interne ou de quantité d'eau, chose qui pourrait modifier la concentration et donc l'abondance de l'étalon interne. Il est plus probable qu'il s'agisse de saturation au niveau de la colonne. Ce qui nous fait dire cela est le fait que le blanc le plus éloigné des trois, le Blank_3, est celui qui a été injecté le plus tard parmi eux. Notez que pour l'injection A, il y a eu une erreur au niveau des manipulations pour le troisième réplikat blanc, il y en a donc que deux.

Pour éviter les erreurs de lecture du signal, les échantillons et blancs sont séparés en groupe de réplikats ; les réplikats étiquetés « 1 » sont injectés en premier et constitue le groupe de réplikats 1. Ce premier groupe de réplikats est suivi du groupe 2 puis du groupe 3. Autrement, les réplikats d'un même échantillon qui ont la chance d'être injecté en premier auront une meilleure chance d'être lu à juste valeur que ceux injectés en dernier puisqu'ils sont injectés peu de temps après le nettoyage du système d'injection. L'alternance des groupes égalise les « chances » de lecture, elle évite que tous les réplikats d'un même échantillon soient pénalisés par des facteurs tels que l'accumulation de sucre au niveau de la source du spectromètre de masse (chose qui se produit lorsqu'on travaille avec des échantillons concentrés en sucre). Les injections des échantillons de type REG et type $\sqrt{R5}$ au sein des groupes de réplikats ont été alternées à chaque fois (blanc_1, typeREG_1, type $\sqrt{R5}$ _1, autre typeREG_1, etc.). Les injections du groupe de réplikats 2 ressemblent à cela : blanc_2, typeREG_2, type $\sqrt{R5}$ _2, autre typeREG_2, etc. D'ailleurs, les réplikats d'un échantillon issu des groupes de réplikats 2 et 3, sont systématiquement plus rapprochés entre eux qu'avec le réplikat du premier groupe.

Pour en revenir à l'injection C (figure 3.4), les 5 échantillons entourés d'un cercle rose ne suivent pas le motif observé, à savoir un regroupement distinct d'échantillons $\sqrt{R5}$, d'échantillons REG et de blanc. Malgré qu'ils soient de types de sirop différents, ils sont plus fortement regroupés en plus d'être plus à proximité des blancs que des échantillons de sirop d'érable. Leurs coordonnées sont très similaires ; leur coordonnée des abscisses ne varient que de 0,0897 unité, et leur ordonnée, de 0,0324 unité seulement. Difficile d'expliquer cela, surtout qu'ils proviennent de différents groupes de réplikats, soit les groupes 2 et

3, il ne s'agit donc pas d'un problème au niveau de la colonne ou autre problème que l'on pourrait rencontrer après une longue série d'injections en chaîne. Ce n'est ni lié à l'échantillon mère puisqu'ils sont tous des répliqués d'échantillons différents. Ce n'est non plus lié à un problème au niveau du UPLC-MS, puisque, selon le chromatogramme, il n'y a pas eu de problème de détection ou d'injections des échantillons. Pour conclure, cette aberration n'est pas un problème lié aux manipulations ou à l'analyse de l'échantillon. Il est donc dû à l'un des logiciels utilisés pour le traitement de données, à savoir *MarkerLynx* ou *EZinfo*.

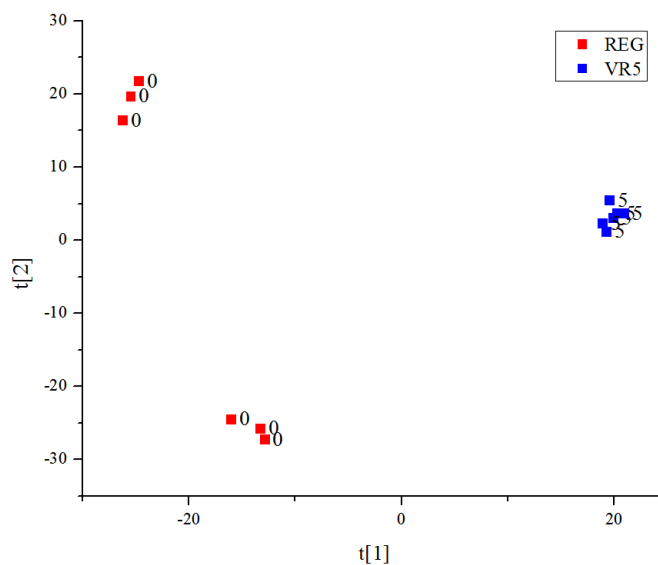


Figure 3.5 – Carte factorielle de la série d'injection A en mode négatif sans les blancs, où $t[1]$ est la composante 1, et $t[2]$, est la composante 2

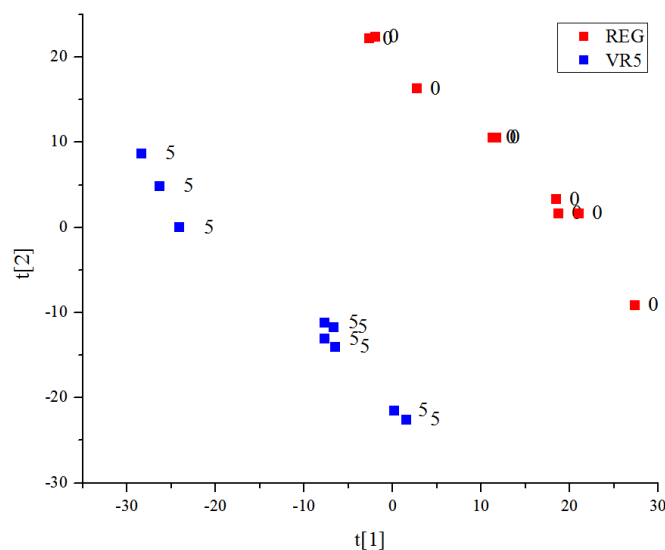


Figure 3.6 – Carte factorielle de la série d'injection B en mode négatif sans les blancs, où $t[1]$ est la composante 1, et $t[2]$, est la composante 2

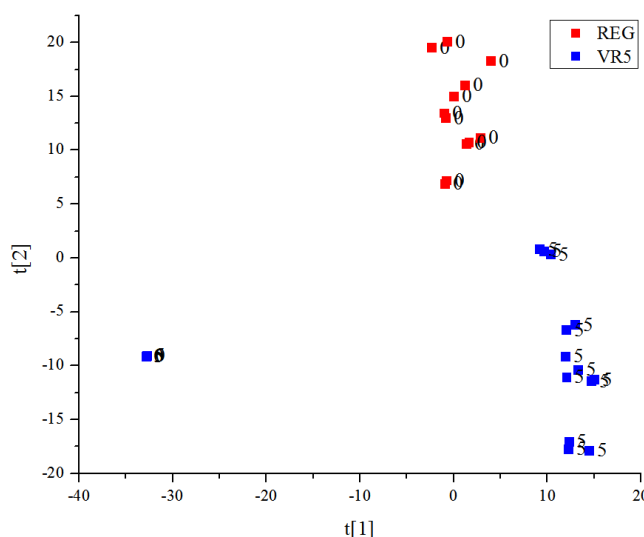


Figure 3.7 – Carte factorielle de la série d'injection C en mode négatif sans les blancs, où $t[1]$ est la composante 1, et $t[2]$, est la composante 2

Qu'on l'inclue ou non, les patrons de regroupement sont les mêmes. Cela est mis en évidence par l'exclusion des blancs de nos cartes factorielles pour l'injection A, il y a deux groupes distincts pour les échantillons de type REG. Chacun d'eux est en fait un regroupement de réplicats d'un même échantillon ; ceux situés dans le quadrant supérieur gauche sont de l'échantillon 2020_03392_0, et ceux du quadrant inférieur gauche, de l'échantillon 2063_07785_0. Ceci est attendu, les échantillons de sirop même si de même classe, ont une composition qui varie parfois fortement comme observé dans l'étude SPME-GC-MS puisqu'il s'agit d'un produit naturel.

3.2.2.2 Mode positif

L'analyse en mode positif a démontré très peu de répétabilité en plus de peu de différence entre les échantillons de type REG et $\sqrt{R5}$. Comme on peut le voir dans la fig. 3.9, la plupart des échantillons de sirop sont regroupés ensemble alors qu'ils sont de types différents et il y a un manque important de répétabilité des blancs. Même s'il y a une séparation lorsqu'on exclut les échantillons blancs, il y a toujours un manque de répétabilité chez les échantillons de sirops et l'élimination des marqueurs présents dans les blancs n'y change rien (fig. 3.9). De plus, dans toutes les versions incluant celle où l'on exclut les blancs (fig. 3.9), il y a un regroupement parfait d'échantillons de différents types à gauche du graphique (même valeur des abscisses et des ordonnées).

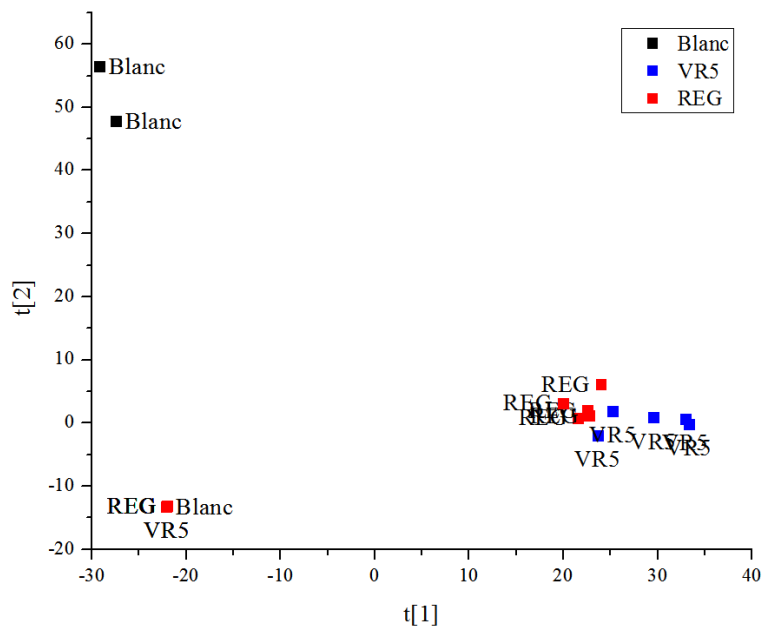


Figure 3.8 – Carte factorielle de la série d’injection B en mode positif, où $t[1]$ est la composante 1, et $t[2]$, est la composante 2

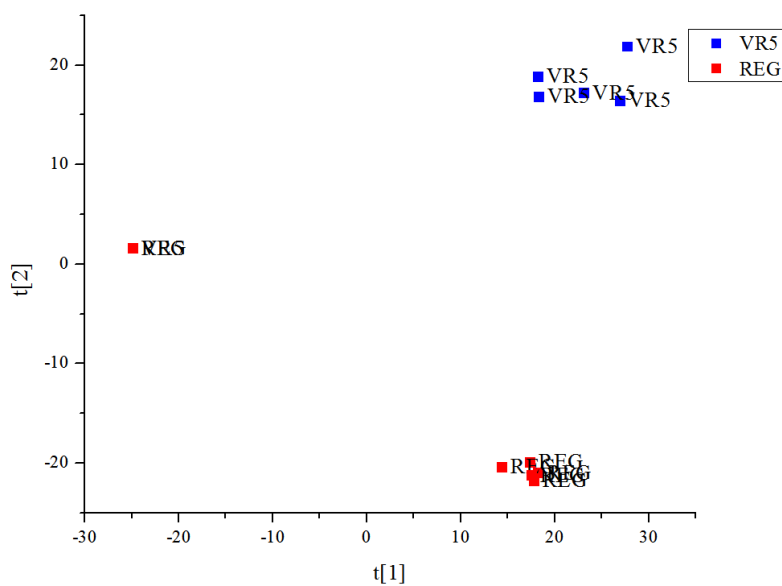


Figure 3.9 – Carte factorielle de la série d’injection B en mode positif sans les blancs, où $t[1]$ est la composante 1, et $t[2]$, est la composante 2

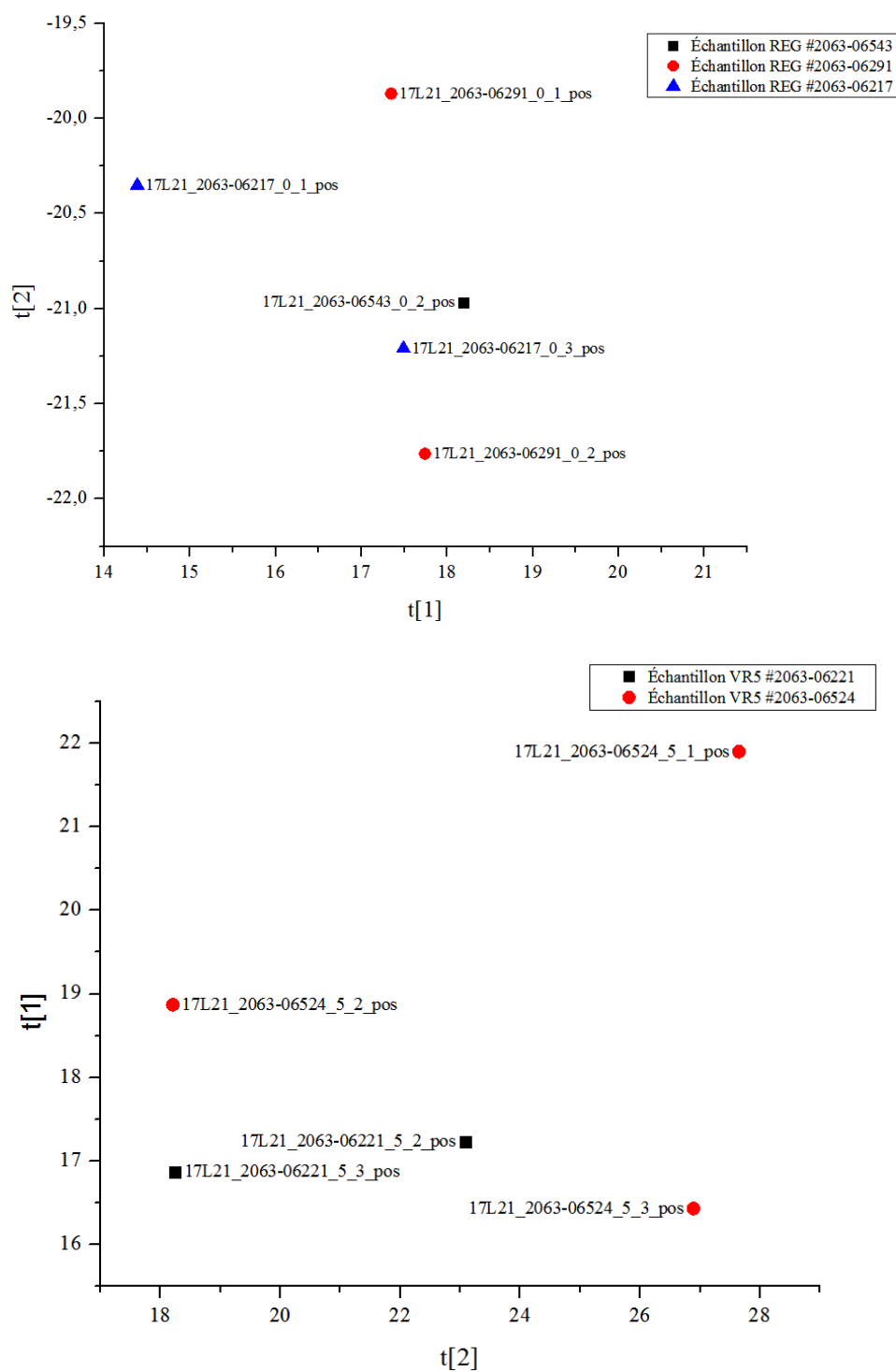


Figure 3.10 – Cartes factorielles de la série d’injection B en mode positif sans les blancs où $t[1]$ est la composante 1, et $t[2]$, est la composante 2. La figure du haut représente les échantillons REG et celle du bas, les échantillons VR5.

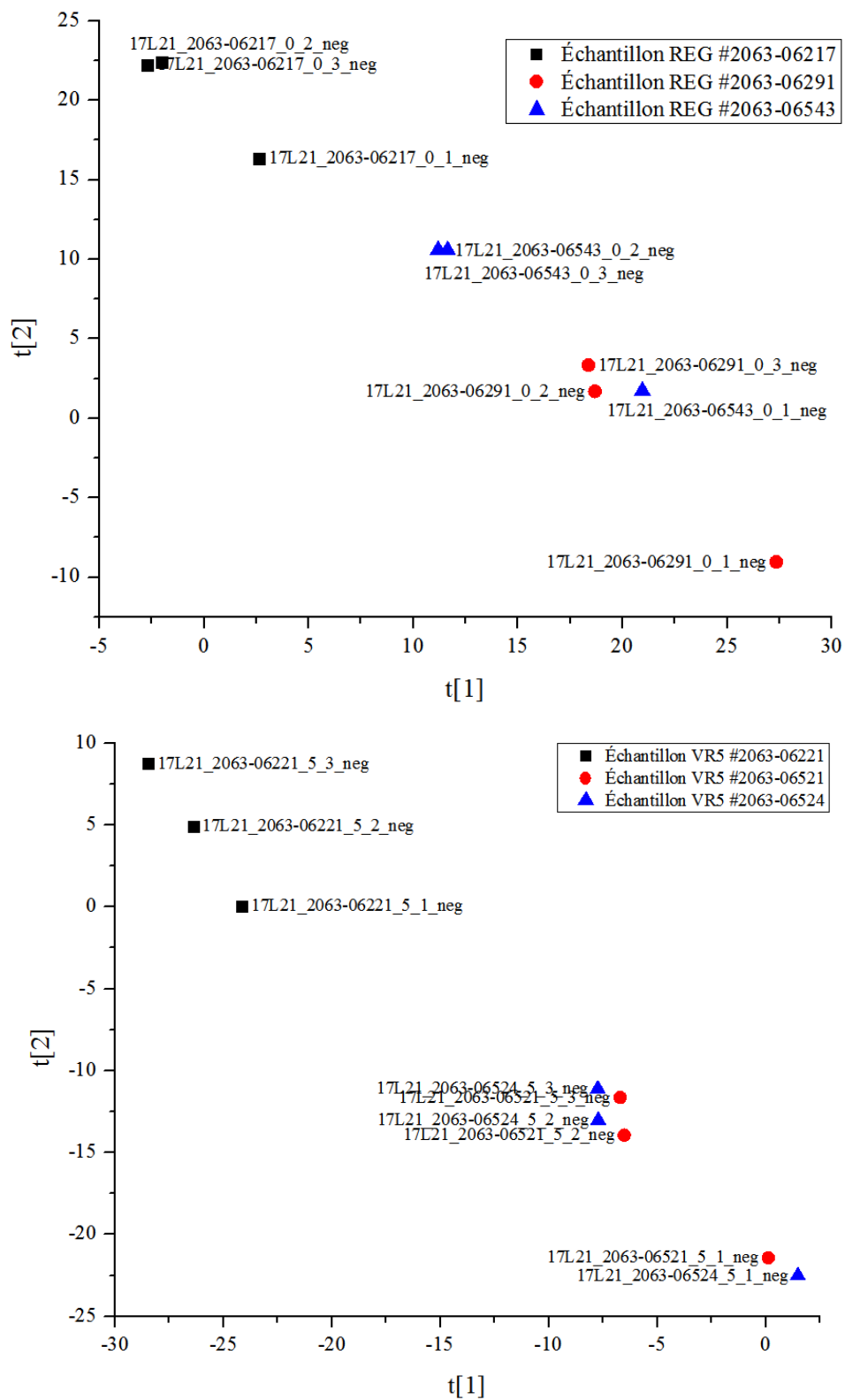


Figure 3.11 – Carte factorielle de la série d’injection B en mode négatif sans les blancs, où $t[1]$ est la composante 1, et $t[2]$, est la composante 2. La figure du haut représente les échantillons REG et celle du bas, les échantillons VR5.

Comme on peut le constater lorsqu'on compare les figures 3.10 et 3.11, les échantillons sont mieux regroupés selon leur type de sirop dans la carte factorielle effectuée sur les marqueurs négatifs en plus de la proximité aux réplicats de mêmes échantillons plus importants.

L'analyse des composantes, et la comparaison entre le mode négatif et le mode positif (tableau 3.2) démontrent la différence de reproductibilité. Les écarts-types des coordonnées des échantillons 2063-06543, 2063-06291 et 2063-06217 sont plus élevés, surtout pour l'axe t[1], pour l'analyse en mode positif.

Tableau 3.2 - Coordonnées des échantillons de la carte factorielle de l'injection B du mode positif et négatif

# Échantillon	Type	# Réplica	Mode positif		Mode négatif	
			t[1]	t[2]	t[1]	t[2]
2063-06521	5	1	-25	1,6	0,11	-21
		2	-25	1,6	-6,5	-14
		3	-25	1,6	-6,7	-12
Écart-type			0	3E-16	4	5
2063-06221	5	1	-25	1,6	-24	0,060
		2	23	17	-26	4,9
		3	18	17	-28	8,8
Écart-type			26	9	2	4
2063-06524	5	1	28	22	1,5	-23
		2	18	19	-7,7	-13
		3	27	16	-7,7	-11
Écart-type			5	3	5,3	6
2063-06217	0	1	14	-20	2,7	16
		2	-25	1,6	-2,0	22
		3	17	-21	-2,7	22
Écart-type			24	13	3	3
2063-06543	0	1	-25	1,6	21	1,7
		2	18	-21	12	11
		3	-25	1,6	11	11
Écart-type			25	13	6	5
2063-06291	0	1	17	-20	27	-9,1
		2	18	-22	19	1,7
		3	-25	1,6	18	3,3
Écart-type			25	13	5	7

C'est pour cela que l'analyse ne s'est poursuivie que pour les données du mode négatif. Ainsi, nous évitons les données aberrantes de l'injection B observée en mode positif.

3.2.3 Filtration des données

Cette section consiste à réduire la liste des marqueurs de chaque injection de sorte à obtenir une liste de composés qui sont plus abondants dans l'un des deux types de sirop à l'étude. Ainsi, comme pour l'étude HS-SPME-GC-MS, nous obtiendrons une liste de composés qui sont potentiellement responsables du goût de bourgeon dans les sirops $\sqrt{R5}$.

Le nombre total de marqueurs pour les injections A, B et C en mode négatif sont respectivement de 2696, 2470 et 3460. Après avoir enlevé les marqueurs présents dans les blancs, nous avons séparé les marqueurs en deux groupes selon le type de sirop (type $\sqrt{R5}$ ou REG), ceci a été notre première filtration. Pour ce, il a été question de choisir dans les *loadings plot* les échantillons se trouvant dans les quadrants correspondant au regroupement observé dans les cartes factorielles. Si l'on prend la combinaison *loading-score (bi-plot)* de l'injection A (fig. 3.12), les marqueurs se trouvant en haut à droite de l'axe des ordonnées sont associés au type $\sqrt{R5}$, et ceux en bas à gauche de l'axe sont associés au type REG.

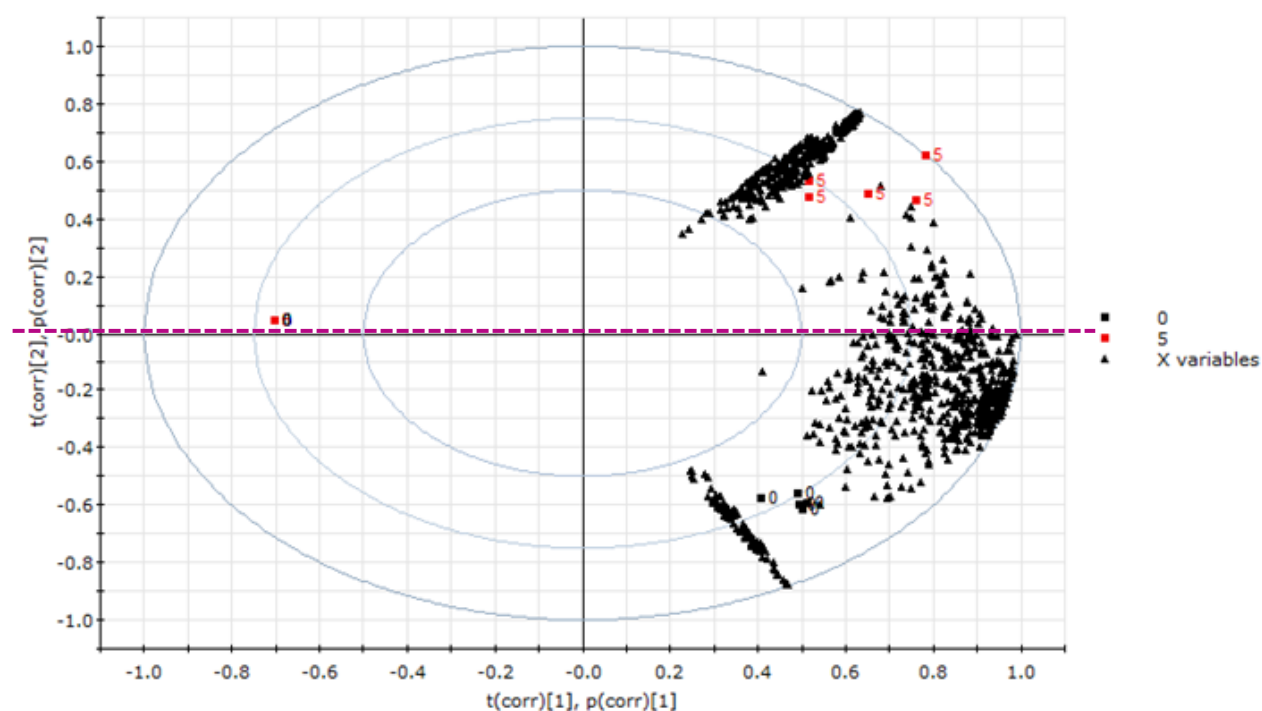


Figure 3.12 - *Loading-score bi-plot* de l'injection A en mode négatif sans les blancs et les marqueurs présents dans les blancs, où $t[1]$ est la composante 1, et $t[2]$, est la composante 2

À la suite de cela, il reste alors 2421, 2246 et 3305 marqueurs pour les injections A, B et C. Pour la deuxième filtration, on a sélectionné les marqueurs dont le m/z se répète dans plus d'une série d'injections et qui correspondent au même type de sirop auquel ils sont attribués. Par exemple, si dans une première

injection un marqueur semble correspondre au type REG, mais que dans la suivante il correspond au type $\sqrt{R5}$, il est alors exclu.

Une fenêtre de temps de rétention de 0,3 minute a été fixée, ce qui constitue notre troisième filtration. Celle-ci est nécessaire, car des marqueurs de même m/z se trouvent à différents temps de rétention, certes parfois proches, mais il pourrait tout de même provenir de différents composés. Ceci donne une liste de marqueurs que nous appellerons liste des 42 marqueurs HITs. Ils ont été sujets à des identifications dans la section suivante et sont classés selon leur m/z dans le tableau 3.3.

Notez qu'à partir d'ici, les entités associées au type REG seront associées à la couleur rouge et ceux du type $\sqrt{R5}$, la couleur bleue (comme c'était le cas dans la partie SPME-GC-MS). Cette fois-ci, il y a bien plus de marqueurs HITs associés au type REG, soit 27, et 15 marqueurs HITs pour le type $\sqrt{R5}$.

Tableau 3.3 – Liste des 42 marqueurs HITs issue de l'étude UPLC-QTOF-MS/MS

#	dRT (min)	RT (min) dans l'une des injections	[M-H] ⁻	Type	Nombre d'injection ou présent
1	0,2673	3,4778	151,0379	REG	2
2	0,0393	3,5744	231,9665	$\sqrt{R5}$	3
3	0,0389	4,6287	247,0638	$\sqrt{R5}$	2
4	-0,001	5,7829	249,0788	$\sqrt{R5}$	2
5	0,0401	4,5408	267,0856	$\sqrt{R5}$	2
6	0,071	4,6416	291,9864	$\sqrt{R5}$	3
7	0,0241	3,9415	329,1368	REG	2
8	0,0133	3,4017	329,1374	REG	2
9	0,2508	4,1685	329,1381	REG	2
10	0,0819	2,2961	341,1085	$\sqrt{R5}$	2
11	-0,1545	3,6311	345,1329	REG	2
12	0,0089	5,7983	360,0882	REG	2
13	0,1826	4,2932	373,1269	REG	2
14	-0,0556	3,9480	373,1285	$\sqrt{R5}$	2

15	0,2756	3,6756	377,1586	REG	2
16	0,2907	3,4241	377,1587	REG	2
17	0,0085	3,0195	393,1521	REG	2
18	0,0994	2,7210	393,1544	REG	2
19	-0,0002	4,1563	403,1373	REG	2
20	0,0284	3,7913	407,134	REG	2
21	0,1522	3,3630	409,1483	REG	2
22	0,0068	2,4131	409,1485	REG	2
23	0,0277	3,9425	463,2164	REG	2
24	0,0176	2,7171	467,1555	√R5	2
25	0,0355	3,6924	487,3037	REG	2
26	-0,1189	2,7201	506,0881	REG	2
27	0,1999	4,0009	535,1819	√R5	2
28	0,0268	3,6247	539,1785	√R5	2
29	0,0208	3,3648	541,1919	REG	2
30	-0,1270	3,5305	545,2011	√R5	2
31	0,0284	3,6573	548,1038	REG	2
32	0,0232	3,9396	551,2134	REG	2
33	-0,0912	4,1775	555,2202	√R5	2
34	0,0389	3,7525	585,1964	√R5	2
35	0,0223	3,4178	622,1369	REG	2
36	0,1719	3,2558	635,2338	REG	2
37	-0,0049	2,7339	637,2288	REG	2

38	-0,0015	3,1835	647,2329	REG	2
39	0,0025	4,0297	716,1752	√R5	2
40	-0,0104	4,9041	786,1826	√R5	2
41	0,0000	4,7377	811,3172	√R5	2
42	0,0276	3,5285	845,3073	REG	2

3.2.4 Identification des marqueurs HITs

Pour l'identification des marqueurs HITs, nous avons mesuré les spectres MS/MS de chacun puis comparer ceux-ci aux spectres MS/MS dans diverses bases de données disponibles en ligne telles que MoNA (*Mass Bank of North America*), *MassBank Europe Mass Spectral DataBase*, *MSSJ MassBank Mass Spectral DataBase*, *The Human Metabolome Database*, *DRUGBANK Online* et *Tandem Mass Spectrum Database*. Nous avons aussi utilisé des outils d'identifications disponibles en ligne tels que *MetFrag* et *CFM-ID (Competitive Fragmentation Modeling for Metabolite Identification)*. Lorsqu'un spectre similaire est trouvé, le composé associé fut commandé si disponible puis testé en l'analysant avec les mêmes méthodes chromatographiques et de spectrométrie de masse pour confirmer s'il correspond au marqueur HIT. Il ne faut bien entendu pas seulement vérifier le patron de fragmentation, mais aussi si la masse exacte correspond.

Cette tâche s'est révélée être plus ardue que prévu ; pour tous les candidats commandés et testés, aucun ne correspond à nos marqueurs. Pour certains, le ou les composés candidats n'étaient pas faciles d'accès ; ce fut un défi de trouver des fournisseurs offrant les composés candidats. Pour d'autres, il n'y avait pas de candidats avec un spectre MS/MS suffisamment ressemblant parmi tous les composés de même masse exacte. Souvent, au cours de notre processus d'identification, les spectres MS/MS des marqueurs ne figuraient pas dans les bases de données consultées ou il pourrait également s'agir de composés non découverts à ce jour. Il se peut qu'ils correspondent aux composés analysés, mais que leurs spectres MS/MS ont été effectués dans des conditions suffisamment différentes pour générer un patron de fragmentation trop différent pour qu'ils soient associés. Il est également difficile de tester tous les composés de même masse avec nos méthodes.

À l'inverse, nous pouvons confirmer que certains de nos HITs ne correspondent pas à une série de molécules testées et c'est une information qui est profitable dans le cadre de notre étude. Pour les HITs qui n'ont pas pu être testés ou qui n'ont pas de candidats suffisamment plausibles, nous avons des hypothèses

basées sur l'analyse des spectres MS/MS enregistrés qui sont réunies dans le tableau 3.5 discuté plus tard. La liste initiale comprend 7 HITS seulement et 14 molécules testées (tableau 3.4).

Tableau 3.4 - Listes des composés candidats testés pour l'identification des HITS de l'étude UPLC-QTOF-MS/MS

[M-H] ⁻	M	RT (min)	Nom des candidats testés	CAS	M	*RT (min)	XLogP3-AA
151.0379	152.0452	3.4778	Oxypurinol	2465-59-0	152.0334	0.55-0.71	-0.9
			2-Méthyl-5-nitroaniline	99-55-8	152.0586	(Visible qu'en mode positif)	1.9
			Acide DL-mandélique	90-64-2	152.0473	2.45	0.6
			Vanilline	121-33-5	152.0473	3.17	1.2
			Acide 3-Hydroxyphénylacétique	621-37-4	152.0473	2.72	0.9
247.0638	248.0711	4.6287	Sudan I	842-07-9	248.0950	7.54-8.49	4.1
			Fludioxonil	131341-86-1	248.0397	6.39	2.6
249.0788	250.0861	5.7829	Diflunisal	22494-42-4	250.0442	7.11	4.4
329.1368	330.1441	3.9415	Tricine	520-32-1	330.0740	5.22	1.7
329.1374	330.1447	3.4017	2-{{6-(Diéthylamino)pyridin-3-yl}amino}-5-nitropyridine-3-carboxamide	1209192-88-0	330.1440	3.17	2.1
			2-{{1-[3-(diméthylamino)-2-hydroxypropyl]-1H-pyrazol-4-yl}amino}-5-nitrobenzotrile	1333724-88-1	330.1440	2.23-2.66	1.2
345.1329	346.1402	3.6311	3-(1-{{1-(difluorométhyl)-1H-imidazol-2-yl}méthyl}-1,2,3,6-tétrahydropyridin-4-yl)-6-fluoro-1H-indole	2094588-76-6	346.1405	3.51-3.64	2.8
487.3037	488,3110	3.6924	Acide asiatique	464-92-6	488.3502	6.89	5.7
			Vardénafil	224785-90-4	488.2206	3.35-3.60	2.5

*Il y a parfois deux RT d'inscrits, car il y a deux signaux qui apparaissent sur le spectre.

C'est en se basant sur des prédictions de fragmentation, la similarité de leur masse exacte et celle de leur spectre MS/MS que les composés testés ont été choisis. Les spectres MS/MS trouvés dans les banques de données sont souvent effectués sous différentes conditions et avec des appareils différents, c'est pourquoi il a été jugé utile de les tester avec nos instruments sous les mêmes conditions que celles des HITs malgré de faible similarité. Ils ont été testés une fois en les diluant simplement dans du méthanol et une deuxième fois en dopant un de nos échantillons de sirop d'érable ; à chaque fois, il n'y avait aucun (ou peu, pas plus de 0,1 min) de différence au niveau du temps de rétention entre la matrice d'eau et la matrice de sirop d'érable.

Inutile de comparer les spectres MS/MS de chacun de ces composés avec les HITs correspondant puisque le RT prouve qu'il ne s'agit pas du composé excepté pour 3-(1-{[1-(difluorométhyl)-1H-imidazol-2-yl]méthyl}-1,2,3,6-tétrahydropyridin-4-yl)-6-fluoro-1H-indole testé pour le HIT 345.1329. La différence entre de temps de rétention entre les deux (le HIT et le candidat) n'est que de 0,0089 min, mais on voit que dans la figure 3.13, il n'y a que le pic de l'ion précurseur (pointé d'une flèche rose) qui correspond.

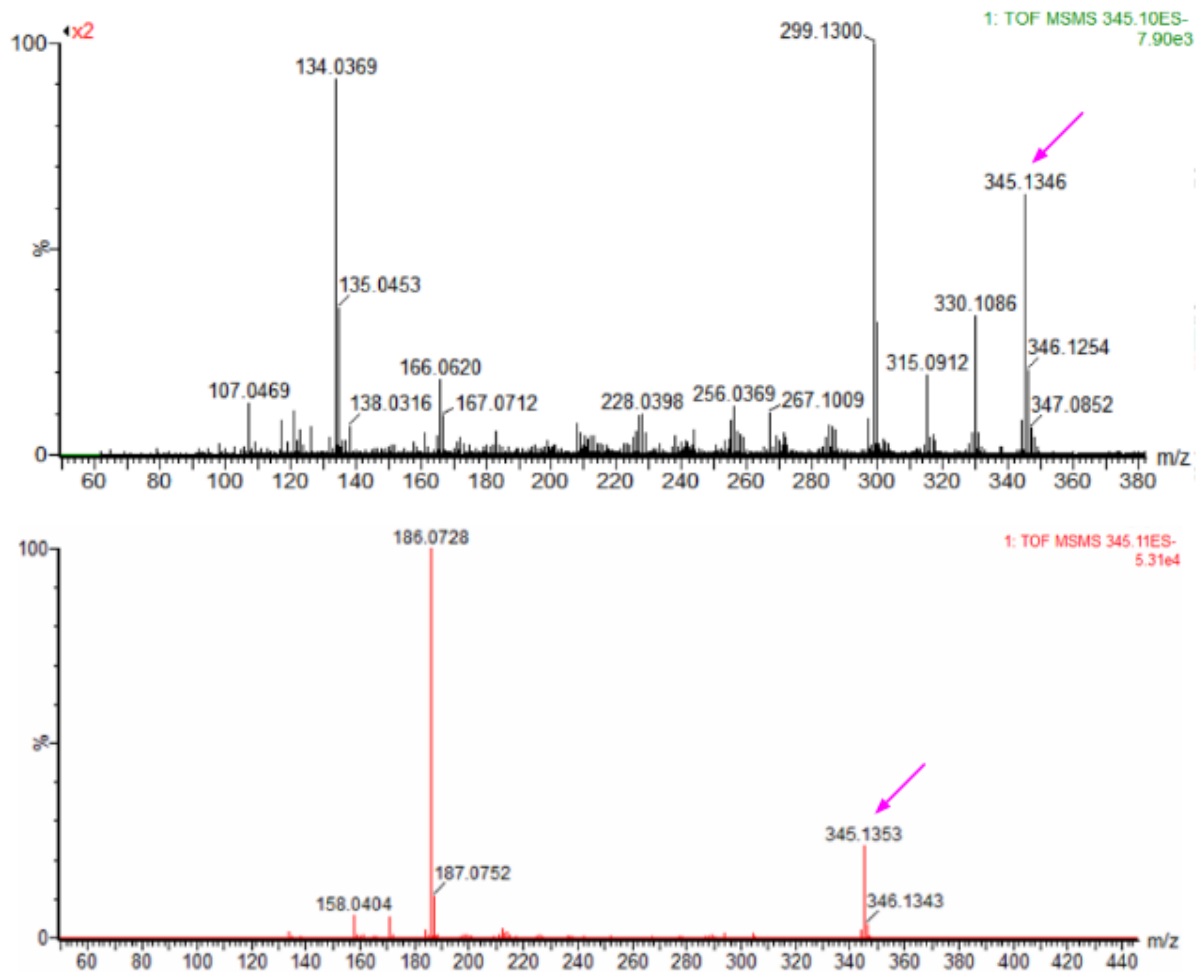


Figure 3.13 Spectres de masse en tandem du HIT à m/z 345.1329 (en haut) et du composé candidat 3-(1-{[1-(difluorométhyl)-1H-imidazol-2-yl]méthyl}-1,2,3,6-tétrahydropyridin-4-yl)-6-fluoro-1H-indole (à bas)

Sur ce, l'identification ne s'est pas soldée par un échec total ; les tests nous ont permis de récolter quelques informations sur nos HITs. Prenons par exemple le premier HIT, soit m/z 151.0379 : son patron de fragmentation est plus ressemblant à celui de l'acide 3-hydroxyphénylacétique.

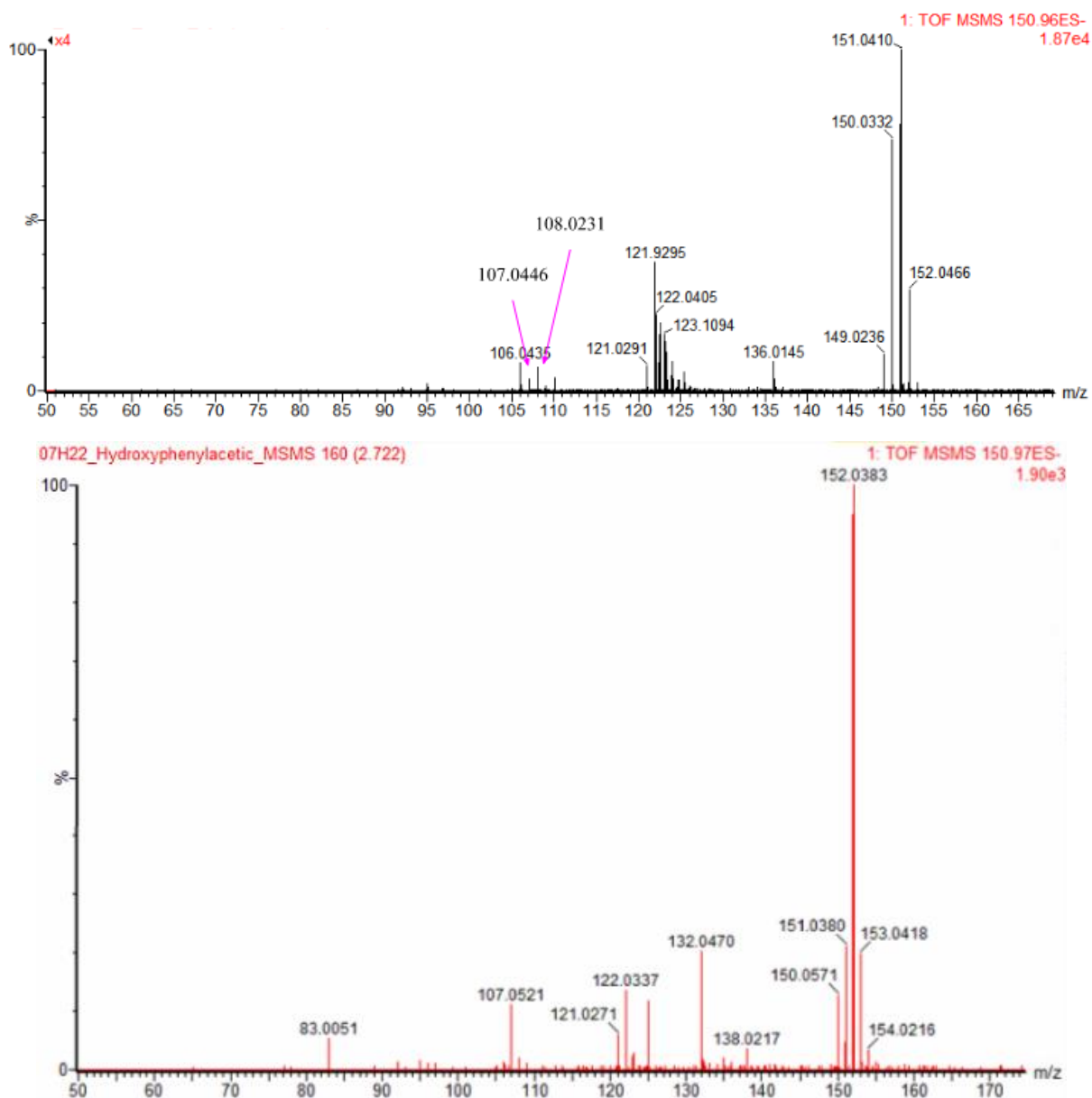


Figure 3.14 - Spectres de masse en tandem du HIT à m/z 151.0379 (en haut) et du candidat acide 3-hydroxyphénylacétique (en bas)

Le pic de 107.0521 m/z correspond à une perte de 43.9859 m/z par rapport au pic de l'ion précurseur, 151.0380, ou de 44.9862 par rapport au pic de 152.0383 pour l'acide 3-hydroxyphénylacétique, ce qui semble être la perte du groupement COO⁻ (M = 43.989830 u) ou COOH (M = 44.997655 u). Il se pourrait que cela soit le cas pour le pic de 107.0927 m/z du HIT. Il se pourrait aussi que le pic 108.0231 par rapport au pic 136.0145 ($\Delta(m/z) = 27.9914$) corresponde à une perte de CO (M = 27.994915 u) ; ceci semble être le cas pour la vanilline et ses pics 108.0225 et 136.0184 qui ont une différence de 27.7934 m/z. Aussi, dans le spectre MS/MS du HIT, il y a une différence entre les pics 136.0145 m/z et 151.0410 m/z de

15.0265 m/z, ce qui correspondrait soit à une perte de CH₃ (M = 15.023475 u) ou une perte de NH (M = 15.010899 u). La différence entre 121.9295 et 136.0145 m/z est de 14.0850 m/z ce qui pourrait correspondre à CH₂ (M = 14.015650 u).

Si l'on résume, il est probable que le HIT à m/z 151.0379 ait les groupements suivants : CO, COOH, CH₂, NH ou CH₃. Excepté pour le groupement COOH, tous sont également présents dans le spectre de l'oxypurinol (voir annexes B, b, i, page lxxv), mais, en dehors des pics à m/z 151.0270 et 152.0273, les autres pics correspondants sont 107.0288, 108.0209 et 123.0196 m/z. Sa structure est différente par rapport aux autres candidats.

Il est clair que l'analyse de pic n'est pas suffisante, c'est pourquoi on se tourne vers la polarité. Le temps de rétention du HIT (3.4778 min) se trouve entre celui de la vanilline (3.17 min) et du 2-méthyl-5-nitroaniline (4.43 min), il s'agit donc d'un composé qui a une polarité qui se trouve entre les valeurs de logP des deux composés, soit entre 1.2 et 1.9 respectivement. Selon l'équation d'une courbe exponentielle ($R^2=0.9887$) sur les temps de rétention et leur logP, le logP correspondant au RT du HIT serait de 1.3.

Prenons maintenant le HIT suivant, le HIT à m/z 247.0638, pour qui deux candidats ont été testés, le sudan I et le fludioxonil. Ces derniers ont non seulement des temps de rétention différents, mais en plus leur spectre MS/MS expérimental s'est révélé être fort différent. Leur choix n'aurait jamais dû avoir lieu, car si l'on se fit sur le spectre du HIT, il devrait y avoir un groupement H₂PO₄⁻ (M = 96.9691 u) ou HSO₄⁻ (M=96.9596 u). Ces groupements ont une masse exacte qui pourrait expliquer le pic de 96.9613 m/z. Le m/z du pic étant plus proche de celle de HSO₄⁻, il est plus probable qu'il s'agisse d'un composé ayant ce groupement. Puisque c'est le seul pic en dehors du pic précurseur (m/z 247.0687), il s'agit alors d'un groupement H₂SO₄⁻ terminal, une position où la fragmentation serait facile. Le logP est probablement situé en dessous de celles de deux candidats testés, donc elle se trouve en dessous de 2,6 pour mieux correspondre au temps de rétention.

Ayant ces informations en main, la liste de candidats possible est réduite, mais le manque de spectres MS/MS disponibles fait que ce choix n'est pas évident.

Pour ce qui est du HIT m/z 329.1368, la tricine (pour spectre MS/MS, voir annexe B, b, ix, page **Error! Bookmark not defined.**) qui est le seul candidat testé n'a pas un temps de rétention concordant, mais les premiers pics le sont. Cela porte à conclure qu'il y a des similarités entre la structure du HIT et du candidat. On fait référence aux pics 330.0727, 329.1459, 314.1198, 299.0970 et 185.0224 m/z. Cela dit, les écarts sont d'environ 15 m/z ce qui correspond au groupement CH₃ (M = 15.023475 u) ou NH (M = 15.010899 u), ce qui n'est pas très informatif de la structure du HIT.

Pour ce qui est du HIT m/z 487.3037, il est évident qu'il s'agit d'un composé avec une structure similaire à celle de l'acide asiatique ; dans les spectres du HIT et du candidat, il n'y a qu'un seul pic qui est

de 487.3238 et de 487.3466 m/z respectivement. C'est le temps de rétention non correspondant qui fait qu'il ne s'agit pas de la bonne identité et non le patron de fragmentation.

Notez que nos hypothèses sur l'identité des HITs et les composés candidats non testés sont résumées dans le tableau 3.5.

Tableau 3.5 - Hypothèses sur l'identité des HITs ou les composés non validés avec des étalons

[M-H] ⁻	Nom IUPAC des candidats non validés avec des étalons	Notes
151,0379		Composé ayant un groupement OH, COOH, CH ₂ et CH ₃ LogP est de 1.3 environ
247,0638		Groupement HSO ₄ ⁻ ou H ₂ PO ₄ ⁻ LogP < 2,6
329,1368		Groupement CH ₃ ou NH
329,1374	(2Z)-4,6-dihydroxy-2-[(4-hydroxy-3,5-diméthoxyphényl)méthylidène]-1-benzofuran-3-one	
329,1381	1,7-Bis(3,4-dihydroxyphényl)heptan-3-one	
373,1269	5-Hydroxy-2-(3-hydroxy-4,5-diméthoxyphényl)-3,7-diméthoxy-4H-1-benzopyran-4-one	
373,1285	5-Hydroxy-2-(3-hydroxy-4,5-diméthoxyphényl)-3,7-diméthoxy-4H-1-benzopyran-4-one	
377,1586	6,11-Dihydroxy-3-méthyl-3-(4-méthyl-3-pentényl)-3H,7H-pyrano[2,3-c]xanthène-7-one	
377,1587	6,11-Dihydroxy-3-méthyl-3-(4-méthyl-3-pentényl)-3H,7H-pyrano[2,3-c]xanthène-7-one	
487,3037		Similaire à l'acide asiatique
506,0881	3,15-Dibenzyl-1,4,12-triméthyl-1,4,7,10,13-pentazacyclopentadécane-2,5,8,11,14-pentone	
539,1785	2-[3-[4-[1,3-Dihydroxy-1-(4-hydroxy-3-méthoxyphényl)propan-2-yl]oxy-3-méthoxyphényl]propoxy]-6-(hydroxyméthyl)oxane-3,4,5-triol	
845,3073	[(7S,11S,12R,13S,14R,15R,16R,17S,18S,19Z,21E)-2,15,17,32-tétrahydroxy-11-méthoxy-3,7,12,14,16,18,22-heptaméthyl-1'-(2-méthylpropyl)-6,23-dioxospiro[8,33-dioxa-24,27,29-triazapentacyclo[23.6.1.14.7.05,31.026,30]tritriacontal(31),2,4,9,19,21,25(32),26,29-nonaène-28,4'-pipéridine]-13-yl] acétate	

Il y a un HIT à m/z 539.1785, pour lequel il y a beaucoup d'assurances quant à son identité, même s'il n'a pas été validé avec un étalon. Comme souligné dans la figure 3.15 et le tableau 3.6, plusieurs pics sont en commun. Le pic du candidat 2-[3-[4-[1,3-dihydroxy-1-(4-hydroxy-3-méthoxyphényl)propan-2-yl]oxy-3-méthoxyphényl]propoxy]-6-(hydroxyméthyl)oxane-3,4,5-triol provient de la banque de données *Masse Bank of North America*. Bien que le pic ayant la plus grande intensité n'est pas le même, leur patron est fort similaire ; l'appareil utilisé ainsi que les paramètres d'acquisition pour l'obtention de ce spectre ne sont pas les mêmes. Donc, pour ce HIT, il s'agirait de commander et de tester ce candidat dans les mêmes conditions avec lesquelles le HIT a été analysé. Notez que nous avons échoué à trouver un vendeur pour ce composé.

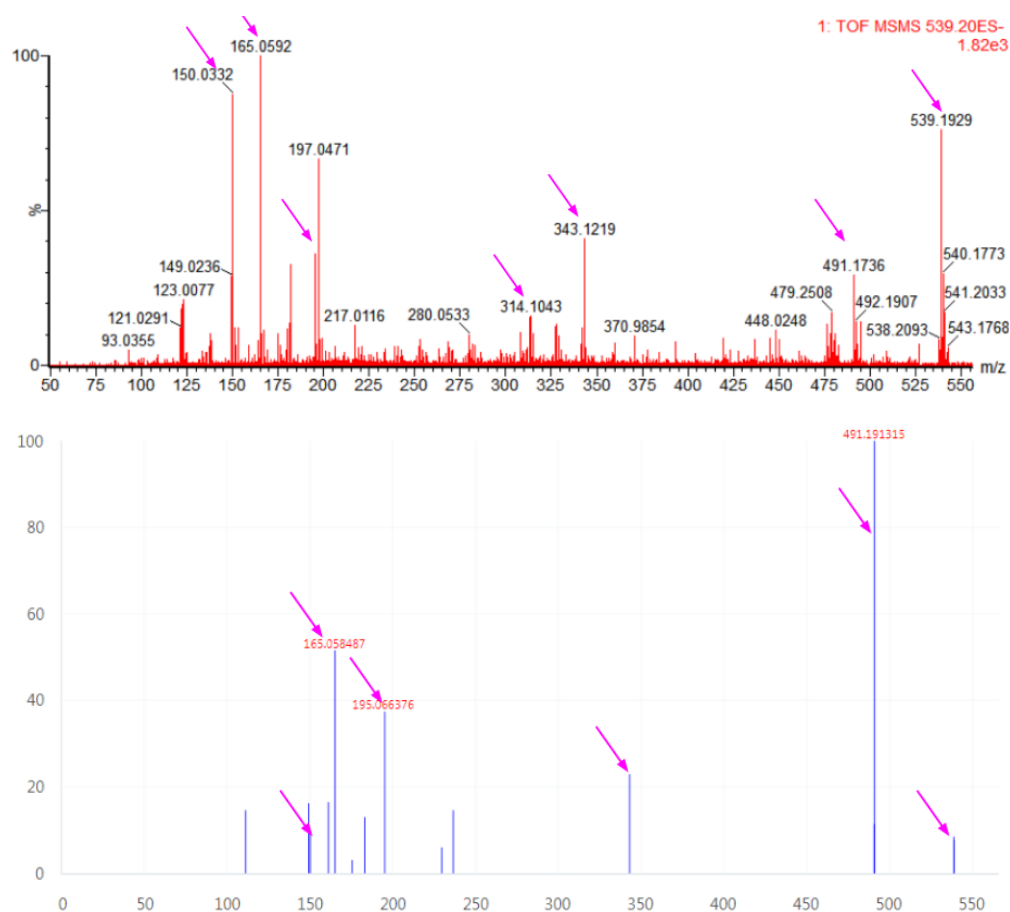


Figure 3.15⁸⁵– Spectre de masse en tandem du HIT à m/z 539.1785 (en haut) et du composé candidat 2-[3-[4-[1,3-dihydroxy-1-(4-hydroxy-3-méthoxyphényl)propan-2-yl]oxy-3-méthoxyphényl]propoxy]-6-(hydroxyméthyl)oxane-3,4,5-triol (en bas)

Tableau 3.6 - Pic en commun entre le HIT à m/z 539.1819 et le candidat 2-[3-[4-[1,3-dihydroxy-1-(4-hydroxy-3-méthoxyphényl)propan-2-yl]oxy-3-méthoxyphényl]propoxy]-6-(hydroxyméthyl)oxane-3,4,5-triol

m/z	%BPI	Ion	Intensity
539.1929	76.15	539.220215	7.659392
491.1736	29.17	491.132355	100.000000
343.1219	40.79	343.143402	22.935387
195.0652	35.96	195.066376	37.398374
165.0592	100.00	165.058487	51.561831
150.0332	87.45	150.033096	9.841677

Pour le reste des HITs mentionnés dans le tableau 3.5, il y a des candidats de proposés. Pour les HITs qui ne sont pas mentionnés dans le tableau 3.5, on peut retrouver leurs spectres en annexe dans la section B, a, page xxii.

Vu l'échec rencontré lors de l'identification des HITs, une seconde séparation par chromatographie préparative pourrait être faite pour isoler les fractions contenant le HIT qui nous intéresse et l'analyser par RMN ou IR. Ainsi nous obtiendrons plus d'informations par rapport à sa structure, ce qui nous permettra de sélectionner le bon candidat. Cela dit, le sirop d'érable étant complexe en termes de composés organiques, la sélection des fractions ne pourra se faire par détection UV, il faudra alors analyser les spectres MS voir MS/MS de chaque fraction de sorte à être sûr de sa présence dans celle sélectionnée. Analyser toutes les fractions est une tâche commensurable, mais ceci sera nécessaire dans un premier temps puisque l'appareillage sera différent autant que le sera la méthode chromatographique.

3.2.5 Conclusion

Ce qui a été observé à partir des résultats de l'analyse UPLC-QTOF-MS est similaire à ce qu'on a observé pour ceux de l'analyse HS-SPME-GC-MS. En effet, à travers les cartes factorielles, la différence entre les échantillons de type $\sqrt{R5}$ et REG a été une seconde fois démontrée dans ce mémoire. Ce n'est donc pas seulement au niveau des composés volatils et semi-volatils que le sirop $\sqrt{R5}$ et REG diffèrent, mais aussi au niveau des composés non volatils. Cette différence est plus accrue pour les composés non volatils ionisables négativement que pour ceux ionisables positivement.

À partir de ces mêmes cartes factorielles, nous avons associé les composés détectés dans les échantillons à l'un des deux types de sirop à l'étude. S'ensuit alors la filtration de ces composés qui nous

ont permis d'obtenir une liste de marqueurs HITs. Tout comme la liste des 42 HITs, c'est une liste de composés qui peut potentiellement caractériser un sirop selon son profil moléculaire. En d'autres mots, ces composés permettent potentiellement de déterminer s'il s'agit d'un sirop $\sqrt{R5}$ ou REG en plus d'y contenir les composés potentiellement responsables du gout de bourgeon. Cette liste regroupe au total 42 marqueurs HITs.

Un échec a été rencontré lors de l'identification des marqueurs HITs. En effet, aucun marqueur HIT n'a été identifié. Nous proposons donc d'utiliser la séparation par chromatographie préparative pour d'abord isoler ces marqueurs HITs pour ensuite les identifier à l'aide d'analyse RMN et IR. Il est aussi possible de poursuivre la méthode que nous avons employée qui est de comparer les spectres MS/MS des marqueurs HITs (voir annexe, section B, b, page lxxv) avec des spectres MS/MS provenant de diverses banques de données. Le mieux est d'utiliser des banques de données que nous n'avons pas pu utiliser.

4 Conclusion

4.1 Sommaire des résultats

Lorsque l'on compare nos deux études par chromatographie gazeuse et liquide, on constate que l'étude des composés organiques volatils issus du sirop d'érable est plus complète ; les composés nommés composés HITs sont identifiés alors qu'aucun marqueur HIT des composés lourds ne l'est. Cela dit, cela ne nous empêche pas de mieux comprendre la composition du sirop d'érable. Une observation qui ne peut être faite qu'en les comparant est qu'il y a une différence plus importante au niveau de la composition pour les composés lourds. En effet, si l'on revient vers les cartes factorielles, les regroupements des échantillons de sirop par type sont plus distincts pour l'étude UPLC, soit pour les composés moins volatils et de masse molaire plus élevée. Pour l'étude SPME, il y a de l'enchevêtrement, c'est-à-dire que la composition des composés organiques volatils de certains échantillons $\sqrt{R5}$ et similaires à celle de certains échantillons de sirop réguliers.

Aussi, une seconde observation d'ordre plus général, il nous a été possible de voir qu'il y a une disparité entre les deux types de sirop au sein des compositions des composés lourds, mais aussi pour celle des composés légers. De plus, les composés volatils et semi-volatils caractéristiques sont plus souvent associés au sirop $\sqrt{R5}$, alors que les composés lourds caractéristiques sont plus souvent associés au sirop REG.

Au niveau de l'étude SPME, la composition étant majoritairement identifiée, les informations concernant la composition du sirop d'érable sont dès lors plus complètes. En effet, plusieurs composés qui n'ont pas été rapporté auparavant comme étant présent dans le sirop d'érable à notre connaissance y ont été trouvés : acide 2-furoïque (**4**), ester bis(2-méthylpropyl) d'acide 1,2-benzènedicarboxylique (**5**, **18**), 3-méthylène-2-norbornanone (**6**), phénol, 2,6-bis(1,1-diméthyléthyl)- (**8**), trans-2,3-époxydecane (**11**), bicyclo[2.2.1]heptan-2-one, 1,7,7-triméthyl-, (1R)- (**12**), cyclopentanone, 2-méthyl- (**16**), 2,3-diméthyl-5-éthylpyrazine (**20**), cédrol (**21**), 9,9-diméthoxybicyclo[3.3.1]nona-2,4-dione (**24**), acide (R-(R*,R*))-4-(1,5-diméthylhexyl)-1-cyclohexènedicarboxylique (**25**), bicyclo[2.2.1]heptan-2-one, 1-(bromométhyl)-7,7-diméthyl-, (1S)- (**26**), acide 7,7-diméthyl-2-oxo-bicyclo[2.2.1]heptane-1-méthanesulfonique, (+/-)- (**27**), cyclohexanone, 5-méthyl-2-(1-méthyléthényl)-, trans- (**29**), cyclohexane, 1,5-diméthyl-2,3-divinyl- (**30**), 2,3'-bipyridine, 1',3,4,4',5,5',6,6'-octahydro- (**31**), cyclopentane, 1-acétoxyméthyl-3-isopropényl-2-méthyl- (**33**), spiro[2.4]heptan-4-one (**34**), uracil, 5-éthyl- (**36**), acide 1,3-benzènedicarboxylique, 5-(1,1-diméthyléthyl)- (**38**), cyclopropane, 1,1-dichloro-2-(1-éthylpropyl)-2-méthyl- (**39**), hexanal, 3,3-diméthyl- (**41**) et 3-pentanol, 2,2-diméthyl- (**42**). Nous considérons cette contribution comme un élément important de notre étude.

Puisque cela était à notre portée, nous avons également mené une sous étude par rapport aux cartes factorielles pour le regroupement selon la transmittance de nos échantillons. Comme attendu, il y a en effet regroupement par rapport aux gammes de transmittance, mais ce qui ne l'était pas, c'est le fait que le regroupement selon le type de classement de saveur est plus apparent au sein des échantillons de la gamme transmittance 0-25%, soit les sirops d'érable les plus foncés. Les résultats ont montré que le regroupement était de moins en moins marqué au fur et à mesure que les sirops sont de transmittances plus élevées.

Ils ont aussi montré que les HITs qui sont plus abondants dans le type de sirop $\sqrt{R5}$, sont pour la plupart plus abondants dans la gamme de sirop 51-75%, soit une gamme de transmittance relativement claire.

Il a également été démontré que l'utilisation prolongée de l'appareillage utilisé a un effet faible, certes, mais présent au niveau des regroupements puisqu'il y a une tendance de regroupement dans les cartes factorielles lorsque celle-ci compare les mois au cours desquelles nous avons effectué les analyses.

Quant au modèle de prédiction construit, il s'agit d'un arbre de décision permettant de prédire le type de sirop (entre le type régulier et le type $\sqrt{R5}$) en se basant sur les 42 HITs. Il est simplifié de sorte à ne se baser que sur le disulfure de diméthyle (**9**) et a un pourcentage de prédiction exact de 90%, soit 96% d'exactitude pour le sirop régulier et 74% pour le sirop $\sqrt{R5}$.

Pour terminer, au niveau des *loading plot*, nous avons tenté d'observer des covariances au sein des HITs selon leur classe ou leur sous-classe de composés. Cela a été observé surtout pour les pyrazines et les diazines. D'autres covariances moins fortes ont été observées pour les benzènes et dérivés substitués, acides benzoïques et dérivés, les composés organooxygénés, les lipides prénoï et les monoterpénoïdes.

Au niveau de l'étude UPLC, il y a eu une réorientation de celle-ci vers les analyses en mode négatif par souci de répétabilité. En effet, il y avait plus de variation au sein des réplicats dans le mode positif. Aussi, les composés polaires étant majoritairement des sucres et des acides aminés, nous nous sommes concentrés sur les composés apolaires du sirop d'érable.

Dus au logiciel utilisé pour les cartes factorielles et les *loading plots*, nous avons manuellement sélectionné et filtré les marqueurs pour obtenir notre liste de 43 HITs. Ils n'ont malheureusement pas été identifiés, mais plusieurs hypothèses furent posées pour ce qui est de leur identité. Elles sont toutes basées sur les spectres MS/MS de nos HITs et ce qui a été trouvé dans les banques de données.

4.2 Perspectives de recherche

En termes de continuité de notre étude, il y a plus à faire pour l'étude UPLC que pour l'étude SPME/GC-MS. À commencer par les HITs volatils de l'étude SPME, la prochaine étape serait de déterminer les composés responsables du goût de bourgeon parmi les 42 HITs. Certes ils sont plus abondants dans les sirops $\sqrt{R5}$ que dans les sirops réguliers, mais comme expliqués au chapitre 3, ils n'ont pas nécessairement tous un goût désagréable. Les 42 HITs permettent d'identifier les sirops $\sqrt{R5}$ en termes de composition seulement, plus particulièrement le disulfure de diméthyle (**9**) selon le modèle de prédiction. Cependant, une étude antérieure dans le groupe a démontré que le disulfure de diméthyle n'était pas détectable par les goûteurs même à une concentration de 5 à 10 fois supérieure à celle-là plus élevée détectée dans le sirop d'érable.

Pour identifier si les autres composés sont responsables du goût de bourgeon, il nous faudrait commander des étalons de qualité alimentaire pour chaque HIT et les doper avec des échantillons de sirop régulier. Ensuite, il s'agirait de les classer par les mêmes goûteurs de sirop d'érable qui les ont classés comme étant des sirops sans défaut de goût. Pour tous les sirops dopés qui sont reclassés $\sqrt{R5}$, alors il s'agit d'un sirop qui a été dopé par l'un des, ou le responsable du goût de bourgeon. Vu que les OTV et FTV varient grandement à travers les composés organiques, il serait pertinent d'effectuer des dopages à des concentrations subséquentes. Effectuer des dopages combinant différents composés le serait aussi étant donné de la complexité du sirop d'érable.

L'étude SPME ne se limite pas qu'à identifier les composés au goût de bourgeon, la détermination de la composition du sirop d'érable peut aussi permettre de dépister les réactions métaboliques qui se produisent lors du bourgeonnement des érables. Le sirop d'érable est un produit consommé régulièrement pour certains, d'où l'importance d'en comprendre sa composition. Il nous faut donc continuer à compléter la liste de composés qui compose le sirop ou la sève.

Quant aux HITs avec une masse molaire élevée révélés par l'étude UPLC, la suite logique serait de les identifier. Premièrement il nous faut tester les hypothèses posées au chapitre 3, en particulier le candidat du HIT 539.1819 vu la similarité des spectres MS/MS. Autrement, la méthode de séparation par chromatographie préparative pourrait être utilisée ; en isolant les HITs il nous serait possible d'effectuer des analyses RMN et IR ce qui nous informerait sur leurs structures.

Une autre option serait d'utiliser une méthode sur notre appareillage MS/MS différente de ce que nous avons utilisé de sorte à obtenir un patron de fragmentation différent. Ceux obtenus avec notre méthode ne semblent pas correspondre aux spectres MS/MS disponibles dans les banques de données qui nous sont disponibles; un patron de fragmentation différent nous permettra potentiellement d'obtenir un spectre MS/MS similaire aux bibliothèques et d'effectuer une identification.

Une fois l'identification des HITs faite, il s'agira alors de doper des sirops réguliers et de déterminer à l'aide de goûteurs les composés qui sont réellement responsables du goût de bourgeon similairement à l'approche proposée pour les HITs de l'étude SPME.

Ultimement, pour résoudre le problème des acériculteurs expliqué dans l'introduction de ce mémoire, basé sur les résultats, l'étape finale serait de confectionner un détecteur qui permettrait de détecter le taux des composés de bourgeon et ainsi déterminer précisément le début de la production du sirop $\sqrt{R5}$. Ainsi, cela leur limiterait les dommages financiers que suscite la production du sirop de goût de bourgeon.

4.3 Résumé pour les acériculteurs

Dans ce mémoire est présenté une recherche menée qui compare le sirop d'érable régulier, soit le celui que l'on retrouve dans les rayons des supermarchés, et le sirop d'érable goût de bourgeon. Cette recherche a permis de trouver des différences dans leur composition au niveau, mais aussi de découvrir de nouveaux composés présents dans le sirop d'érable québécois. Ceci a été fait dans le but de savoir quelle molécule est responsable du goût de bourgeon dans le sirop d'érable au goût de bourgeon. Or, il se trouve que 42 molécules ont été identifiées et que parmi elles se trouvent statistiquement plus abondantes dans le sirop de bourgeon alors que le reste d'entre elles est plus abondant dans le sirop régulier. Nous poussons les prochaines études à se faire pour confirmer les résultats et à compléter notre étude.

5 Références

1. Production de sirop d'érable (acériculture). <https://www.quebec.ca/agriculture-environnement-et-ressources-naturelles/agriculture/industrie-agricole-au-quebec/productions-agricoles/production-sirop-erable-acericulture#:~:text=La%20consommation%20mondiale%20de%20sirop> (accessed 2022-10-06).
2. Production mondiale de sirop d'érable. <https://www.planetoscope.com/Autre/1579-.html#:~:text=La%20production%20de%20sirop%20d.>
3. Moreau, A., Sirop d'érable : Le Québec nuit à ses producteurs et encourage ses concurrents. *IEDM* **2018**.
4. Les origines du sirop d'érable. <https://ppaq.ca/fr/sirop-erable/origines/> (accessed 2022-10-06).
5. Werner, L. H. Industrie du sirop d'érable. <https://www.thecanadianencyclopedia.ca/fr/article/acericulture> (accessed 2022-10-06).
6. Noakes, T. C. Vol de sirop d'érable du siècle. <https://www.thecanadianencyclopedia.ca/fr/article/vol-de-sirop-d-erable-du-siecle> (accessed 2022-10-06).
7. Érable à sucre (*Acer saccharum*). <https://arbrescanada.ca/ressources/arbres-du-canada/erable-a-sucre-acer-saccharum/#:~:text=L> (accessed 2022-10-06).
8. Burt, N. E., Maple syrup production as a laboratory exercise. *Journal of Chemical Education* **1973**, *50* (9), 623.
9. Ball, D. W., The Chemical Composition of Maple Syrup. *Journal of Chemical Education* **2007**, *84* (10), 1647.
10. L'histoire de l'érable, c'est aussi celle du Québec d'hier à aujourd'hui. <https://erableduquebec.ca/a-propos/histoire/> (accessed 2022-10-06).
11. Allard, G. B. *L'osmose inversée: description et principes de fonctionnement*; Centre ACER: 1984, 1984.
12. Leaf, A. L., Pure maple syrup: nutritive value. *Science* **1964**, *143* (3609), 963-964.
13. Vérification de la qualité du sirop d'érable en vrac. Québec, P. e. p. a. d., Ed. 2021.
14. Camara, M.; Cournoyer, M.; Sadiki, M.; Martin, N., Characterization and removal of buddy off-flavor in maple syrup. *Journal of Food Science* **2019**, *84* (6), 1538-1546.
15. Buddy syrup. <https://onmaplesyrup.ca/end-of-the-maple-season/buddy-syrup/> (accessed 2022-10-06).
16. Des chimistes pour résoudre le mystère du goût de bourgeon du sirop d'érable. <https://www.mitacs.ca/fr/impact/des-chimistes-pour-resoudre-le-mystere-du-gout-de-bourgeon-du-sirop-derable>.
17. Hortvet, J., The chemical composition of maple syrup and maple sugar, methods of analysis, and detection of adulteration. *Journal of the American Chemical Society* **1904**, *26* (11), 1523-1545.
18. Carpenter, C. W. E., Howard Austin; Jones, Charles Howland, *Micro-Organisms of Maple Sap*. HardPress Publishing: 1912.
19. Berl, W. G.; Feazel, C. E., Sugar analysis, ultraviolet spectra of sugars in alkaline solution. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1954**, *2* (1), 37-39.
20. Underwood, J. C.; Lento, H. G.; Willits, C. O., Triose compounds in maple syrup. *Journal of Food Science* **1956**, *21* (5), 589-597.
21. Filipic, V. J.; Underwood, J. C.; Dooley, C. J., Trace components of the flavor fraction of maple syrup. *Journal of Food Science* **1969**, *34* (2), 105-110.
22. N'Guyen, G. Q.; Martin, N.; Jain, M.; Lagacé, L.; Landry, C. R.; Filteau, M., A systems biology approach to explore the impact of maple tree dormancy release on sap variation and maple syrup quality. *Scientific Reports* **2018**, *8* (1).
23. Arthur, C. L.; Pawliszyn, J., Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Analytical Chemistry* **1990**, *62* (19), 2145-2148.

24. Louch, D.; Motlagh, S.; Pawliszyn, J., Dynamics of organic compound extraction from water using liquid-coated fused silica fibers. *Analytical Chemistry* **1992**, *64* (10), 1187-1199.
25. Resolves difficult sample matrix problems. <https://www.sigmaaldrich.com/CA/en/technical-documents/technical-article/analytical-chemistry/solid-phase-microextraction/spme-resolves> (accessed 2022-10-06).
26. Górecki, T.; Yu, X.; Pawliszyn, J., Theory of analyte extraction by selected porous polymer SPME fibres†. *The Analyst* **1999**, *124* (5), 643-649.
27. Semenov, S. N.; Koziel, J. A.; Pawliszyn, J., Kinetics of solid-phase extraction and solid-phase microextraction in thin adsorbent layer with saturation sorption isotherm. *J Chromatogr A* **2000**, *873* (1), 39-51.
28. Seethapathy, S.; Górecki, T., Applications of polydimethylsiloxane in analytical chemistry: A review. *Analytica Chimica Acta* **2012**, *750*, 48-62.
29. Bojko, B.; Cudjoe, E.; Gómez-Ríos, G. A.; Gorynski, K.; Jiang, R.; Reyes-Garcés, N.; Risticovic, S.; Silva É, A.; Togunde, O.; Vuckovic, D.; Pawliszyn, J., SPME--quo vadis? *Anal Chim Acta* **2012**, *750*, 132-51.
30. Song, N.-E.; Lee, J.-Y.; Lee, Y.-Y.; Park, J.-D.; Jang, H. W., Comparison of headspace-SPME and SPME-Arrow-GC-MS methods for the determination of volatile compounds in Korean salt-fermented fish sauce. *Applied Biological Chemistry* **2019**, *62* (1).
31. Koziel, J.; Jia, M.; Pawliszyn, J., Air sampling with porous solid-phase microextraction fibers. *Analytical Chemistry* **2000**, *72* (21), 5178-5186.
32. Shirey, R. E., Mindrup, Raymond F. , SPME-adsorption versus absorption: which fiber is best for your application? Co., S.-A., Ed. 1999.
33. Blaber, M. 1.7: Polarity of molecules. [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic_Chemistry/Map%3A_Organic_Chemistry_\(Smith\)/01%3A_Structure_and_Bonding/1.07%3A_Polarity_of_Molecules#:~:text=Dipole%20moments%20occur%20when%20there,arise%20from%20differences%20in%20electronegativity](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic_Chemistry/Map%3A_Organic_Chemistry_(Smith)/01%3A_Structure_and_Bonding/1.07%3A_Polarity_of_Molecules#:~:text=Dipole%20moments%20occur%20when%20there,arise%20from%20differences%20in%20electronegativity). (accessed 2022).
34. Zhang, Z.; Pawliszyn, J., Headspace solid-phase microextraction. *Analytical Chemistry* **1993**, *65* (14), 1843-1852.
35. Sabik, H.; Fortin, J.; Martin, N., Identification of pyrazine derivatives in a typical maple syrup using headspace solid-phase microextraction with gas chromatography-mass spectrometry. *Food Chemistry* **2012**, *133* (3), 1006-1010.
36. Nayik, G. A.; Nanda, V., Characterization of the volatile profile of unifloral honey from Kashmir Valley of India by using solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *European Food Research and Technology* **2015**, *240* (6), 1091-1100.
37. Speer, K.; Tanner, N.; Kölling-Speer, I.; Rohleder, A.; Zeippert, L.; Beitlich, N.; Lichtenberg-Kraag, B., Cornflower honey as a model for authentication of unifloral honey using classical methods combined with plant-based marker substances such as lumichrome. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2021**, *69* (38), 11406-11416.
38. Wang, X.; Rogers, K. M.; Li, Y.; Yang, S.; Chen, L.; Zhou, J., Untargeted and targeted discrimination of honey collected by *Apis cerana* and *Apis mellifera* based on volatiles using HS-GC-IMS and HS-SPME-GC-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2019**, *67* (43), 12144-12152.
39. SPME Direct immersion sampling. <https://www.sigmaaldrich.com/CA/en/technical-documents/technical-article/analytical-chemistry/solid-phase-microextraction/spme-direct-immersion-sampling> (accessed 2022-10-07).
40. McCallum, R.; Pendleton, P.; Schumann, R.; Trinh, M.-U., Determination of geosmin and 2-methylisoborneol in water using solid-phase microextraction and gas chromatography-chemical ionisation/electron impact ionisation-ion-trap mass spectrometry. *The Analyst* **1998**, *123* (10), 2155-2160.
41. Iofi Working Group, Methods of a. guidelines for solid-phase micro-extraction (SPME) of volatile flavour compounds for gas-chromatographic analysis, from the Working Group on Methods of Analysis of the International Organization of the Flavor Industry (IOFI). *Flavour and Fragrance Journal* **2010**, *25* (6), 404-406.

42. Shirey, R. Selecting the appropriate SPME fiber coating – effect of analyte molecular weight and polarity. <https://www.sigmaaldrich.com/CA/en/technical-documents/technical-article/analytical-chemistry/solid-phase-microextraction/selecting-the-appropriate> (accessed 2022-10-07).
43. Chrysene. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Chrysene#section=Structures> (accessed 2022-10-07).
44. SPME fiber performance tips for volatiles & semi-volatiles. <https://www.sigmaaldrich.com/CA/en/technical-documents/technical-article/analytical-chemistry/solid-phase-microextraction/performance-tips> (accessed 2022-10-07).
45. SPME for GC analysis - getting started with solid phase microextraction. products, M. S. S. A., Ed.
46. Pawliszyn, J.; Royal Society of, C., *Applications of solid phase microextraction / edited by Janusz Pawliszyn*. Cambridge : Royal Society of Chemistry: 1999.
47. Kusano, M.; Iizuka, Y.; Kobayashi, M.; Fukushima, A.; Saito, K., Development of a direct headspace collection method from arabidopsis seedlings using HS-SPME-GC-TOF-MS analysis. *Metabolites* **2013**, 3 (2), 223-242.
48. Spietelun, A.; Pilarczyk, M.; Kloskowski, A.; Namieśnik, J., Current trends in solid-phase microextraction (SPME) fibre coatings. *Chemical Society Reviews* **2010**, 39 (11), 4524.
49. Pereira, A.; Silva, E.; Cerejeira, M. J., Applicability of the new 60 µm polyethylene glycol solid-phase microextraction fiber assembly for the simultaneous analysis of six pesticides in water. *Journal of Chromatographic Science* **2014**, 52 (5), 423-428.
50. Dadalı, C.; Elmacı, Y., Optimization of headspace-solid phase microextraction (HS-SPME) technique for the analysis of volatile compounds of margarine. *Journal of Food Science and Technology* **2019**, 56 (11), 4834-4843.
51. Bruno, T. J. S., P. D. N. Solid-phase microextraction sorbents. https://hbcpc.chemnetbase.com/faces/documents/08_44/08_44_0001.xhtml (accessed 2022-10-07).
52. Beitlich, N.; Koelling-Speer, I.; Oelschlaegel, S.; Speer, K., Differentiation of manuka honey from kanuka honey and from jelly bush honey using HS-SPME-GC/MS and UHPLC-PDA-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2014**, 62 (27), 6435-6444.
53. Brunton, N. P.; Cronin, D. A.; Monahan, F. J., The effects of temperature and pressure on the performance of Carboxen/PDMS fibres during solid phase microextraction (SPME) of headspace volatiles from cooked and raw turkey breast. *Flavour and Fragrance Journal* **2001**, 16 (4), 294-302.
54. Piasenzotto, L.; Gracco, L.; Conte, L., Solid phase microextraction (SPME) applied to honey quality control. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2003**, 83 (10), 1037-1044.
55. Li, C.; Li, X.; Liang, G.; Xiang, S.; Han, G., Volatile composition changes in lemon during fruit maturation by HS-SPME-GC-MS. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2022**, 102 (9), 3599-3606.
56. Payne, R. K.; Labows, J. N.; Liu, X., Released oral malodors measured by solid phase microextraction-gas chromatography mass spectrometry. In *Flavor Release*, American Chemical Society: 2000; Vol. 763, pp 73-86.
57. Yashiki, M.; Kojima, T.; Miyazaki, T.; Nagasawa, N.; Iwasaki, Y.; Hara, K., Detection of amphetamines in urine using head space-solid phase microextraction and chemical ionization selected ion monitoring. *Forensic Sci Int* **1995**, 76 (3), 169-77.
58. De SAINT SIMON, M. Spectrométrie de masse. <http://www.universalis-edu.com/encyclopedie/spectrometrie-de-masse/> (accessed 2022-10-07).
59. Thomson, J. J., XL. Cathode Rays. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science* **1897**, 44 (269), 293-316.
60. Downard, K. M., 1912: A titanic year for mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* **2012**, 47 (8), 1034-1039.
61. Donnan, F. G., Rays of positive electricity and their application to chemical analyses. By Sir J. J. Thomson, O. M. F.R.S. Second edition. Pp. x + 237. London: Longmans, Green and Co., 1921. Price 16s. *Journal of the Society of Chemical Industry* **1923**, 42 (36), 861-861.

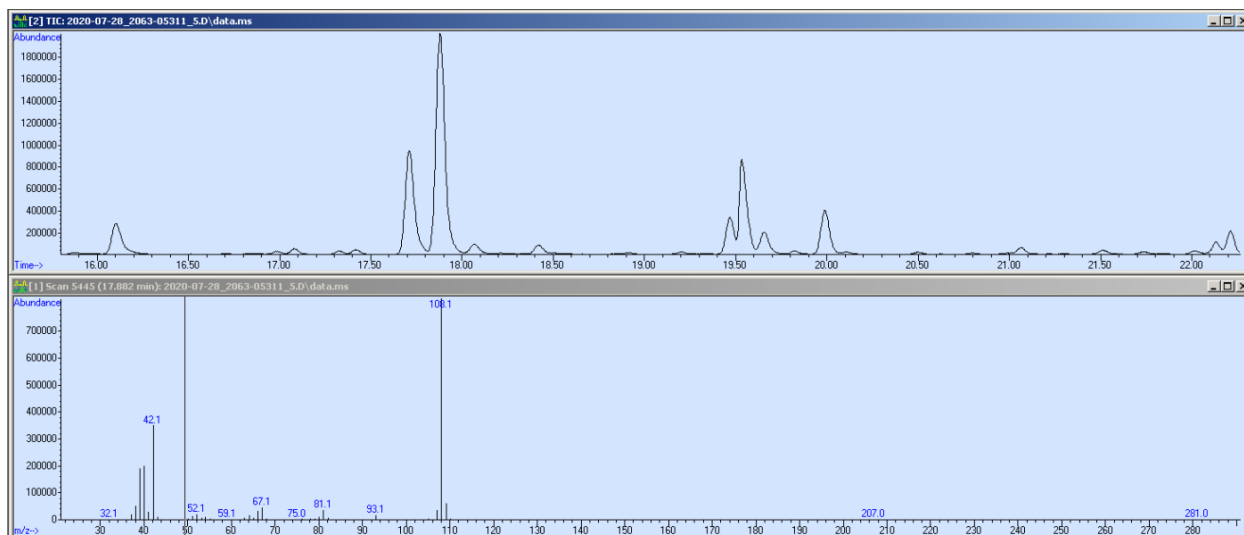
62. Spectromètres de masse. http://www.perrin33.com/biochanalys/ms_0.php (accessed 2022-10-07).
63. Méthodes d'ionisation courantes. <https://www.waters.com/nextgen/ca/fr/education/primers/the-mass-spectrometry-primer/common-ionization.html> (accessed 2022-10-07).
64. Ionization Methods Overview. <https://www.thermofisher.com/ca/en/home/industrial/mass-spectrometry/mass-spectrometry-learning-center/mass-spectrometry-technology-overview/ionization-source-technology-overview.html#:~:text=An%20EI%20source%20uses%20a> (accessed 2022-10-07).
65. La spectrométrie de masse. <https://www.lachimie.fr/analytique/spectrometriedemasse/> (accessed 2022).
66. Introduction to mass analyzers. https://www.shimadzu.com/an/service-support/technical-support/analysis-basics/fundamental/mass_analyzers.html (accessed 2022-10-07).
67. Dahl, D. A. A., A. D. Ion optics through the eyes of SIMION - An ASMS short source. https://simion.com/info/asms_short_course.html (accessed 2022-10-07).
68. Adam-Day, S. Mass spectrometry. <https://alevelnotes.com/notes/chemistry/elements-of-life/mass-spectrometry> (accessed 2022-10-07).
69. M. Guilhaus, D. Selby, V. Mlynsky, Orthogonal acceleration time-of-flight mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews* **2000**, *19* (2), 65-107.
70. Synapt G2-Si resolution in three dimensions. <https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720004681en.pdf> (accessed 2022-10-07).
71. Brown, J. G., K.; Green, M.; Langridge, D.; Perez, J.-C.; Pringle, S.; Wildgoose, J. A high performance, folded geometry OA0TOF mass analyser incorporating novel ADC based detection. <https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720003195en.pdf> (accessed 2022-10-07).
72. SYNAPT G2-Si mass spectrometry. https://www.waters.com/waters/en_US/SYNAPT-G2-Si-Mass-Spectrometry/nav.htm?cid=134740653&locale=en_US (accessed 08-12-22).
73. ClassyFire. <http://classyfire.wishartlab.com/> (accessed 2022-08-27).
74. Food and agriculture organization of the United Nations. <https://www.fao.org/home/en/> (accessed 2022-08-27).
75. TGSC information system, 2-furoic acid. <http://www.thegoodscentscompany.com/data/rw1040161.html> (accessed 2022-08-27).
76. Siddhu, S. Sensory analysis of refined and whole wheat breads made from red and white wheat using electronic nose and gas chromatography - mass spectrometry. University of Manitoba, Winnipeg, Manitoba, 2010.
77. CAMEO Chemicals, di-isobutyl-phthalate. <https://cameochemicals.noaa.gov/chemical/11095> (accessed 2022-08-27).
78. Lab Pro, 3-methylene-2-norbornanone, 5G - M1656-5G. <https://labproinc.com/products/3-methylene-2-norbornanone-5g-ml1656-5g?variant=41531213054121> (accessed 2022-08-27).
79. CAMEO Chemicals, 2,6-di-tert-butylphenol. <https://cameochemicals.noaa.gov/chemical/8508> (accessed 2022-08-27).
80. PubChem, dimethyl disulfide (Compound). <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/12232#section=Experimental-Properties> (accessed 2022-08-27).
81. United States department of labor, Dimethyl disulfide. <https://www.osha.gov/chemicaldata/911> (accessed 2022-08-27).
82. Song, X.; Wang, G.; Zhu, L.; Zheng, F.; Ji, J.; Sun, J.; Li, H.; Huang, M.; Zhao, Q.; Zhao, M.; Sun, B., Comparison of two cooked vegetable aroma compounds, dimethyl disulfide and methional, in Chinese Baijiu by a sensory-guided approach and chemometrics. *LWT* **2021**, *146*, 111427.
83. Edris, A. E.; Fadel, H. M., Investigation of the volatile aroma components of garlic leaves essential oil. Possibility of utilization to enrich garlic bulb oil. *European Food Research and Technology* **2002**, *214* (2), 105-107.
84. Wang, L.; Zhu, L.; Zheng, F.; Zhang, F.; Shen, C.; Gao, X.; Sun, B.; Huang, M.; Li, H.; Chen, F., Determination and comparison of flavour (retronasal) threshold values of 19 flavour compounds in Baijiu. *Journal of Food Science* **2021**, *86* (5), 2061-2074.

85. Spectrum CCMSLIB00000846961 for NCGC00384841-0112-[3-[4-[1,3-dihydroxy-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)propan-2-yl]oxy-3-methoxyphenyl]propoxy]-6-(hydroxymethyl)oxane-3,4,5-triol. <https://mona.fiehnlab.ucdavis.edu/spectra/display/CCMSLIB00000846961> (accessed 2022).

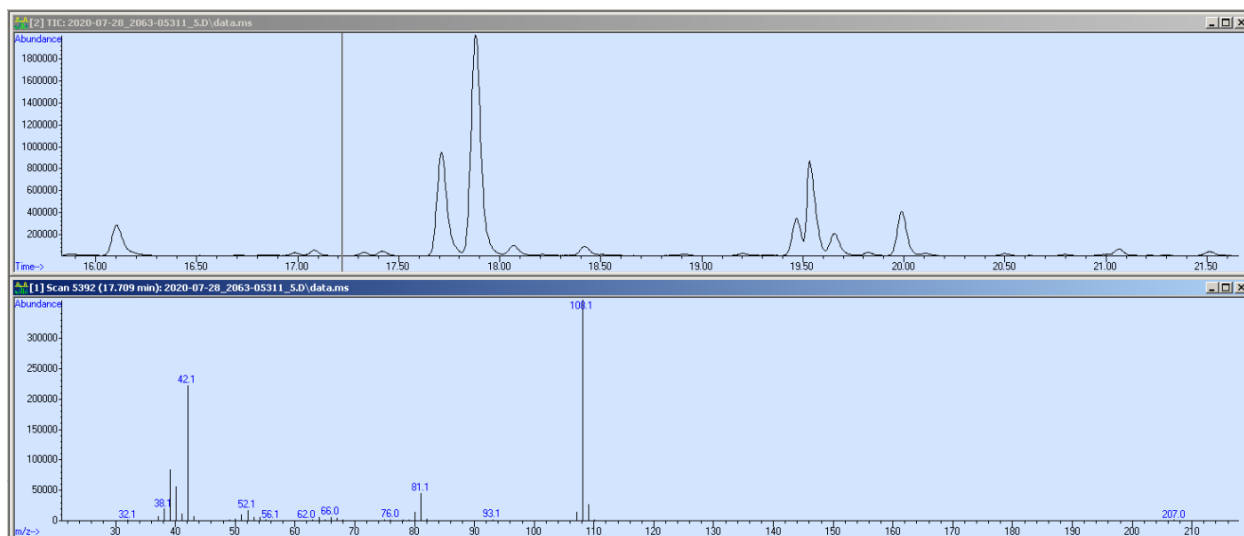
6 Annexe

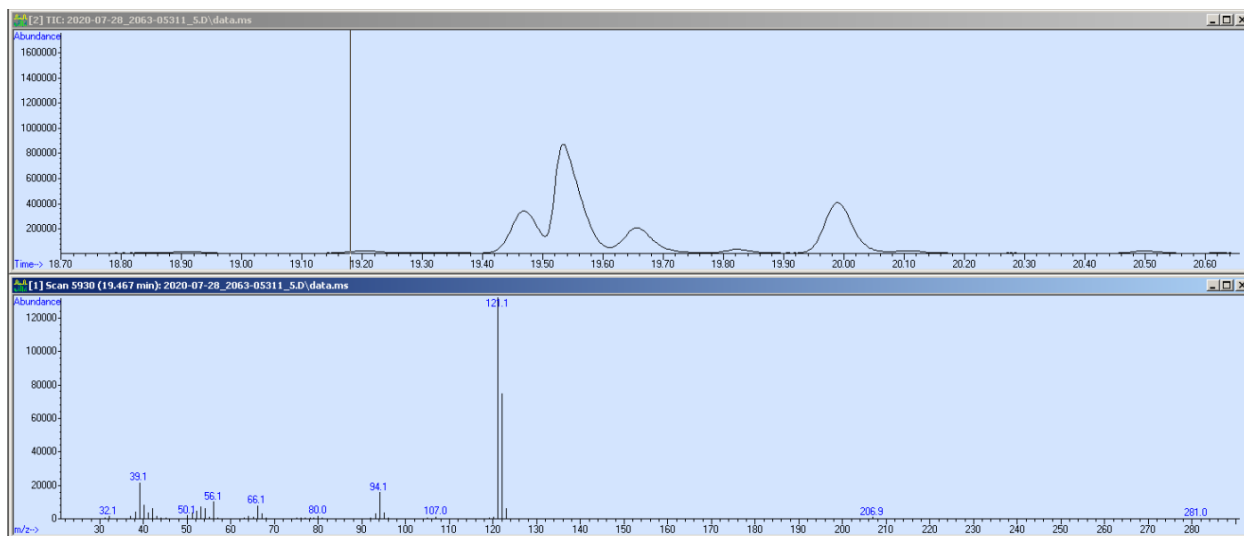
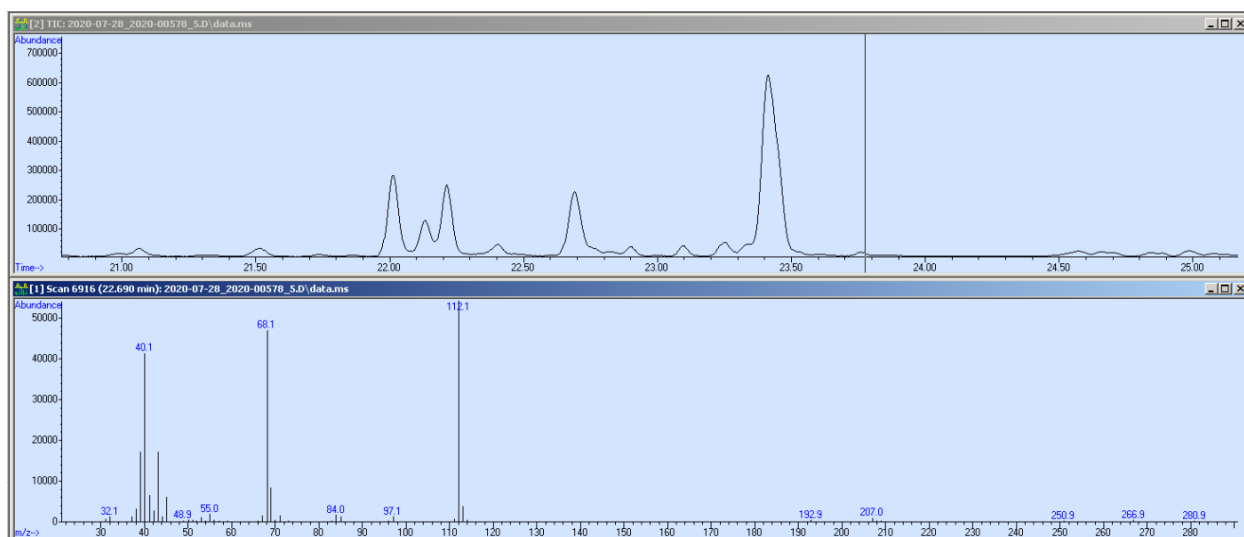
A. SPME-GC-MS

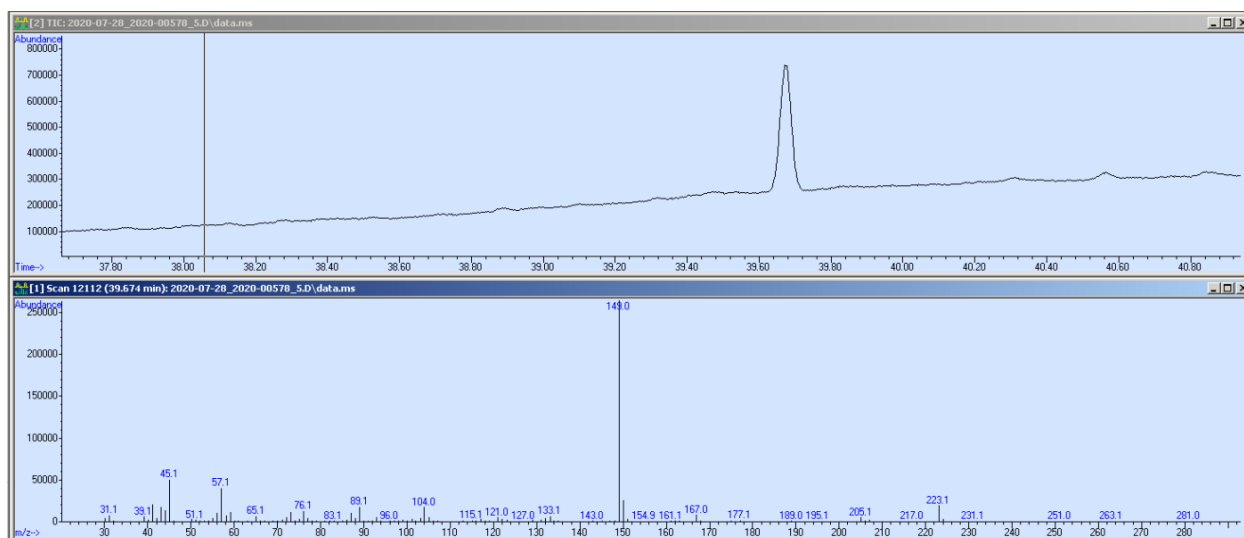
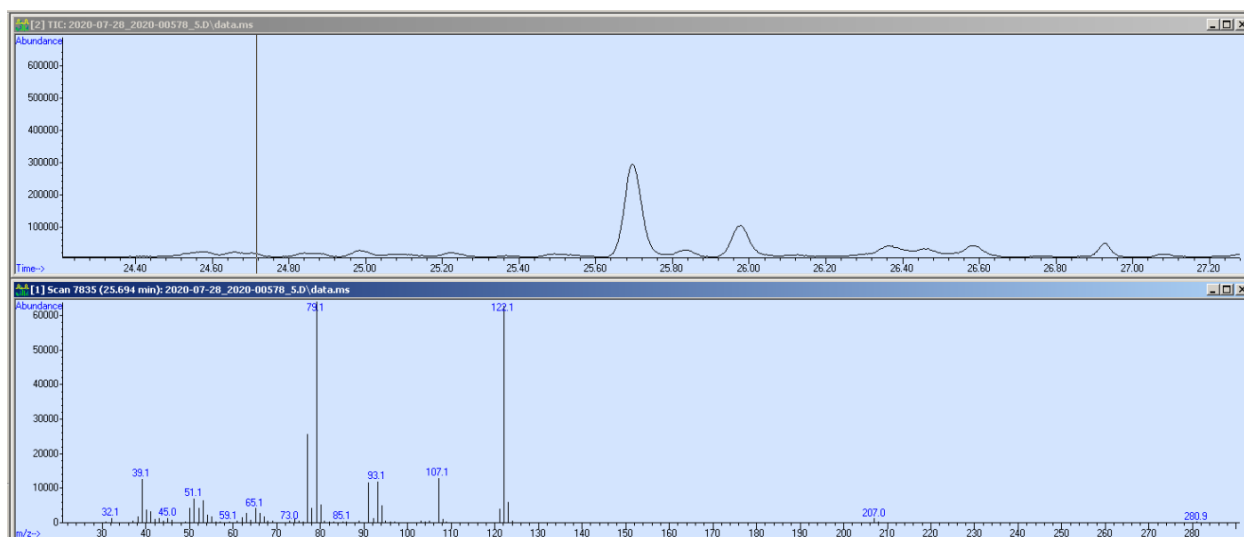
a. Pyrazine, 2,6-dimethyl- (108.0@17.8)

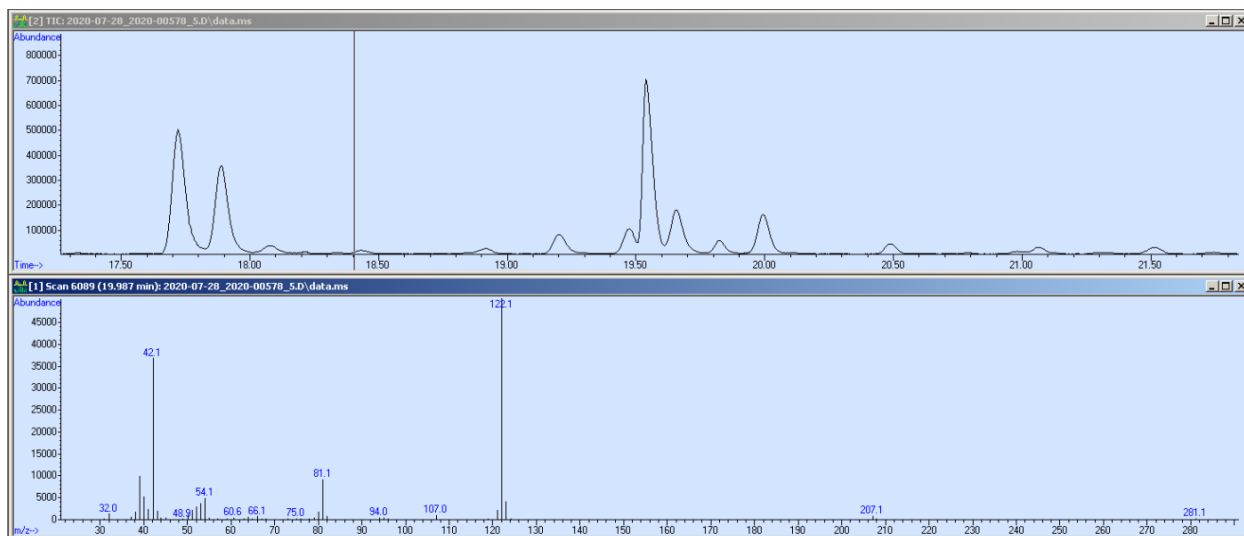
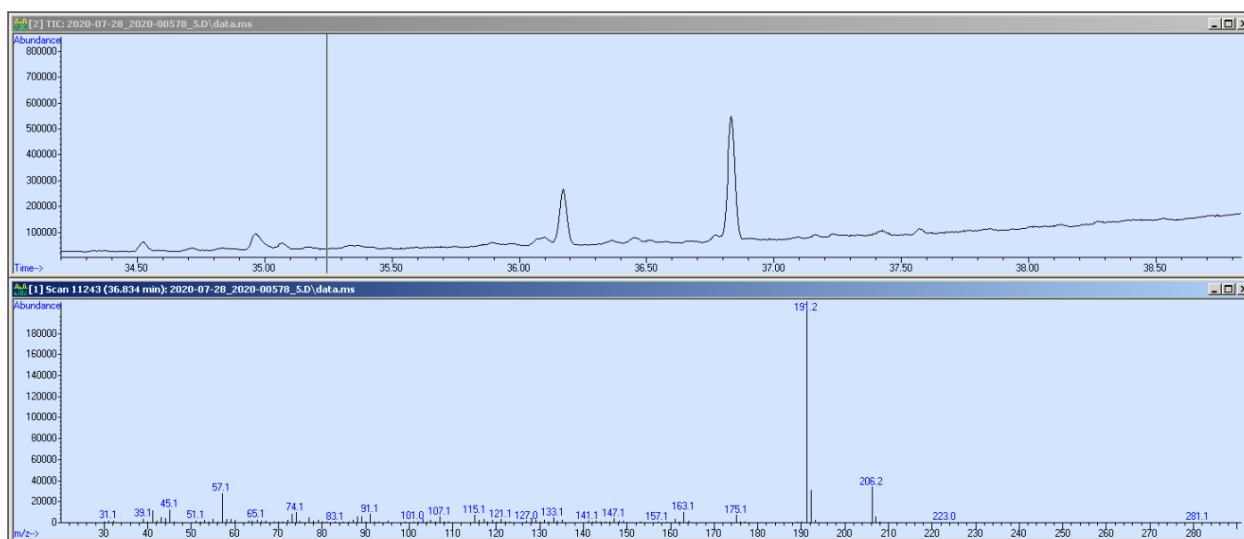


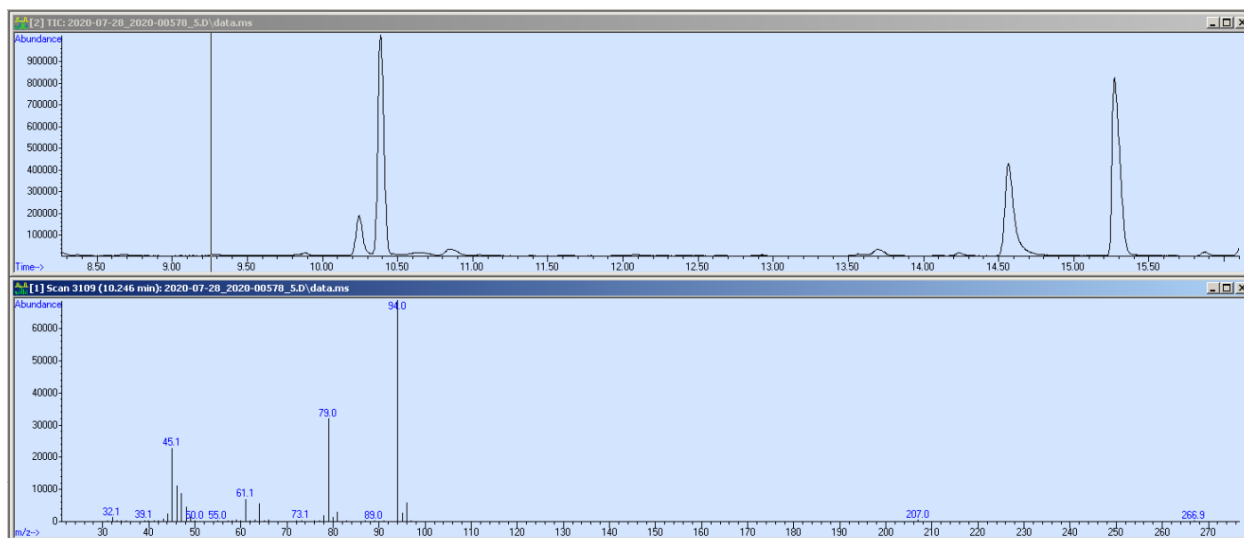
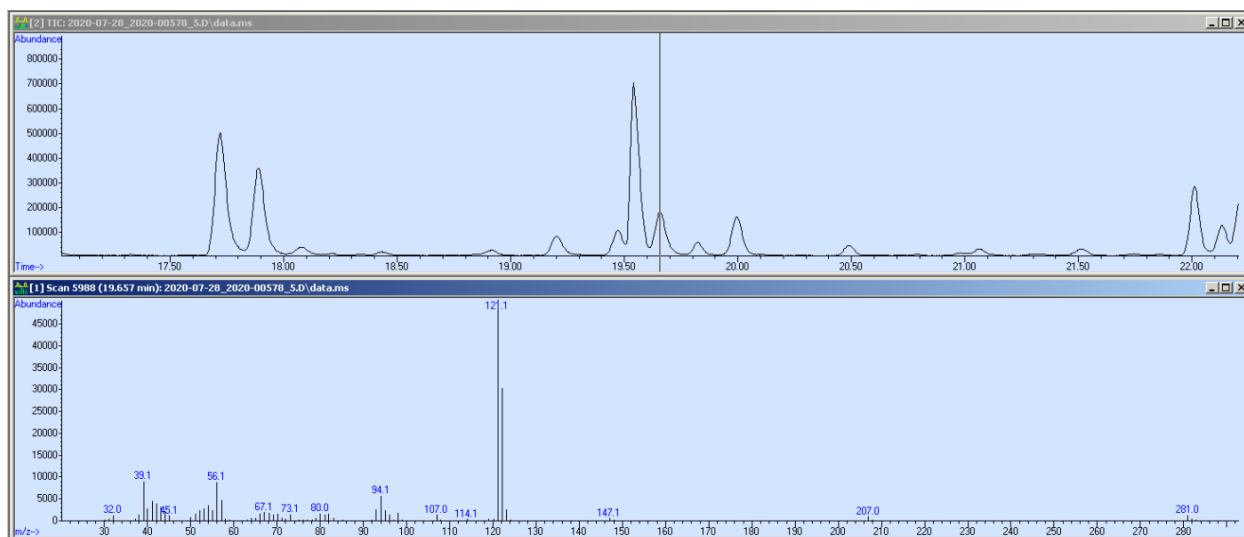
b. Pyrazine, 2,5-dimethyl- (108.0@17.7)

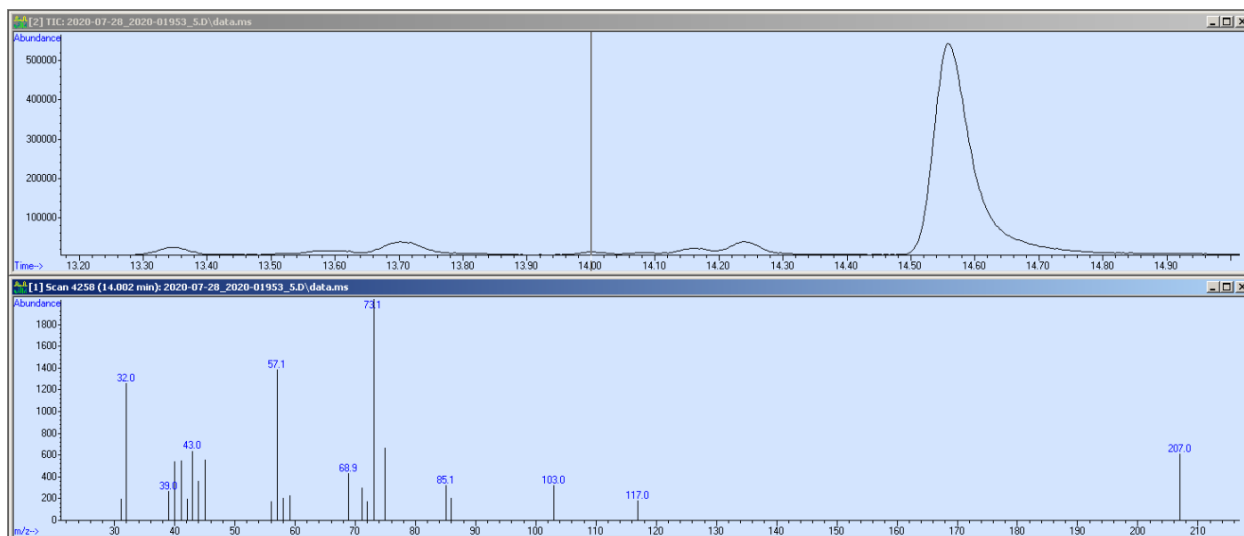
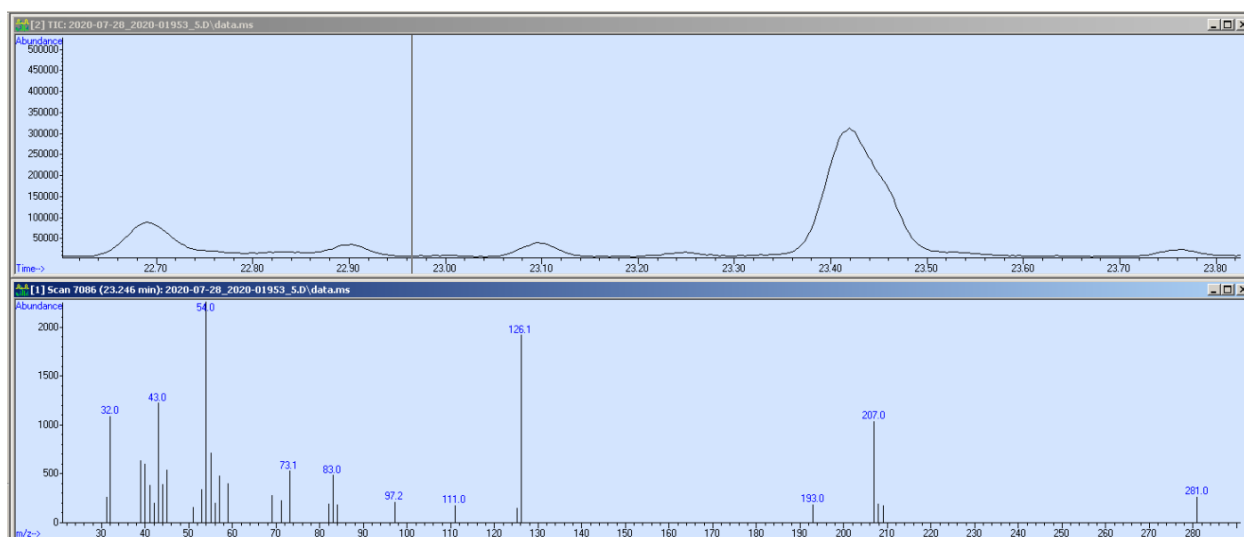


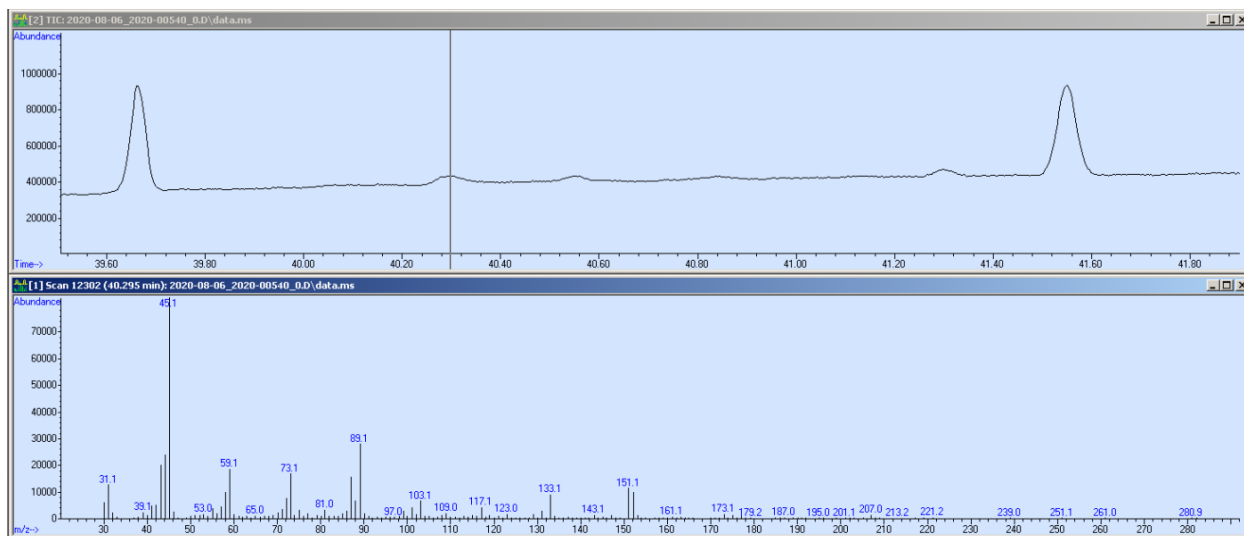
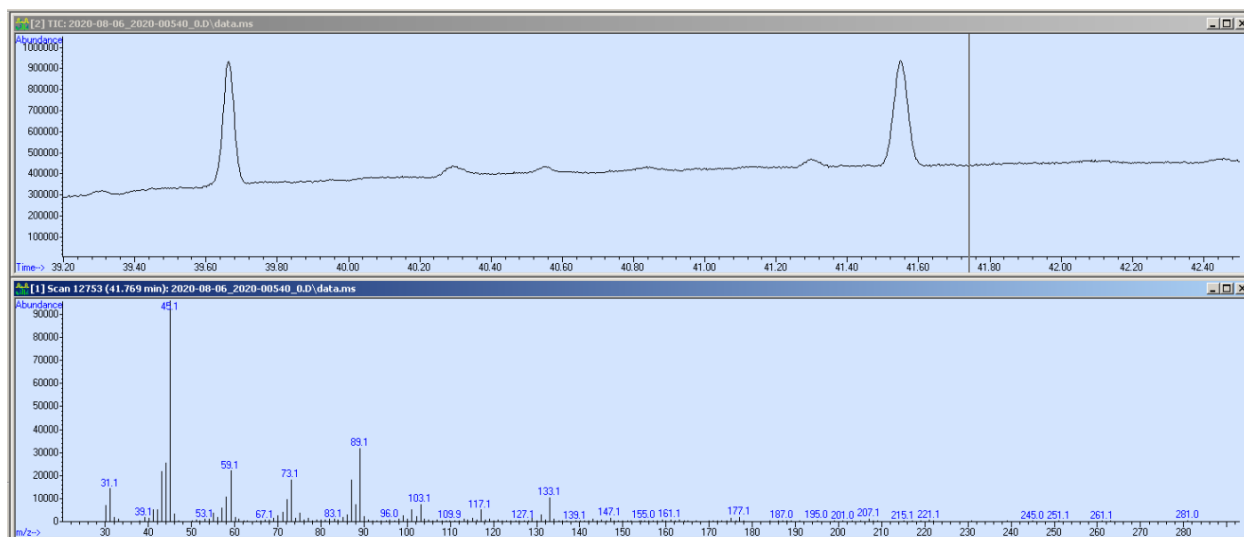
c. Pyrazine, 2-ethyl-6-methyl- (121.0@19.5)**d. Acide 2-furancarboxylique (112.0@22.6)**

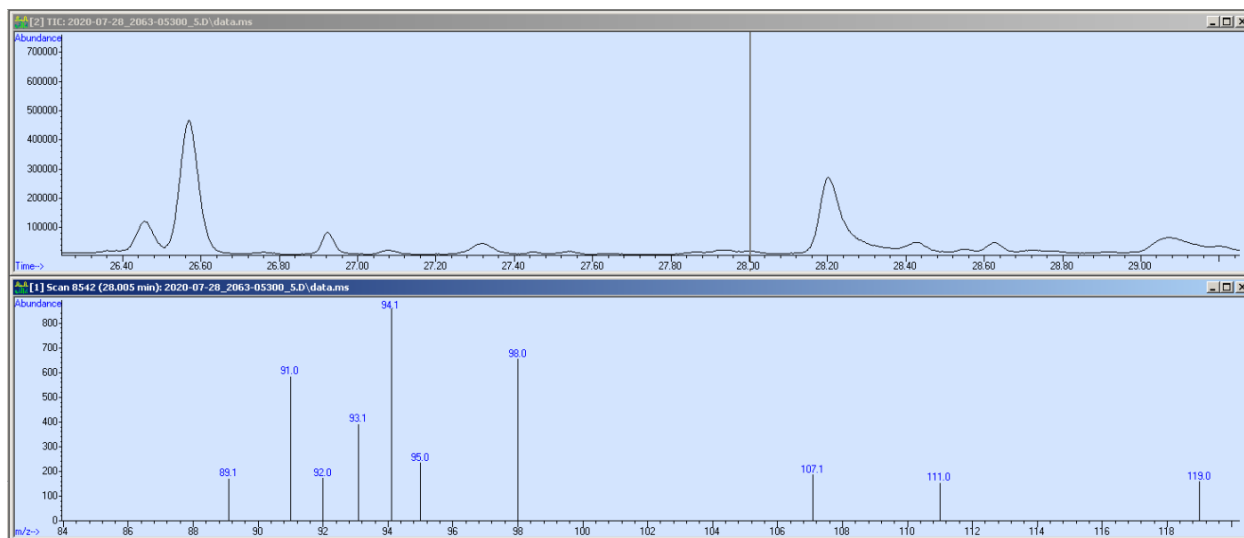
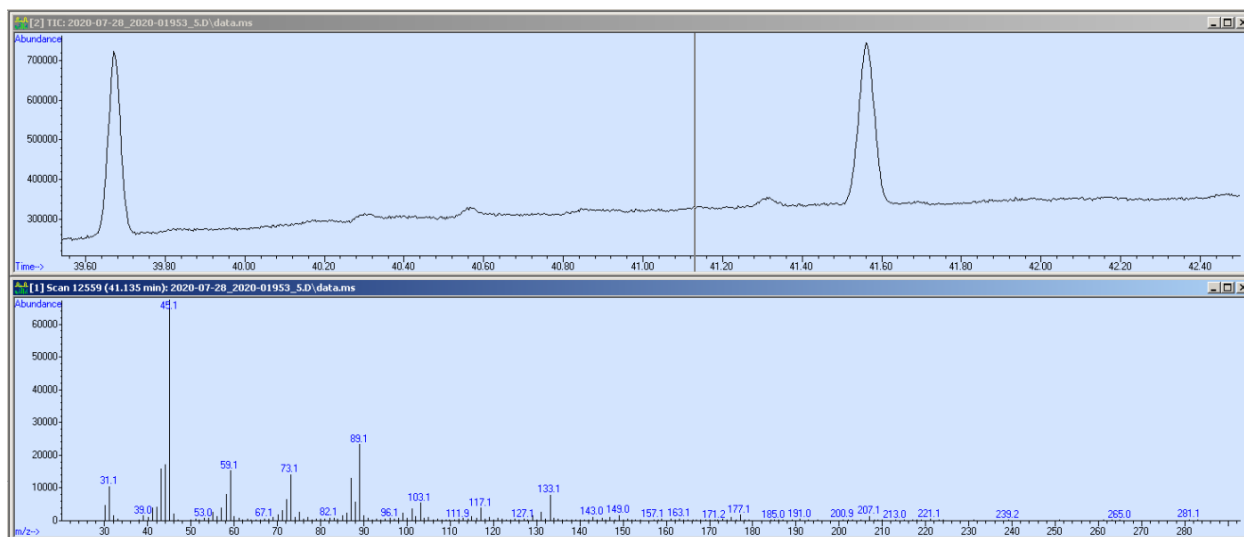
e. Ester bis(2-méthylpropyl) d'acide 1,2-benzènedicarboxylique (149.0@39.6)**f. 3-Methylene-2-norbornanone (79.0@25.7)**

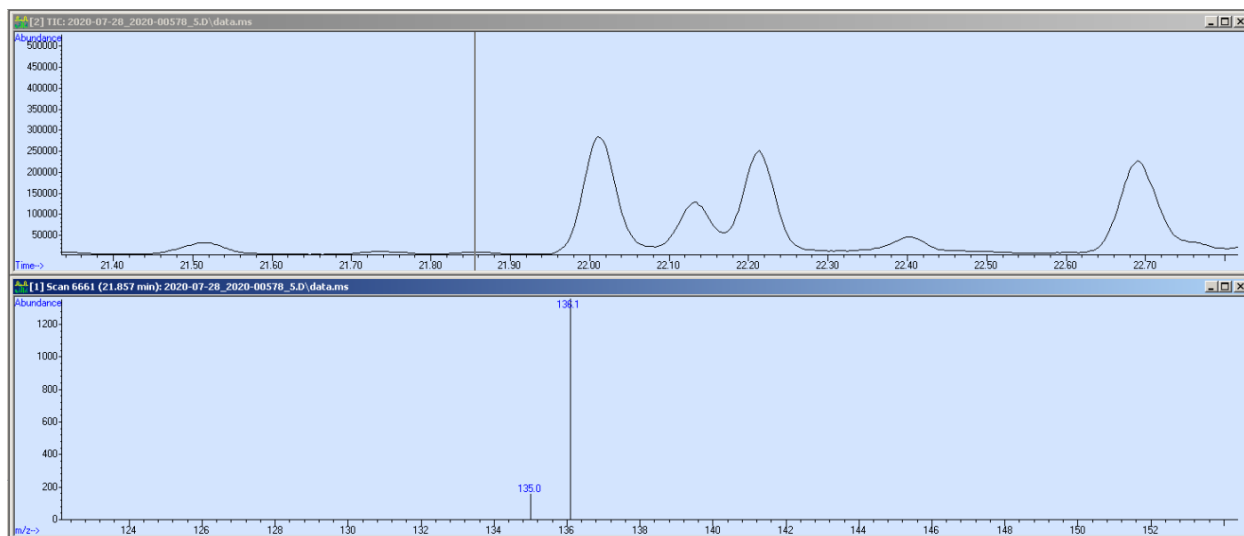
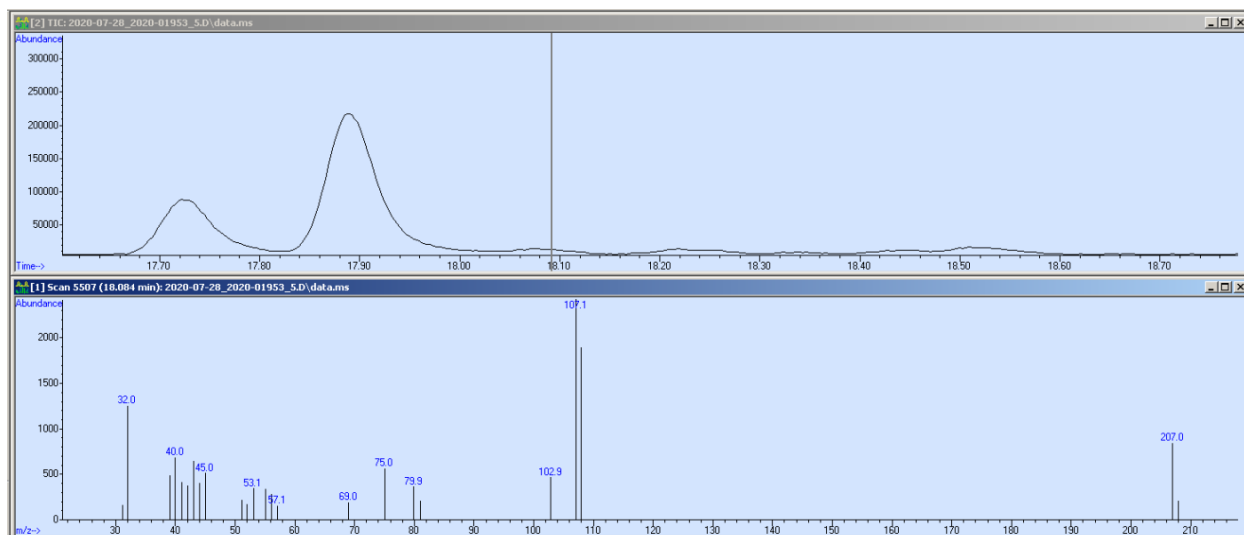
g. Pyrazine, trimethyl- (122.0@20.0)**h. Phenol, 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)- (191.0@36.8)**

i. Disulfide, dimethyl (94.0@10.2)**j. Pyrazine, 2-ethyl-5-methyl- (121.0@19.6)**

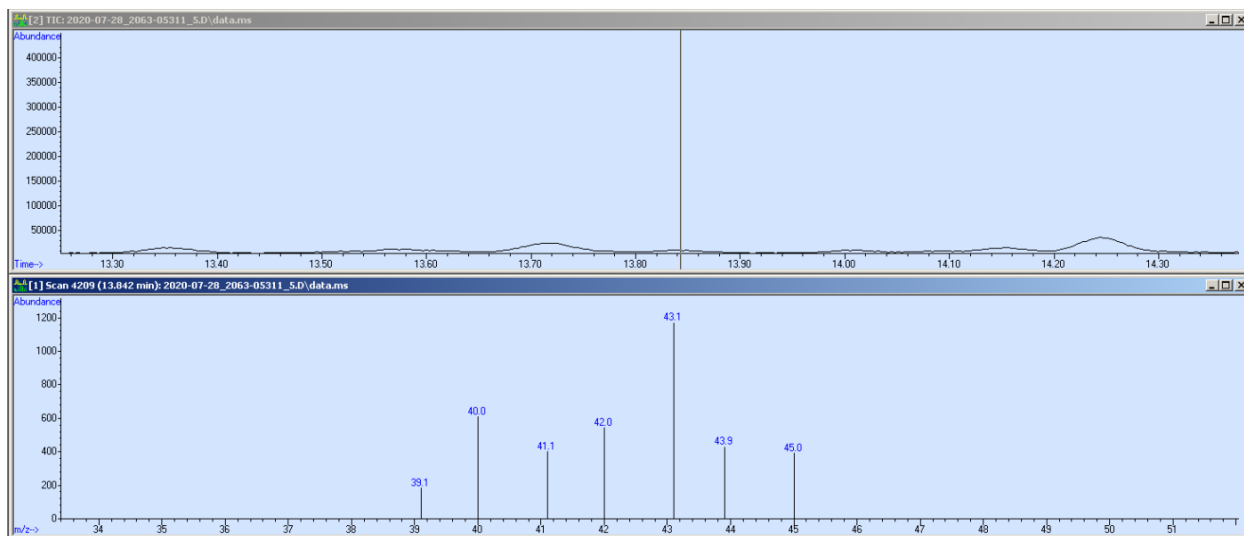
k. trans-2,3-Epoxydecane (57.0@14.0)**l. Bicyclo[2.2.1]heptan-2-one, 1,7,7-trimethyl-, (1R)- (54.0@23.2)**

m. 151.0@40.3**n. 46.0@41.8**

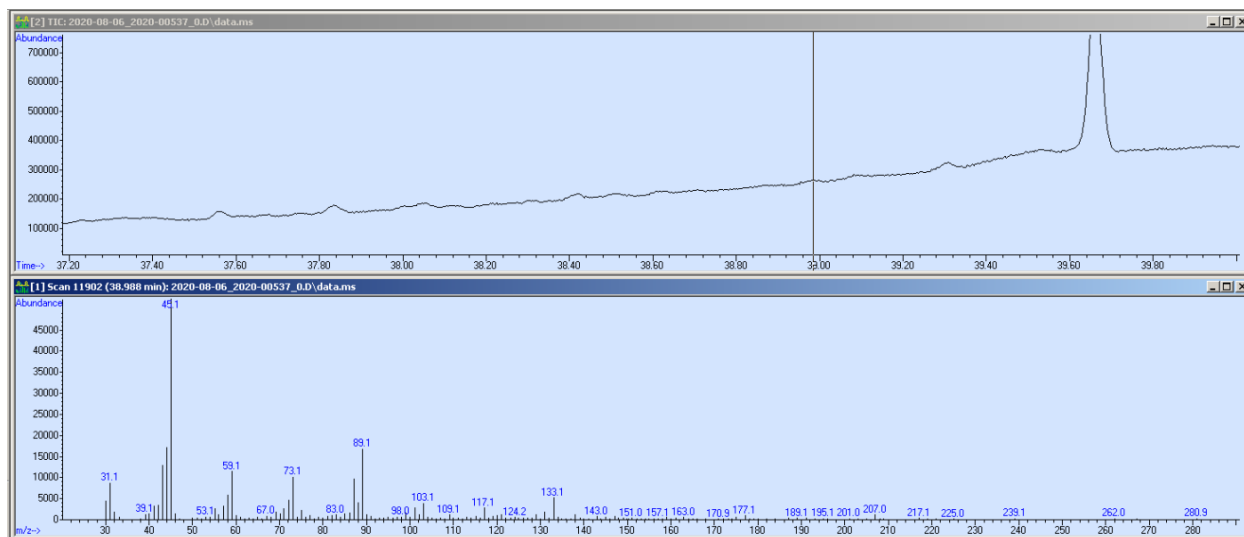
o. Cyclopropane, 1,1-dichloro-2-(1-ethylpropyl)-2-methyl- (98.0@28.0)**p. 149.0@41.1**

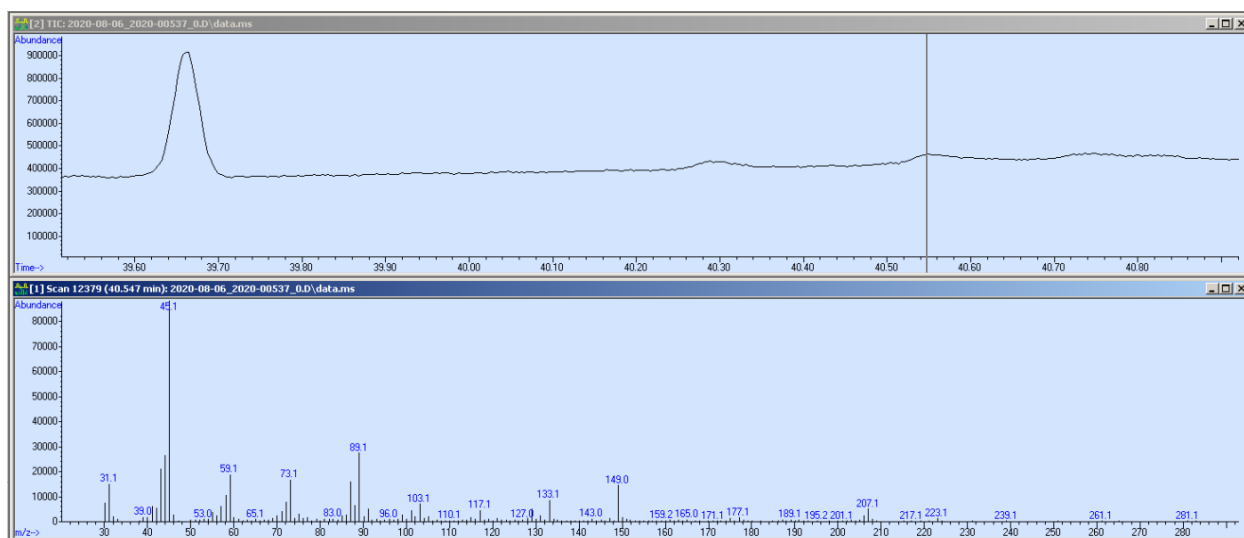
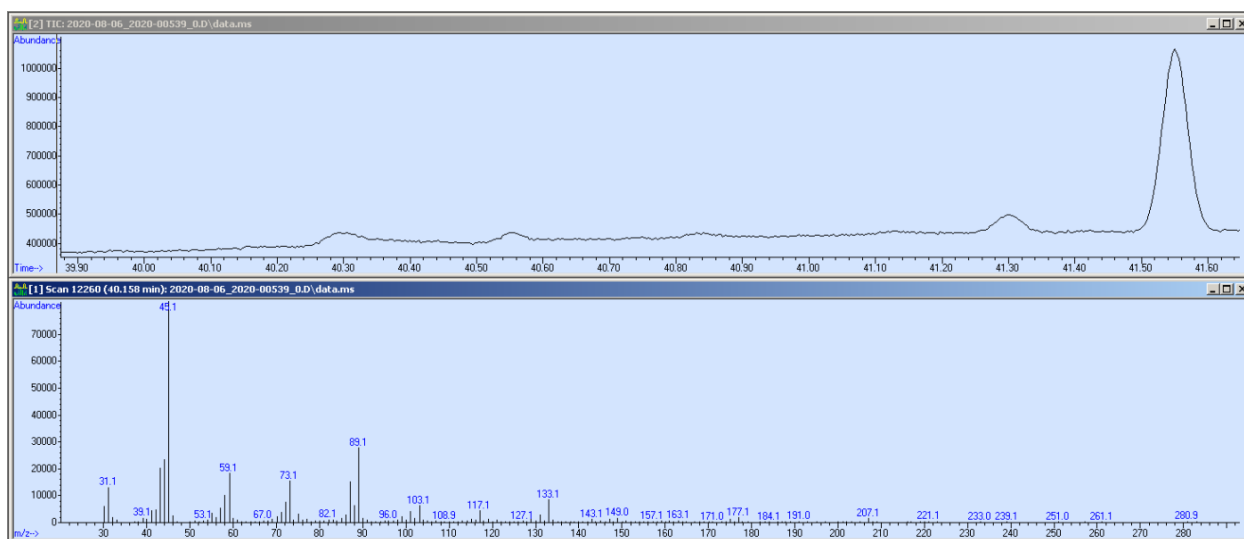
q. Pyrazine, 3-ethyl-2,5-dimethyl- (135.0@20.9)**r. Pyrazine, ethyl- (107.0@18.0)**

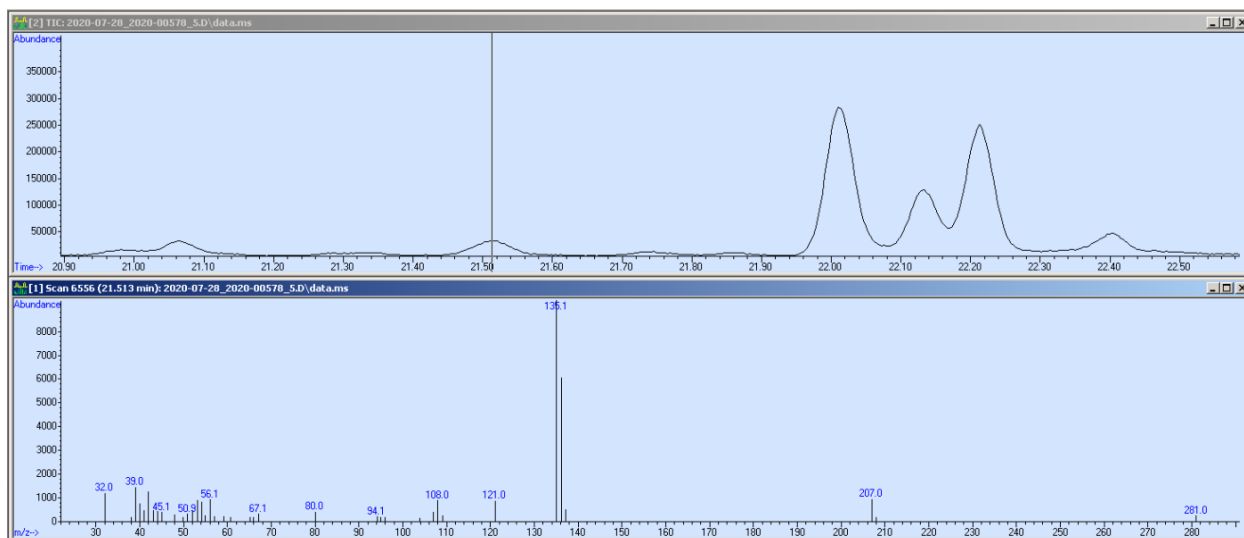
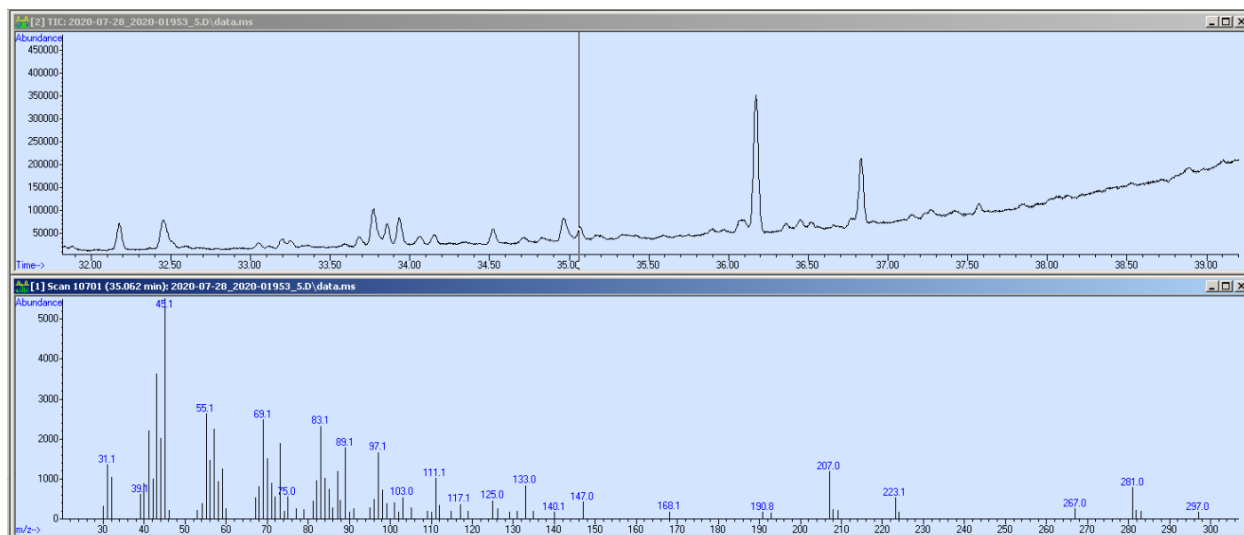
s. Cyclopentanone, 2-methyl- (42.0@13.9)

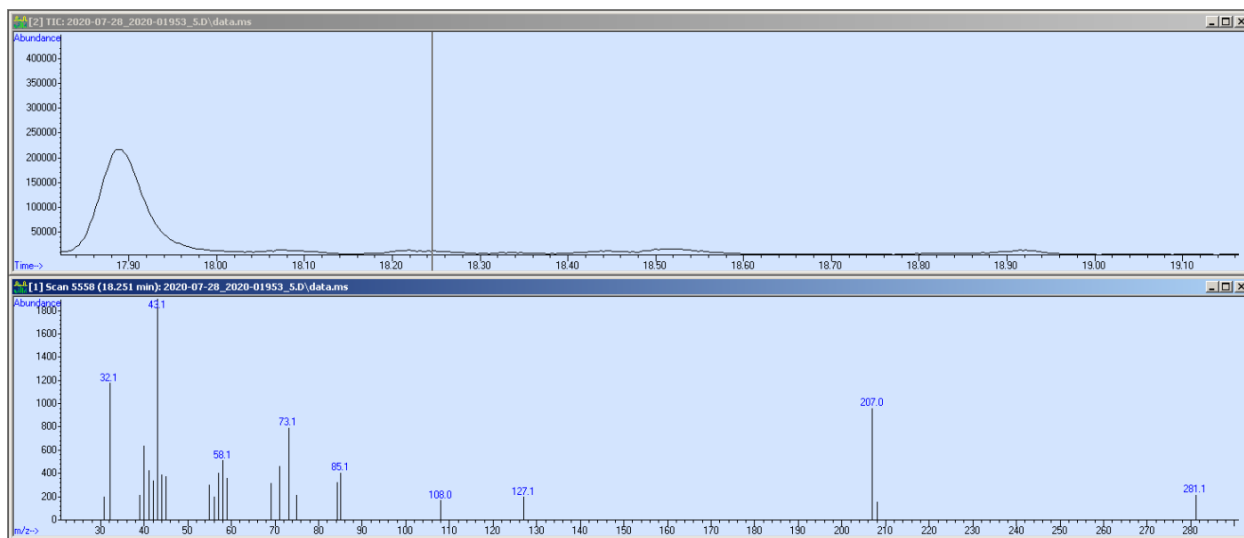
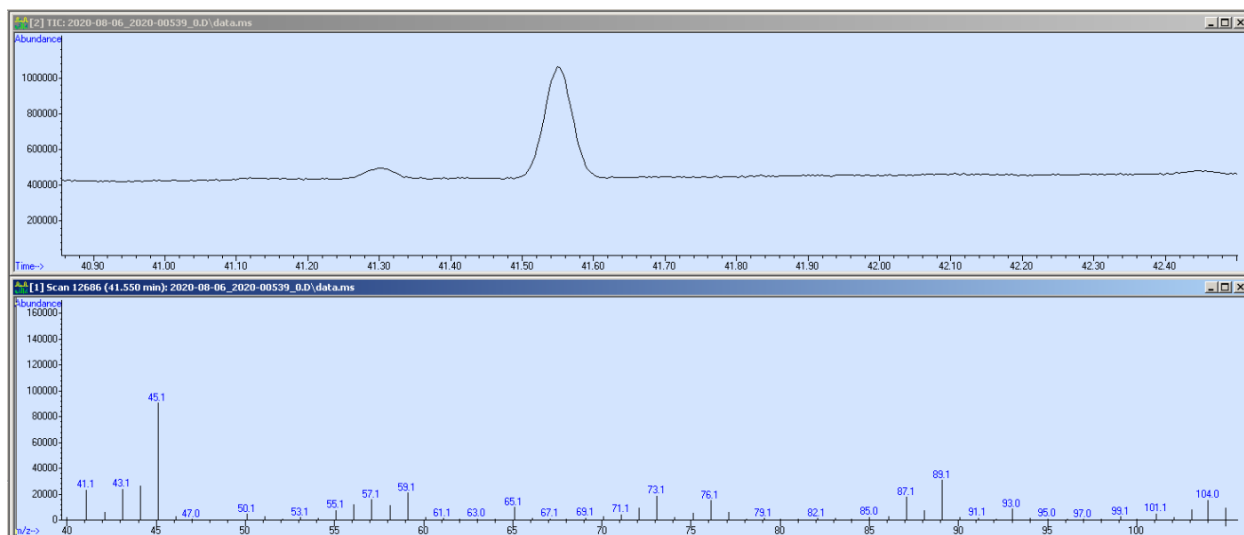


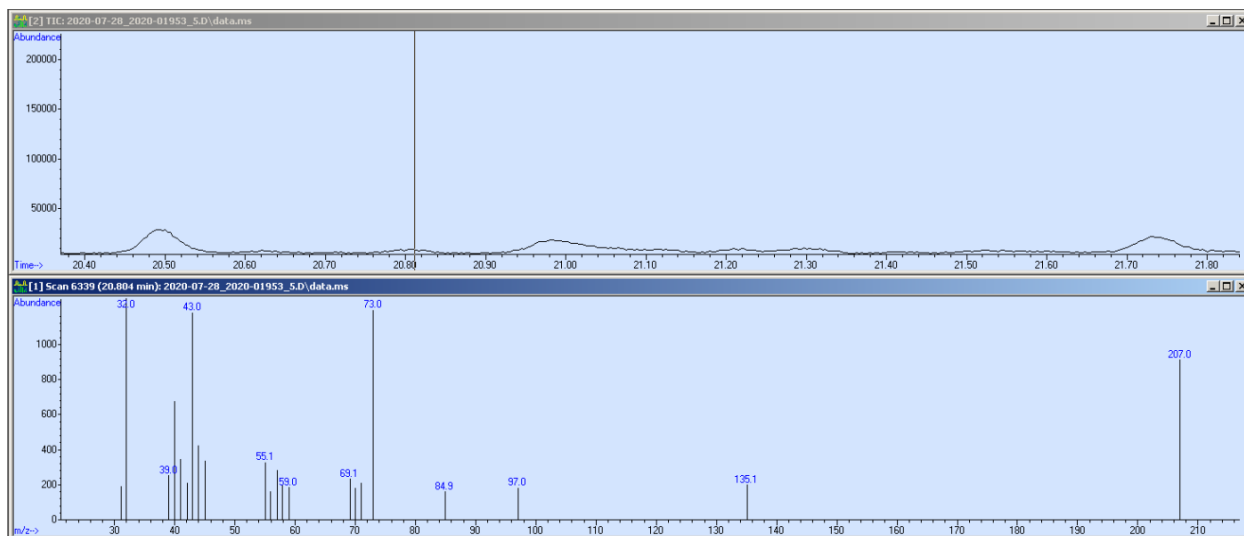
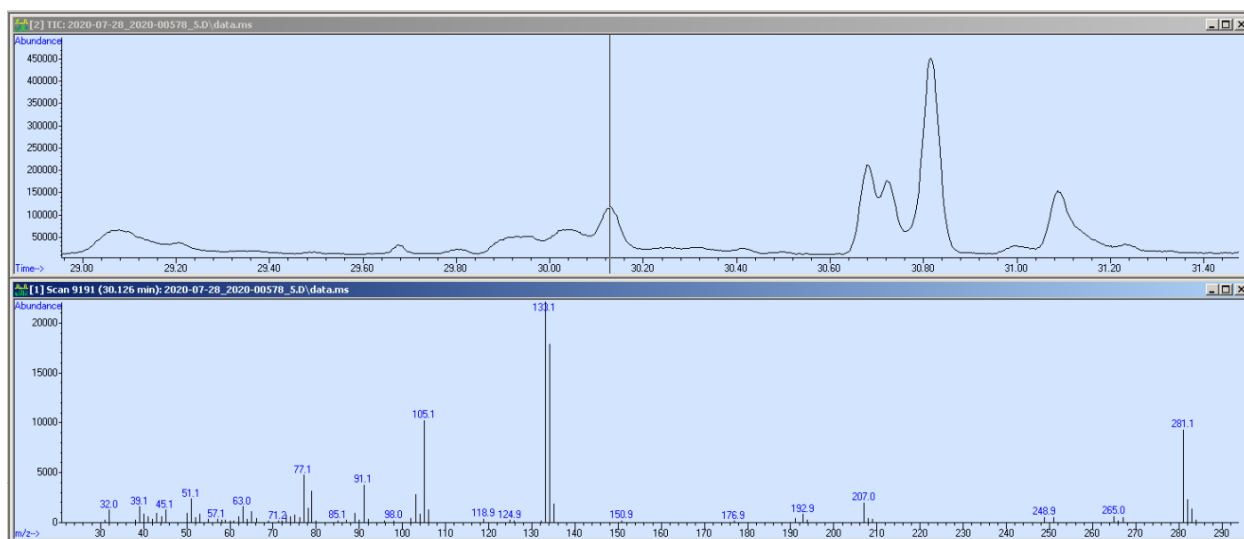
t. 117.0@38.9

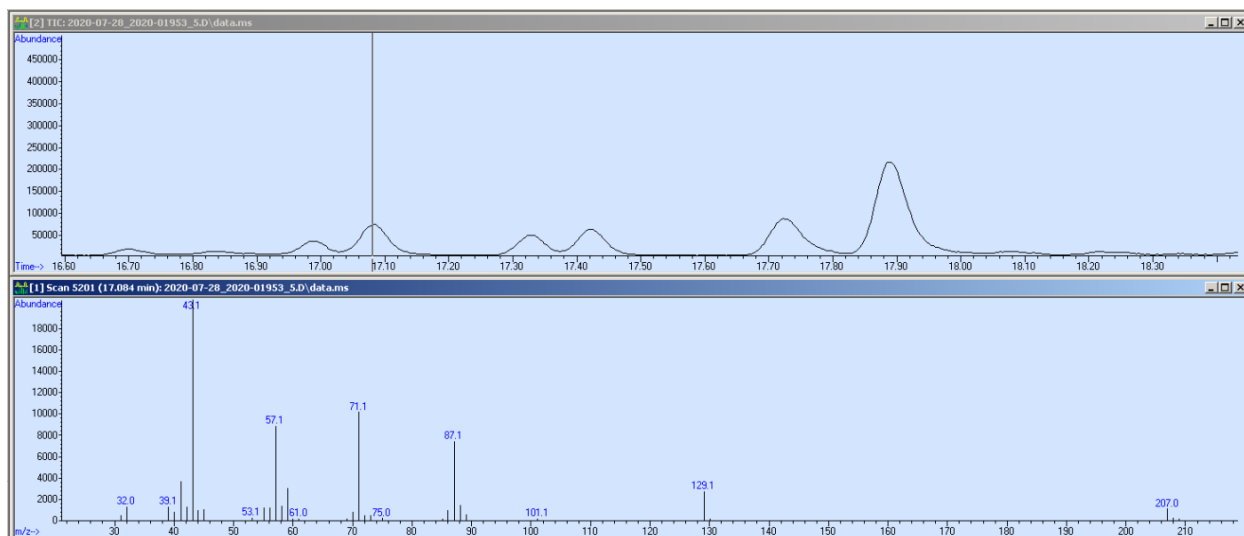
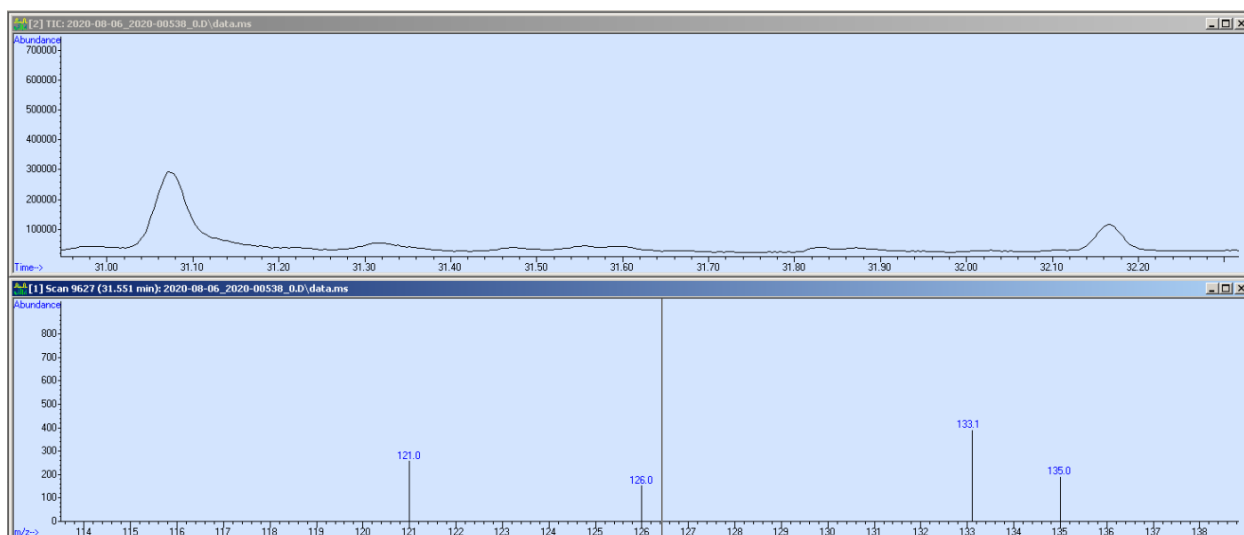


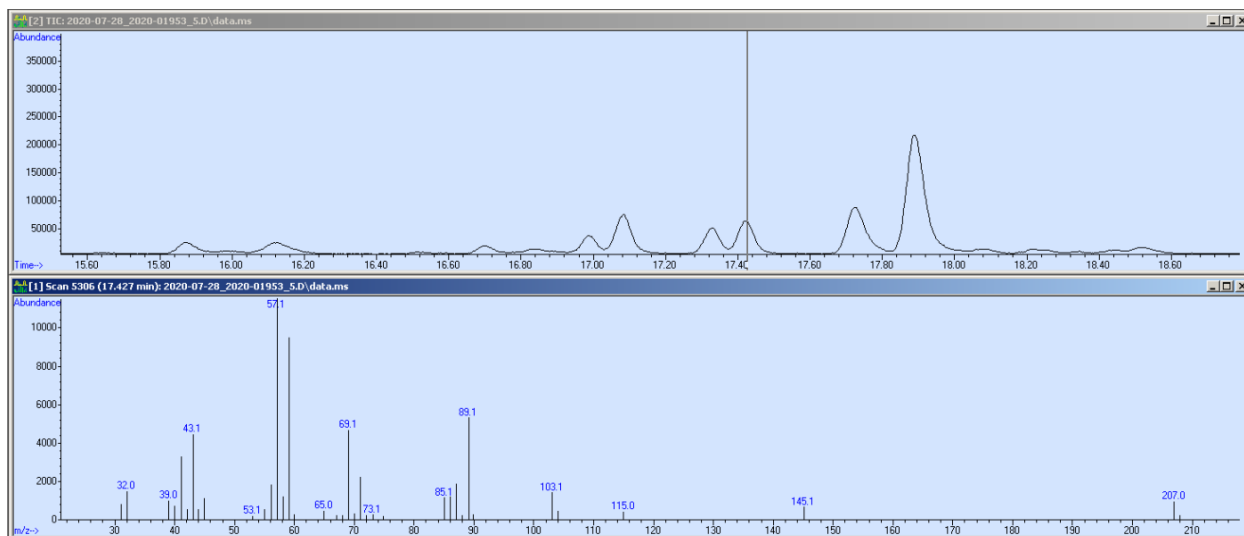
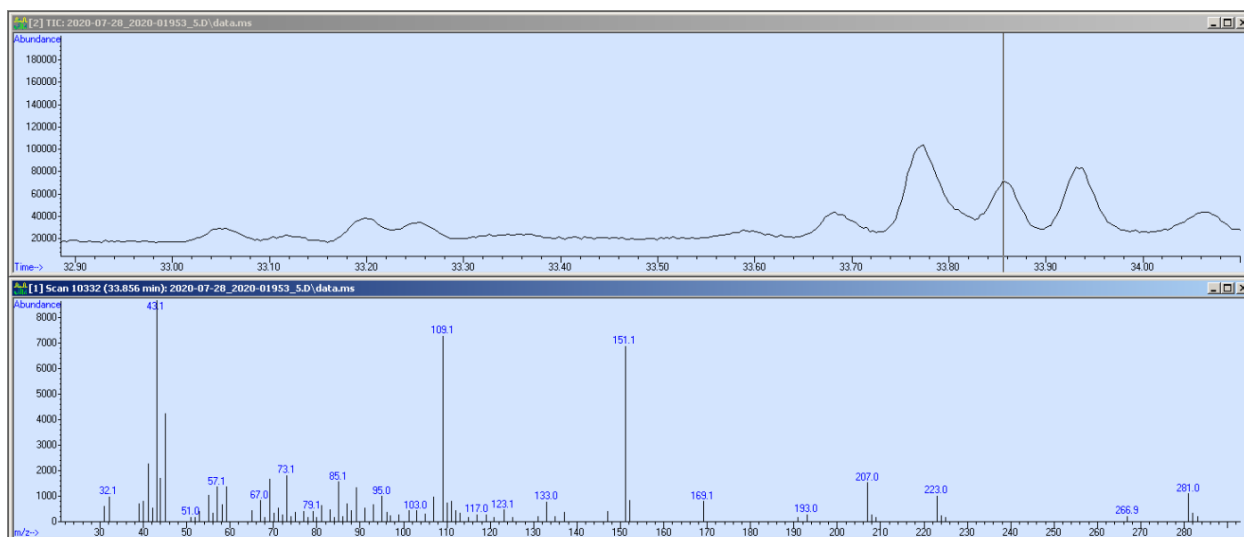
u. 1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-methylpropyl) ester (149.0@40.5)**v. 149.0@40.1**

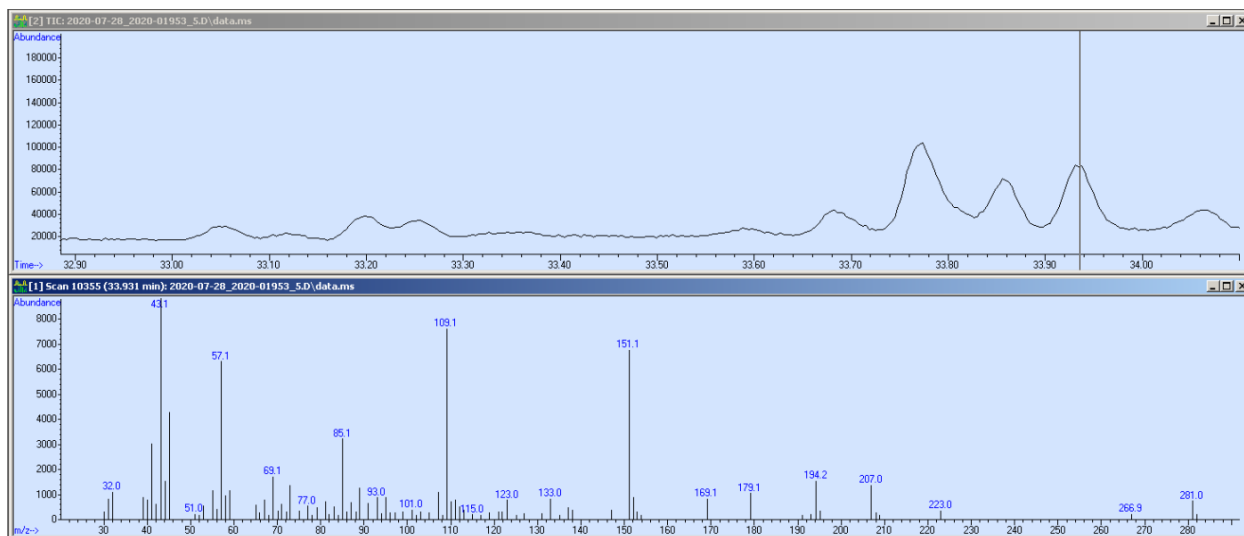
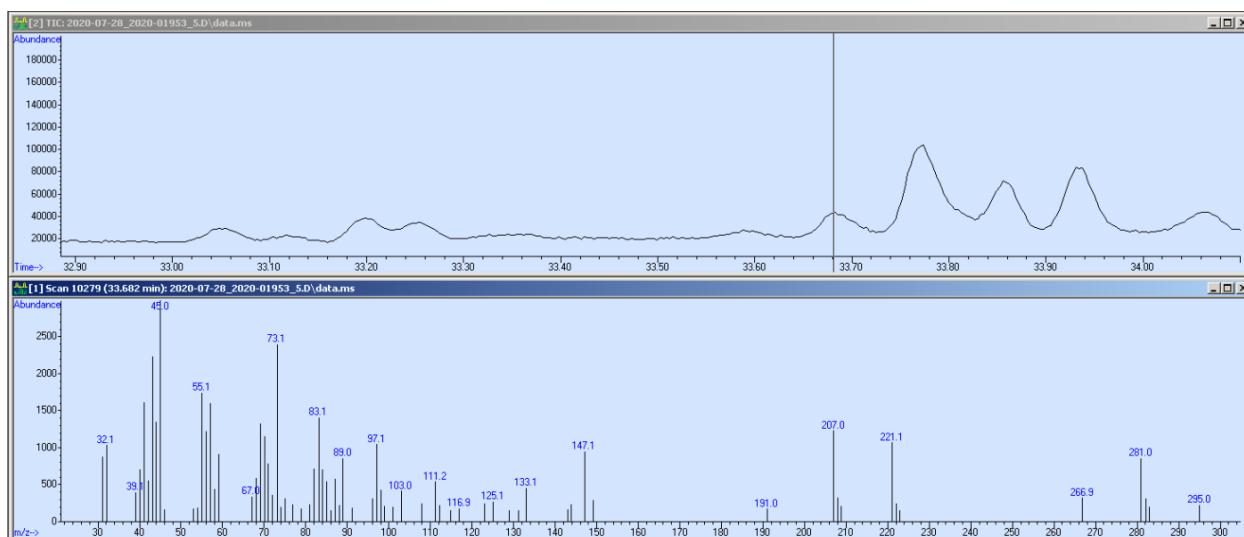
w. 2,3-Dimethyl-5-ethylpyrazine (135.0@21.5)**x. Cedrol (95.0@35.0)**

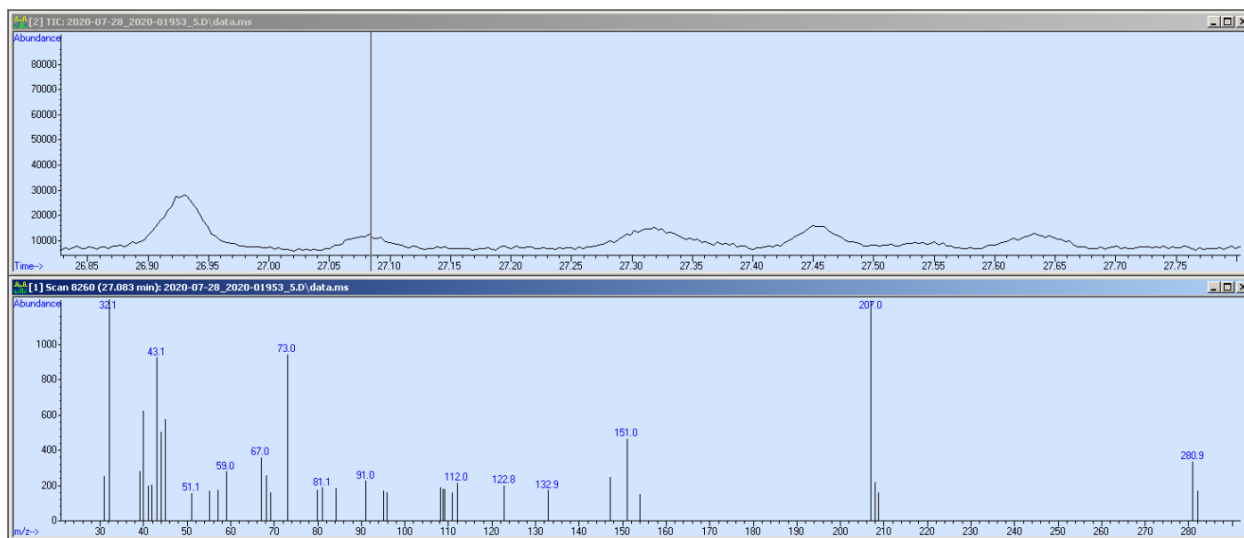
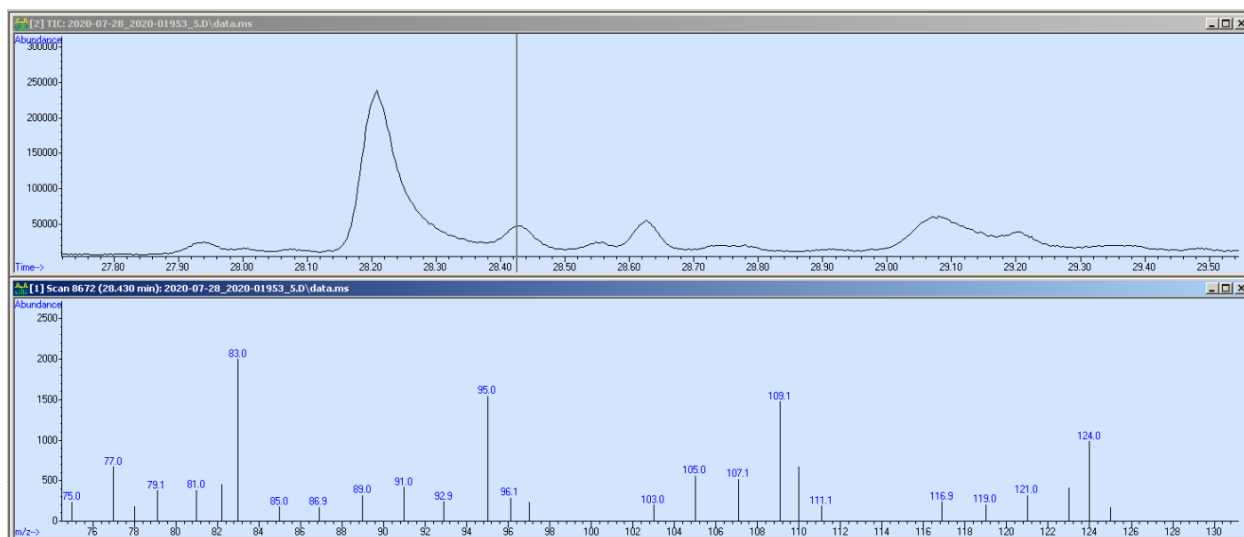
y. Pyrazine, 2,3-dimethyl- (108.0@18.4)**z. 60.0@41.7**

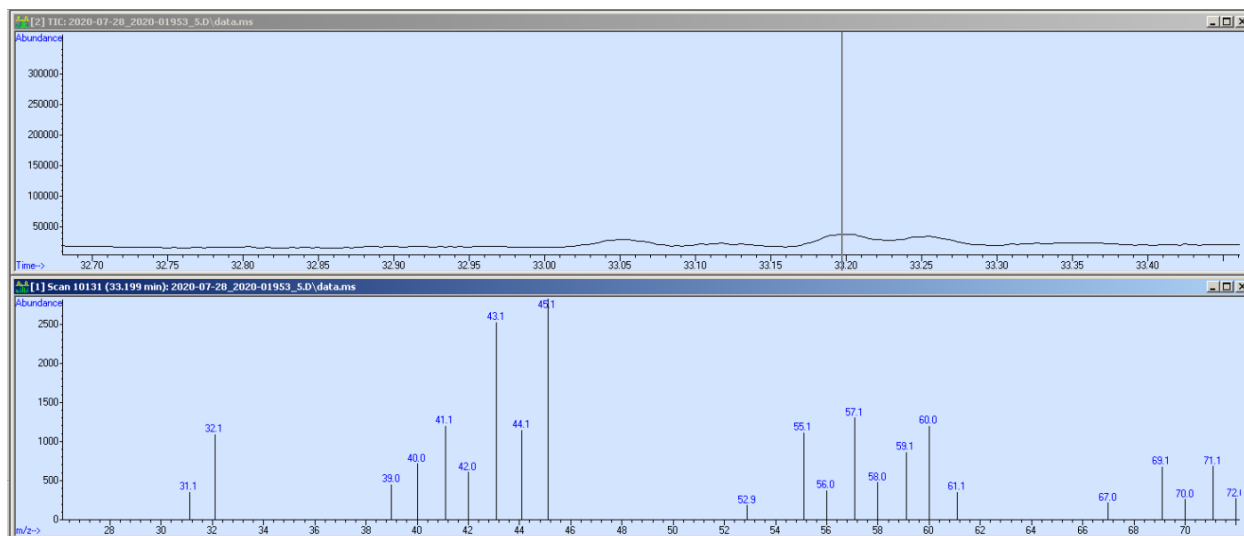
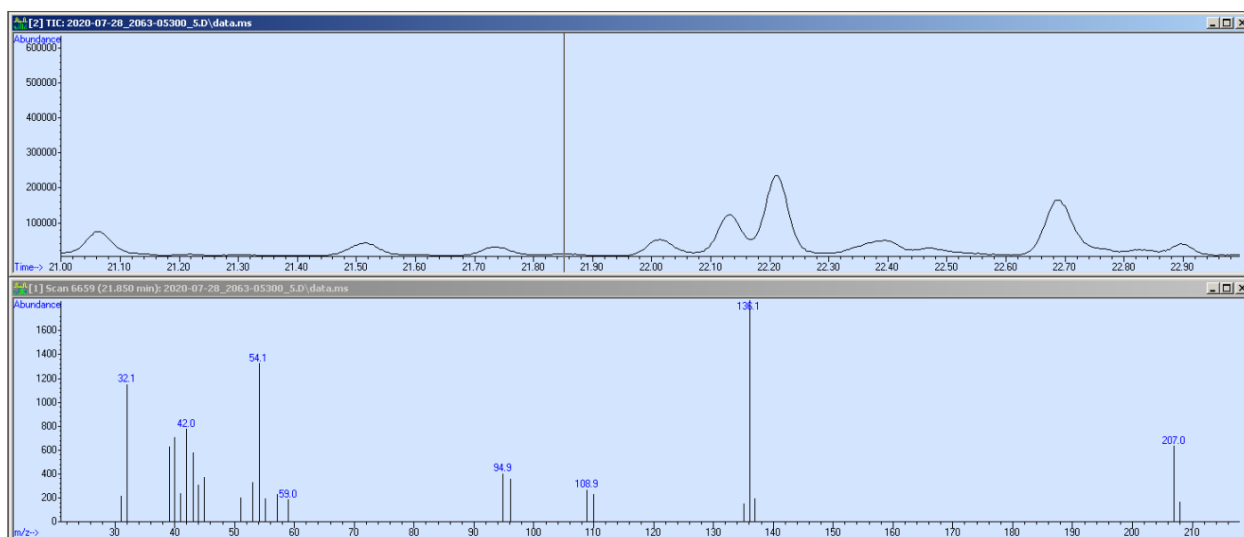
aa. Pyrazine, 3-ethyl-2,5-dimethyl- (135.0@20.9)**bb. 9,9-Dimethoxybicyclo[3.3.1]nona-2,4-dione (105.0@29.9)**

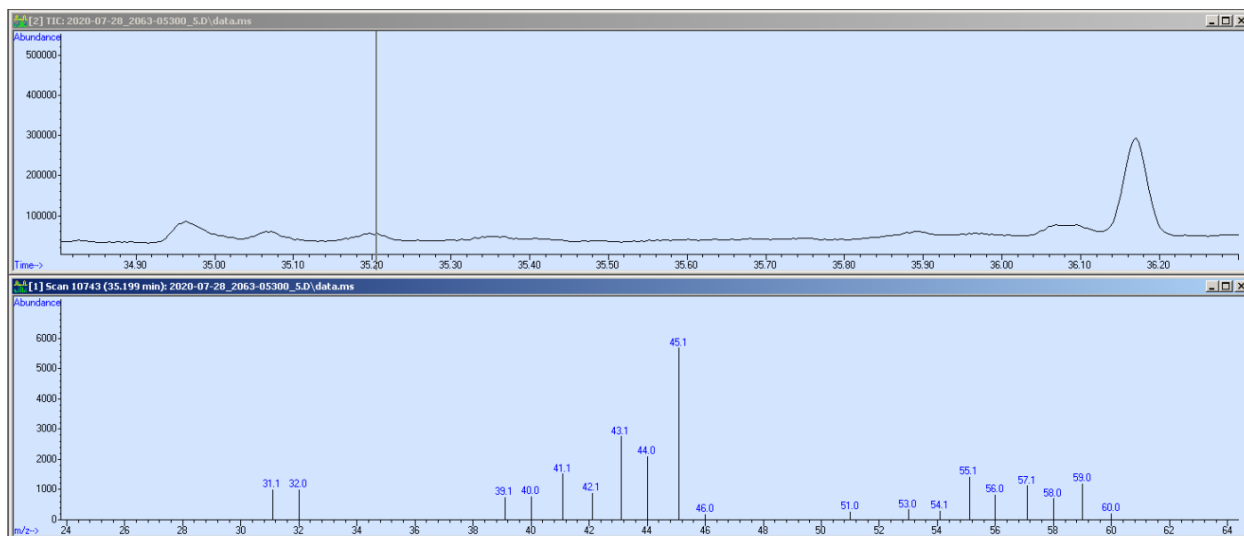
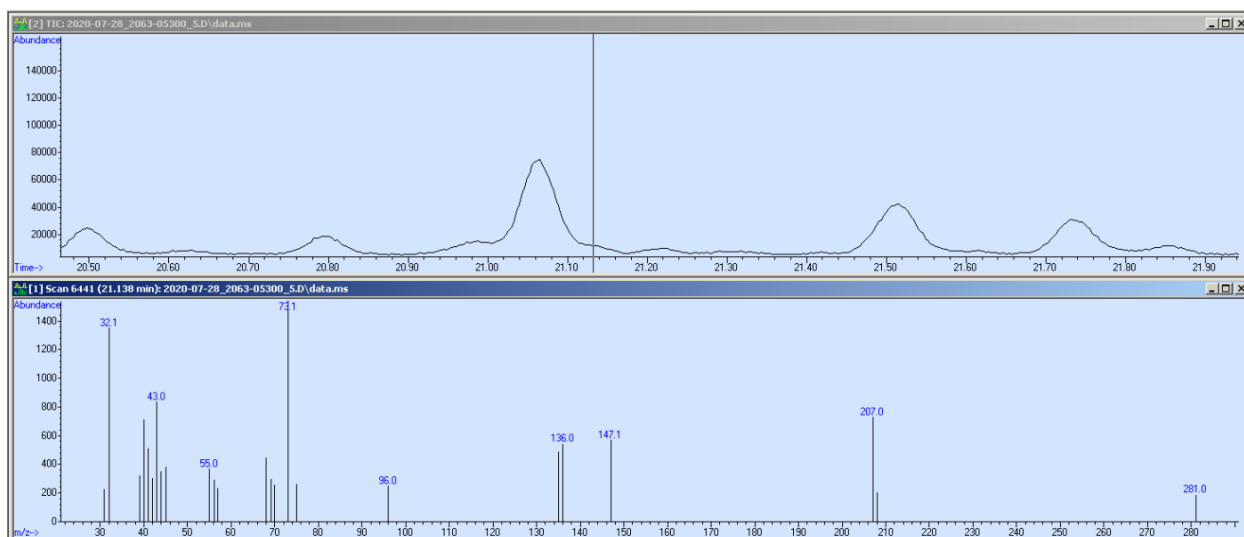
cc. Hexanal, 3,3-dimethyl- (43.0@17.1)**dd. (R-(R*,R*)))-4-(1,5-Dimethylhexyl)-1-cyclohexenecarboxylic acid (126.0@31.7)**

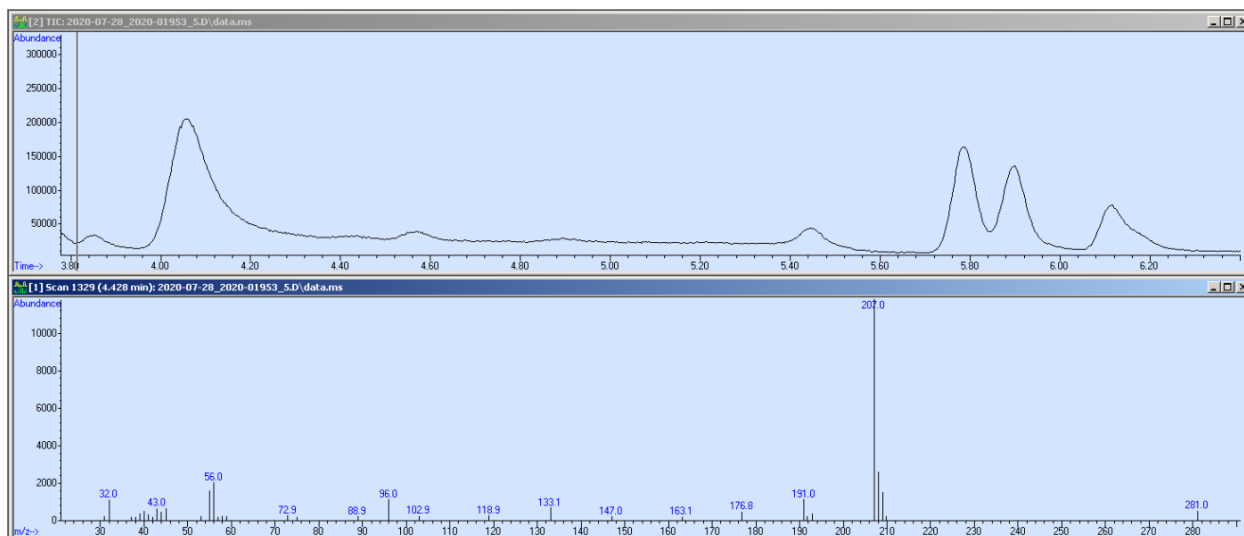
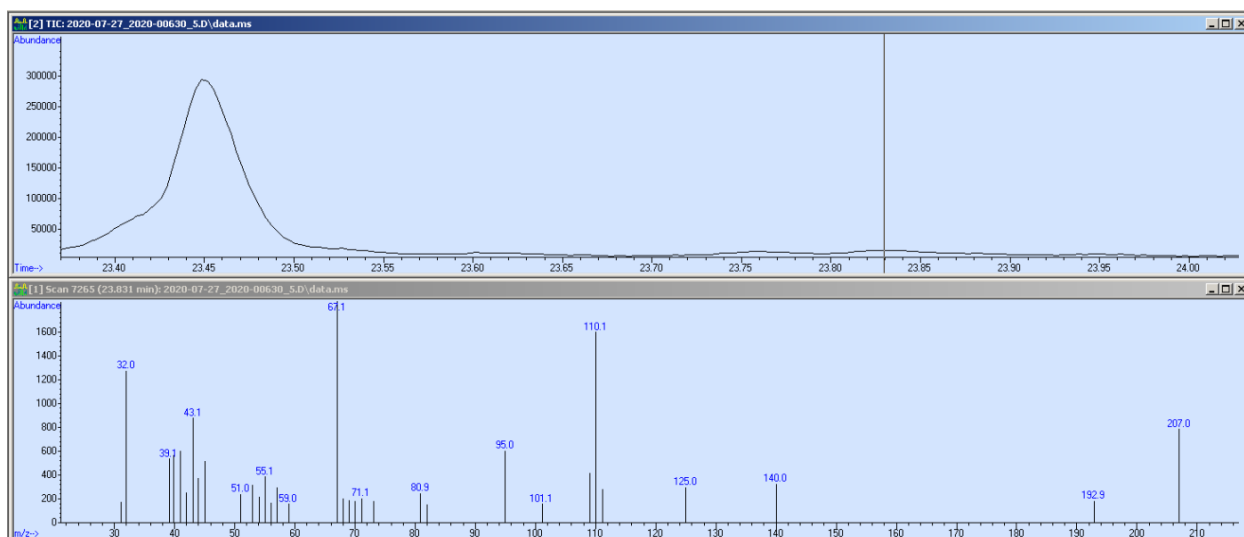
ee. 3-Pentanol, 2,2-dimethyl- (57.0@17.4)**ff. Bicyclo[2.2.1]heptan-2-one, 1-(bromomethyl)-7,7-dimethyl-, (1S)- (43.0@33.8)**

gg. Bicyclo[2.2.1]heptane-1-methanesulfonic acid, 7,7-dimethyl-2-oxo-, (+/-)- (43.0@33.9)**hh. 55.0@33.6**

ii. Cyclohexanone, 5-methyl-2-(1-methylethenyl)-, trans- (67.0@27.0)**jj. Cyclohexane, 1,5-dimethyl-2,3-divinyl- (107.0@28.4)**

kk. 2,3'-Bipyridine, 1',3,4,4',5,5',6,6'-octahydro- (43.0@33.1)**ll. Pyrazine, tetramethyl- (136.0@21.8)**

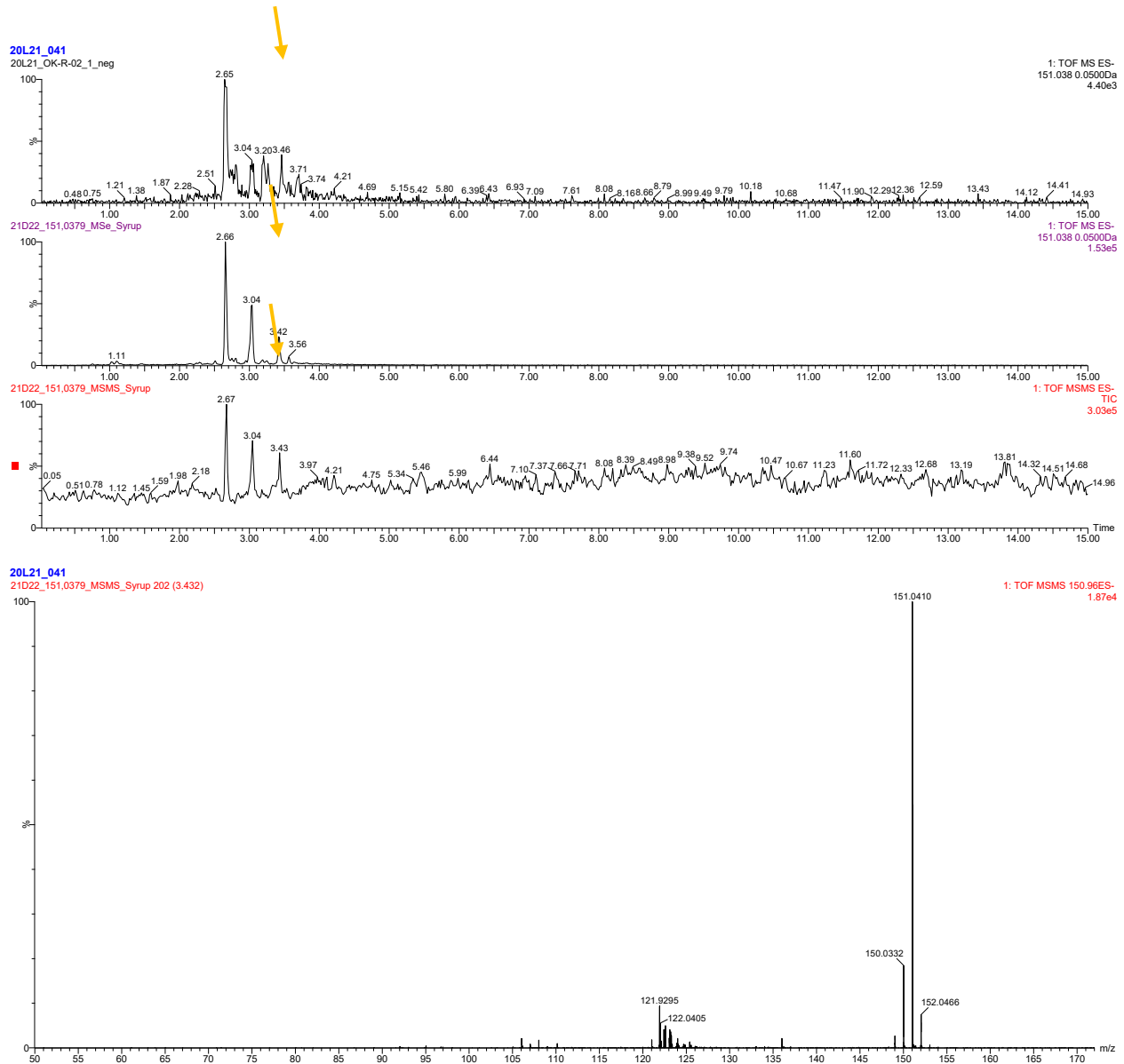
mm. Cyclopentane, 1-acetoxymethyl-3-isopropenyl-2-methyl- (43.0@35.2)**nn. Spiro[2.4]heptan-4-one (67.0@21.3)**

oo. 1,3-Benzenedicarboxylic acid, 5-(1,1-dimethylethyl)- (207.0@4.4)**pp. Uracil, 5-ethyl- (140.0@23.8)**

B. UPLC-QTOF-MS/MS

a. Spectre de mass et chromatographe des HIT

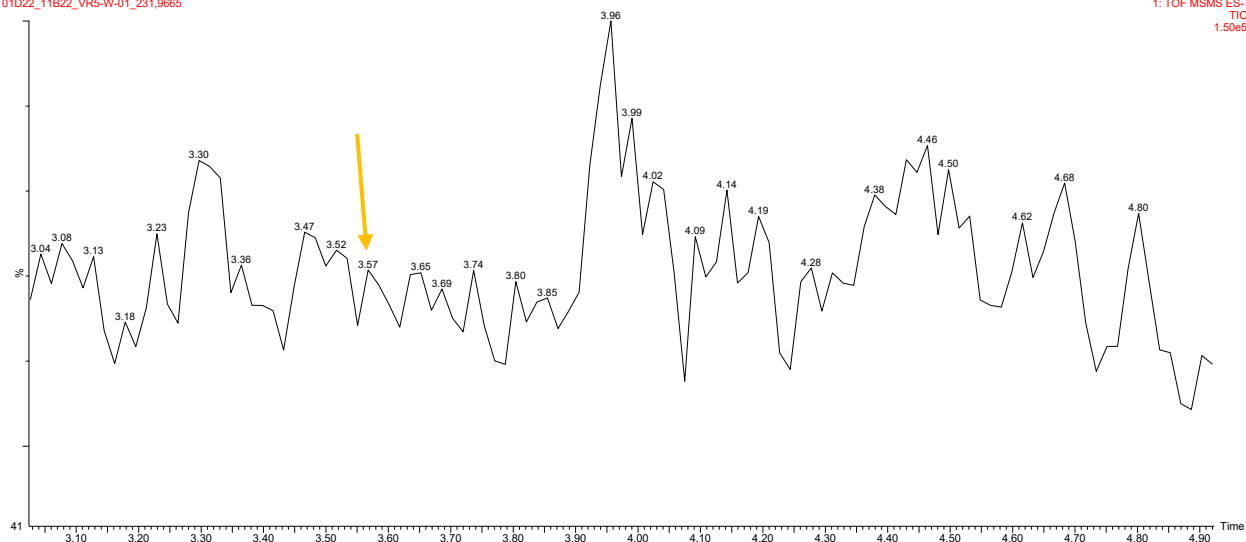
i. 151.0379 m/z, 3.4778 min



ii. 231.9665 m/z, 3.5744

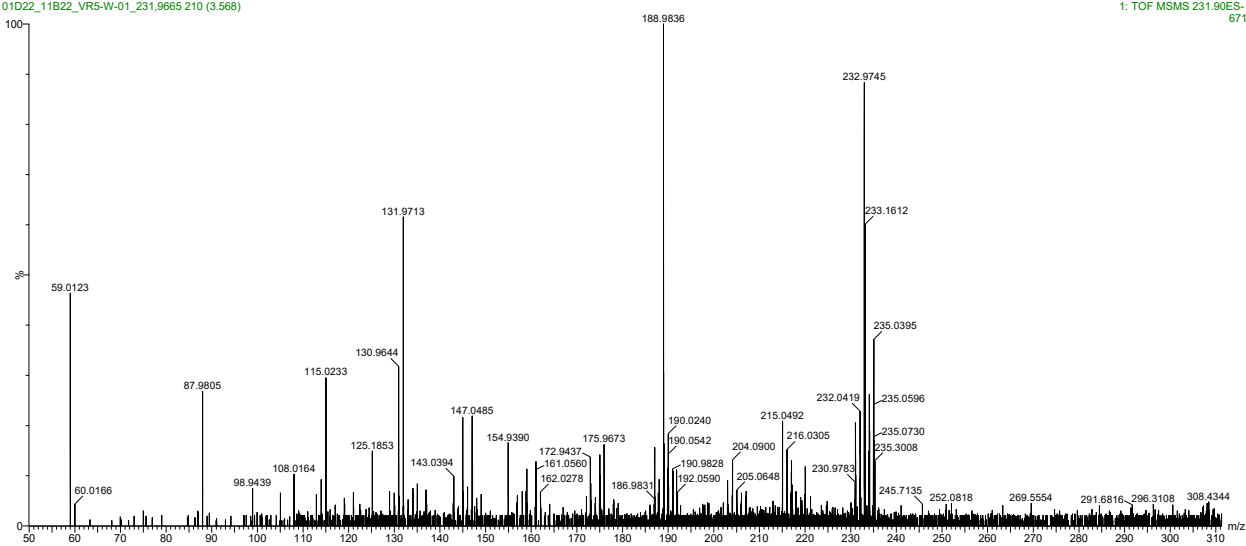
231.9665

01D22_11B22_VRS-W-01_231.9665

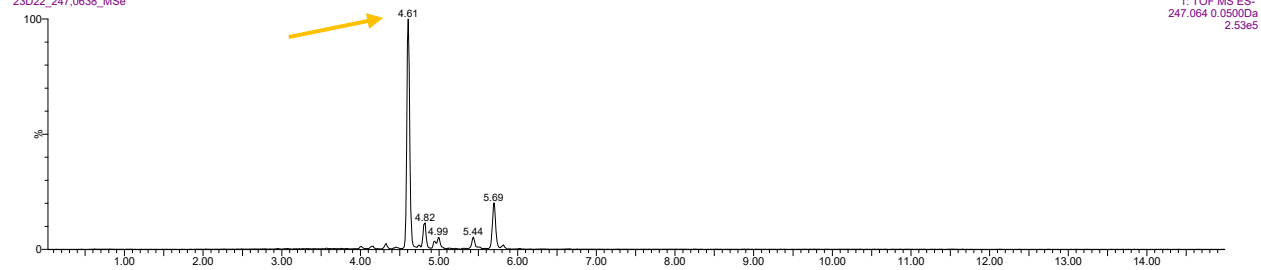
1: TOF MSMS ES-
TIC
1.50e5

231.9665

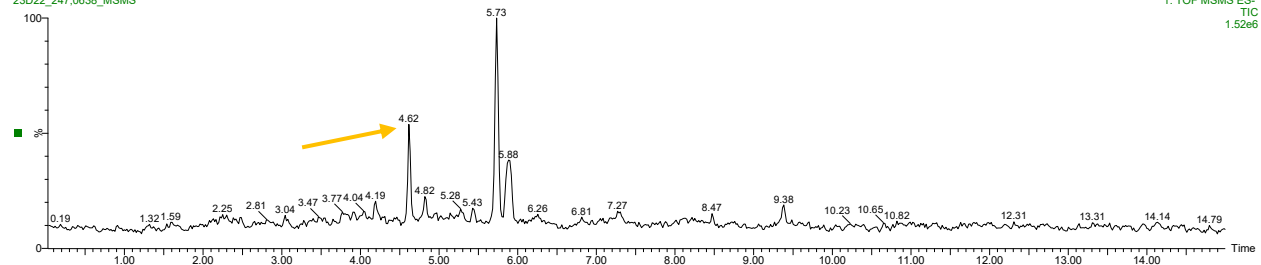
01D22_11B22_VRS-W-01_231.9665 210 (3.568)

1: TOF MSMS 231.90ES-
671

iii. 247.0638 m/z, 4.6287 min

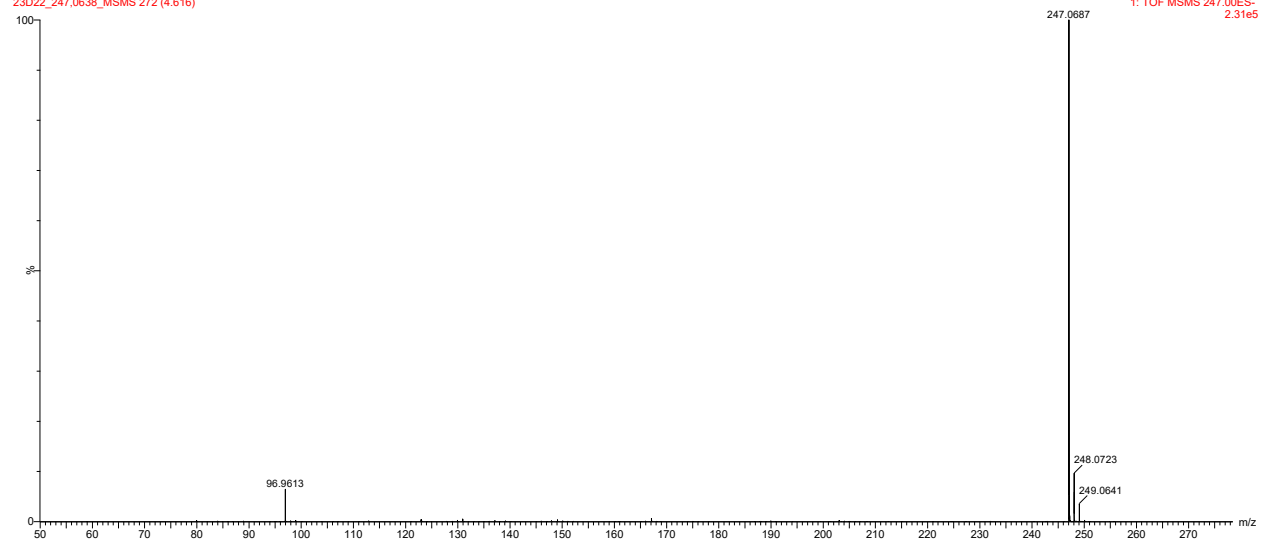
20L21_552
23D22_247.0638_MSe

23D22_247.0638_MSMS



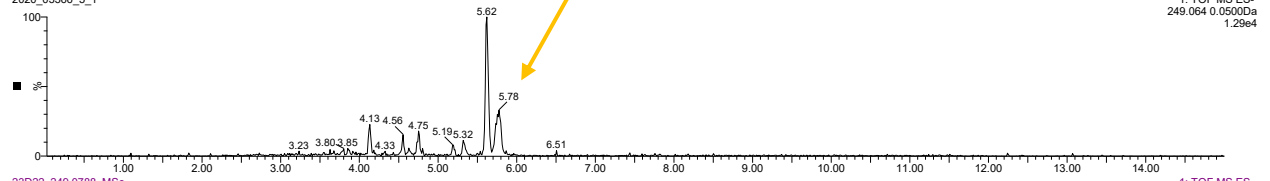
20L21_552

23D22_247.0638_MSMS 272 (4.616)

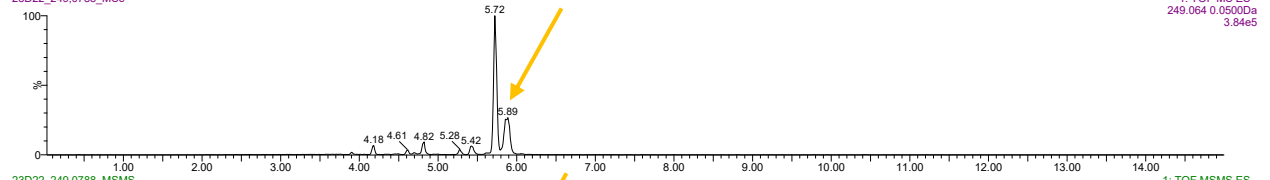


iv. 249.0638 m/z, 5.7829 min

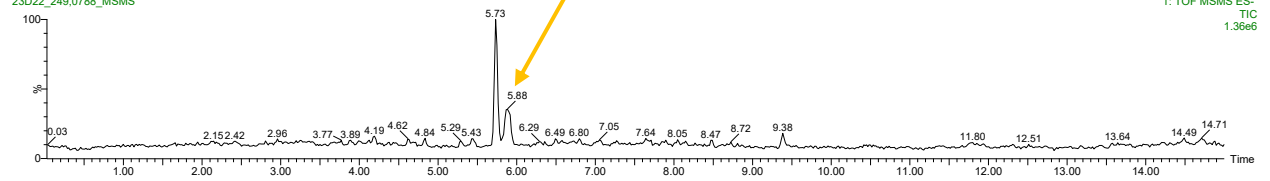
HLB 60 mg
2020_03366_5_1



23D22_249.0788_MS_e

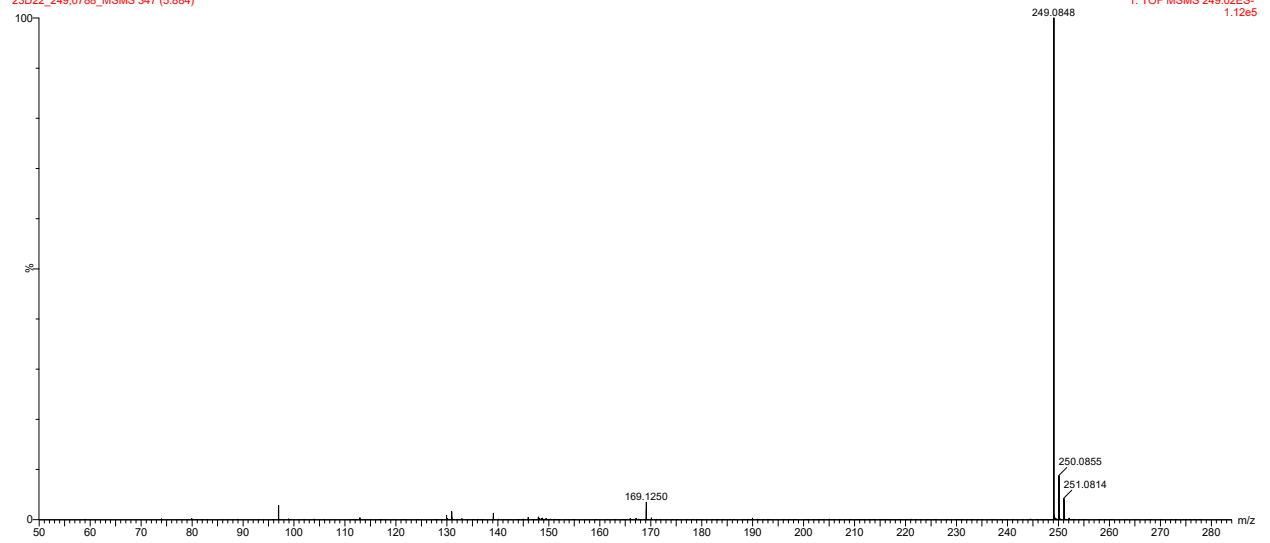


23D22_249.0788_MSMS



20L21_553

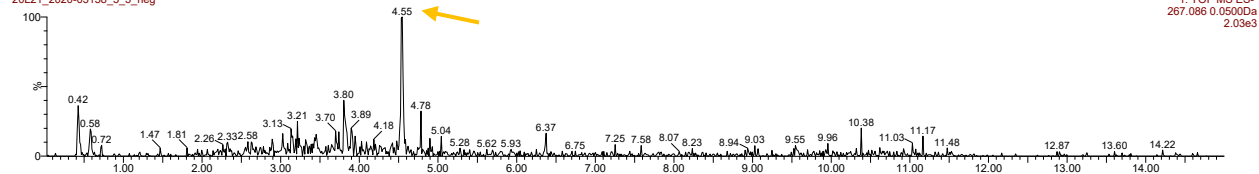
23D22_249.0788_MSMS 347 (5.884)



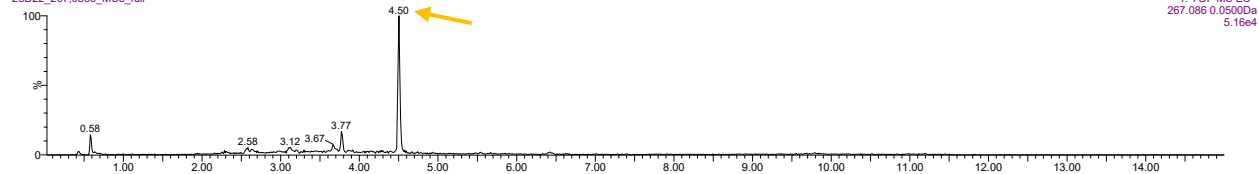
v. 267.0856 m/z, 4.5408 min

20L21 533

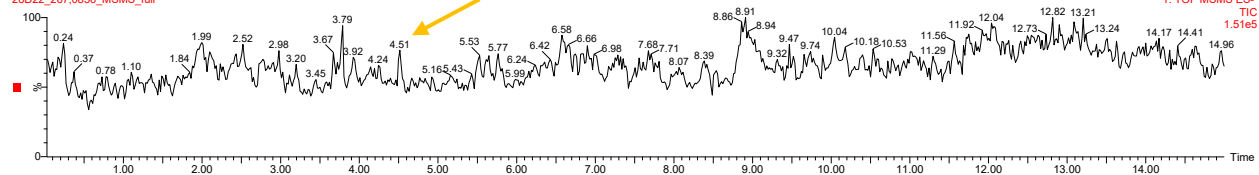
20L21_2020-03158_5_3_neg



28D22_267.0856_MSe_full

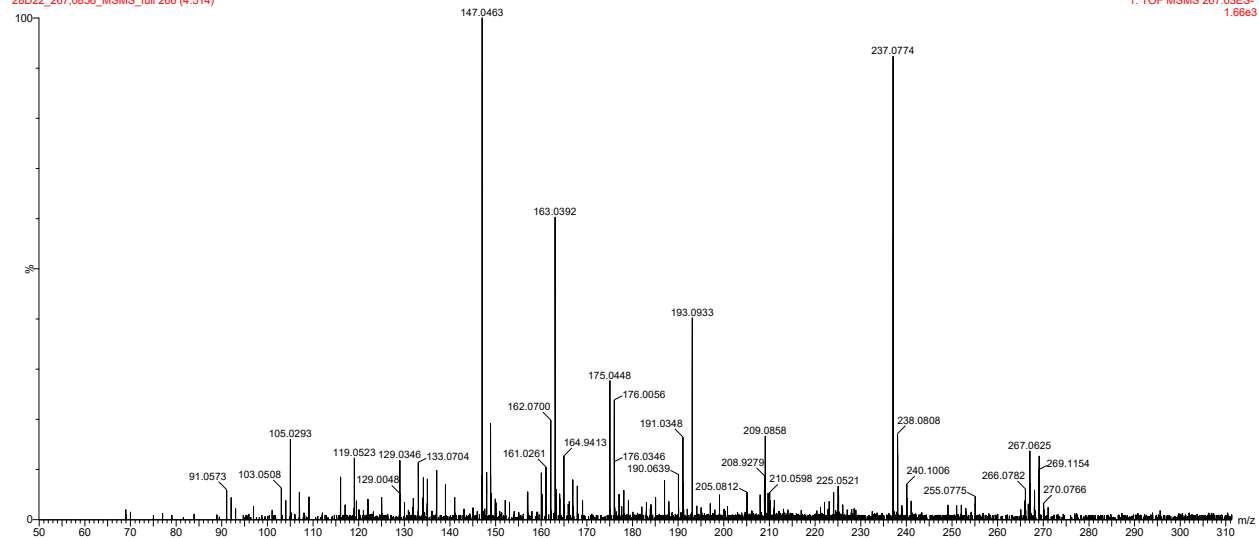


28D22_267.0856_MSMS_full



20L21 533

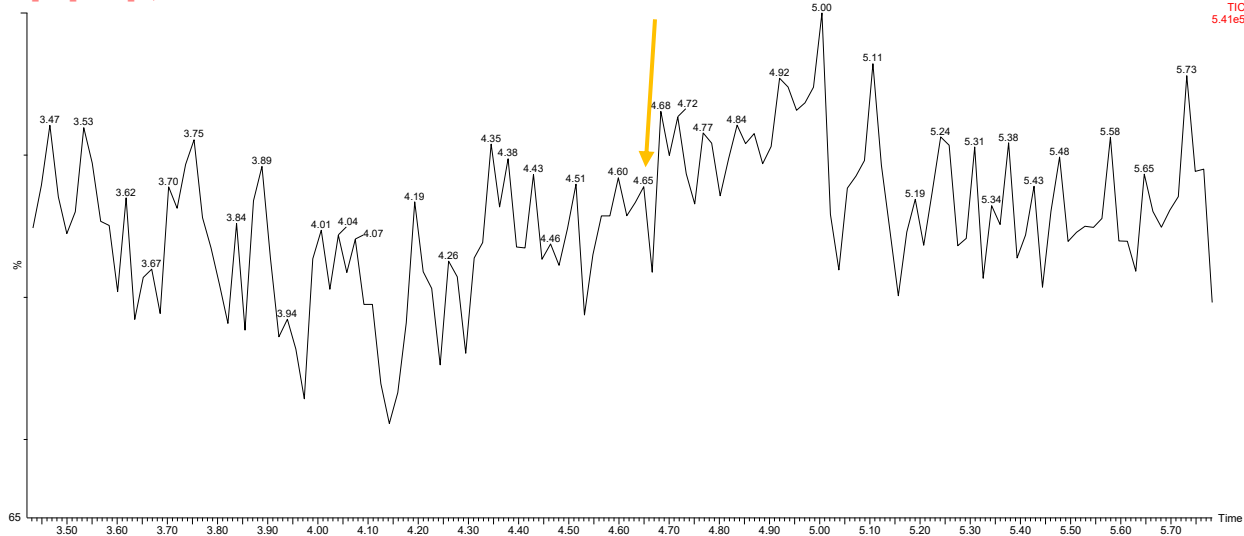
28D22_267.0856_MSMS_full 266 (4.514)



vi. 291.9864 m/z, 4.6416 min

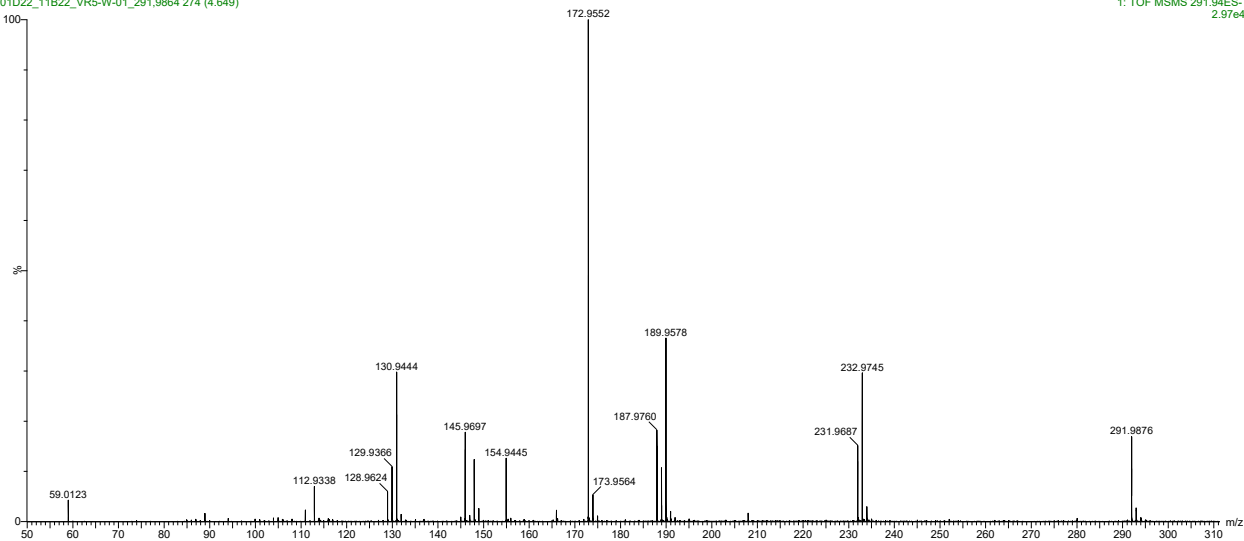
291.9864
01D22_11B22_VRS-W-01_291.9864

1: TOF MSMS ES-
TIC
5.41e5



291.9864
01D22_11B22_VRS-W-01_291.9864 274 (4.649)

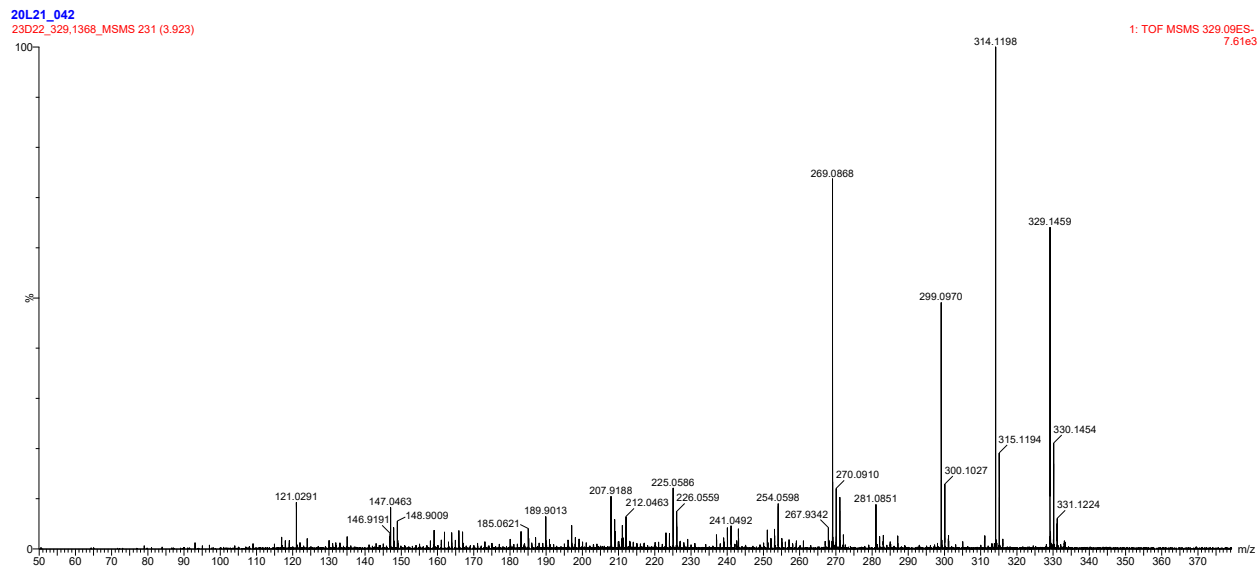
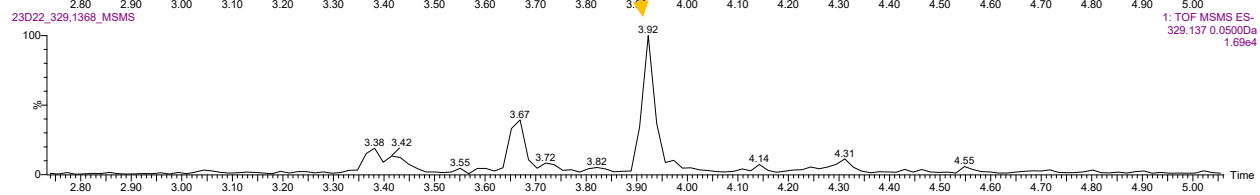
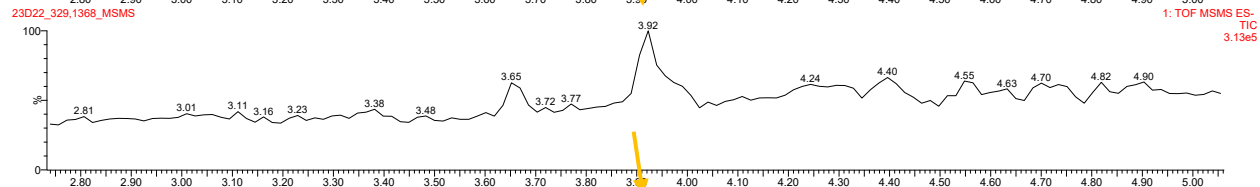
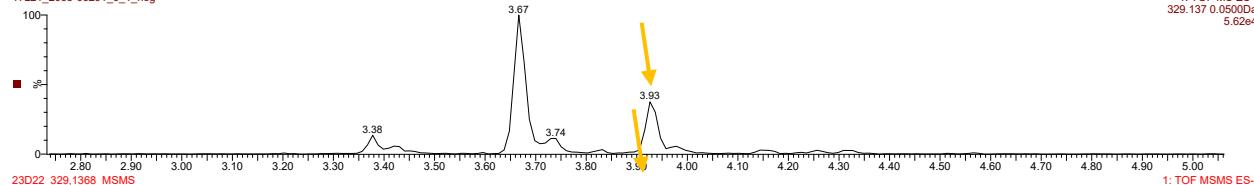
1: TOF MSMS 291.94ES-
2.97e4



vii. 329.1368 m/z, 3.9415 min

Analyte type 0

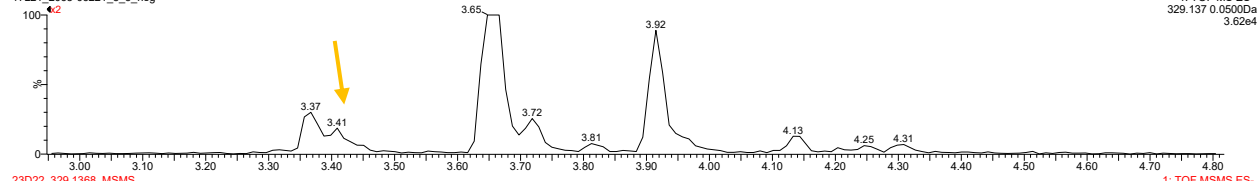
17L21_2063-06291_0_1_neg

1: TOF MS ES-
329.137 0.0500Da
5.62e4

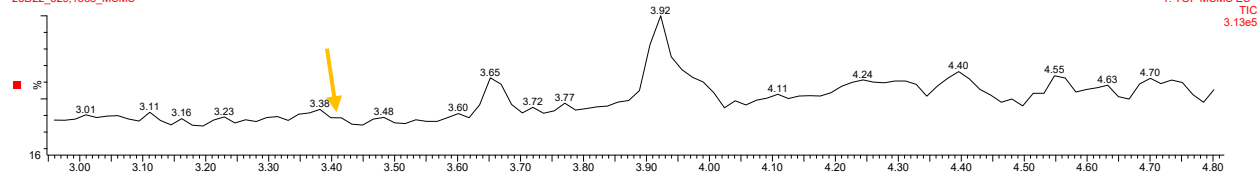
viii. 329.1374 m/z, 3.4017 min

20L21_042

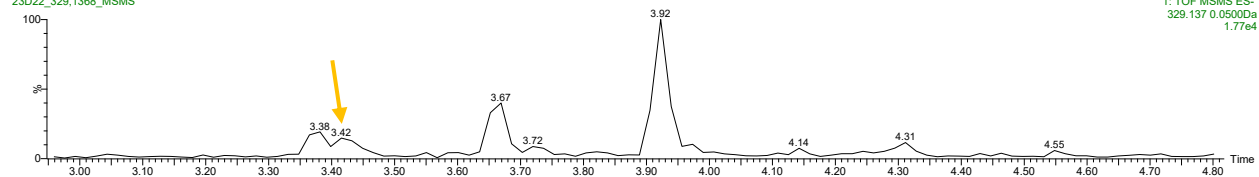
17L21_2063-06221_5_3_neg



23D22_329.1368_MSMS

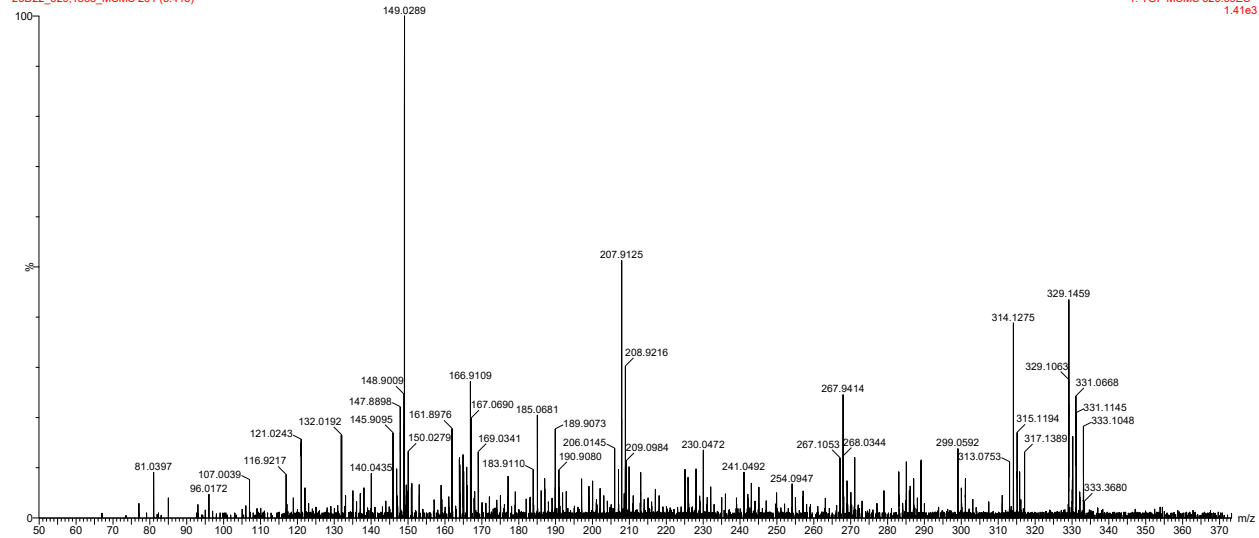


23D22_329.1368_MSMS



20L21_042

23D22_329.1368_MSMS 201 (3.415)

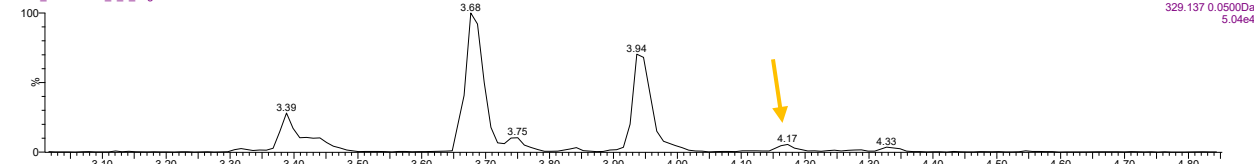


ix. 329.1381 m/z, 4.1685 min

20L21_042

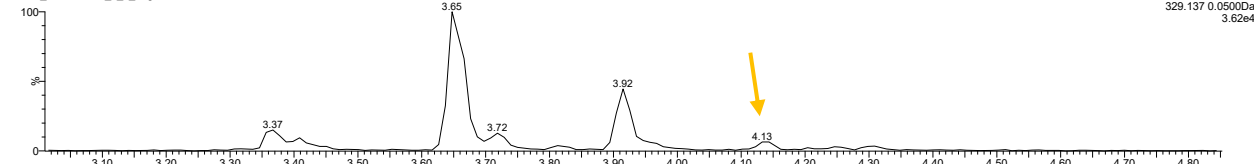
20L21_2020-03158_5_3_neg

1: TOF MS ES-
329.137 0.0500Da
5.04e4



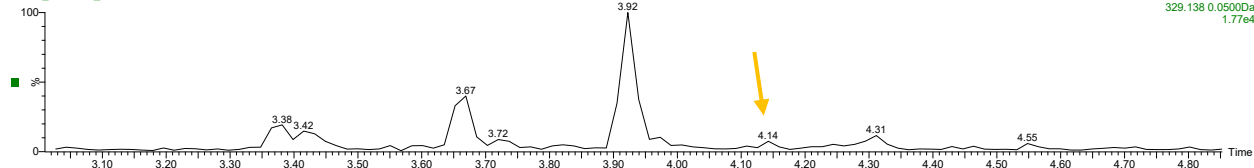
17L21_2063-06221_5_3_neg

1: TOF MS ES-
329.137 0.0500Da
3.62e4



23D22_329.1368_MSMS

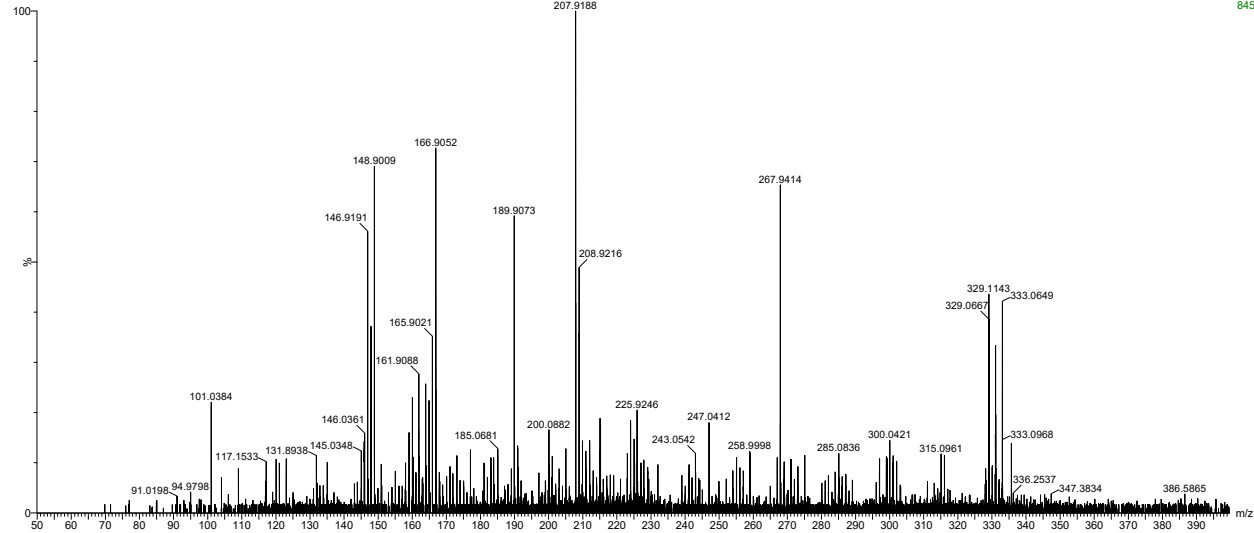
1: TOF MSMS ES-
329.138 0.0500Da
1.77e4

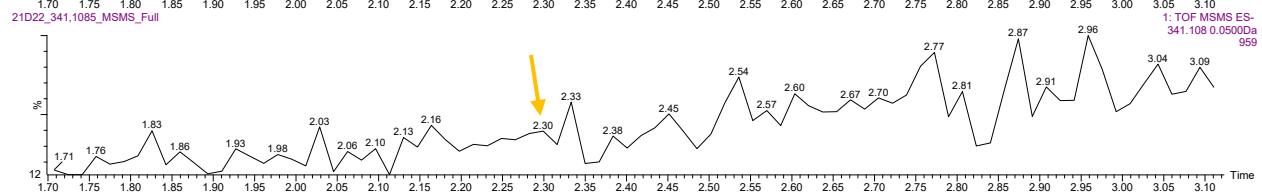
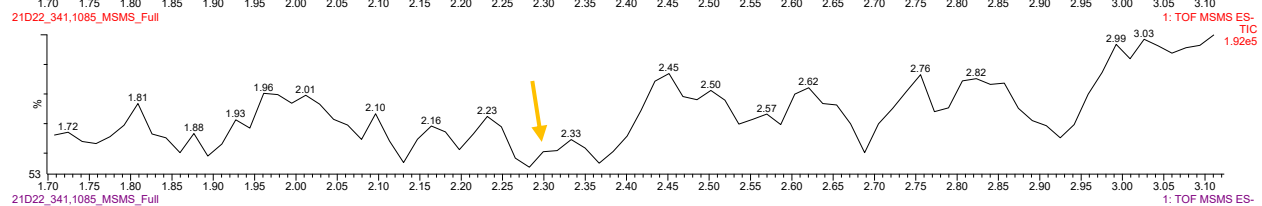
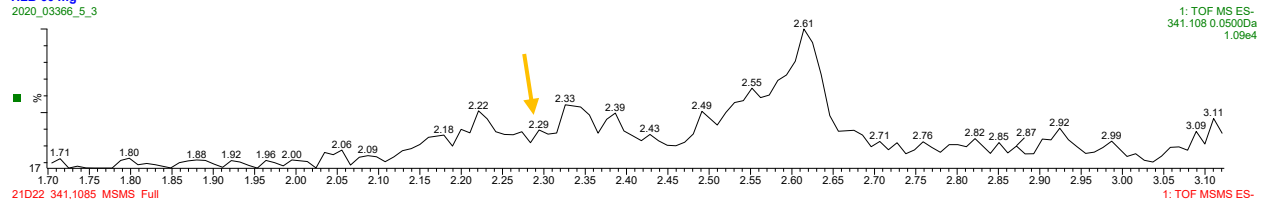


20L21_042

23D22_329.1368_MSMS 244 (4.142)

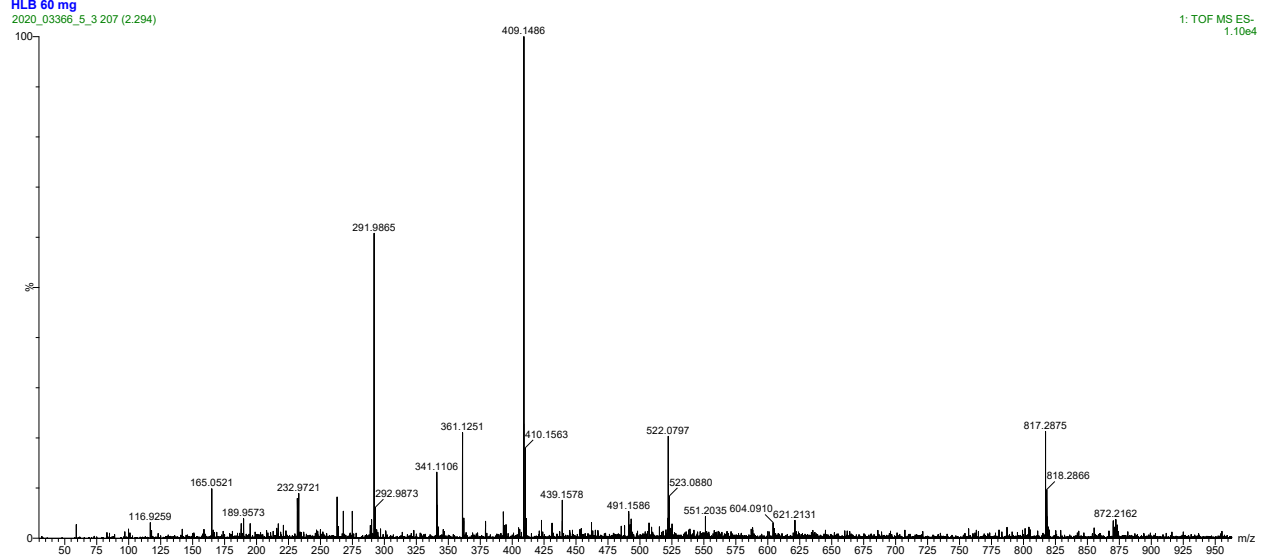
1: TOF MSMS 329.09ES-
845



x. 341.1085 m/z, 2.2961 minHLB 60 mg
2020_03366_5_3

HLB 60 mg

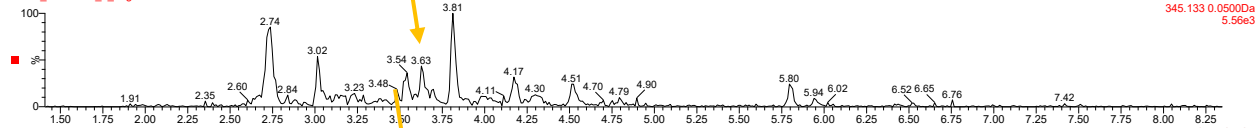
2020_03366_5_3 207 (2.294)



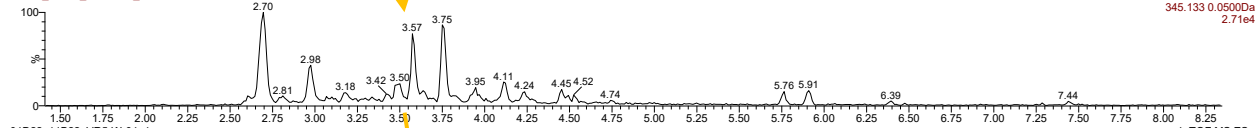
xi. 345.1329 m/z, 3.6311 min

Analyte type 5

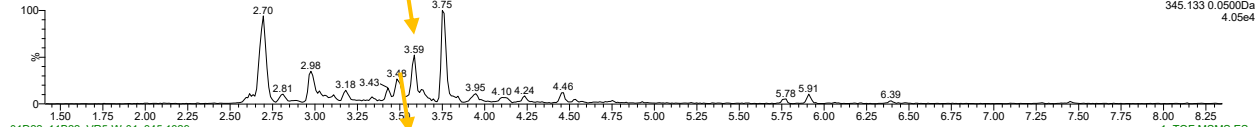
20L21_VRS-U-02_3_neg



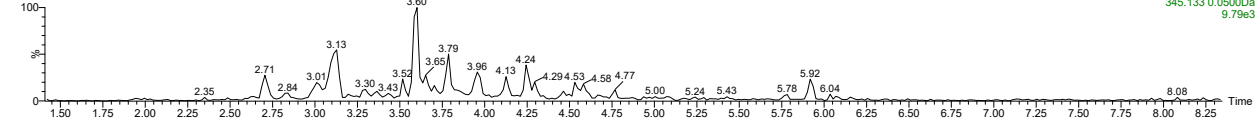
01D22_11B22_VRS-L-01_1



01D22_11B22_VRS-W-01_1

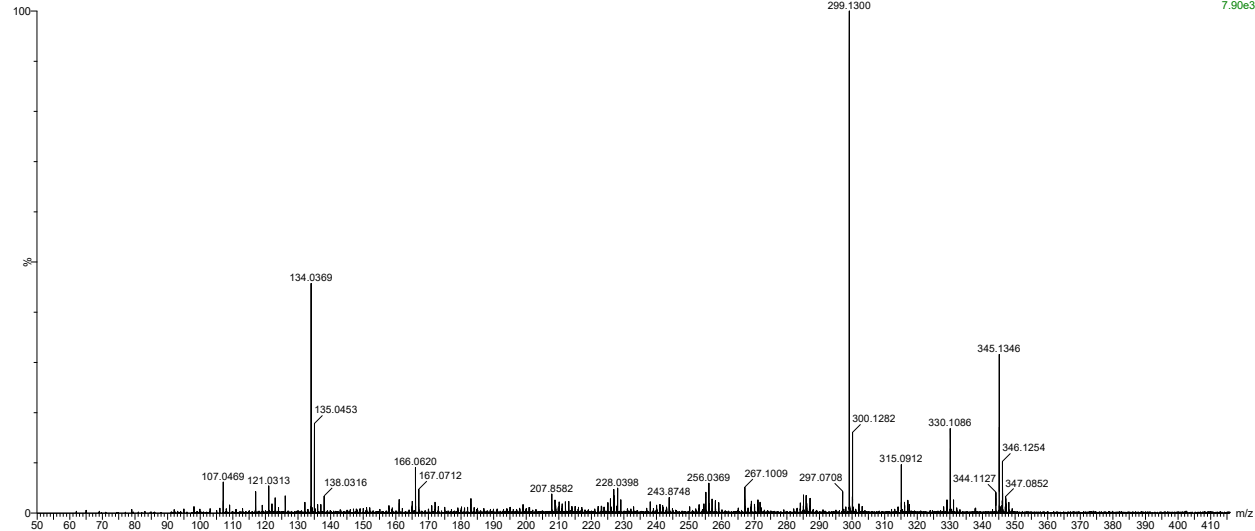


01D22_11B22_VRS-W-01_345,1329



345,1329

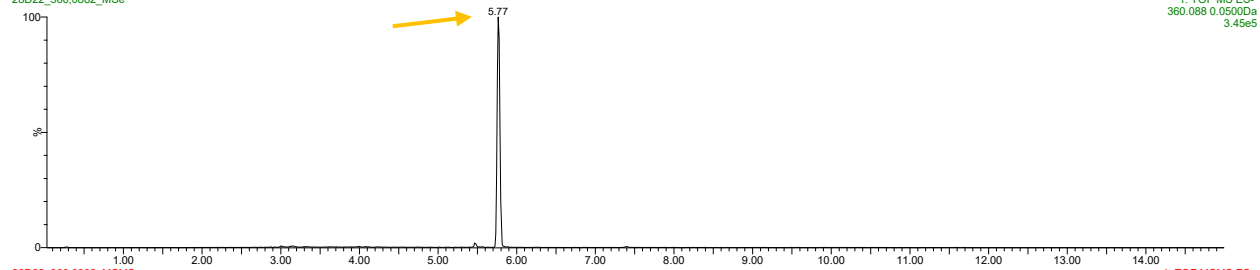
01D22_11B22_VRS-W-01_345,1329 212 (3.601)



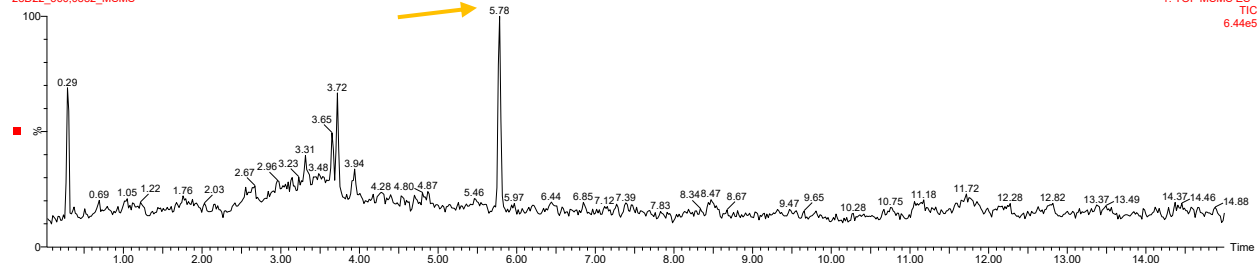
xii. 360.0882 m/z, 5.7983 min

20L21 011

28D22_360.0882_MSe

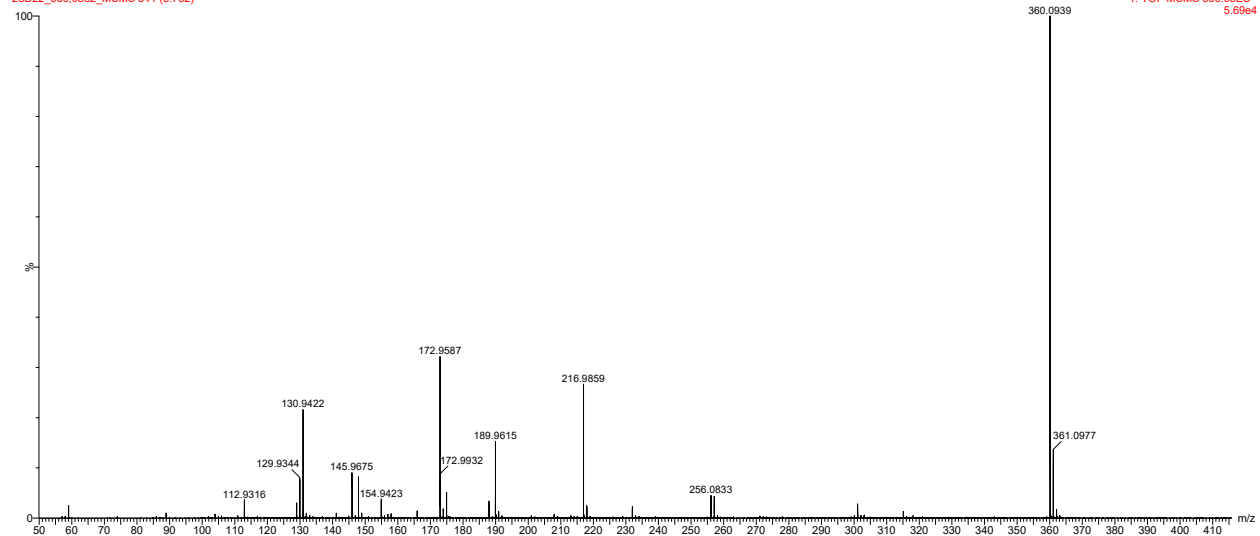


28D22_360.0882_MSMS



20L21 011

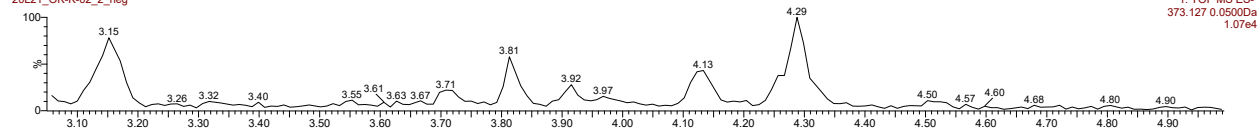
28D22_360.0882_MSMS 341 (5.782)



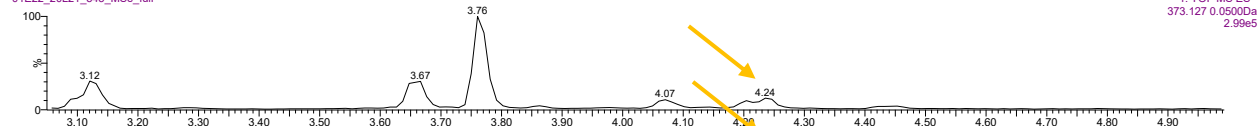
xiii. 373.1269 m/z, 4.2932 min

20L21 023

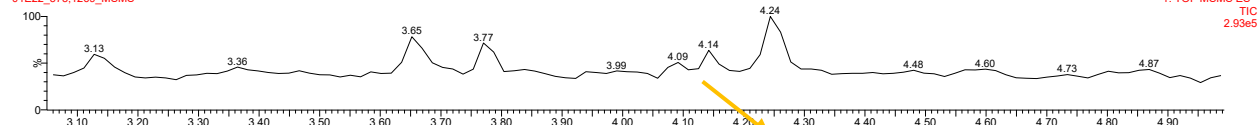
20L21_OK-K-02_2_neg



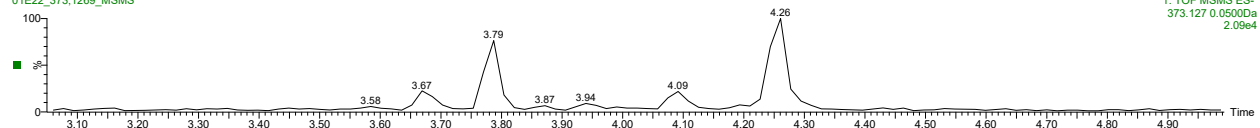
01E22_20L21_543_MS_e_full



01E22_373.1269_MSMS

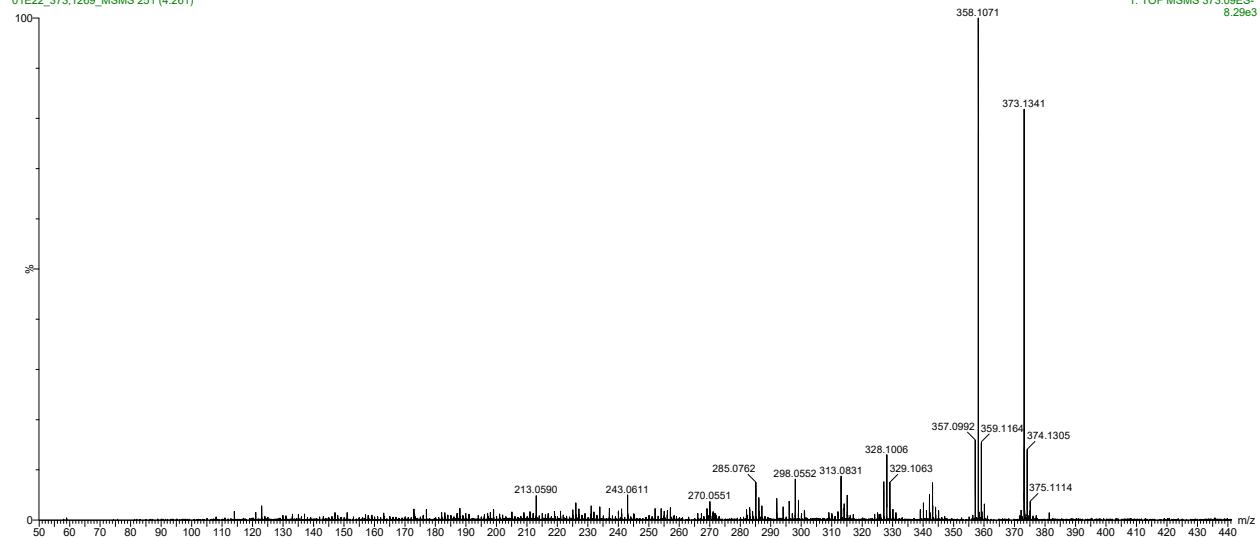


01E22_373.1269_MSMS



20L21 023

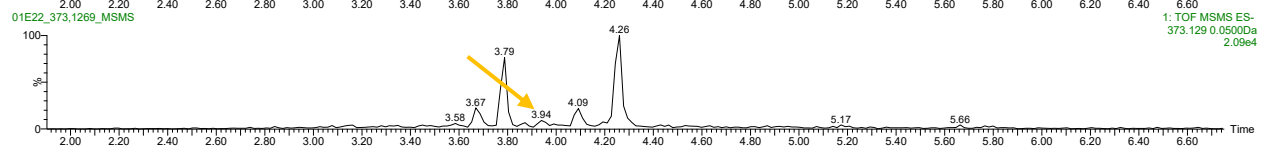
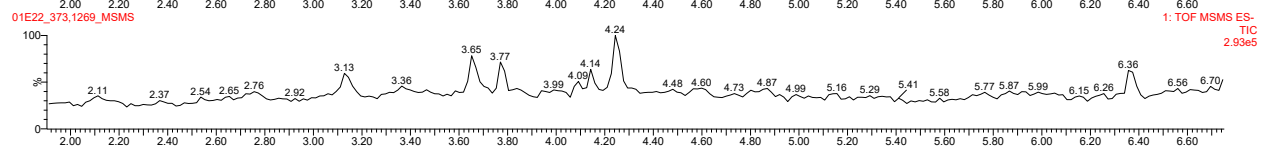
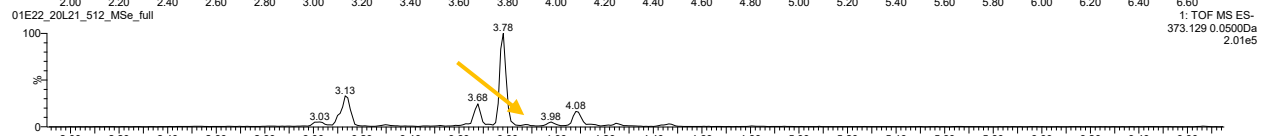
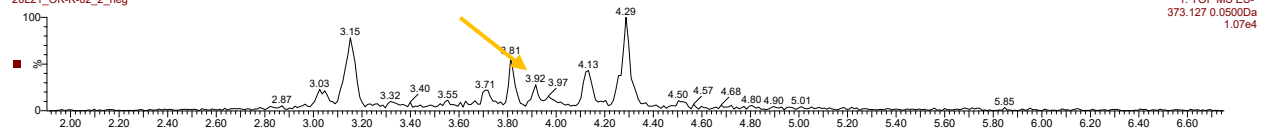
01E22_373.1269_MSMS 251 (4.261)



xiv. 373.1285 m/z, 3.9480 min

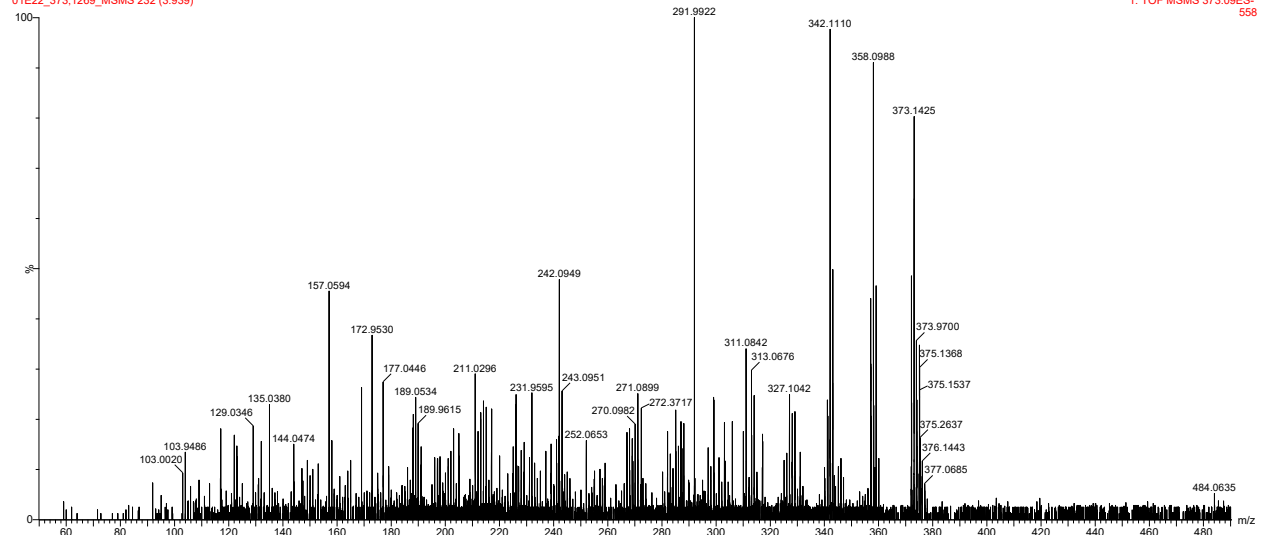
Analyte type 0

20L21_OK-K-02_2_neg



20L21 023

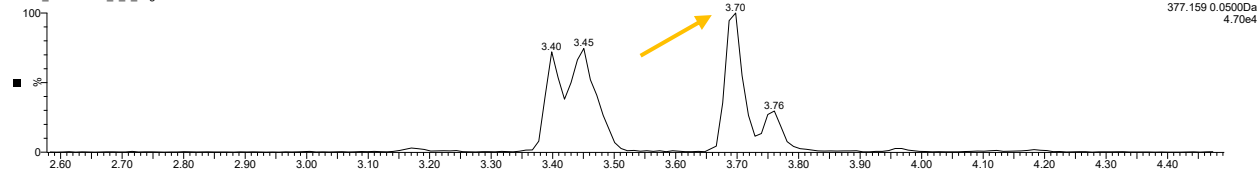
01E22_373.1269_MSMS 232 (3.939)



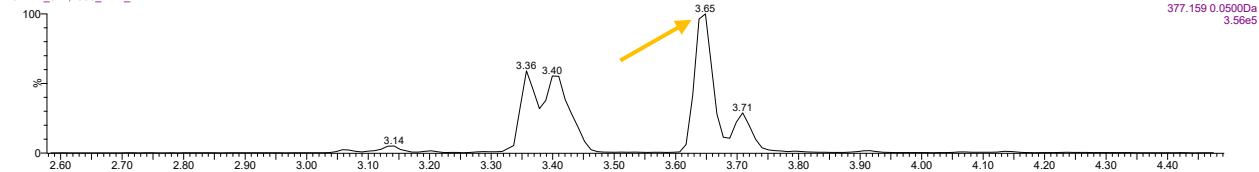
xv. 377.1586 m/z, 3.6756 min

Analyte type 0

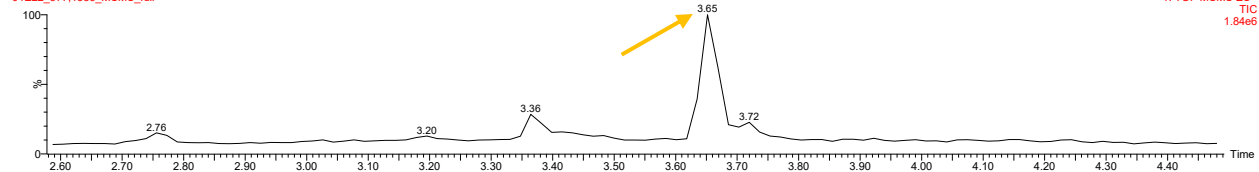
20L21_2020-03160_0_2_neg



01E22_377.1586_MS_e_full

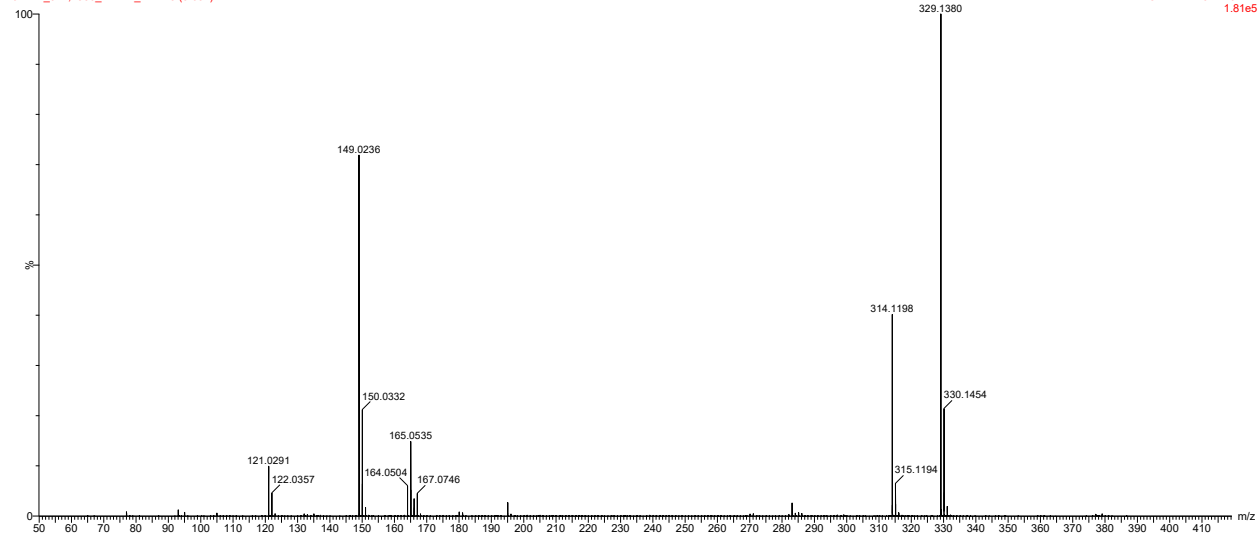


01E22_377.1586_MSMS_full



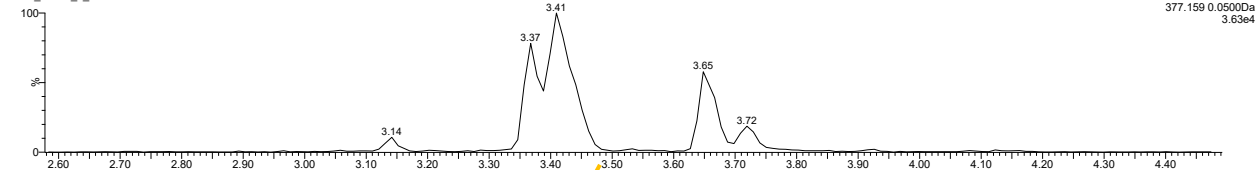
20L21 042

01E22_377.1586_MSMS_full 215 (3.652)

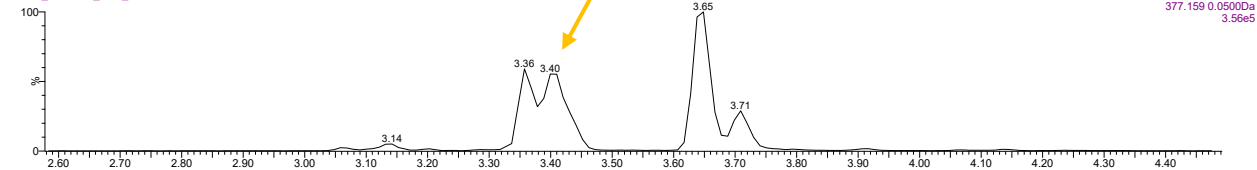


xvi. 377.1587 m/z, 3.4241 min

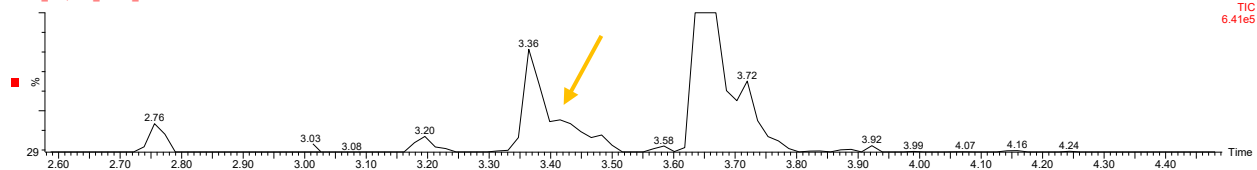
20L21 042
2020_03366_5_3



01E22_377.1586_MS_e_full

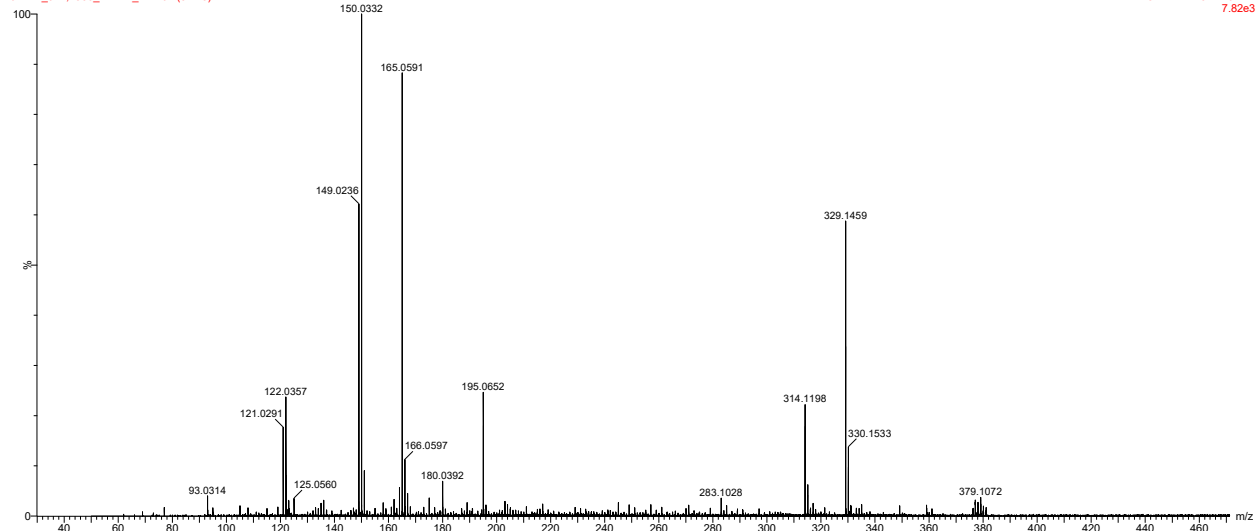


01E22_377.1586_MSMS_full

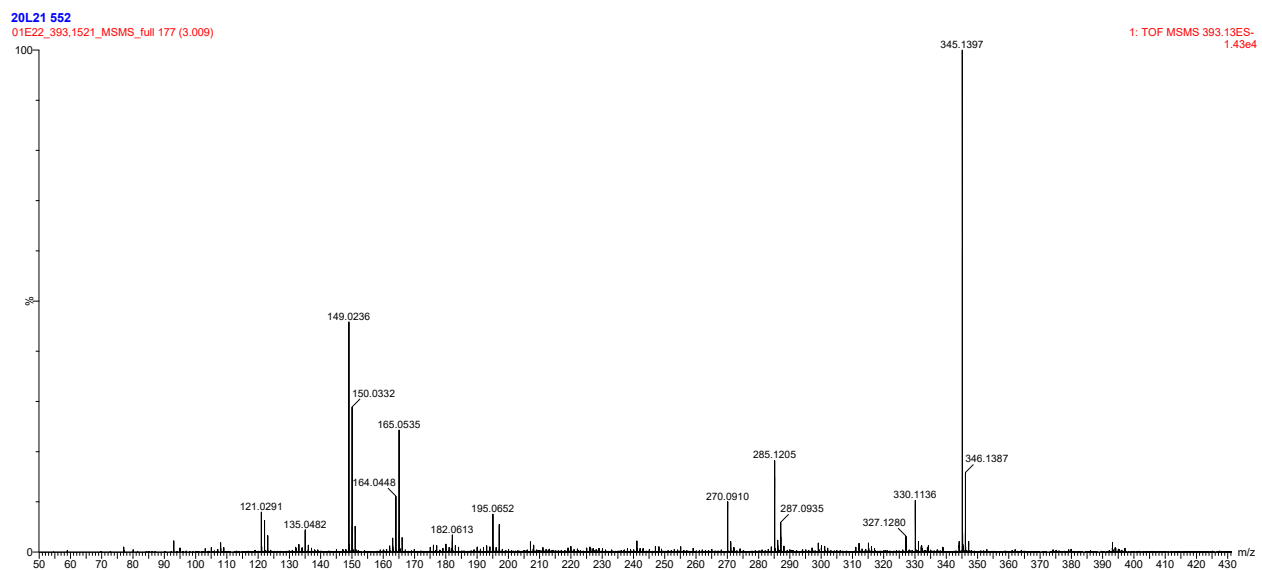
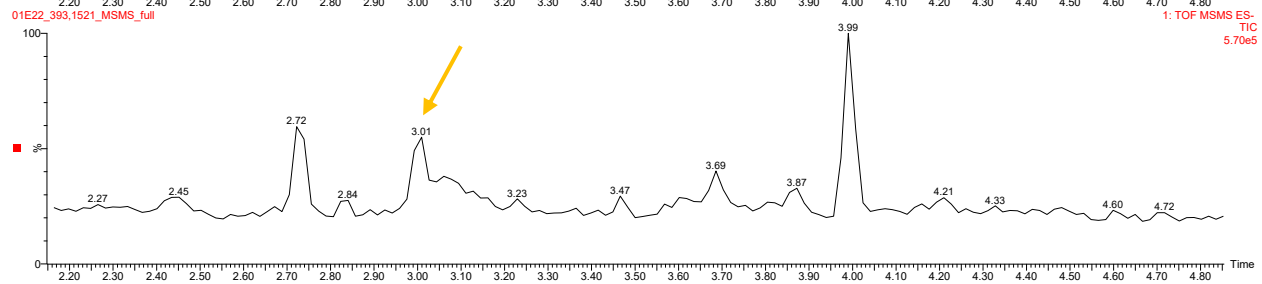
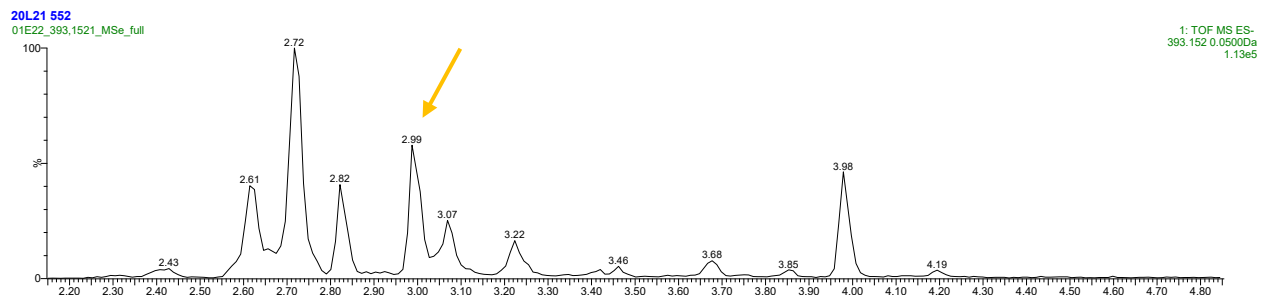


20L21 042

01E22_377.1586_MSMS_full 201 (3.415)

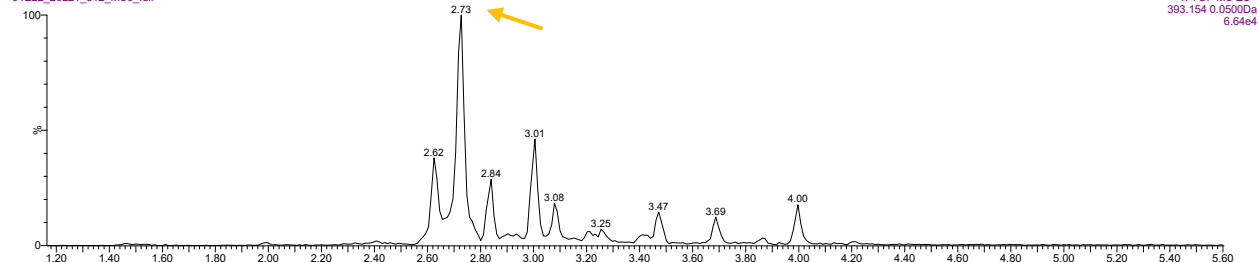


xvii. 393.1521 m/z, 3.0195 min

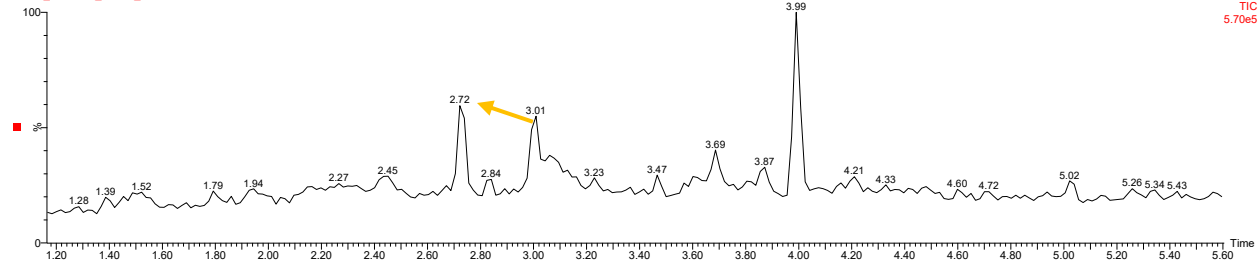


xviii. 393.1544 m/z, 2.7210 min

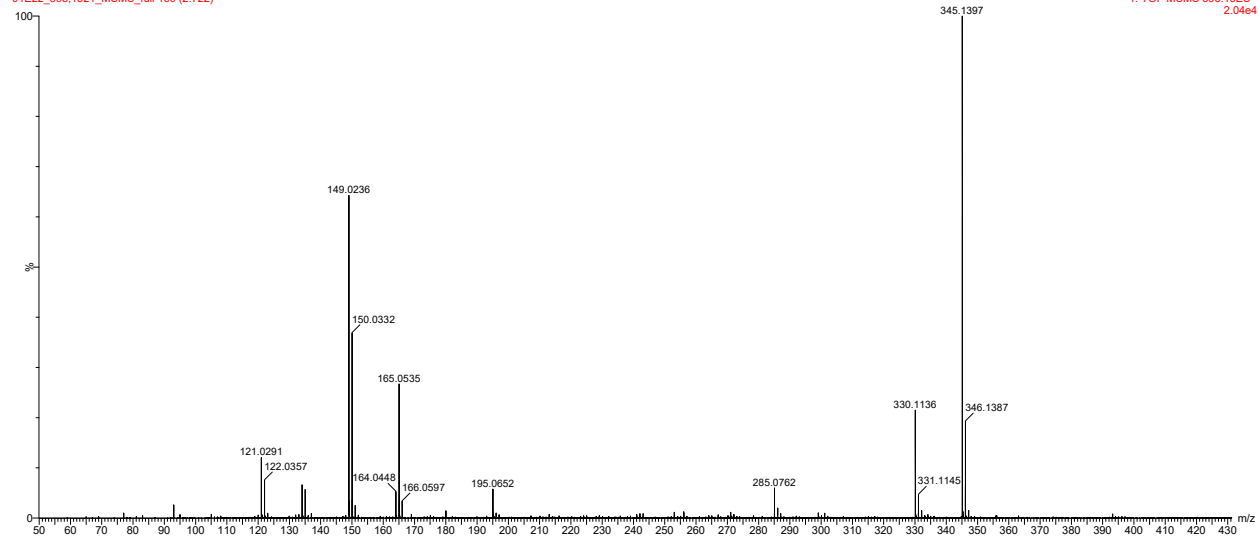
20L21 552
01E22_20L21_512_MSe_full



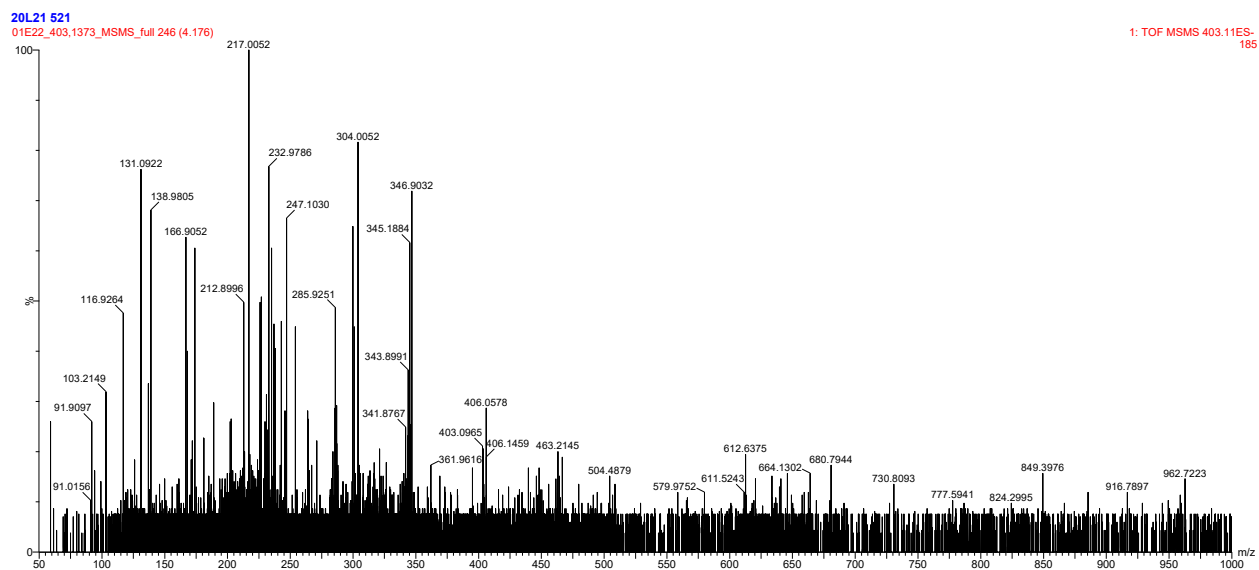
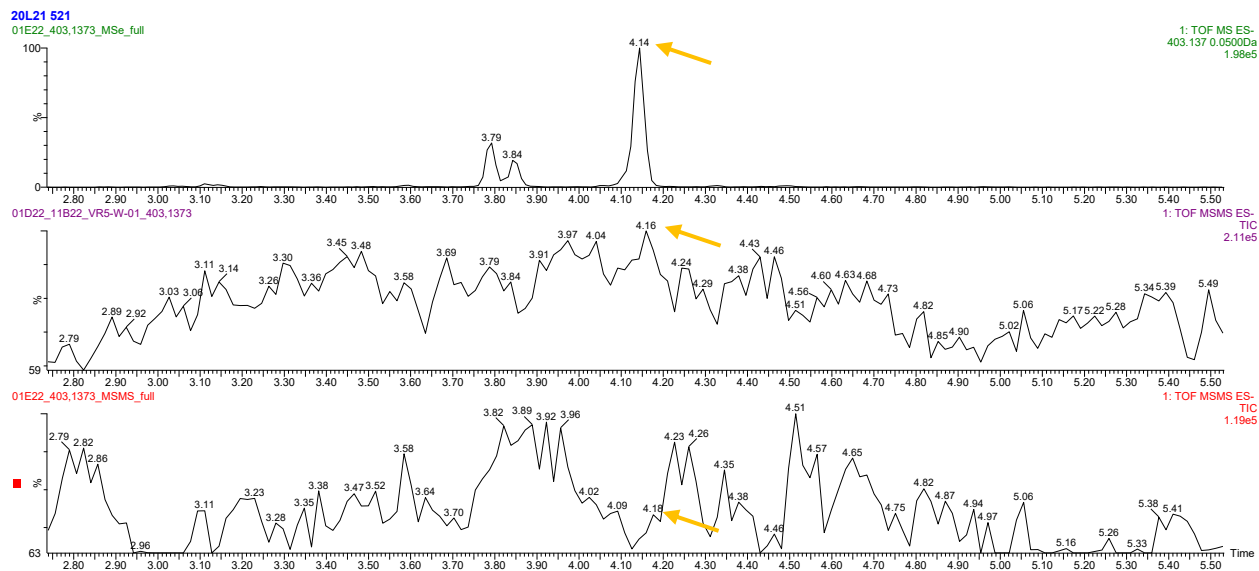
01E22_393.1521_MSMS_full



20L21 552
01E22_393.1521_MSMS_full 160 (2.722)



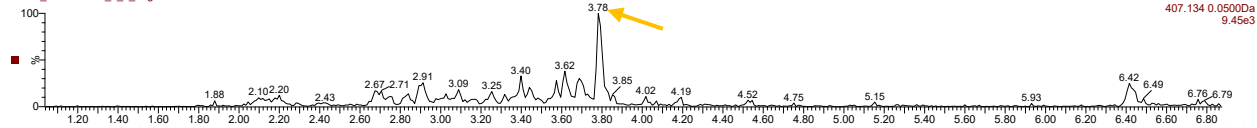
xix. 403.1373 m/z, 4.1563 min



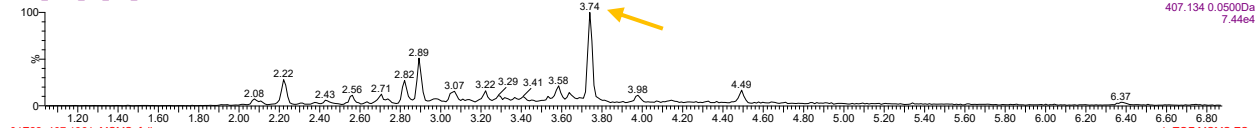
xx. 407.1340 m/z, 3.7913 min

Analyte type 5

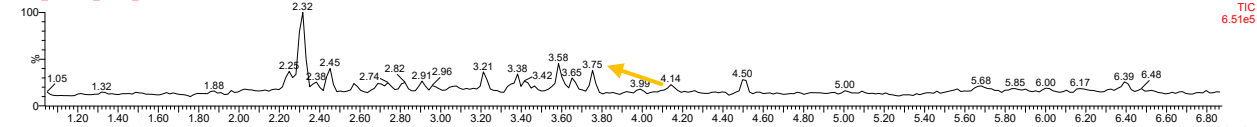
20L21_2020-03158_5_2_neg



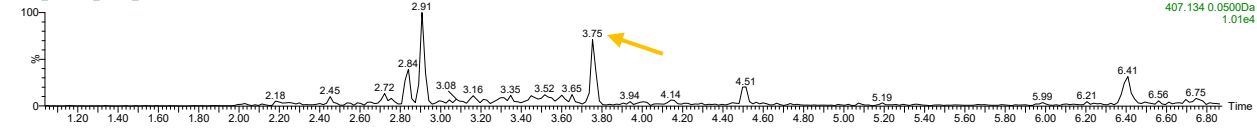
01E22_20L21_543_MS_e_full



01E22_407.1361_MSMS_full

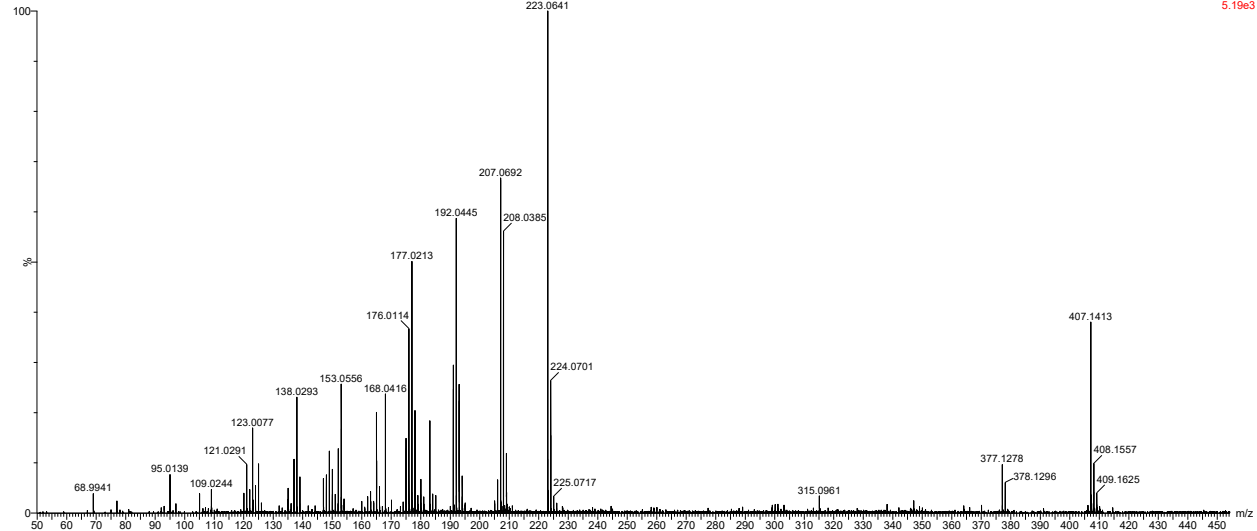


01E22_407.1361_MSMS_full



20L21 512

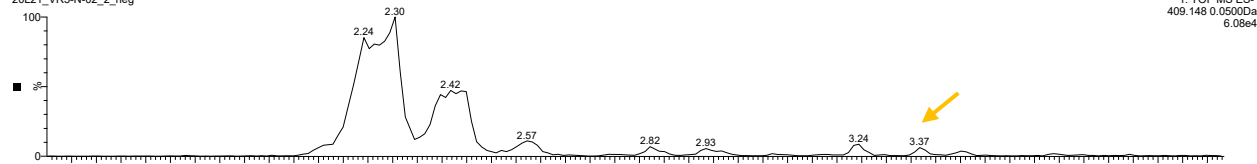
01E22_407.1361_MSMS_full 221 (3.753)



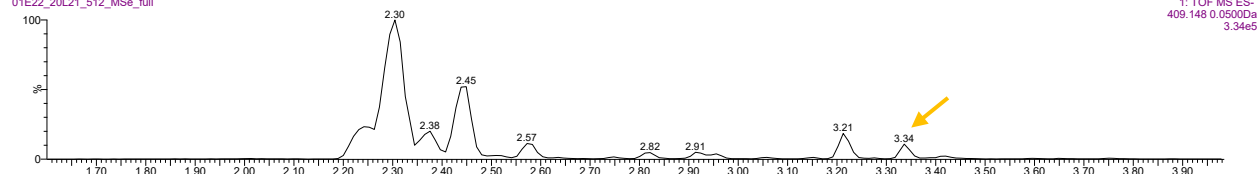
xxi. 407.1700 m/z, 3.8025 min

xxii. 409.1483 m/z, 3.3630 min

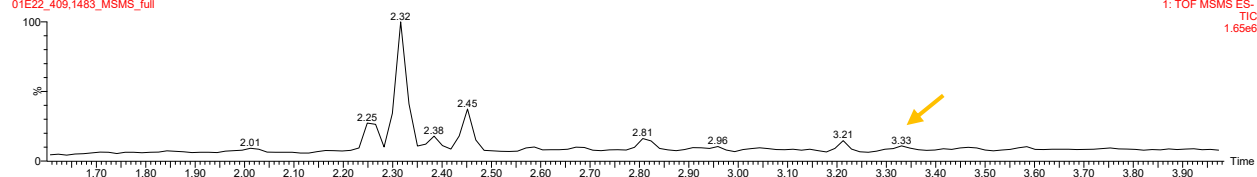
Analyte type 5
20L21_VRS-N-02_2_neg



01E22_20L21_512_MSe_full

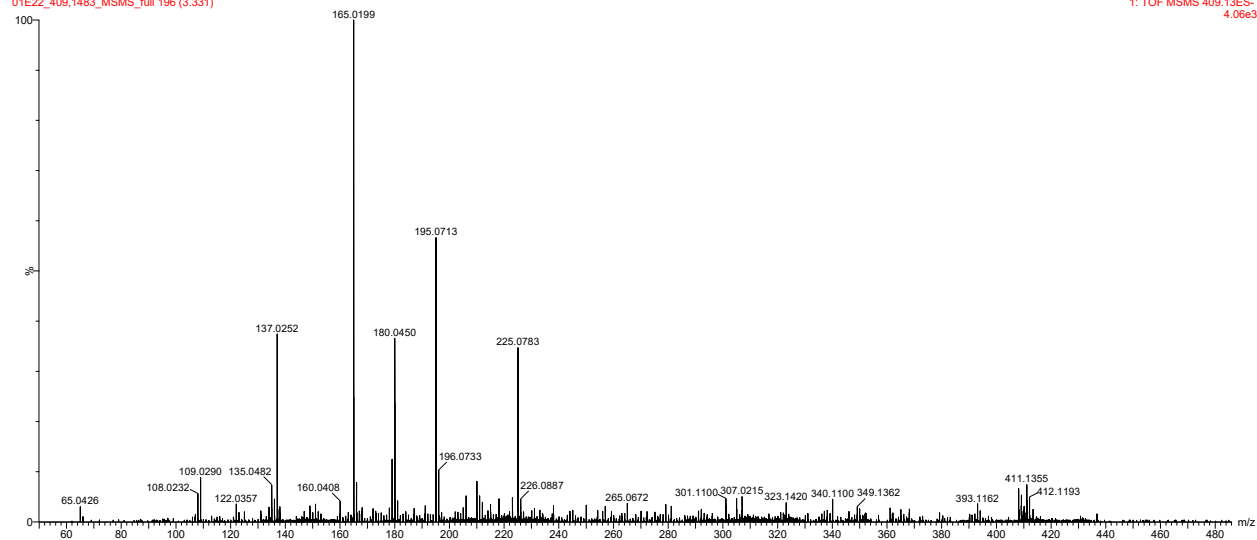


01E22_409_1483_MSMS_full



20L21 543

01E22_409_1483_MSMS_full 196 (3.331)

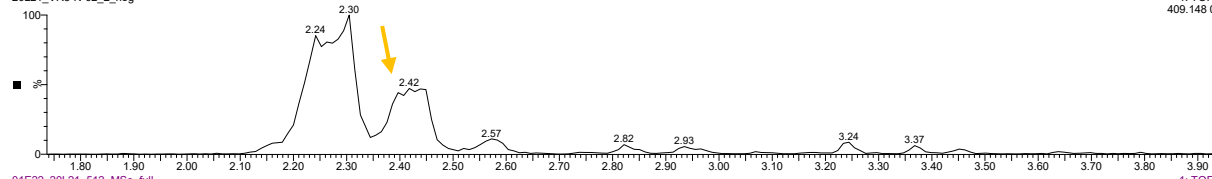


xxiii. 409.1485 m/z, 2.4131 min

Analyte type 5

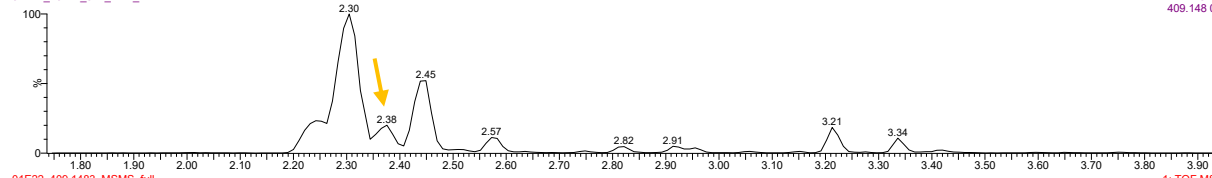
20L21_VR5-N-02_2_neg

1: TOF MS ES-
409.148 0.0500Da
6.08e4



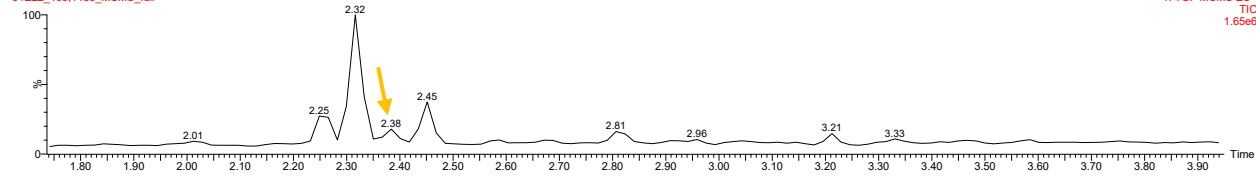
01E22_20L21_512_MSe_full

1: TOF MS ES-
409.148 0.0500Da
3.34e5



01E22_409.1483_MSMS_full

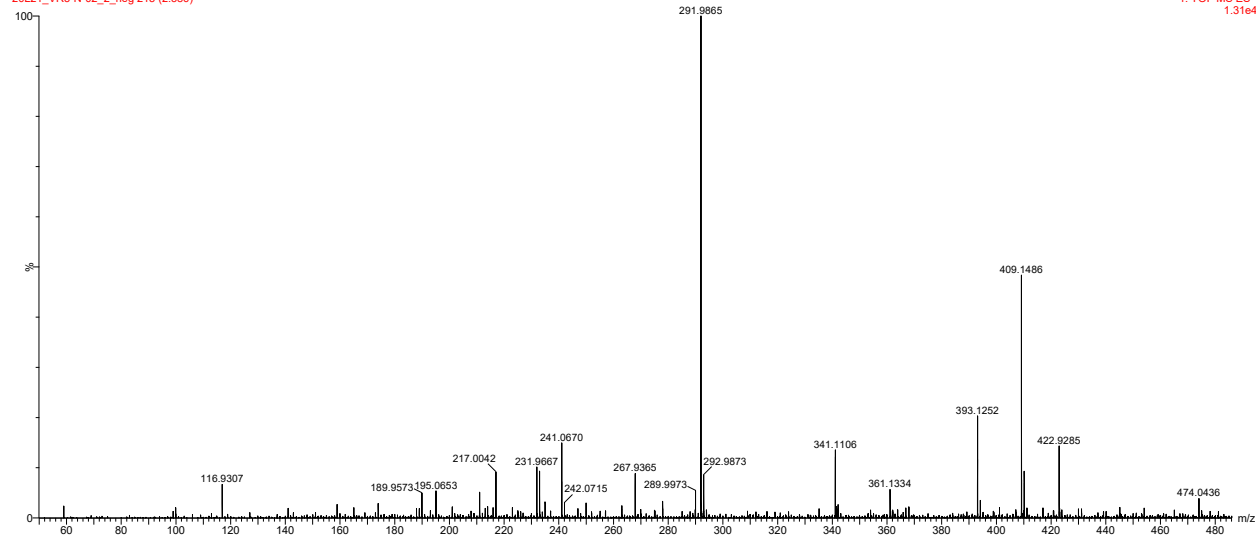
1: TOF MSMS ES-
TIC
1.65e6



Analyte type 5

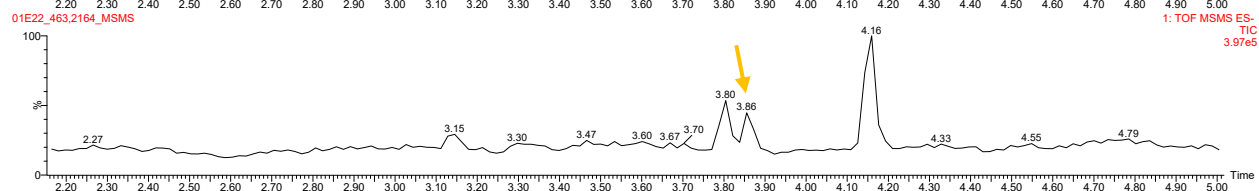
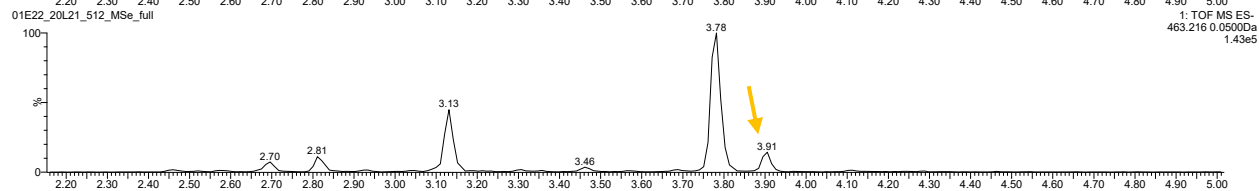
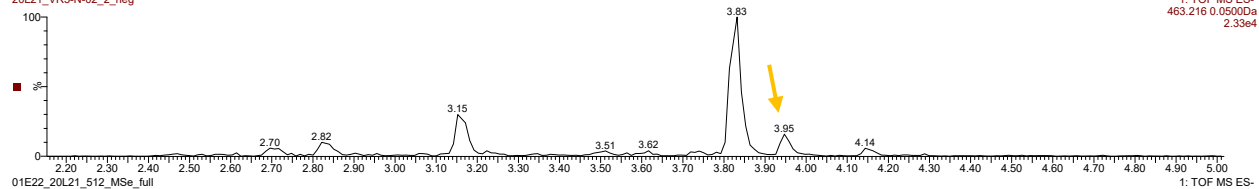
20L21_VR5-N-02_2_neg 215 (2.386)

1: TOF MS ES-
1.31e4

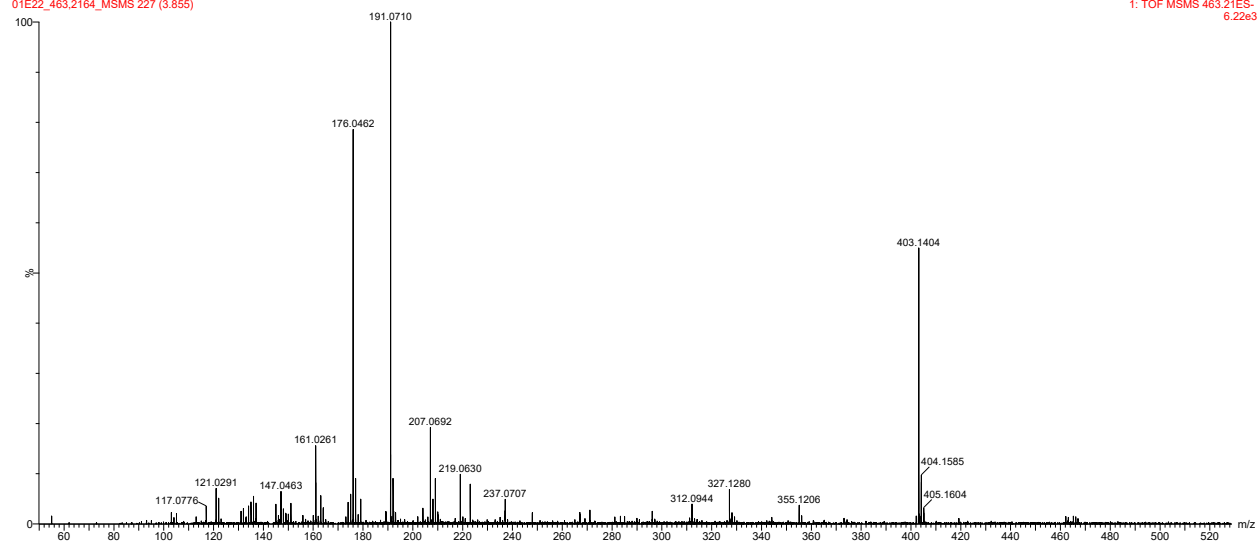


xxiv. 463.2164 m/z, 3.9425 min

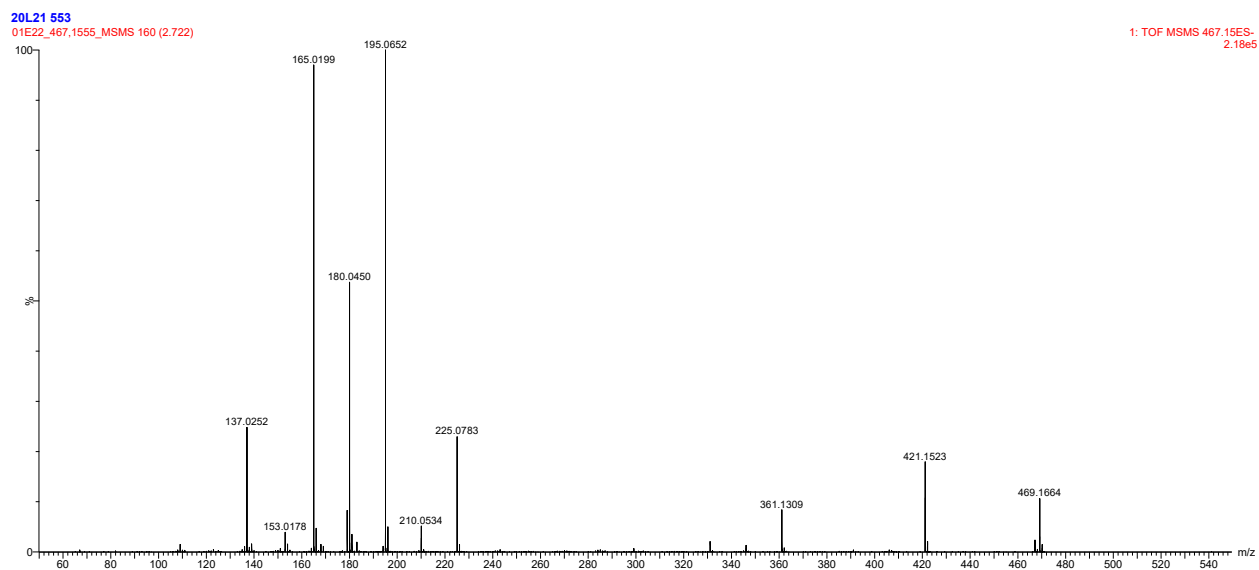
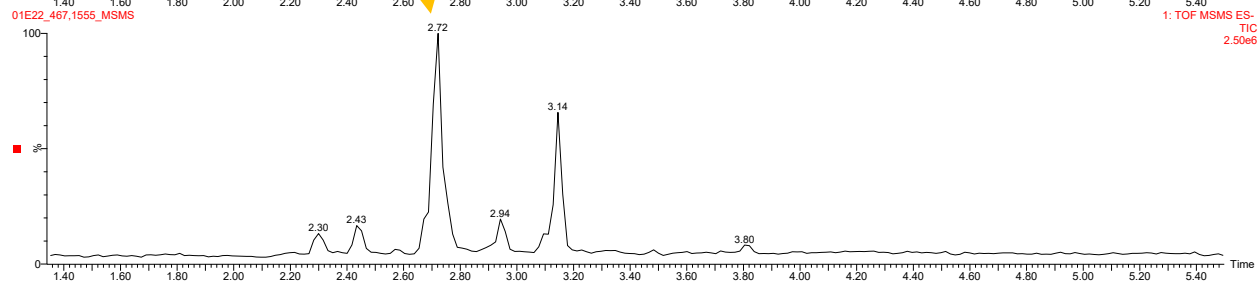
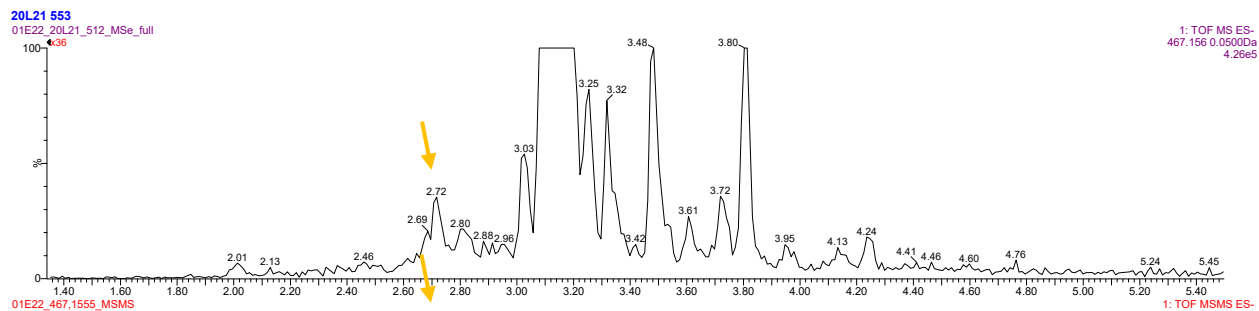
Analyte type 5
20L21_VRS-N-02_2_neg



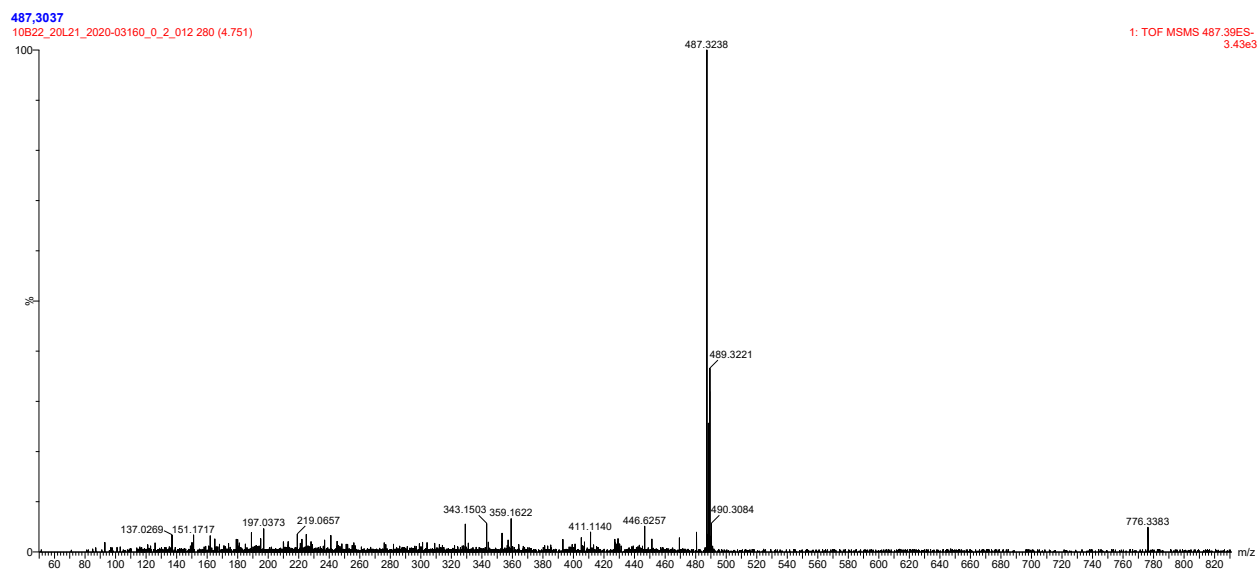
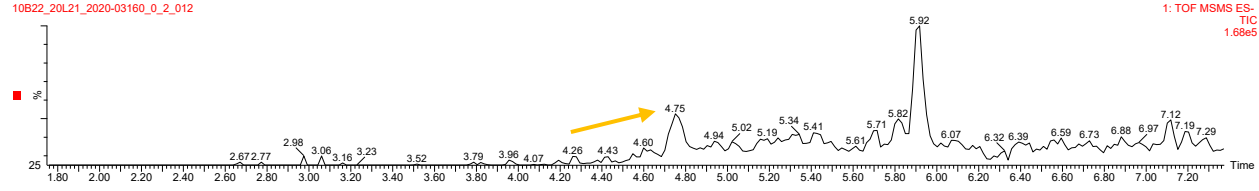
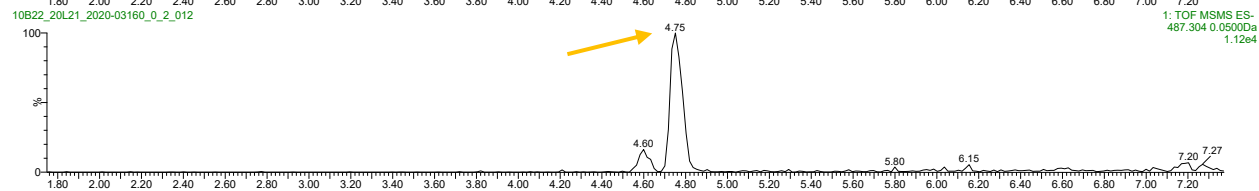
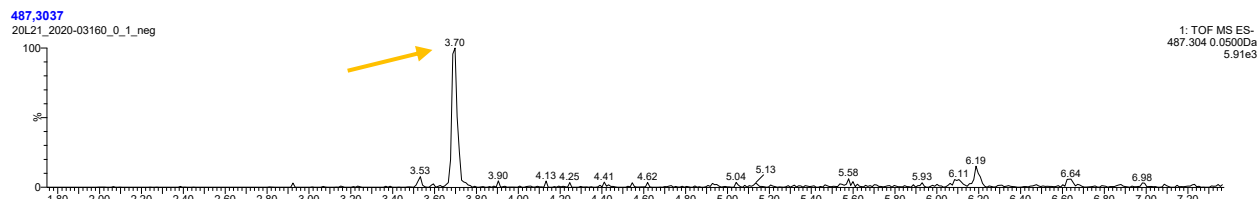
20L21 513
01E22_463.2164_MSMS 227 (3.855)



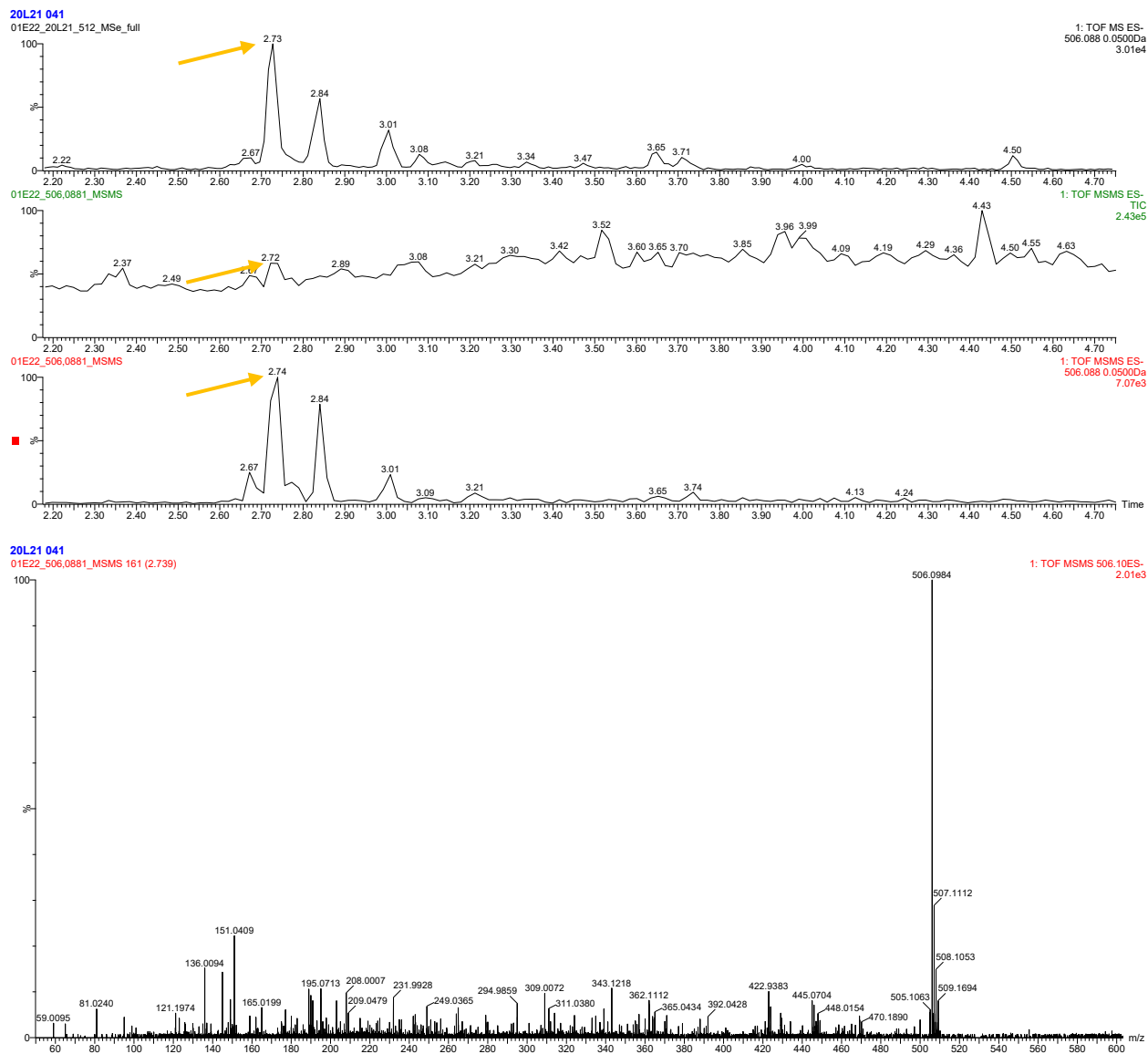
xxv. 467.1555 m/z, 2.7171 min



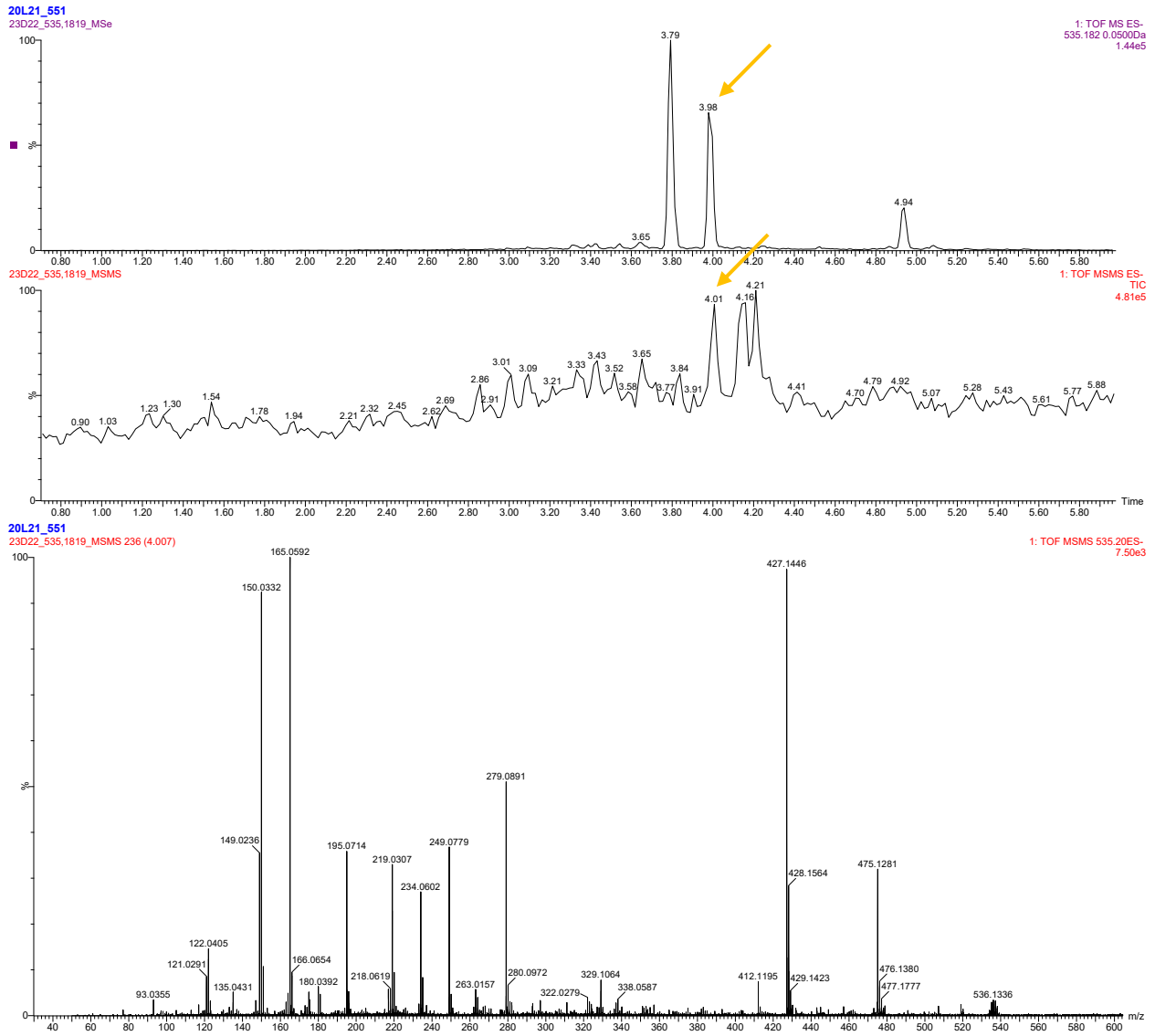
xxvi. 487.3037 m/z, 3.6924 min



xxvii. 506.0881 m/z, 2.7201 min



xxviii. 535.1819 m/z, 4.0009 min

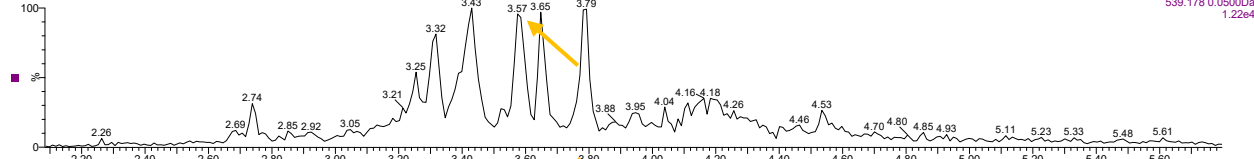


xxix. 539.1785 m/z, 3.6247 min

20L21_551

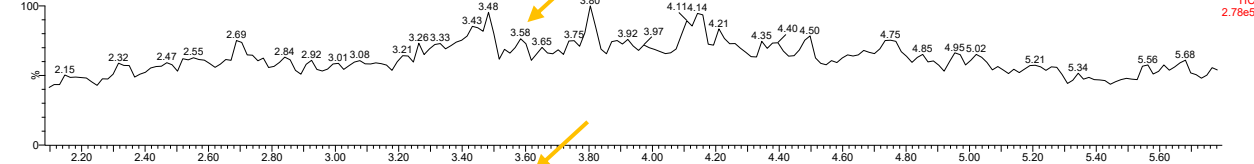
23D22_539.1785_MSse

1: TOF MS ES-
539.178 0.0500Da
1.22e4



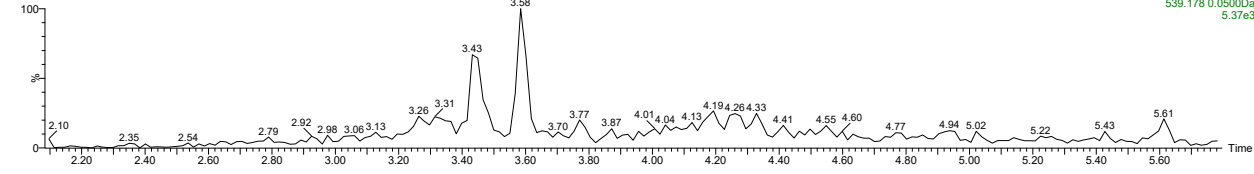
23D22_539.1785_MSMS

1: TOF MSMS ES-
TIC
2.78e5



23D22_539.1785_MSMS

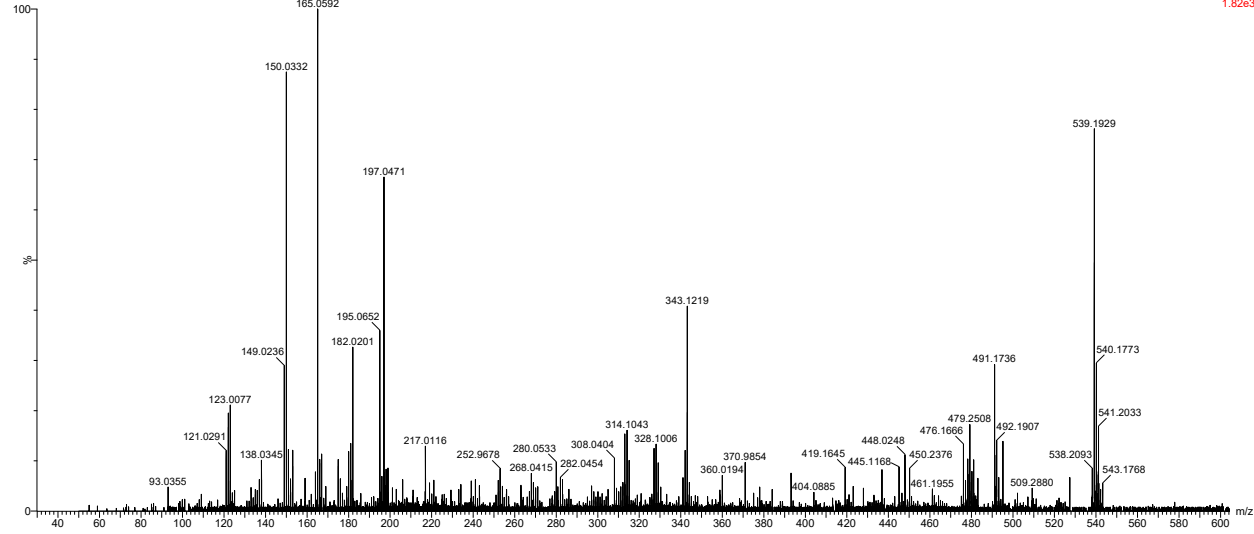
1: TOF MSMS ES-
539.178 0.0500Da
5.37e3



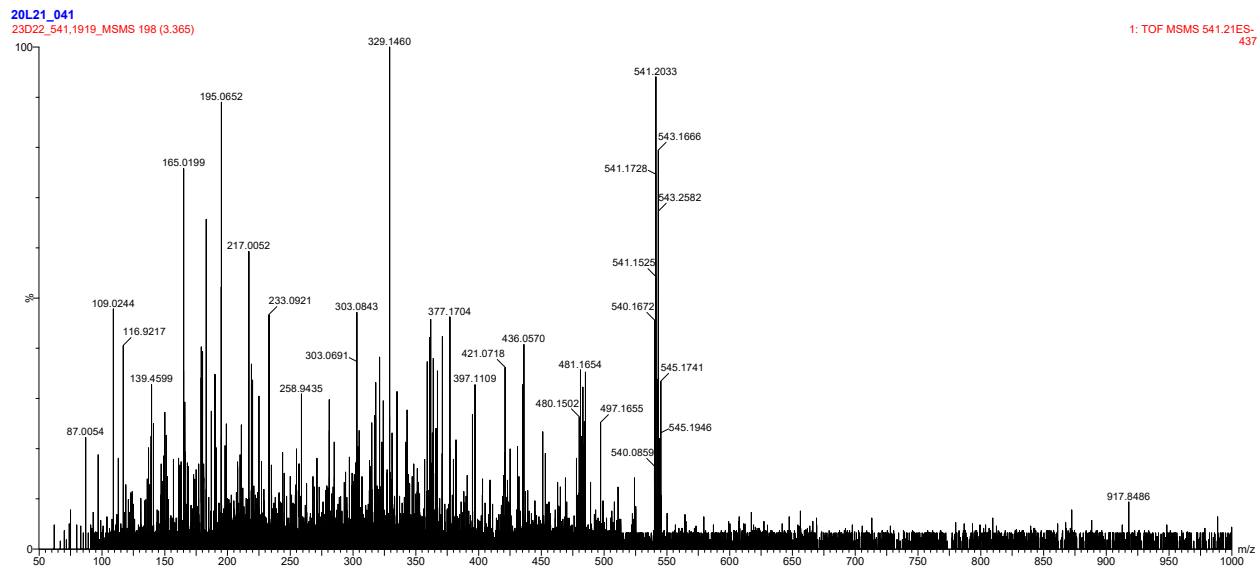
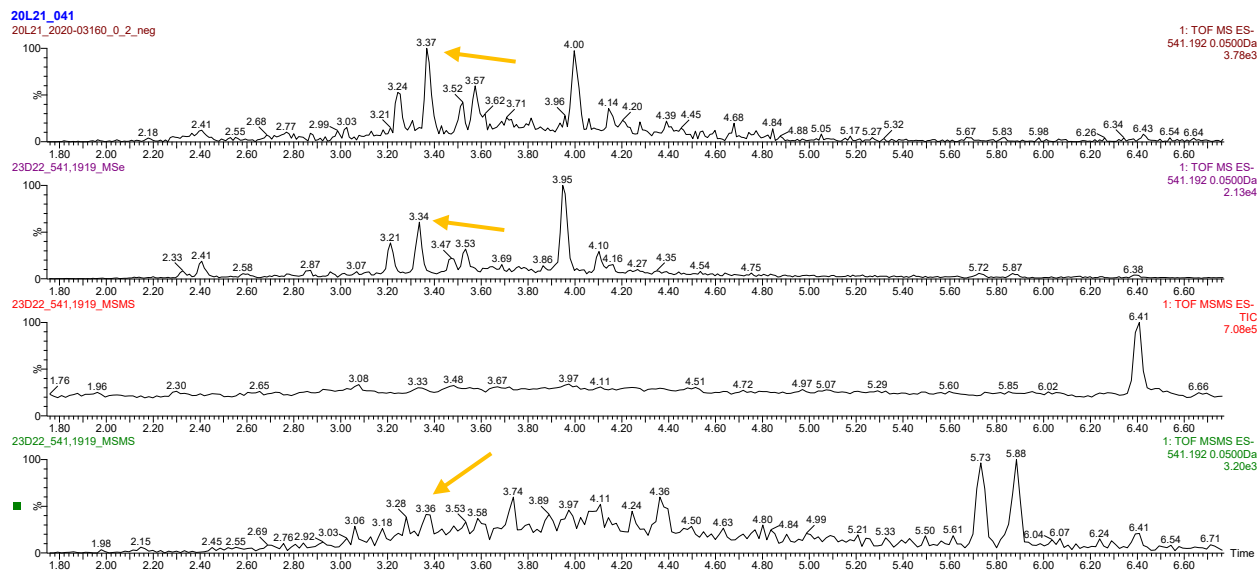
20L21_551

23D22_539.1785_MSMS 211 (3.584)

1: TOF MSMS 539.20ES-
1.82e3



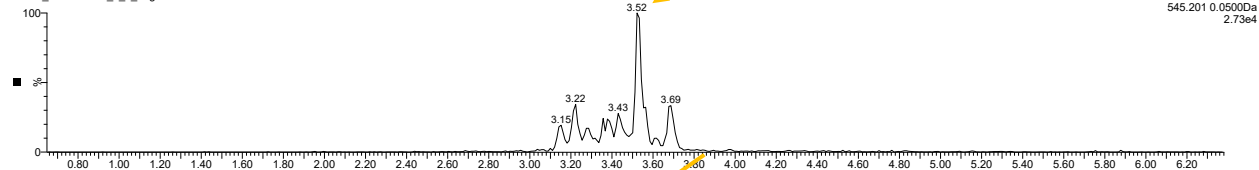
xxx. 541.1919 m/z, 3.3648 min



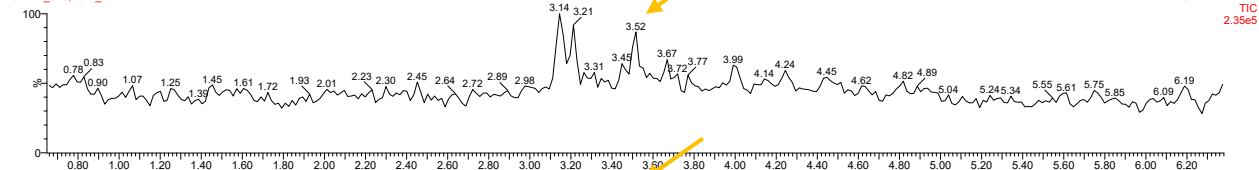
xxxi. 545.2011 m/z, 3.5305 min

Analyte type 5

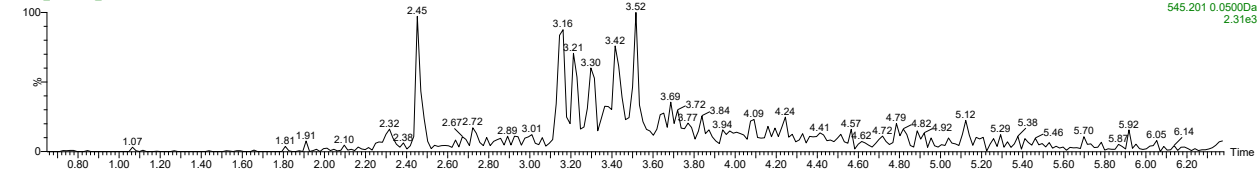
20L21_2020-03158_5_1_neg



01E22_545.2011_MSMS

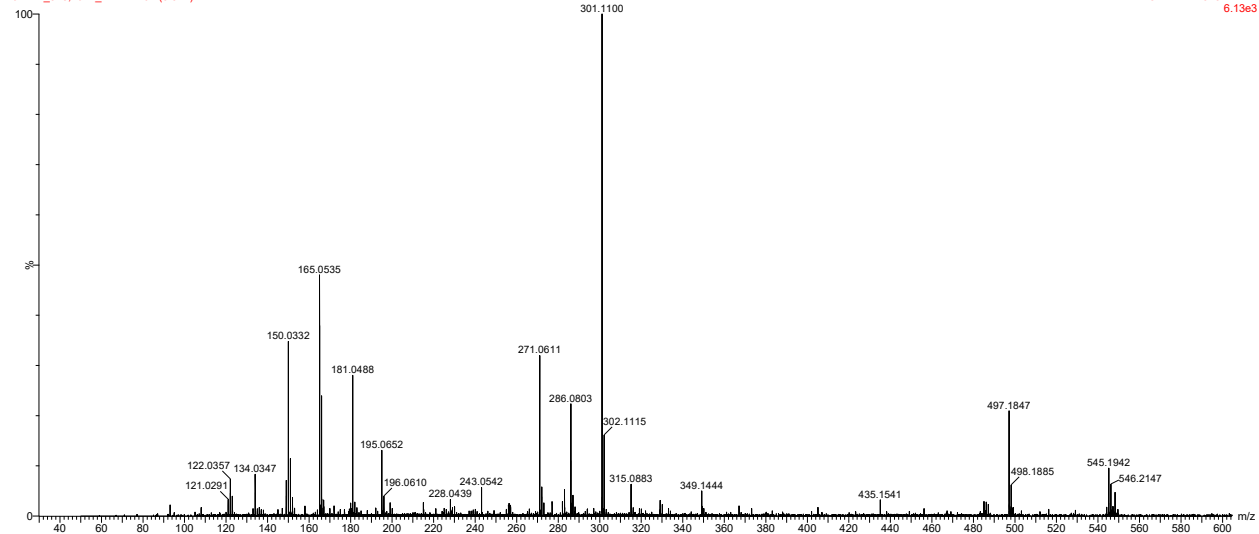


01E22_545.2011_MSMS

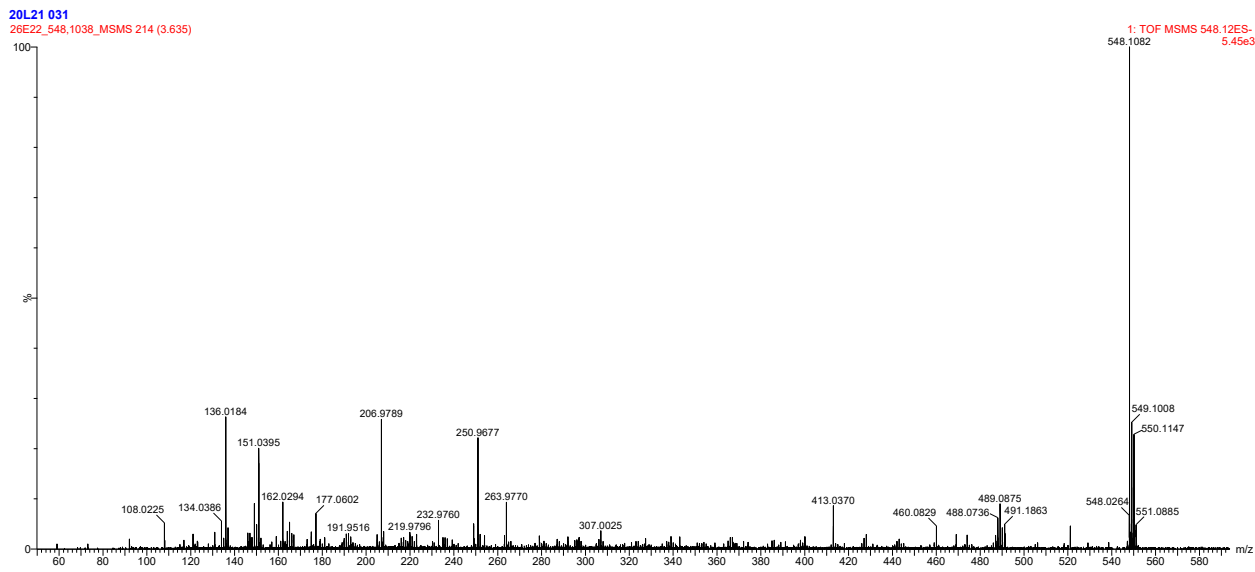
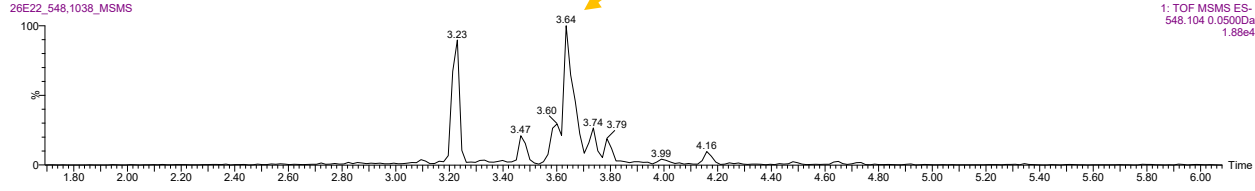
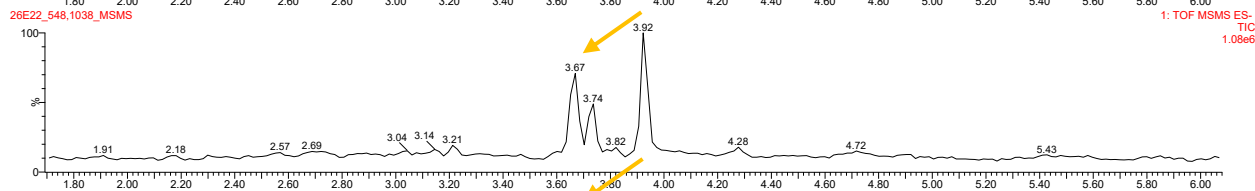
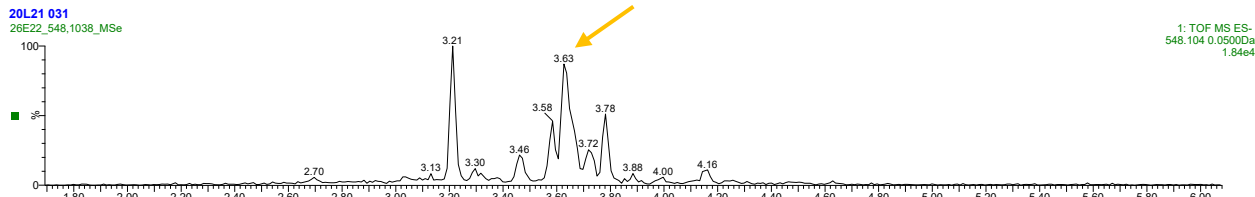


20L21 551

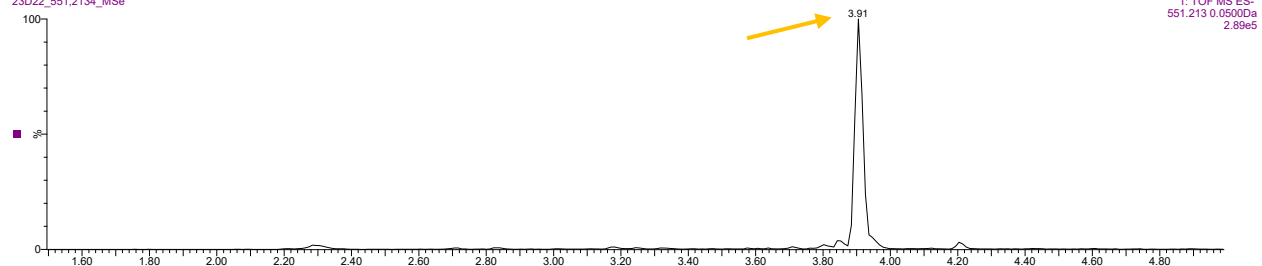
01E22_545.2011_MSMS 207 (3.517)



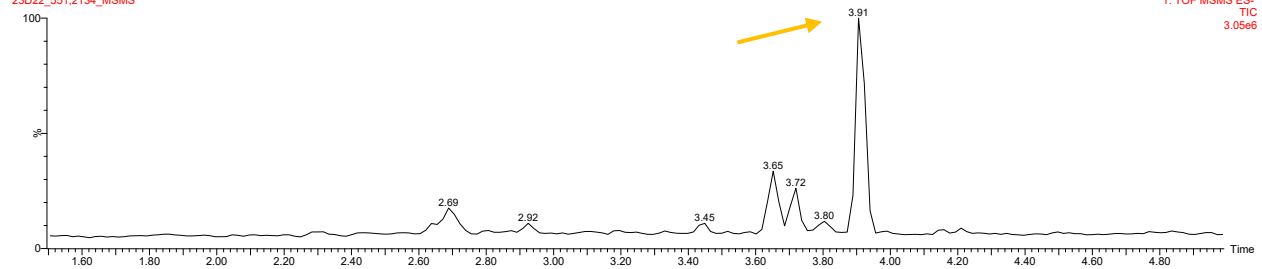
xxxii. 548.1038 m/z, 3.6573 min



xxxiii. 551.2134 m/z, 3.9396 mi

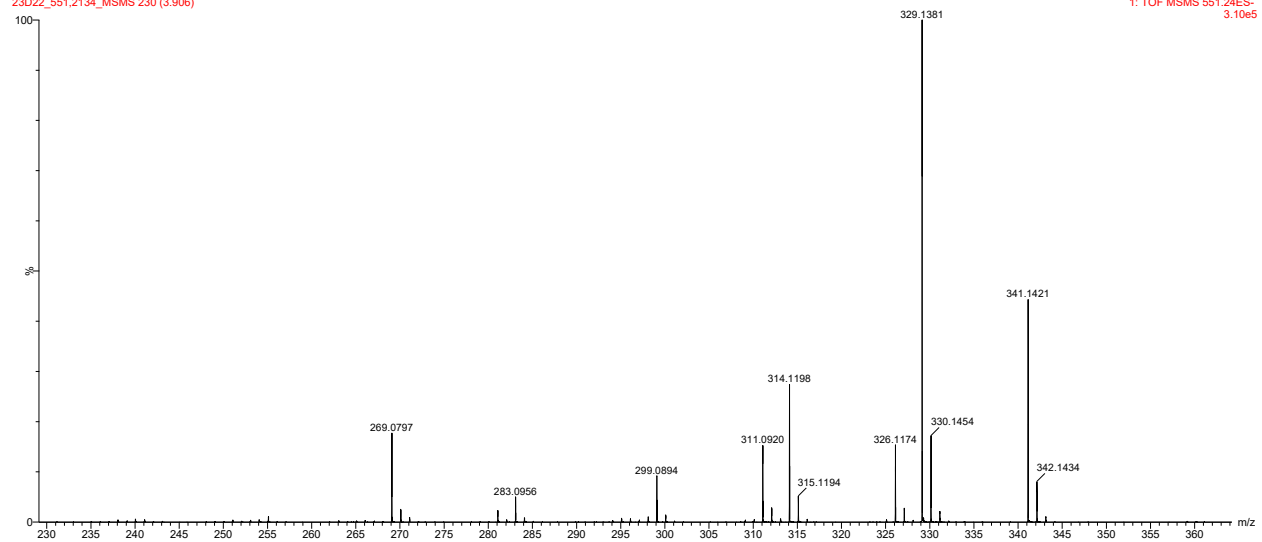
20L21_513
23D22_551.2134_MSe

23D22_551.2134_MSMS

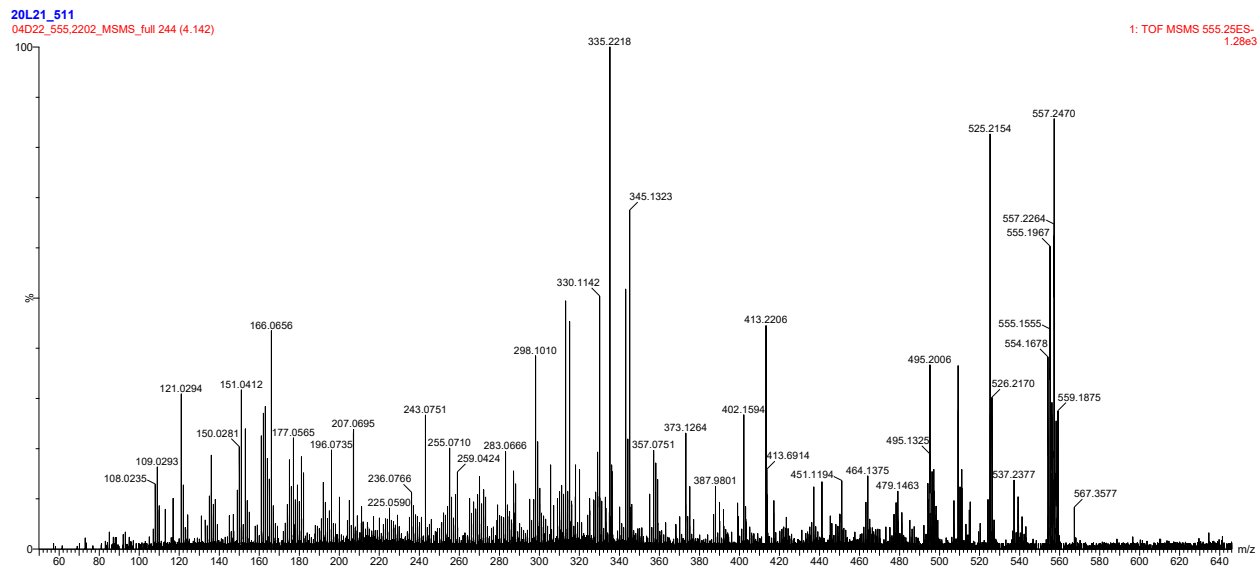
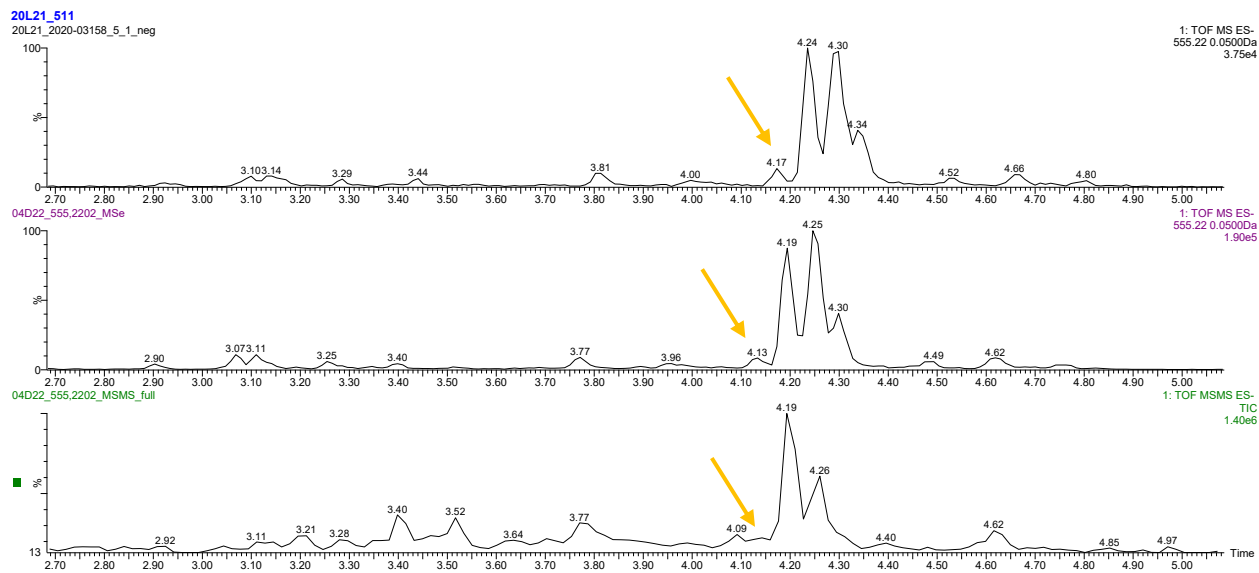


20L21_513

23D22_551.2134_MSMS 230 (3.906)



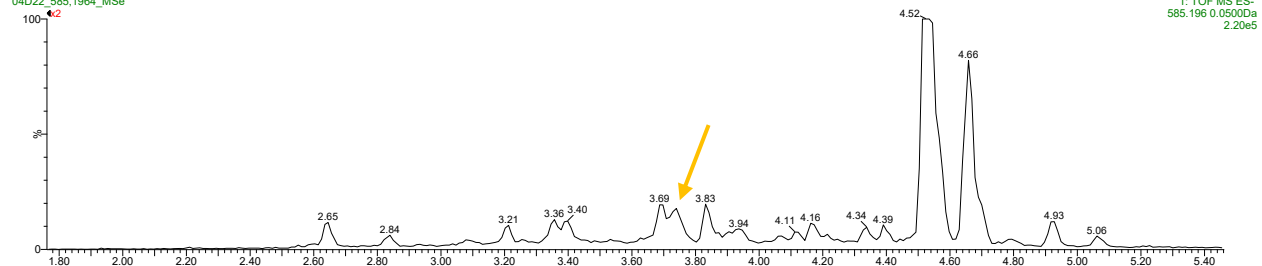
xxxiv. 555.2202 m/z, 4.1775 min



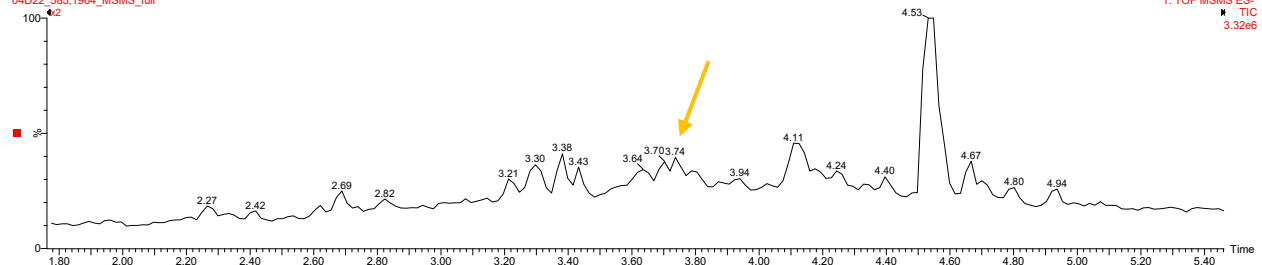
xxxv. 585.1964 m/z, 3.7525 min

20L21_541

04D22_585.1964_MSe

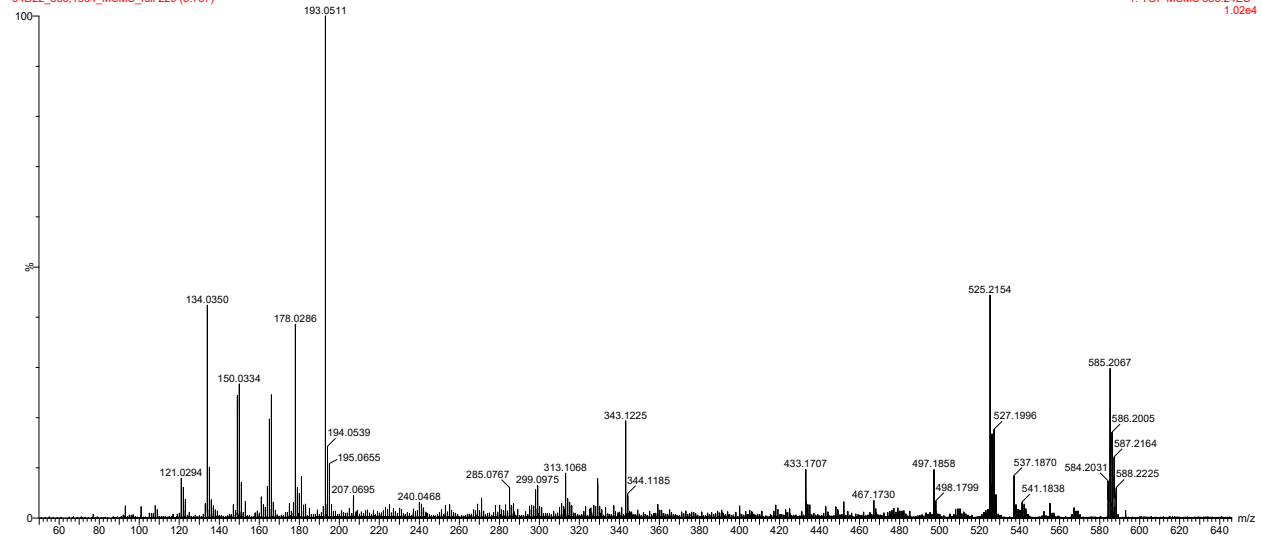


04D22_585.1964_MSMS_full



20L21_541

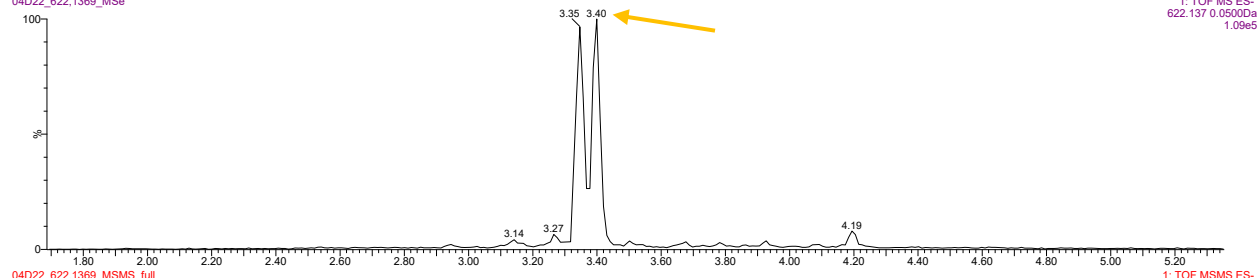
04D22_585.1964_MSMS_full 220 (3.737)



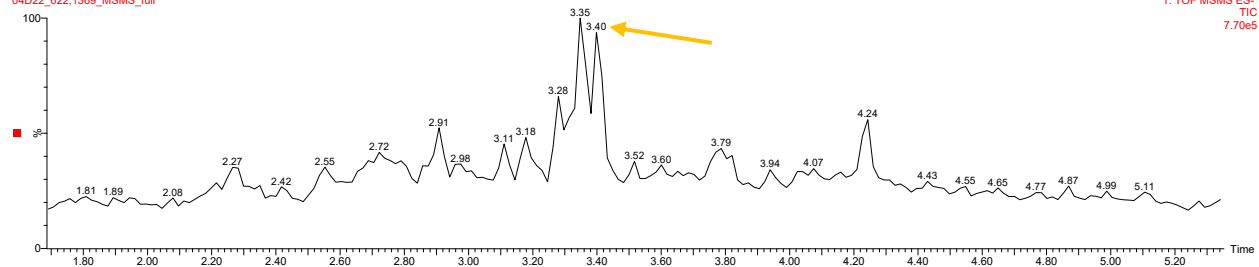
xxxvi. 622.1369 m/z, 3.4178 min

20L21_511

04D22_622.1369_MSe

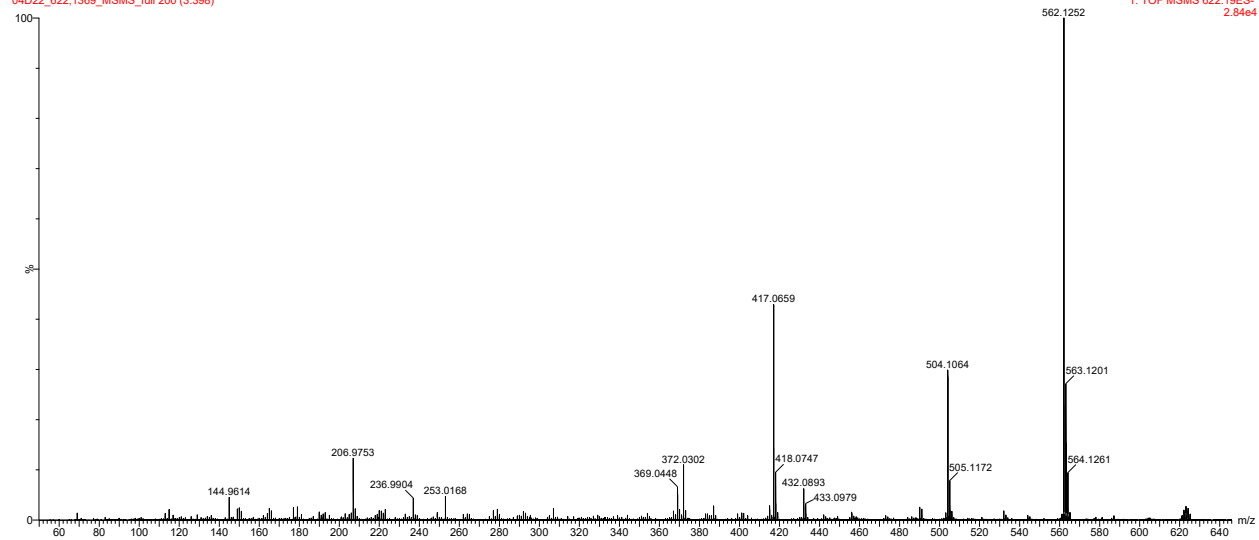


04D22_622.1369_MSMS_full



20L21_511

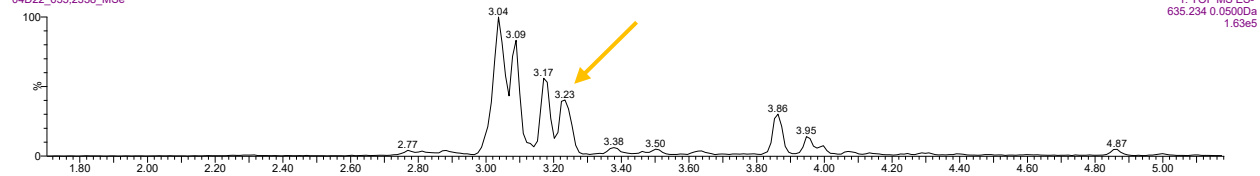
04D22_622.1369_MSMS_full 200 (3.398)



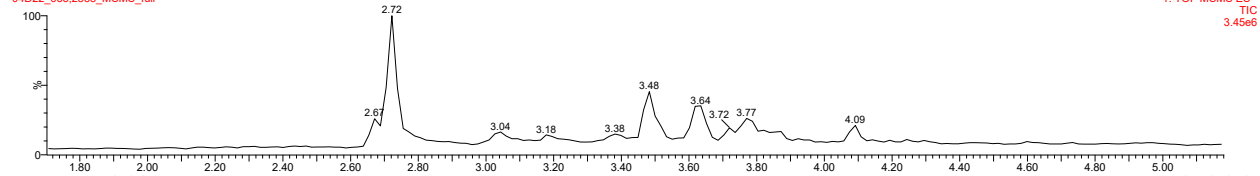
xxxvii. 635.2338 m/z, 3.2558

20L21_551

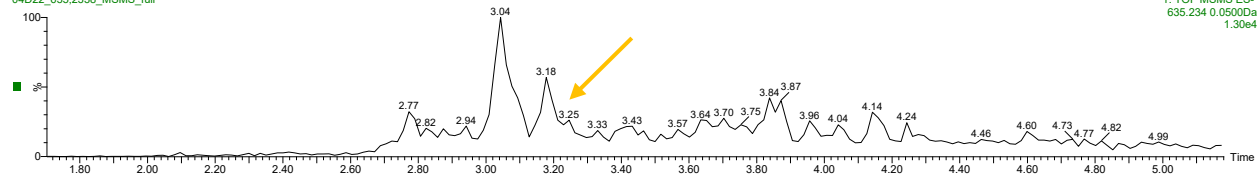
04D22_635.2338_MSe



04D22_635.2338_MSMS_full

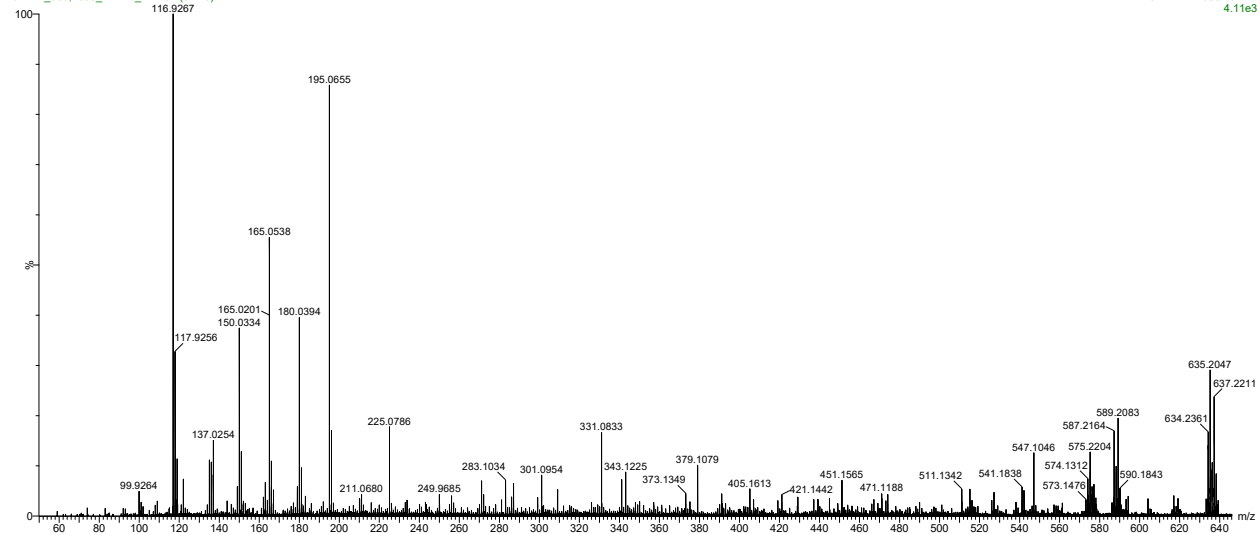


04D22_635.2338_MSMS_full



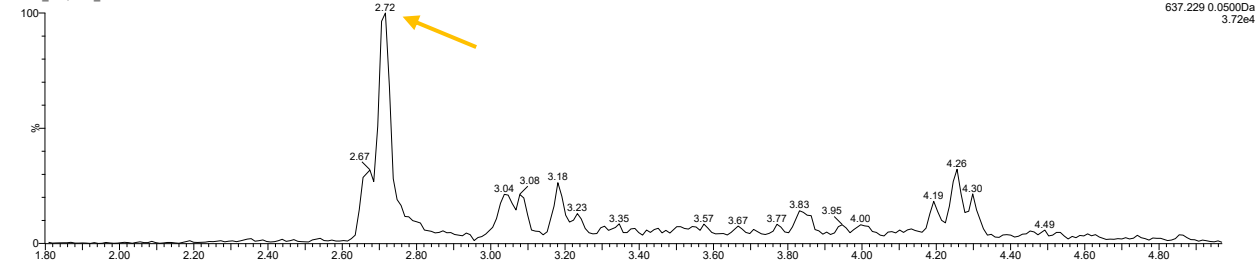
20L21_551

04D22_635.2338_MSMS_full 191 (3.246)

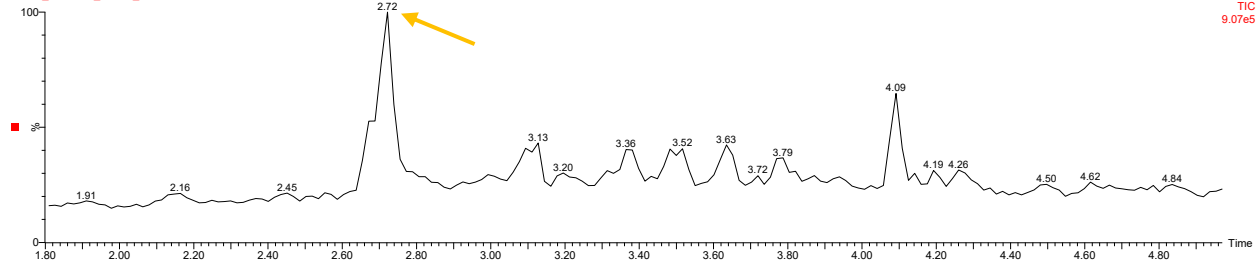


xxxviii. 637.2288 m/z, 2.7339 min

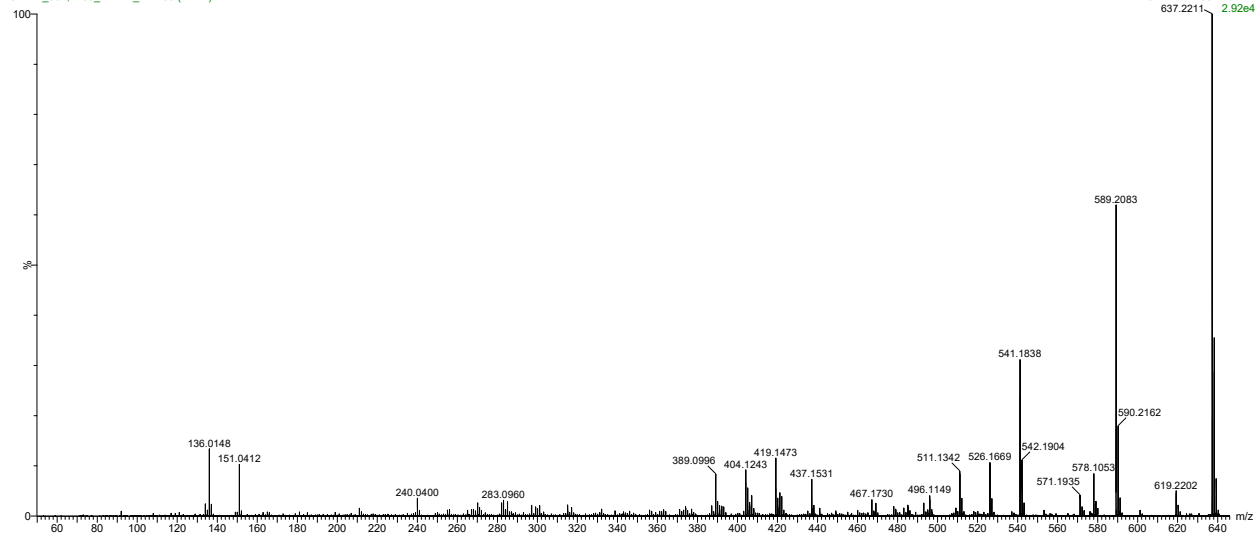
20L21_053
04D22_637.2288_MSe



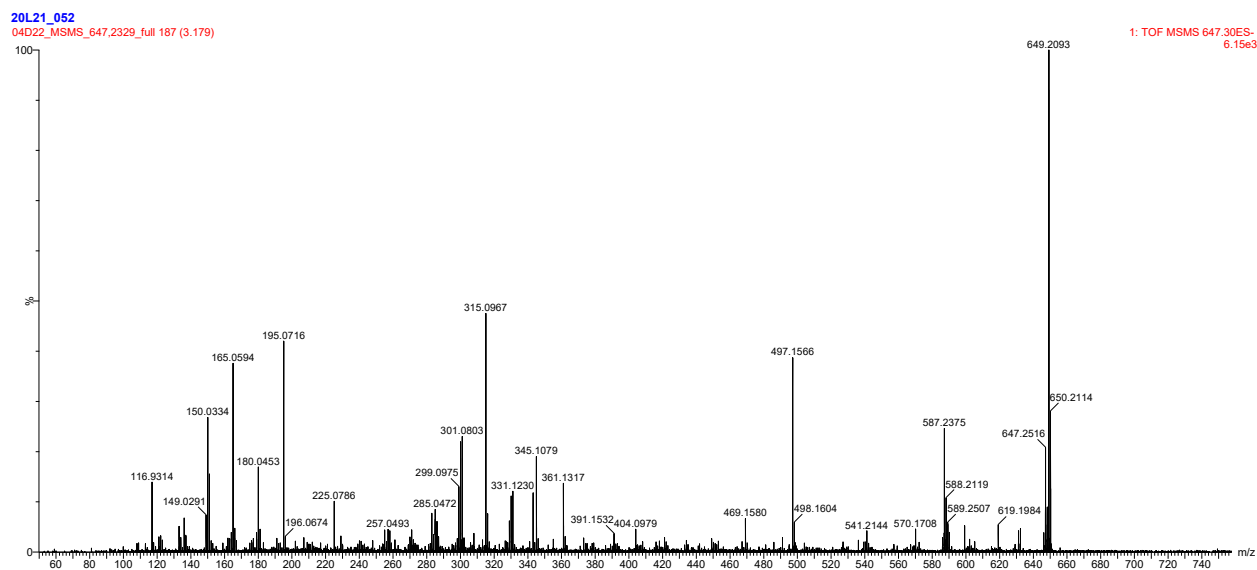
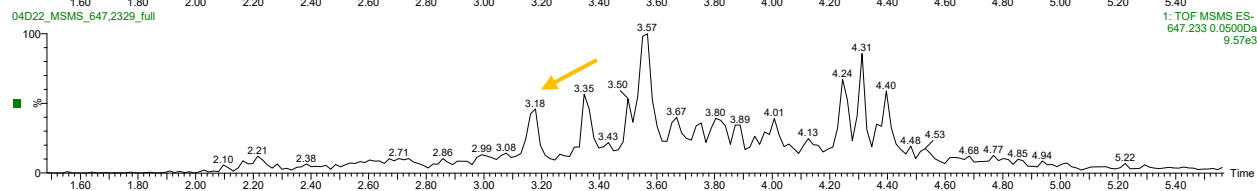
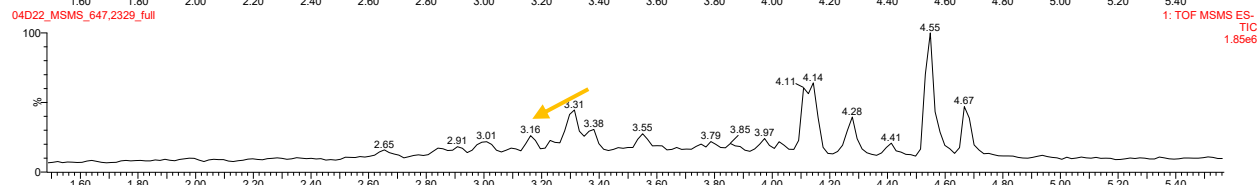
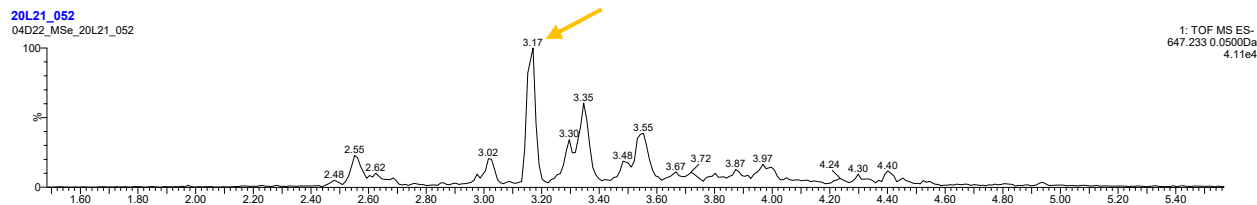
04D22_637.2288_MSMS_full



20L21_053
04D22_637.2288_MSMS_full 160 (2.722)



xxxix. 647.2329 m/z, 3.1835 min

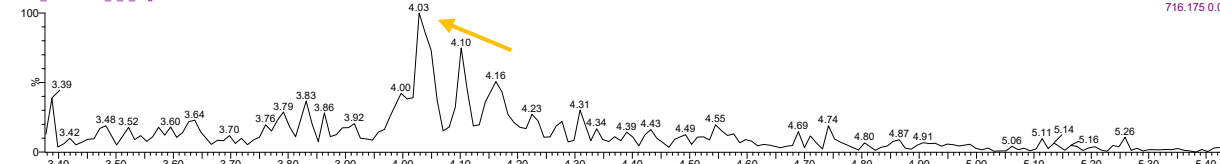


xl. 716.1752 m/z, 4.0297 min

20L21_512

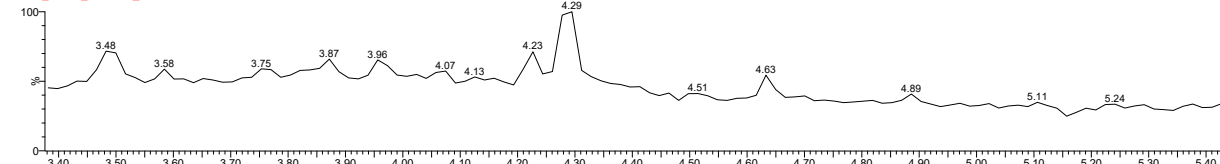
20L21_2020-03158_5_3_neg

1: TOF MS ES-
716.175 0.0500Da
2.13e3



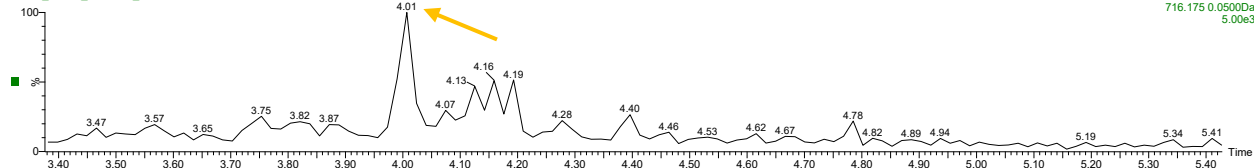
04D22_MSMS_716.1752_full

1: TOF MSMS ES-
TIC
5.62e5



04D22_MSMS_716.1752_full

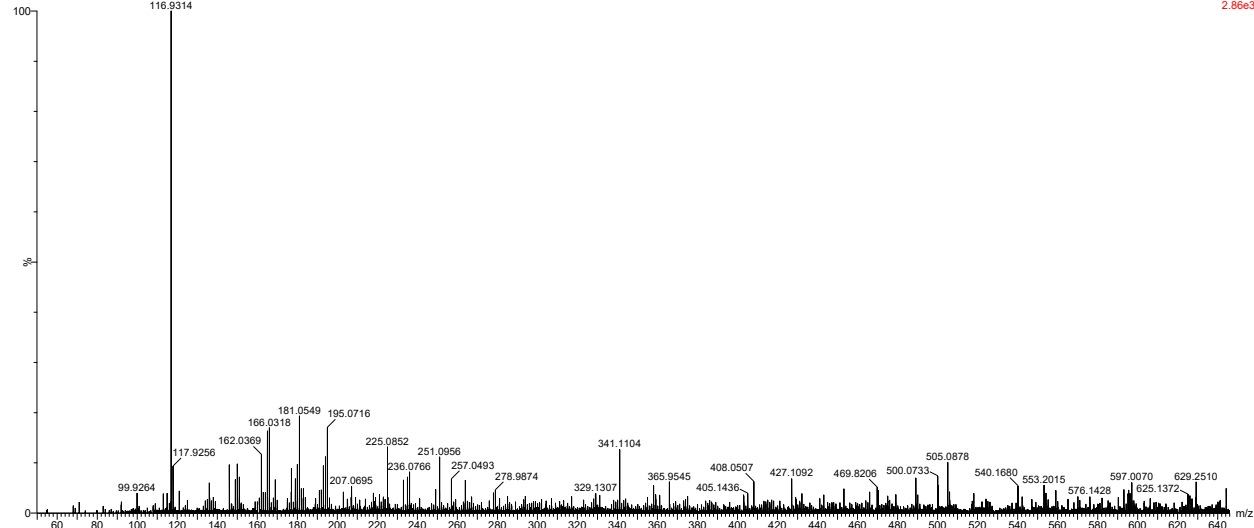
1: TOF MSMS ES-
716.175 0.0500Da
5.00e3



20L21_512

04D22_MSMS_716.1752_full 236 (4.007)

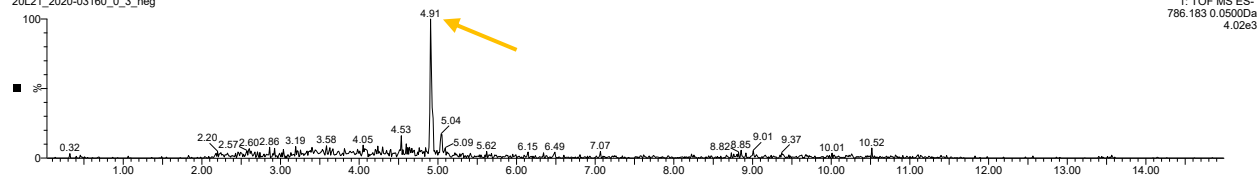
1: TOF MSMS 716.26ES-
2.86e3



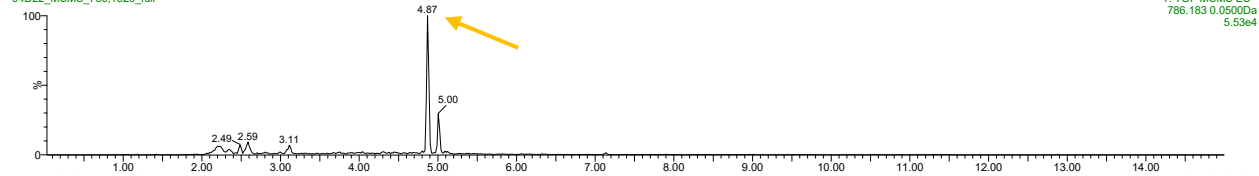
xli. 786.1826 m/z, 4.9041 min

Analyte type 0

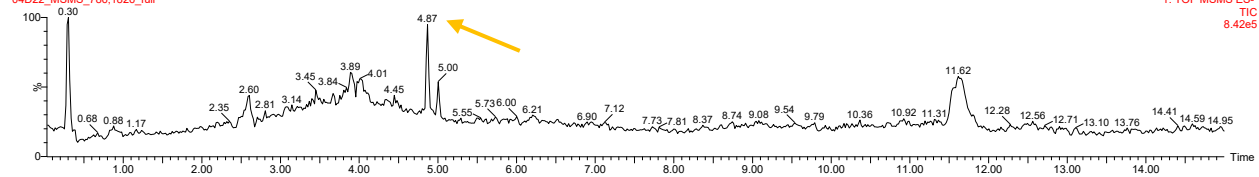
20L21_2020-03160_0_3_neg



04D22_MSMS_786.1826_full

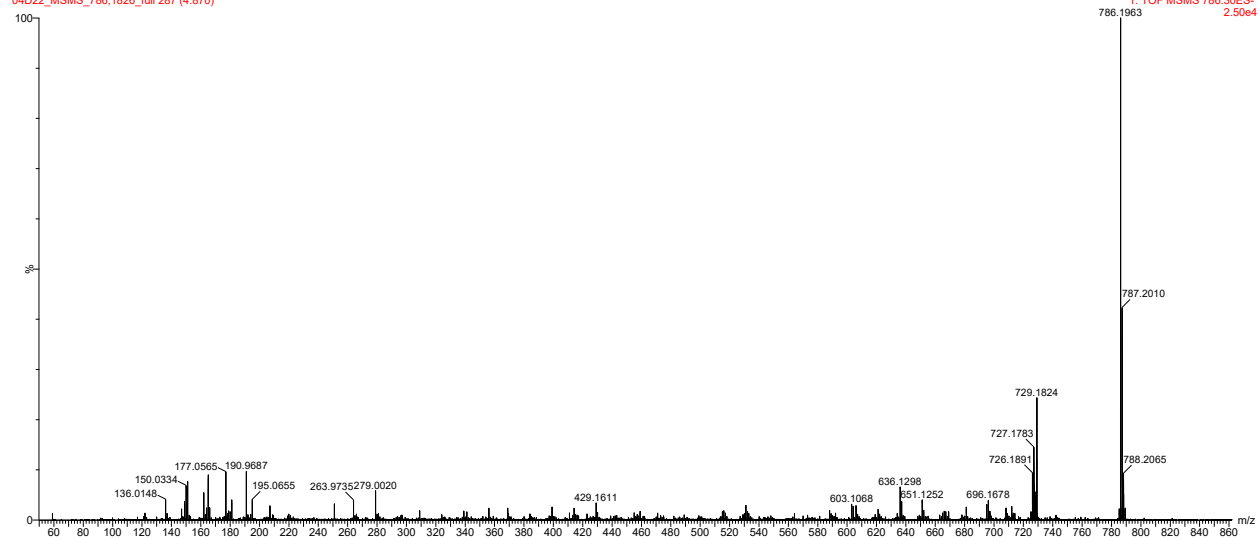


04D22_MSMS_786.1826_full



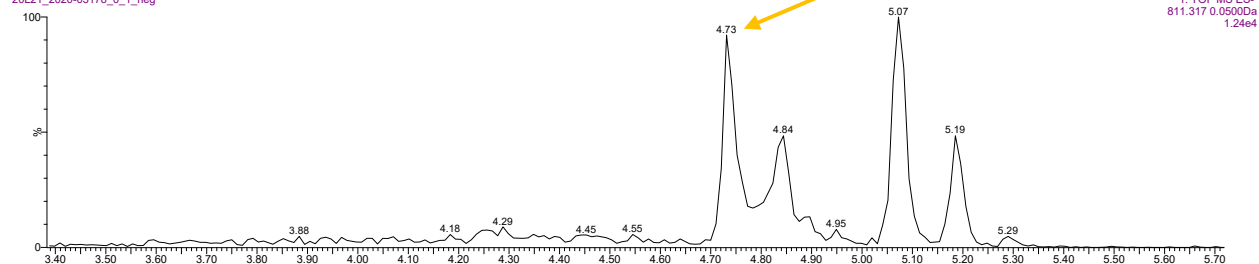
20L21_521

04D22_MSMS_786.1826_full 287 (4.870)

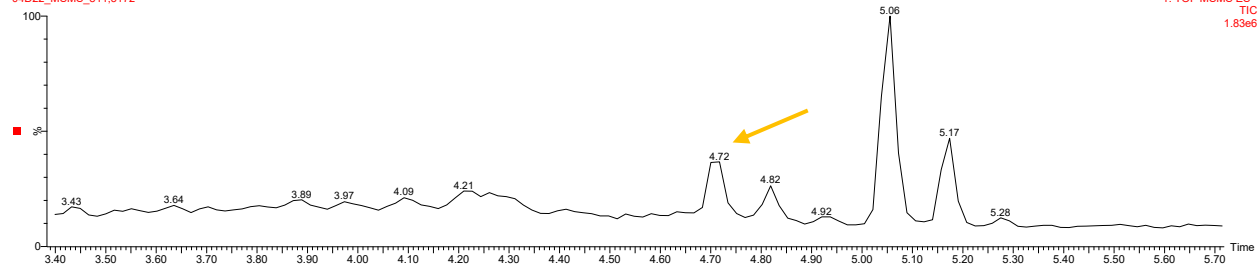


xlii. 811.3172 m/z, 4.7377 min

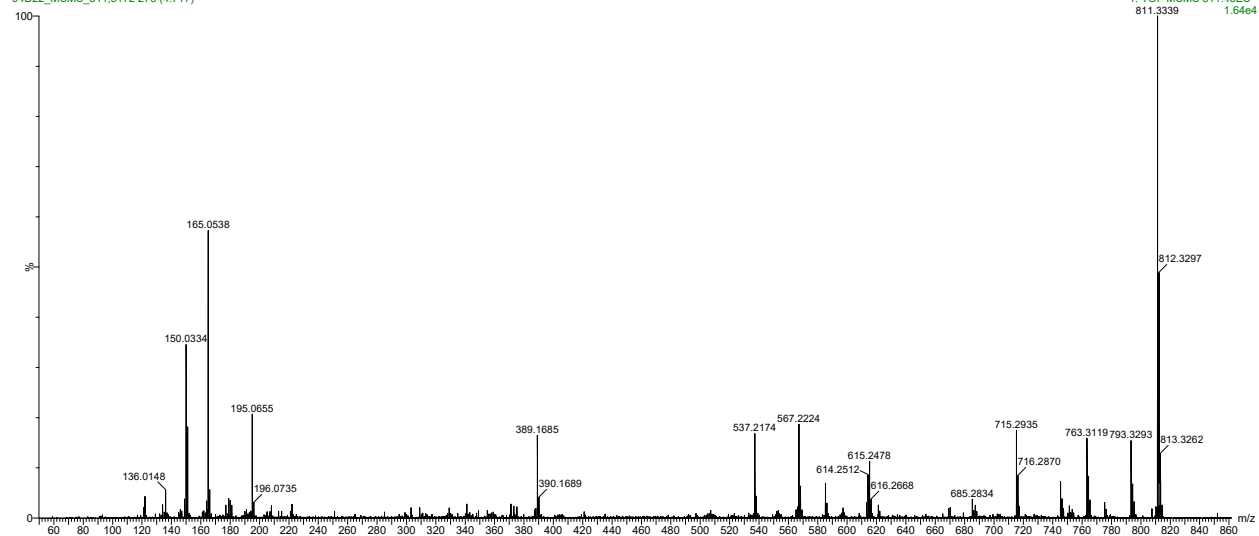
20L21_032
20L21_2020-03176_0_1_neg



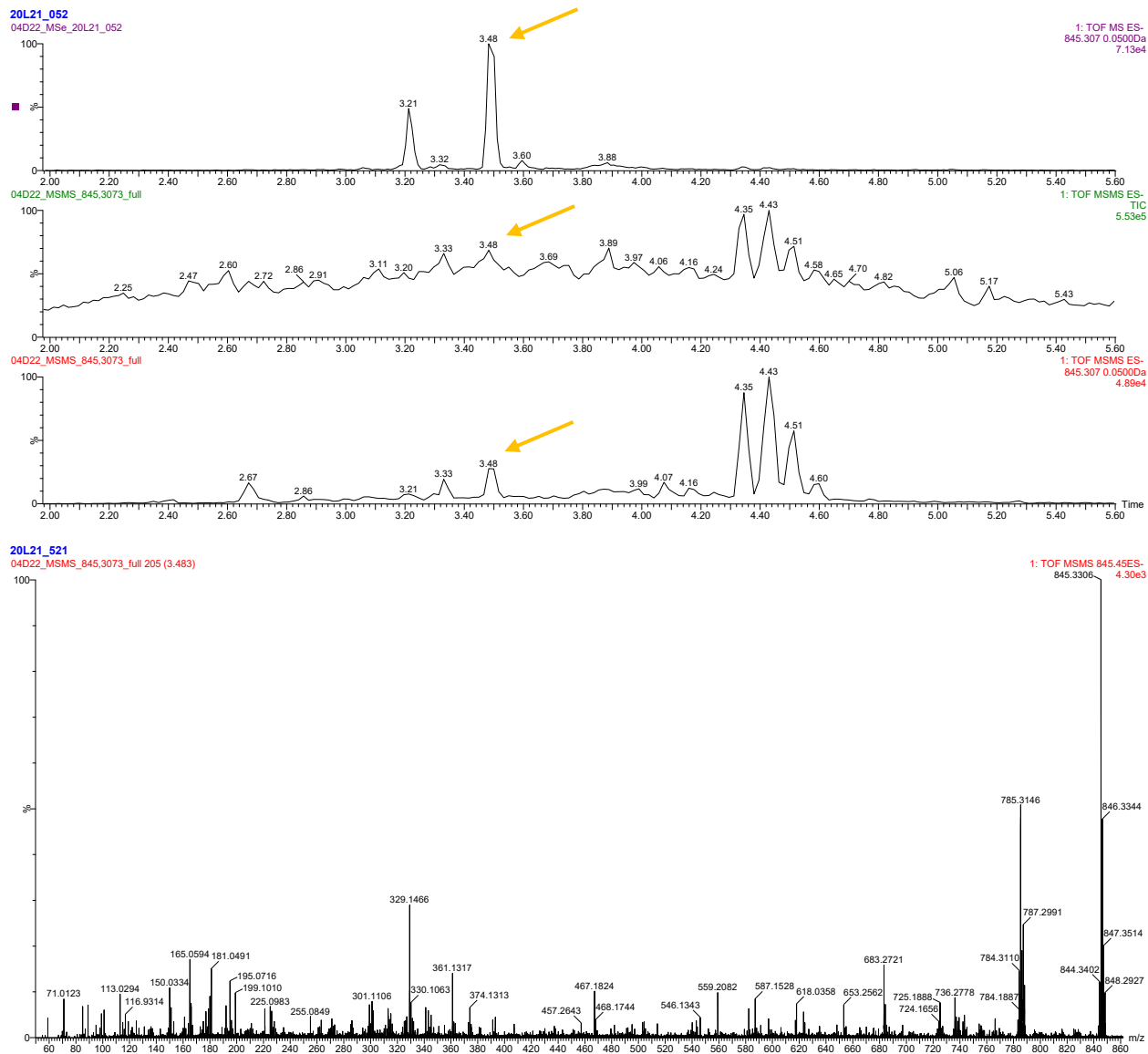
04D22_MSMS_811.3172



20L21_032
04D22_MSMS_811.3172.278 (4.717)



xliv. 845.3073 m/z, 3.5285 min



b. Spectre de mass et chromatographie des composés candidats testés**i. Oxypurinol ($[M-H]^- = 151,0261494$ m/z)**

Std diluted in MeOH

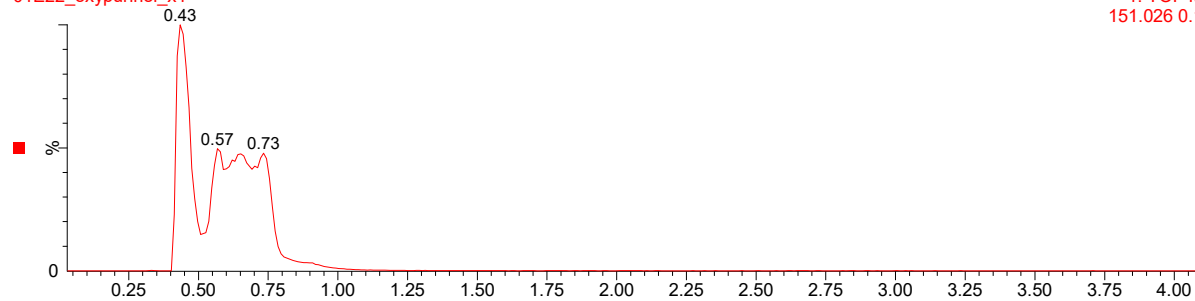
01-May-2022 13:15:34

01E22_oxypurinol_x1

1: TOF MS ES-

151.026 0.1000Da

1.70e6

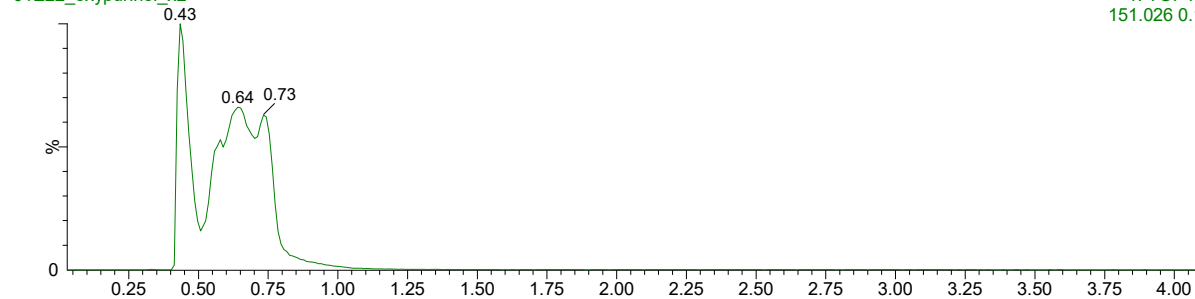


01E22_oxypurinol_x2

1: TOF MS ES-

151.026 0.1000Da

1.73e6

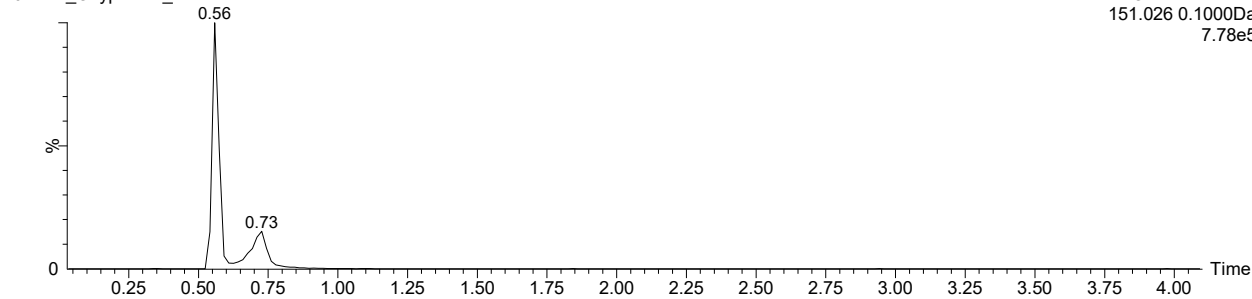


01D22_Oxypurinol_MSMS

1: TOF MSMS ES-

151.026 0.1000Da

7.78e5



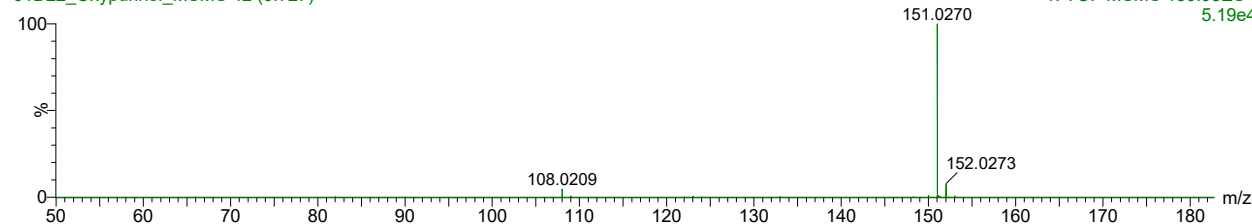
151,026149

01-Apr-2022 15:36:13

01D22_Oxypurinol_MSMS 42 (0.727)

1: TOF MSMS 150.95ES-

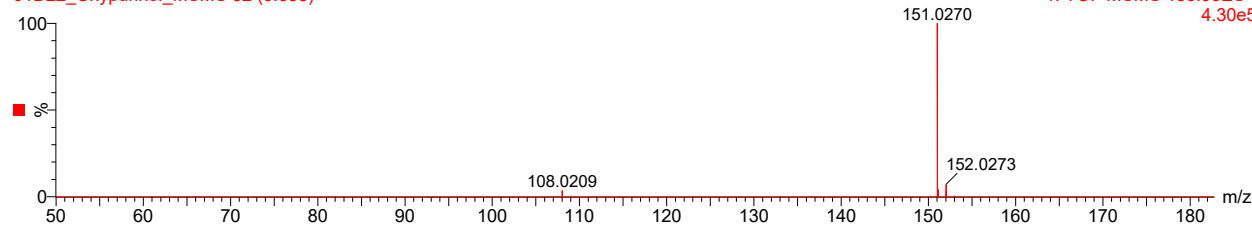
5.19e4



01D22_Oxypurinol_MSMS 32 (0.558)

1: TOF MSMS 150.95ES-

4.30e5



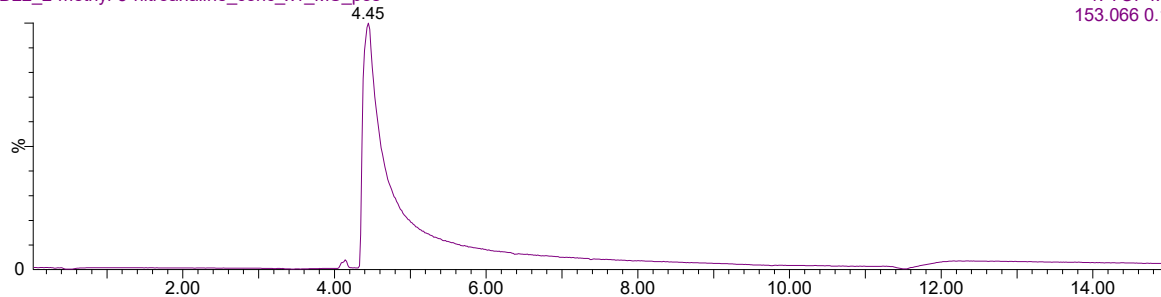
ii. 2-Methyl-5-nitroaniline ([M+H]⁺ = 153,0658535 m/z)

Diluted in MeOH, high concentration

23-Apr-2022 17:32:51

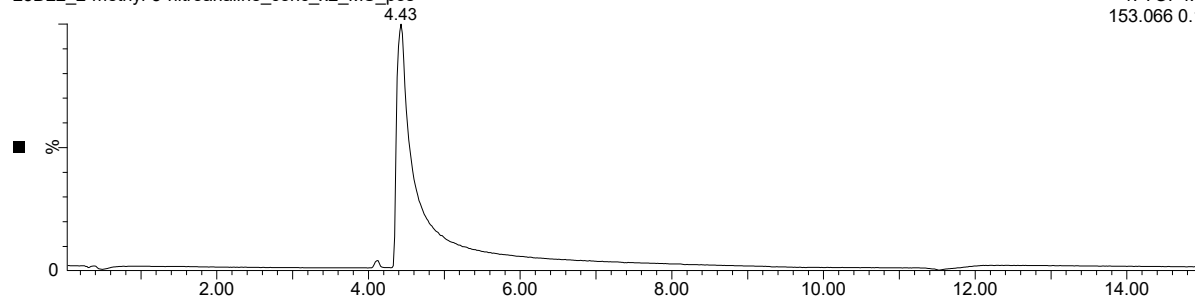
23D22_2-methyl-5-nitroaniline_conc_x1_MS_pos

1: TOF MS ES+
153.066 0.1000Da
2.13e7



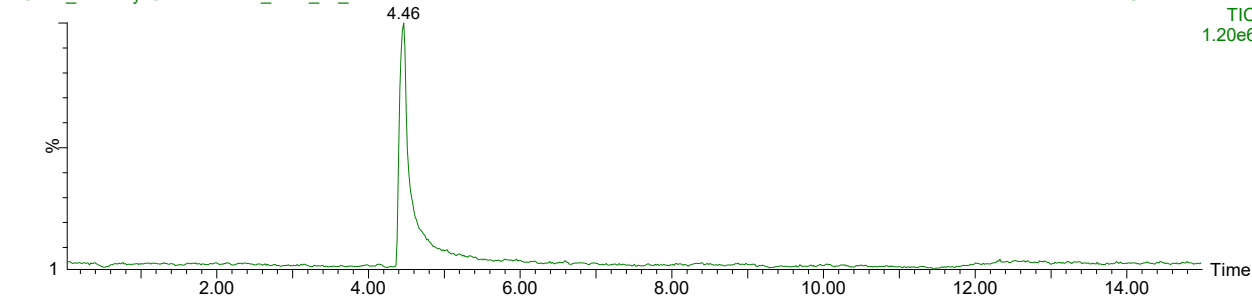
23D22_2-methyl-5-nitroaniline_conc_x2_MS_pos

1: TOF MS ES+
153.066 0.1000Da
2.17e7



23D22_2-methyl-5-nitroaniline_conc_x2_MSMS

1: TOF MSMS ES+
TIC
1.20e6

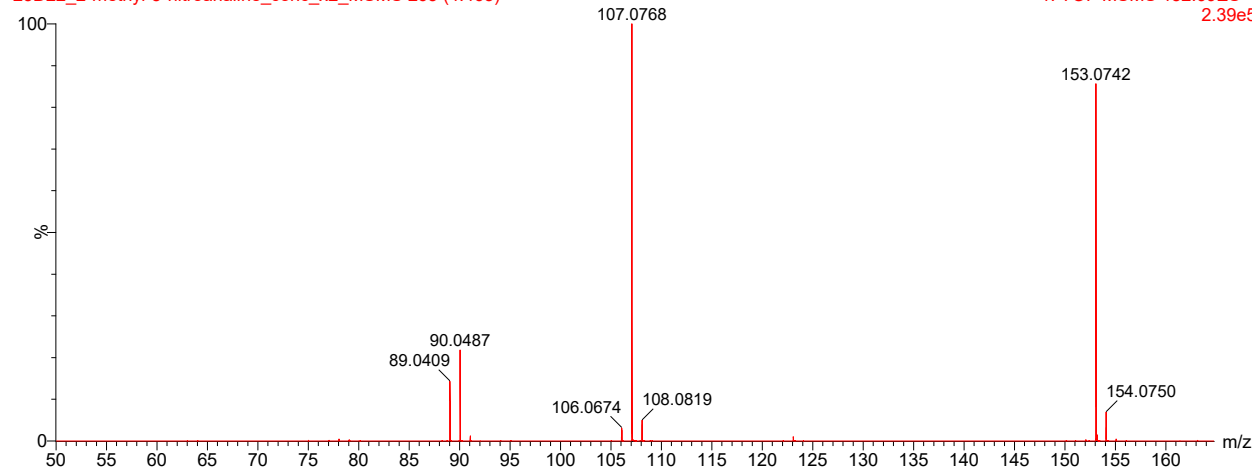


Diluted in MeOH, high concentration

23-Apr-2022 16:35:58

23D22_2-methyl-5-nitroaniline_conc_x2_MSMS 263 (4.463)

1: TOF MSMS 152.99ES+
2.39e5



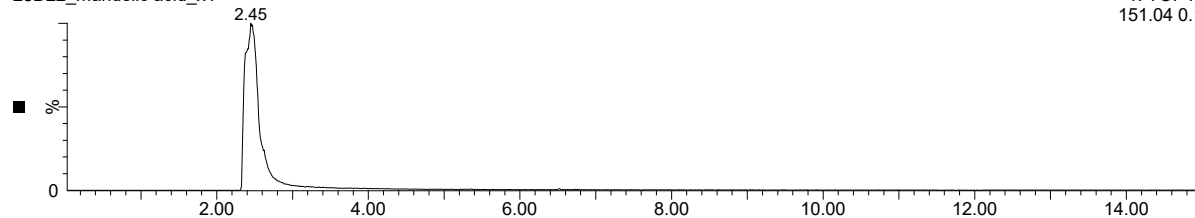
iii. DL-Mandelic acid ([M-H]⁻ = 151,0400681 m/z)

Std diluted in MeOH

28-Apr-2022 15:07:29

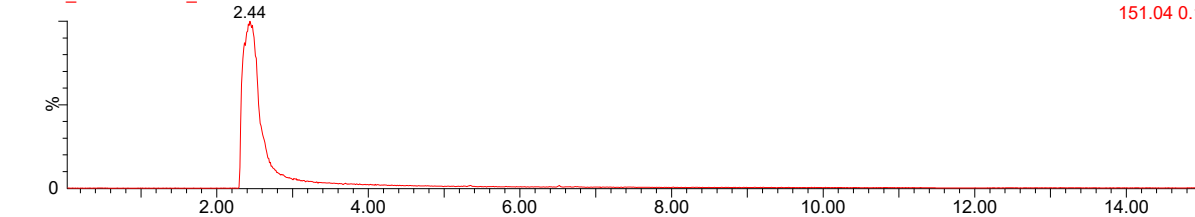
28D22_mandelic acid_x1

1: TOF MS ES-
151.04 0.1000Da
6.54e5



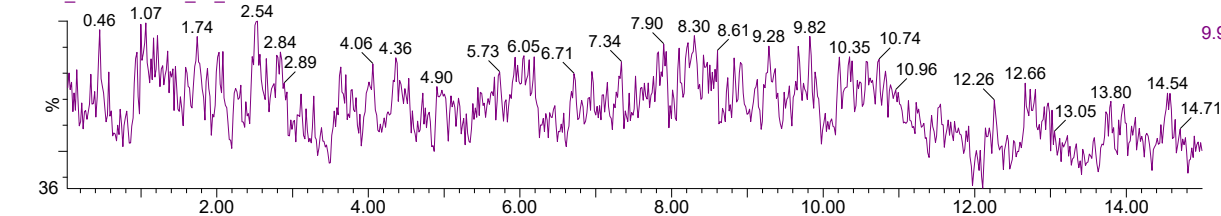
28D22_mandelic acid_x2

1: TOF MS ES-
151.04 0.1000Da
6.99e5



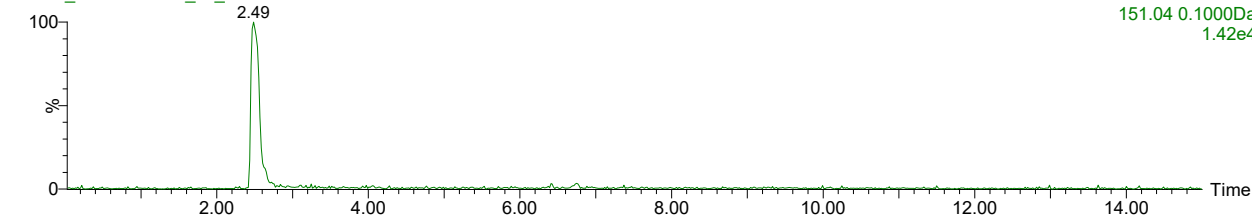
01E22_mandelic acid_x1_MSMS

1: TOF MSMS ES-
TIC
9.93e4



01E22_mandelic acid_x1_MSMS

1: TOF MSMS ES-
151.04 0.1000Da
1.42e4

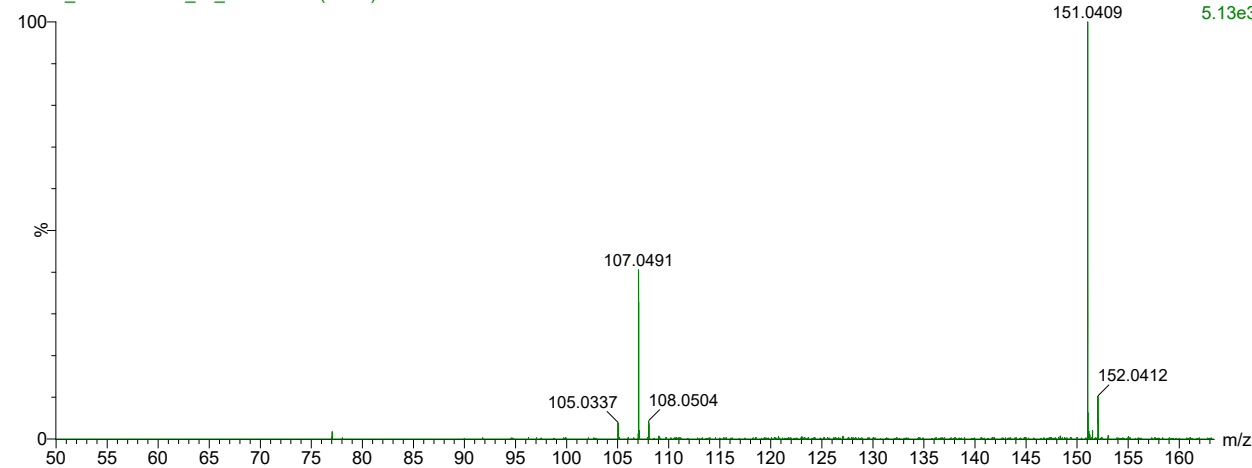


Std diluted in MeOH

01-May-2022 12:27:20

01E22_mandelic acid_x1_MSMS 146 (2.485)

1: TOF MSMS 150.96ES-
151.0409 5.13e3



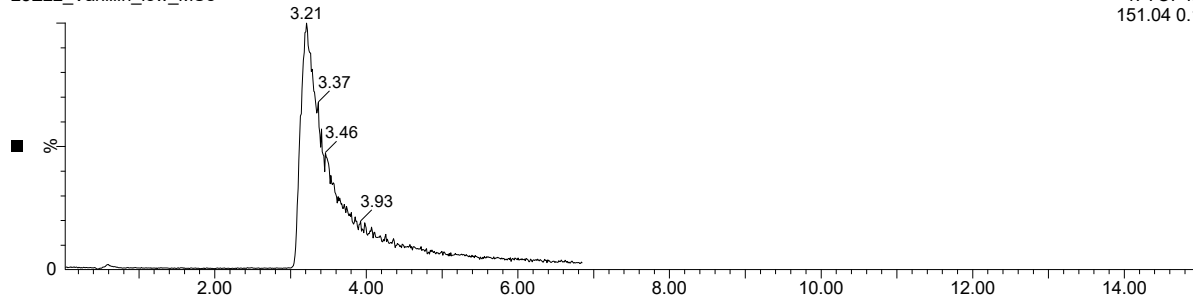
iv. Vanillin ([M-H]⁻ = 151,0400681 m/z)

Std

28-May-2022 13:52:21

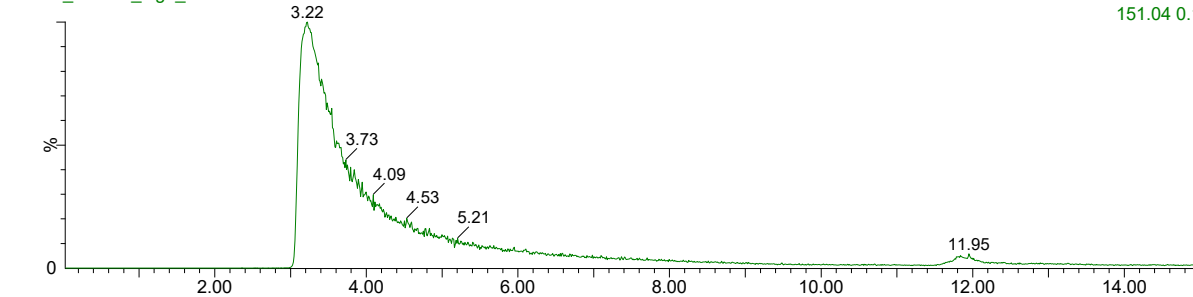
28E22_Vanillin_low_MSe

1: TOF MS ES-
151.04 0.1000Da
9.07e5



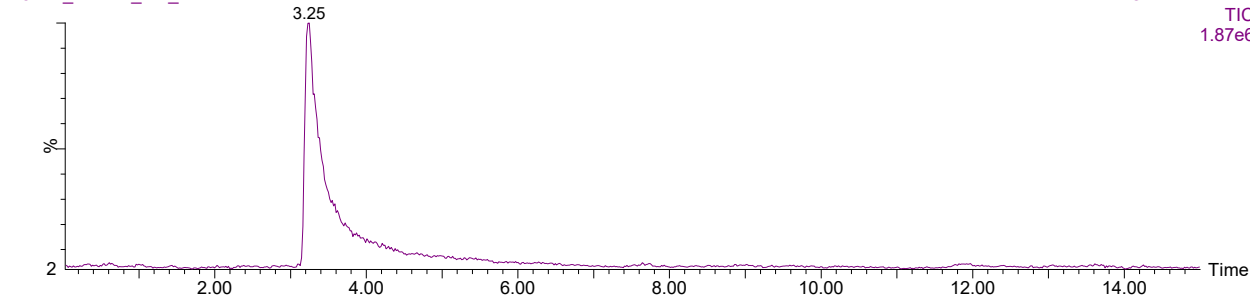
28E22_Vanillin_high_MSe

1: TOF MS ES-
151.04 0.1000Da
9.99e5



28E22_Vanillin_low_MSMS

1: TOF MSMS ES-
TIC
1.87e6

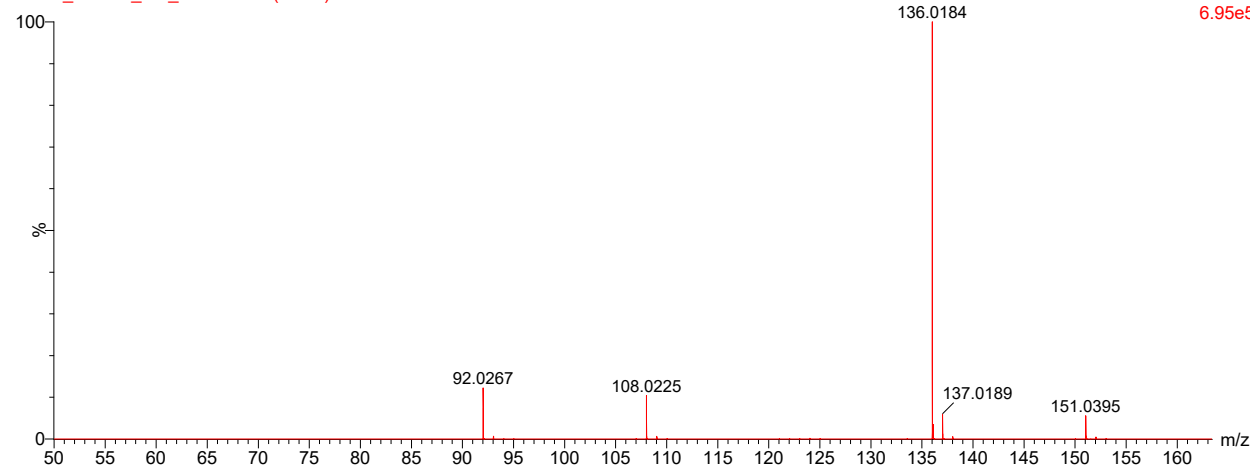


Std

28-May-2022 14:00:43

28E22_Vanillin_low_MSMS 190 (3.229)

1: TOF MSMS 150.96ES-
6.95e5



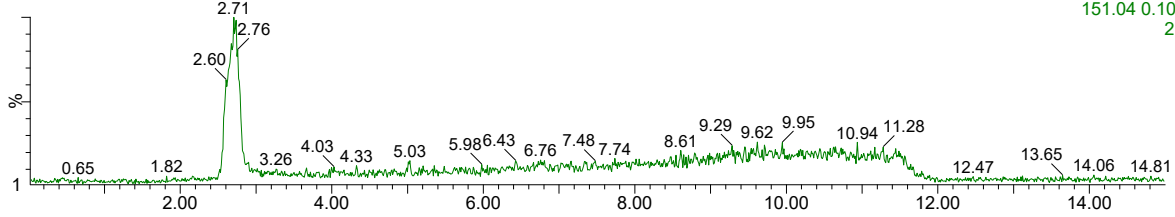
v. 3- Hydroxyphenylacetic acid ([M-H]⁻ = 151,0400681 m/z)

487.3037 3.6924 min

07-Aug-2022 19:33:47

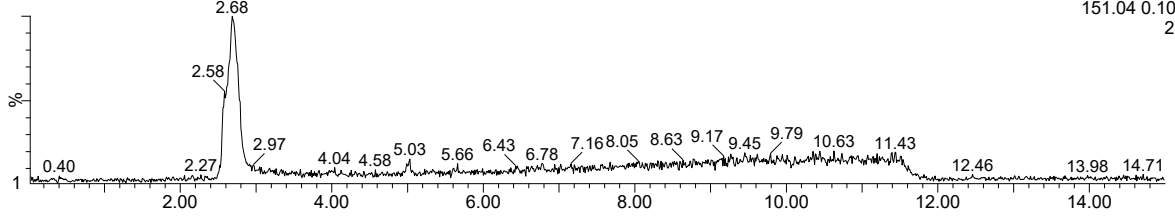
07H22_Hydroxyphenylacetic_x1

1: TOF MS ES-
151.04 0.1000Da
2.06e4



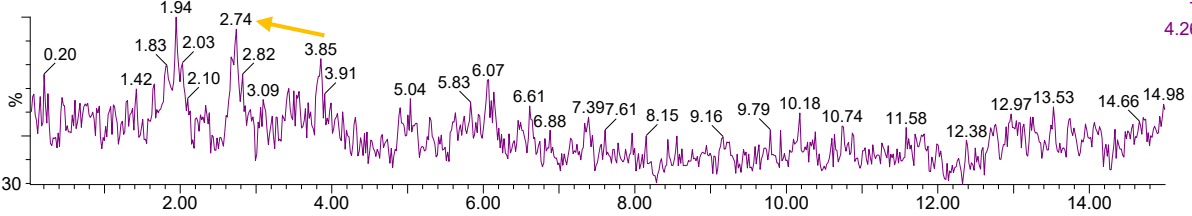
07H22_Hydroxyphenylacetic_x2

1: TOF MS ES-
151.04 0.1000Da
2.45e4



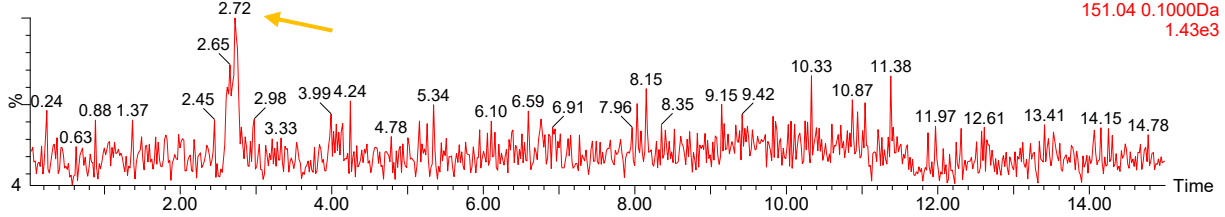
07H22_Hydroxyphenylacetic_MSMS

1: TOF MSMS ES-
TIC
4.26e4



07H22_Hydroxyphenylacetic_MSMS

1: TOF MSMS ES-
151.04 0.1000Da
1.43e3

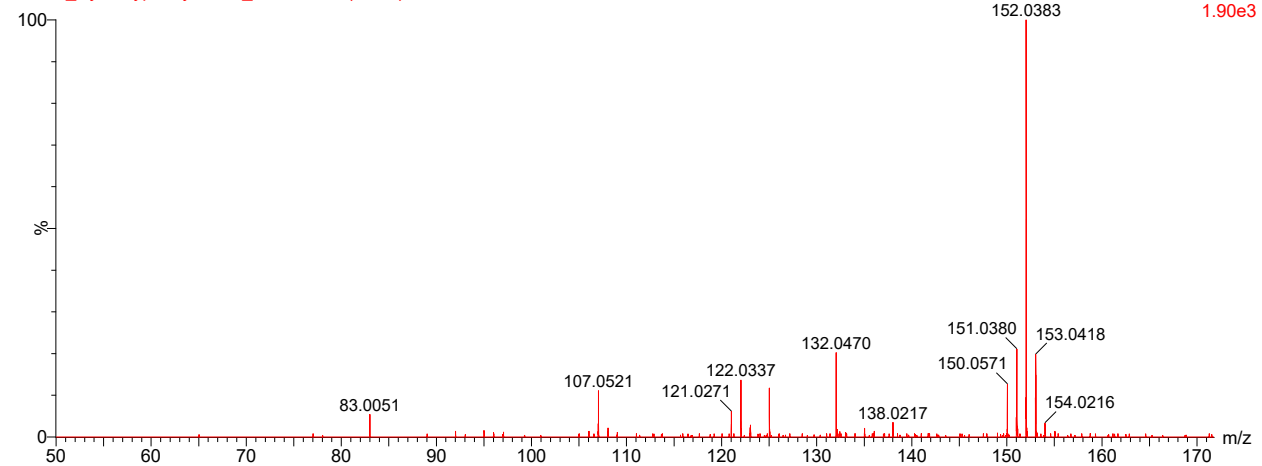


487.3037 3.6924 min

07-Aug-2022 19:33:47

07H22_Hydroxyphenylacetic_MSMS 160 (2.722)

1: TOF MSMS 150.97ES-
1.90e3

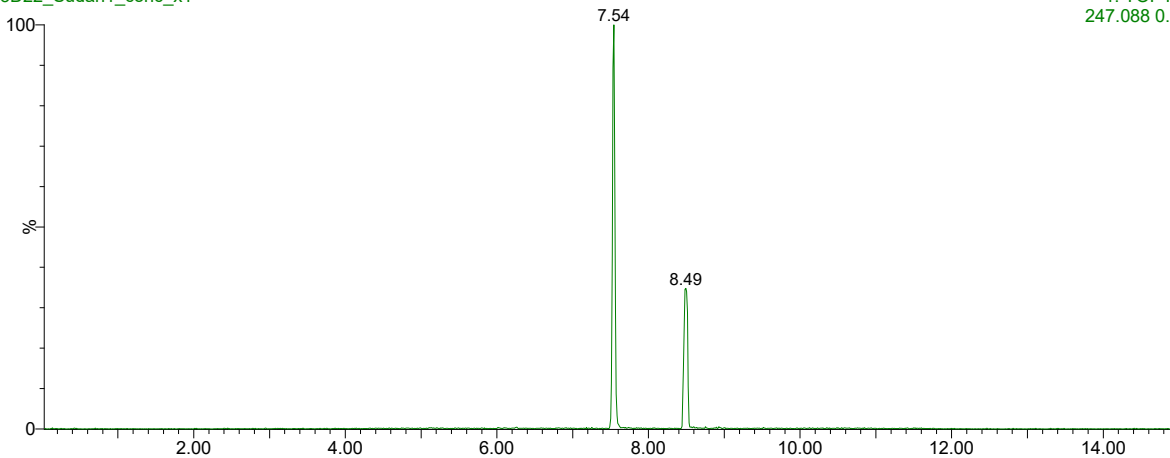


vi. Sudan I ([M-H]⁻ = 247,087687 m/z)

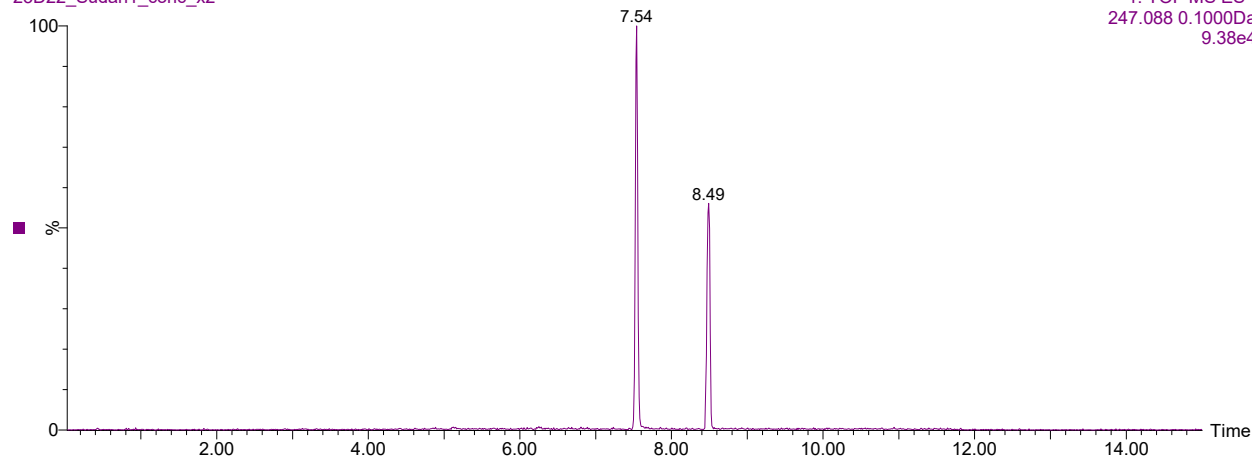
Diluted in MeOH, high concentration

23-Apr-2022 18:05:08

23D22_Sudan1_conc_x1

1: TOF MS ES-
247.088 0.1000Da
1.65e5

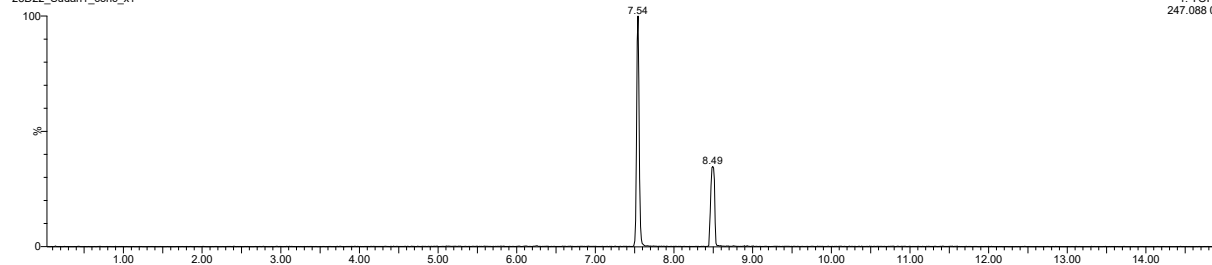
23D22_Sudan1_conc_x2

1: TOF MS ES-
247.088 0.1000Da
9.38e4

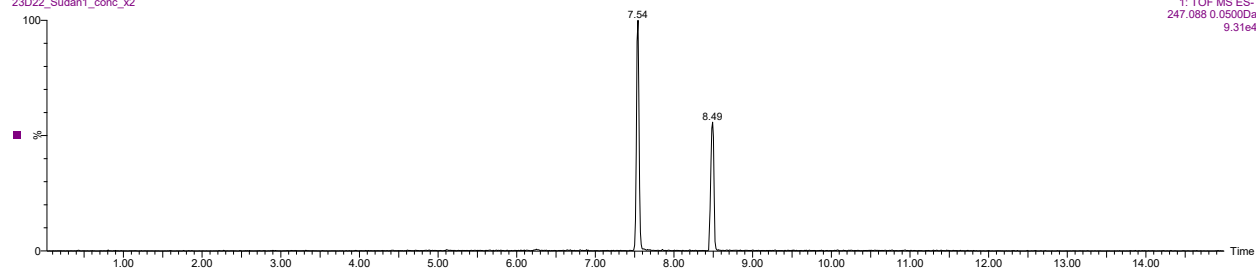
Diluted in MeOH, high concentration

1: TOF MS ES-
247.088 0.0500Da
1.63e5

23D22_Sudan1_conc_x1



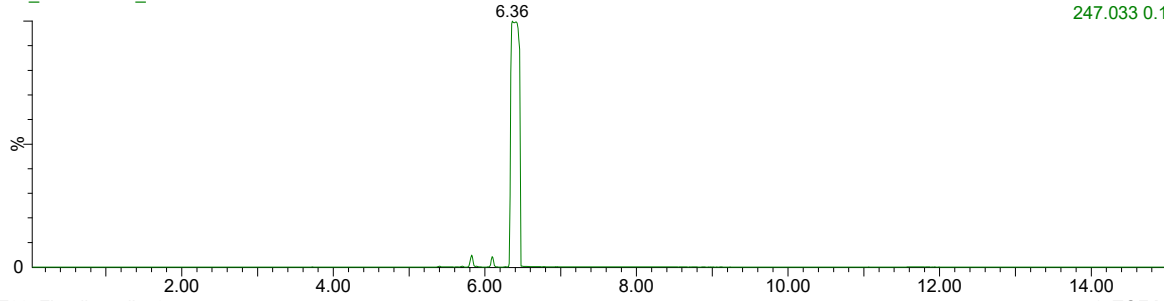
23D22_Sudan1_conc_x2

1: TOF MS ES-
247.088 0.0500Da
9.31e4

vii. Fludioxonil ([M-H]⁻ = 247,0324578 m/z)

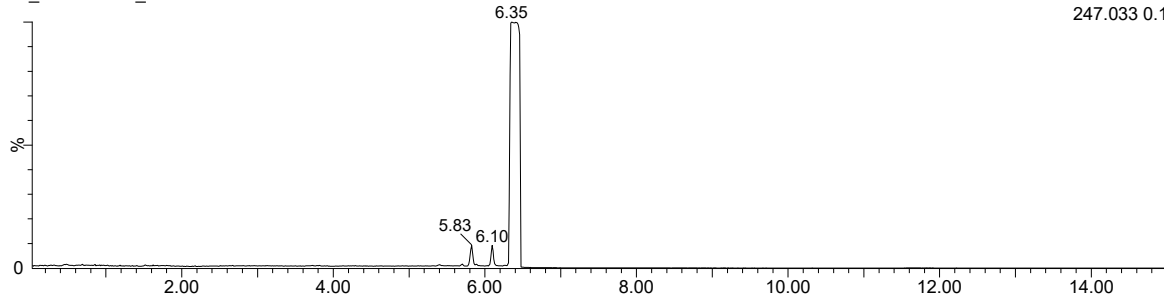
247.0638 4.6287 min
23F22_Fludioxonil_x1

23-Jun-2022 15:02:05
1: TOF MS ES-
247.033 0.1000Da
5.52e6



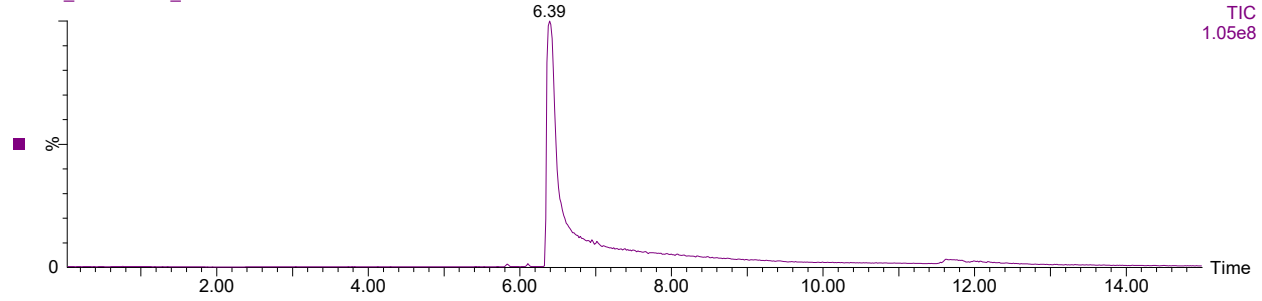
23F22_Fludioxonil_x2

1: TOF MS ES-
247.033 0.1000Da
5.49e6



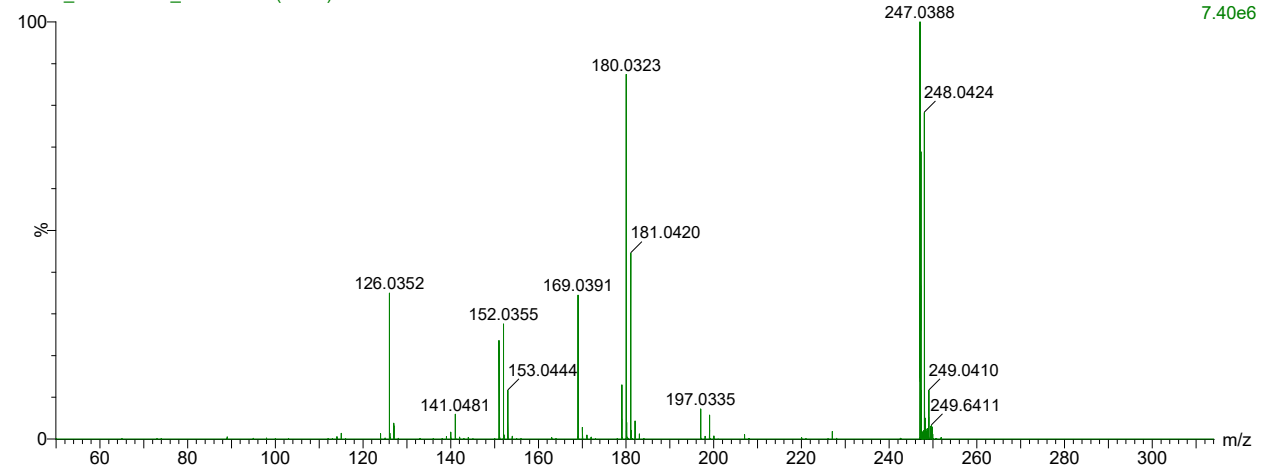
23F22_Fludioxonil_MSMS

1: TOF MSMS ES-
TIC
1.05e8



247.0638 4.6287 min
23F22_Fludioxonil_MSMS 377 (6.391)

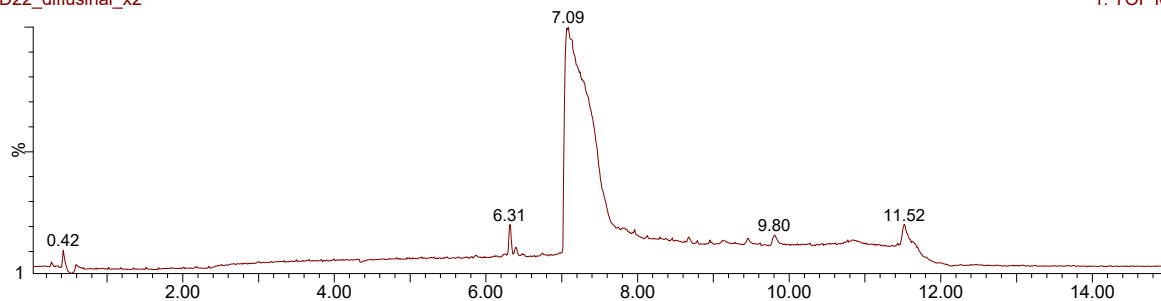
23-Jun-2022 15:02:05
1: TOF MSMS 247.02ES-
7.40e6



viii. Diflunisal ([M-H]⁻ = 249,0368744 m/z)

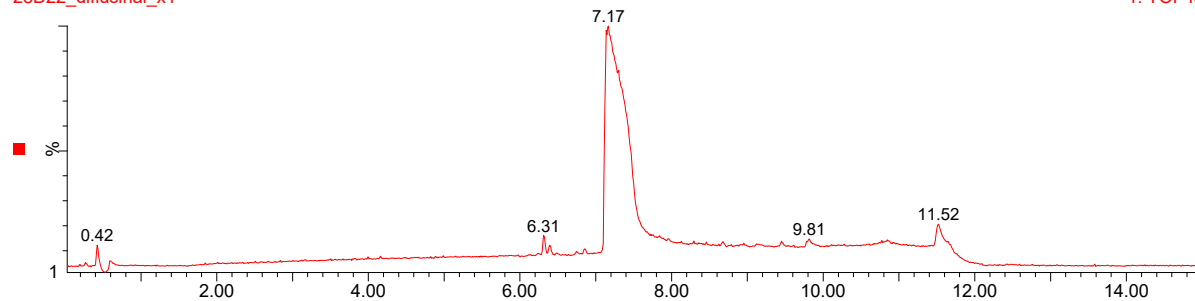
Std diluted in MeOH
28D22_diflunisal_x2

28-Apr-2022 16:11:45
1: TOF MS ES-TIC
4.43e7



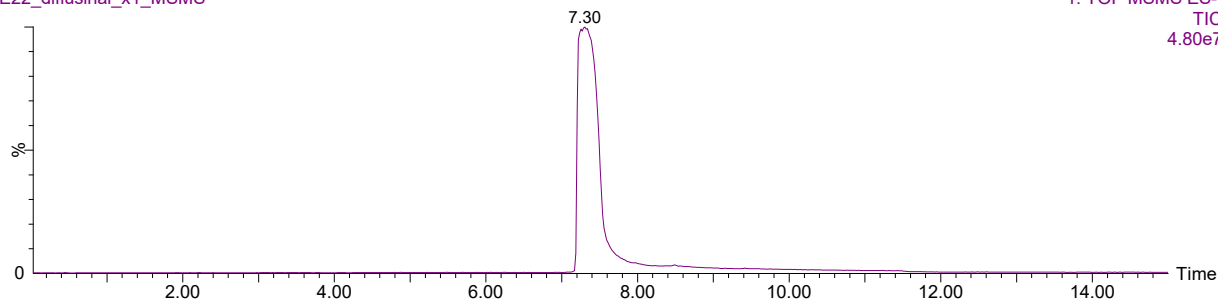
28D22_diflunisal_x1

1: TOF MS ES-TIC
4.31e7



01E22_diflunisal_x1_MSMS

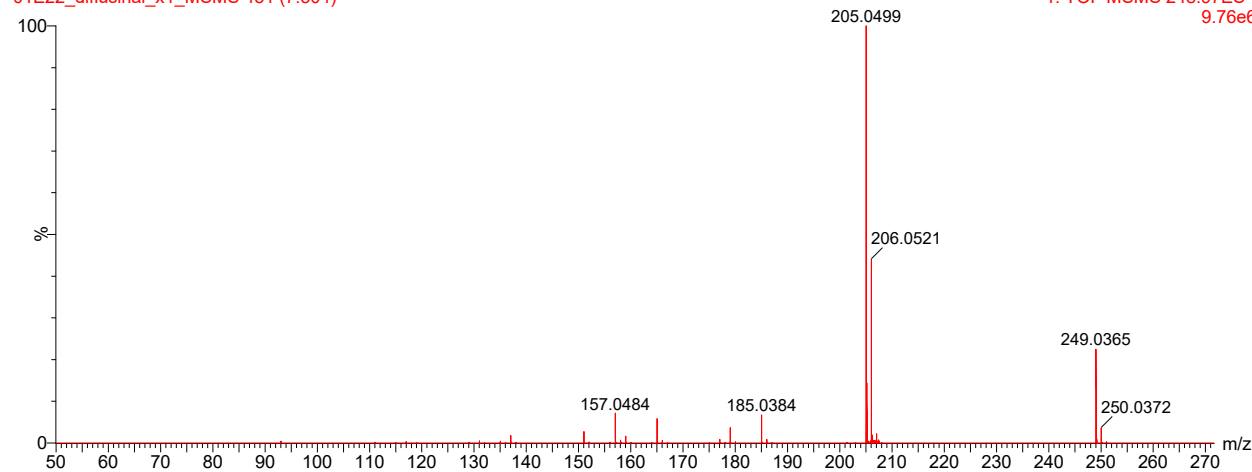
1: TOF MSMS ES-TIC
4.80e7



Std diluted in MeOH

01E22_diflunisal_x1_MSMS 431 (7.304)

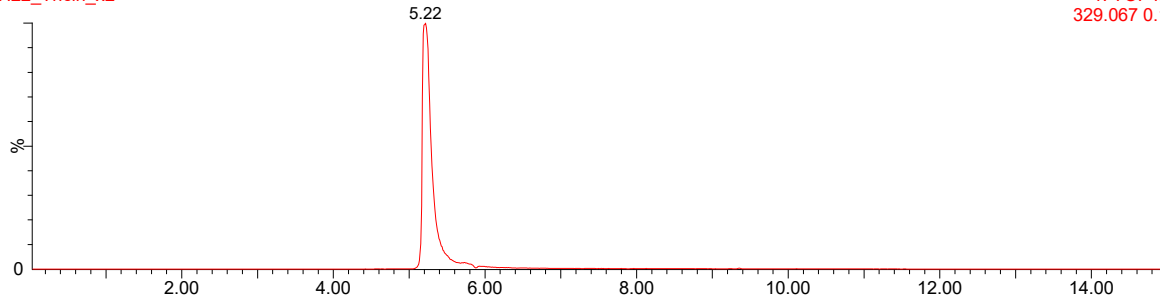
01-May-2022 12:43:14
1: TOF MSMS 248.97ES-
9.76e6



ix. Tricin ([M-H]⁻ = 329,0666768 m/z)

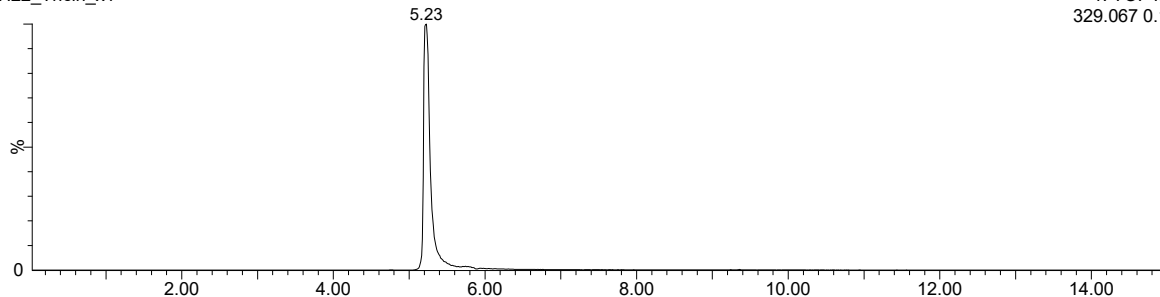
487.3037 3.6924 min
07H22_Tricin_x2

07-Aug-2022 18:45:30
1: TOF MS ES-
329.067 0.1000Da
6.48e6



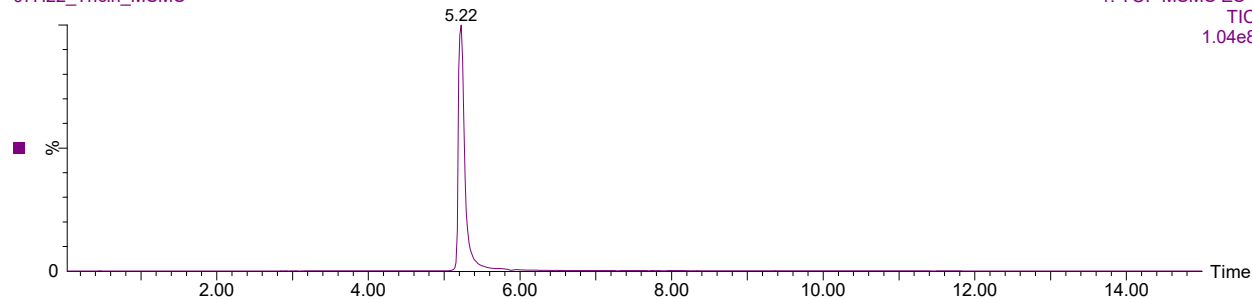
07H22_Tricin_x1

1: TOF MS ES-
329.067 0.1000Da
6.43e6



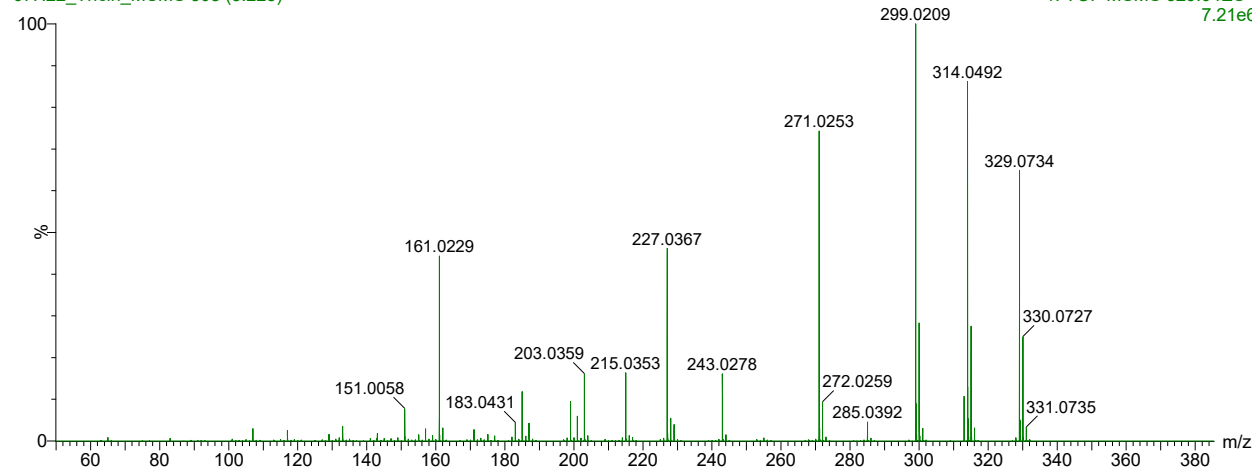
07H22_Tricin_MSMS

1: TOF MSMS ES-
TIC
1.04e8



487.3037 3.6924 min
07H22_Tricin_MSMS 308 (5.225)

07-Aug-2022 18:45:30
1: TOF MSMS 329.04ES-
7.21e6



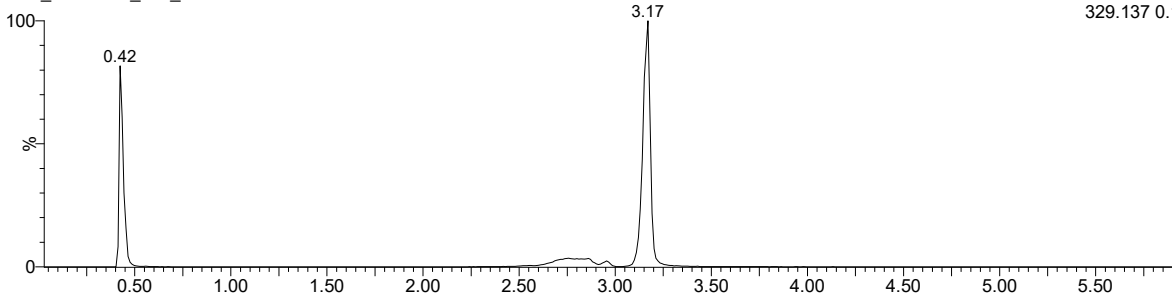
x. 2-{{6-(Diethylamino)pyridin-3-yl}amino}-5-nitropyridine-3-carboxamide ([M-H]⁻ = 329,1367625 m/z)

2 dose non dilue

23-Jun-2022 17:10:28

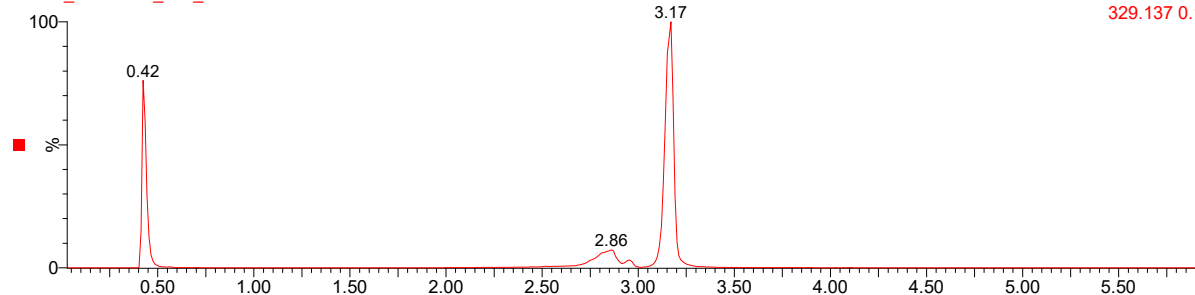
23F22_CSSS000_294_x1

1: TOF MS ES-
329.137 0.1000Da
2.39e6



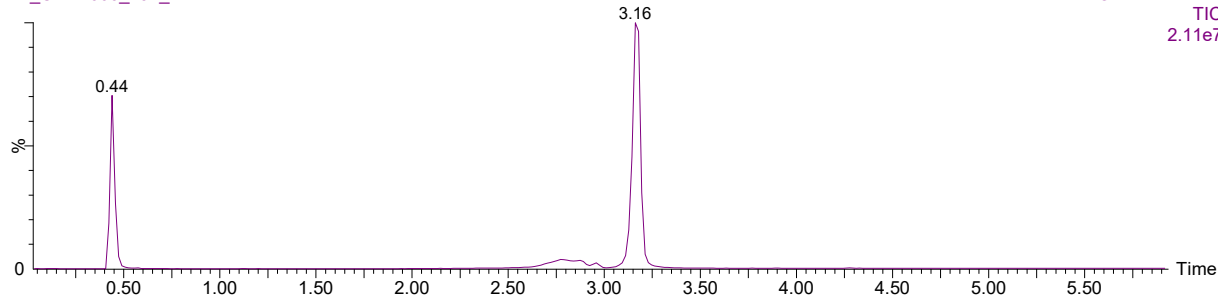
23F22_CSSS000_294_x2

1: TOF MS ES-
329.137 0.1000Da
3.41e6



23F22_CSSS000_294_MSMS

1: TOF MSMS ES-
TIC
2.11e7

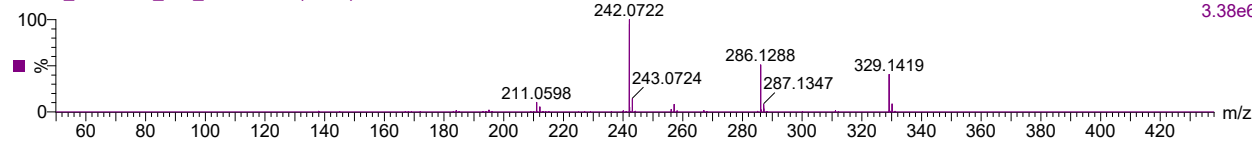


329.1374 3.4017 min

23-Jun-2022 17:26:20

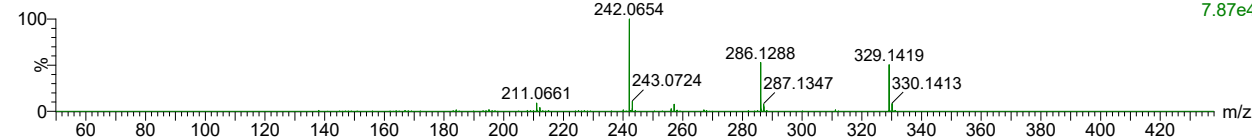
23F22_CSSS000_294_MSMS 186 (3.162)

1: TOF MSMS 329.11ES-
3.38e6



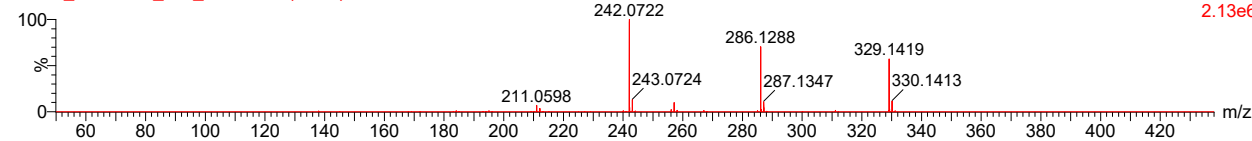
23F22_CSSS000_294_MSMS 166 (2.824)

1: TOF MSMS 329.11ES-
7.87e4



23F22_CSSS000_294_MSMS 25 (0.440)

1: TOF MSMS 329.11ES-
2.13e6



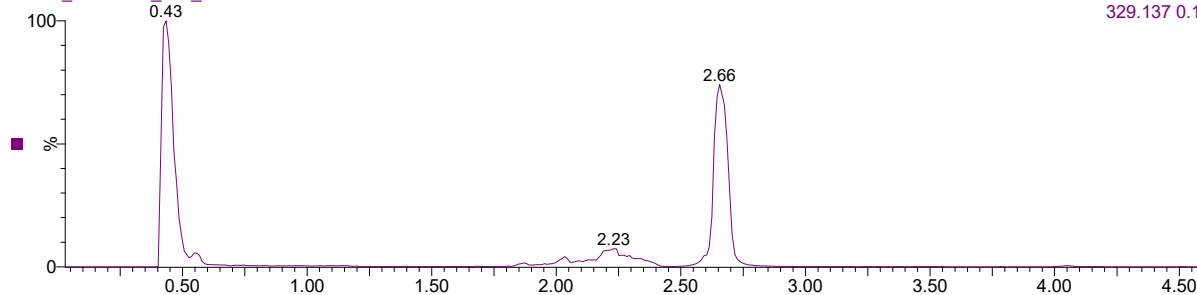
xi. 2-({1-[3-(dimethylamino)-2-hydroxypropyl]-1H-pyrazol-4-yl}amino)-5-nitrobenzonitrile
 ([M-H]⁻ = 329,1367625 m/z)

1 dose dilue

23-Jun-2022 16:06:04

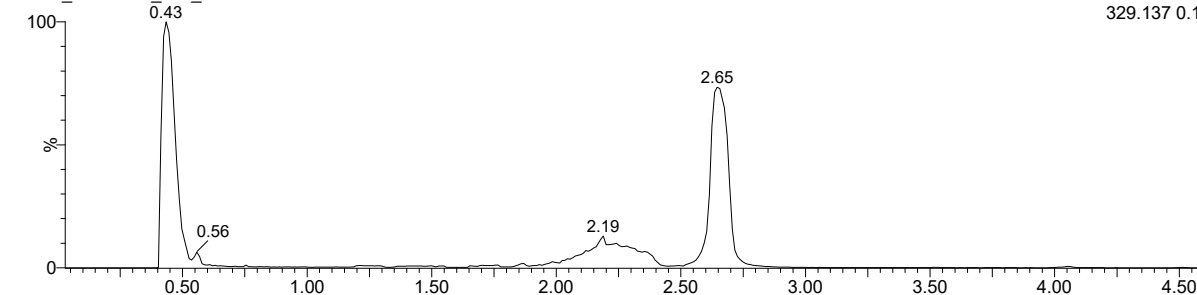
23F22_CSS000_955_x1

1: TOF MS ES-
 329.137 0.1000Da
 5.86e6



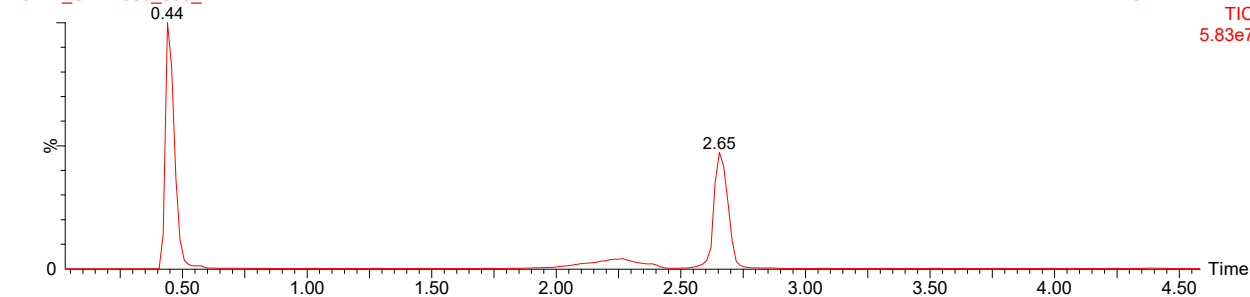
23F22_CSS000_955_x2

1: TOF MS ES-
 329.137 0.1000Da
 6.13e6



23F22_CSS000_955_MSMS

1: TOF MSMS ES-
 TIC
 5.83e7

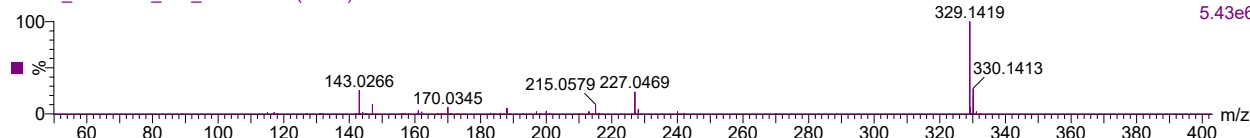


329.1374 3.4017 min

23-Jun-2022 16:38:13

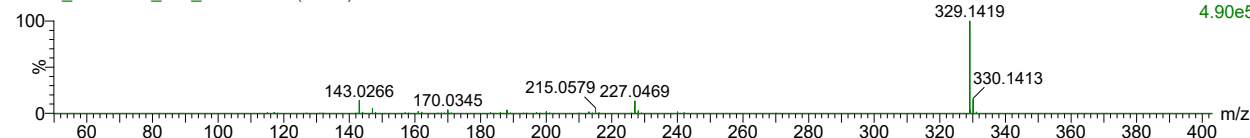
23F22_CSS000_955_MSMS 156 (2.655)

1: TOF MSMS 329.11ES-
 5.43e6



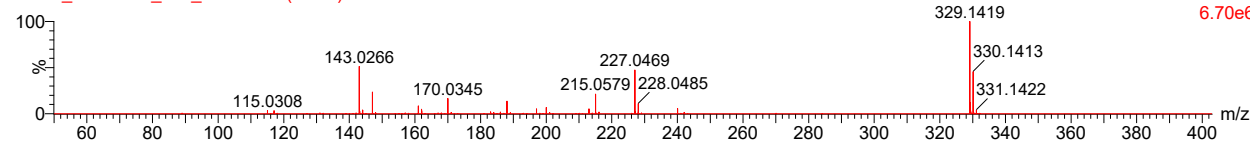
23F22_CSS000_955_MSMS 132 (2.249)

1: TOF MSMS 329.11ES-
 4.90e5



23F22_CSS000_955_MSMS 25 (0.439)

1: TOF MSMS 329.11ES-
 6.70e6

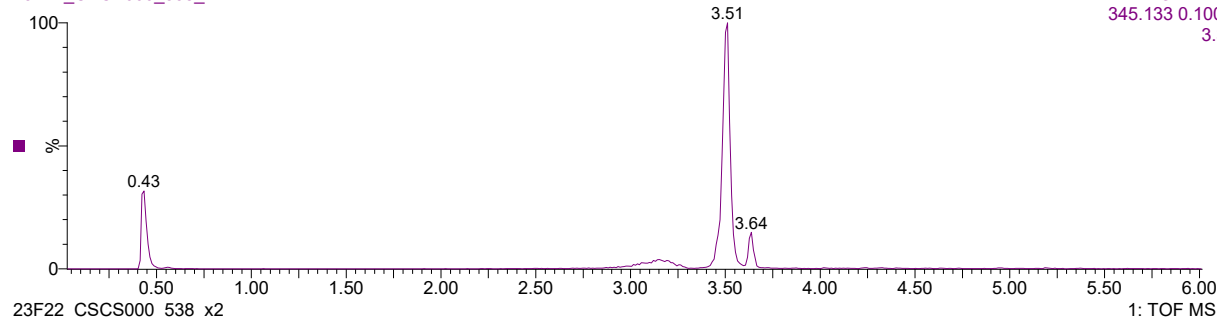


xii. 3-(1-{1-(difluoromethyl)-1H-imidazol-2-yl}methyl)-1,2,3,6-tetrahydropyridin-4-yl)-6-fluoro-1H-indole ([M-H]⁻ = 345,1332551 m/z)

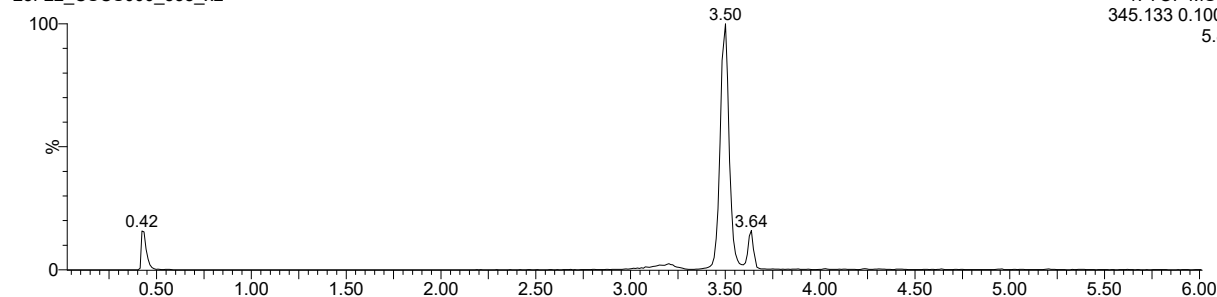
1 dose dilue

23-Jun-2022 15:17:59

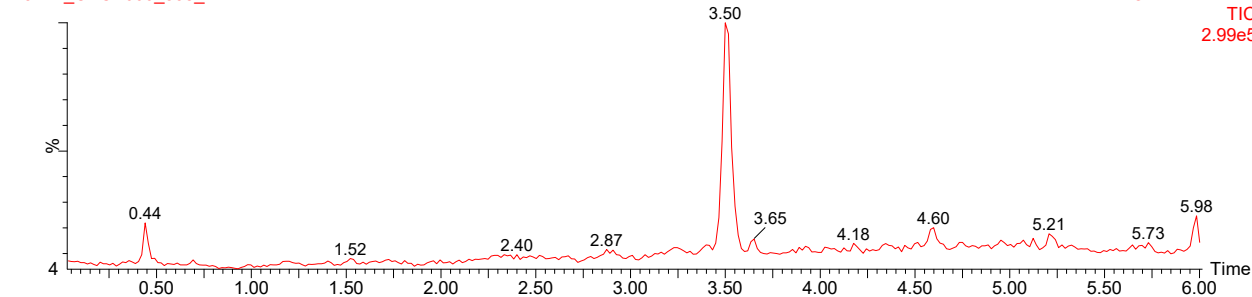
23F22_CSCS000_538_x1

1: TOF MS ES-
345.133 0.1000Da
3.35e5

23F22_CSCS000_538_x2

1: TOF MS ES-
345.133 0.1000Da
5.88e5

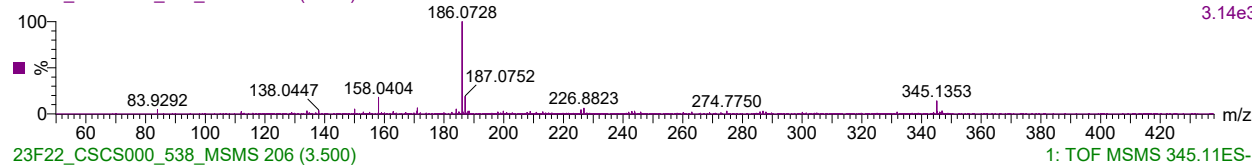
23F22_CSCS000_538_MSMS

1: TOF MSMS ES-
TIC
2.99e5

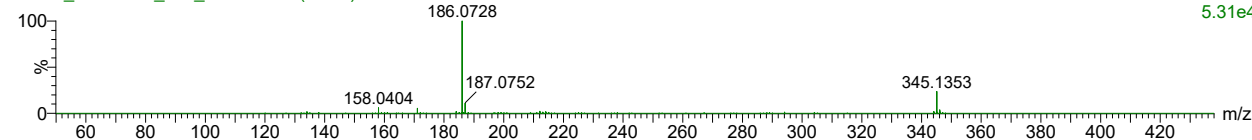
345.1329 3.6311 min

23-Jun-2022 15:50:09

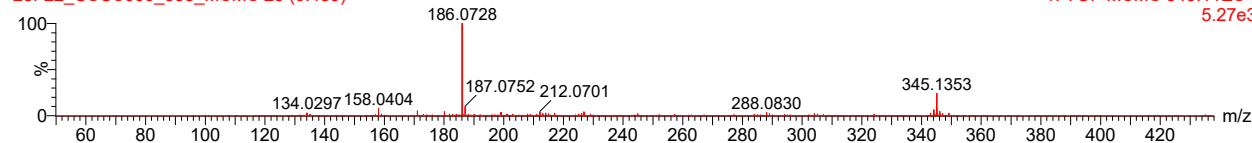
23F22_CSCS000_538_MSMS 214 (3.635)

1: TOF MSMS 345.11ES-
3.14e3

23F22_CSCS000_538_MSMS 206 (3.500)

1: TOF MSMS 345.11ES-
5.31e4

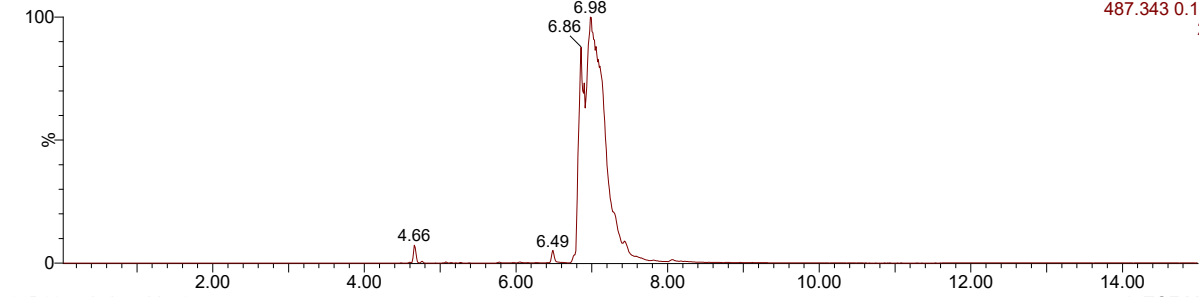
23F22_CSCS000_538_MSMS 25 (0.439)

1: TOF MSMS 345.11ES-
5.27e3

xiii. Asiatic acid ([M-H]⁻ = 487,3428986 m/z)

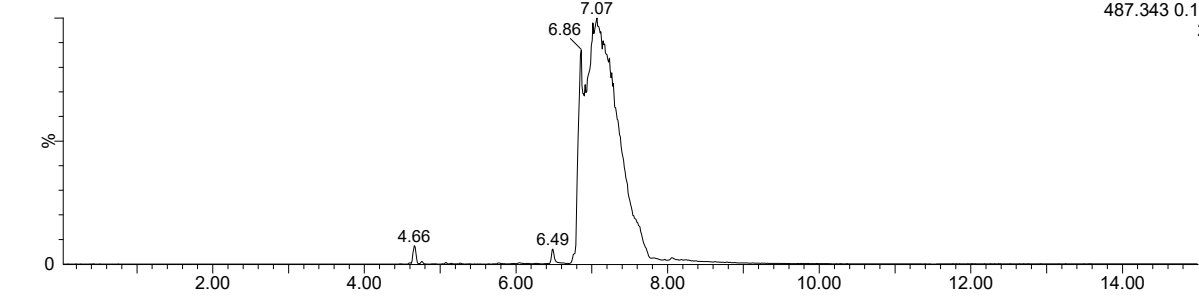
Std diluted in MeOH
28D22_asiatic acid_x1

01-May-2022 12:59:35
1: TOF MS ES-
487.343 0.1000Da
2.92e6



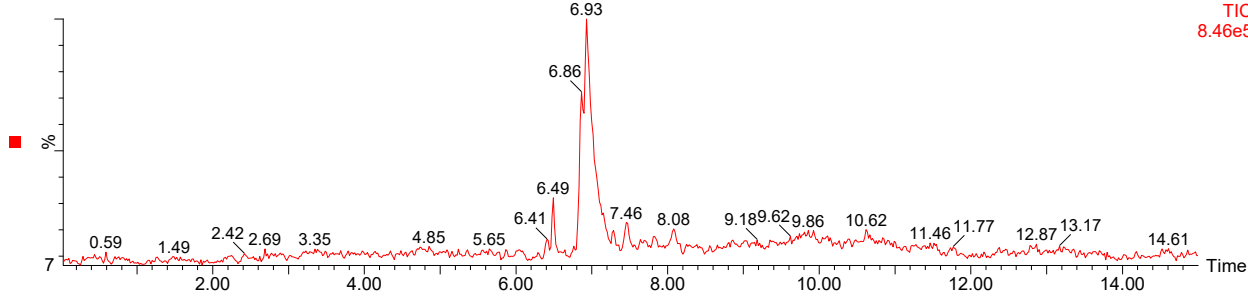
28D22_asiatic acid_x2

1: TOF MS ES-
487.343 0.1000Da
2.83e6



01E22_asiatic acid_x1_MSMS

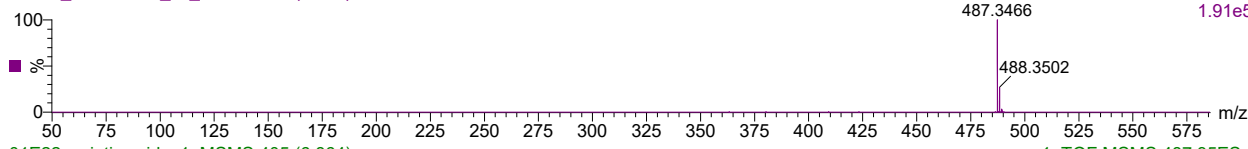
1: TOF MSMS ES-
TIC
8.46e5



Std diluted in MeOH

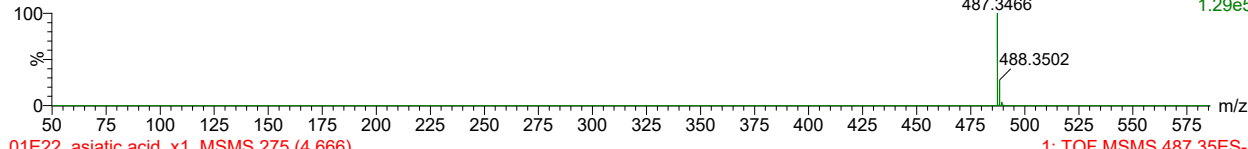
01E22_asiatic acid_x1_MSMS 409 (6.932)

01-May-2022 12:59:35
1: TOF MSMS 487.35ES-
1.91e5



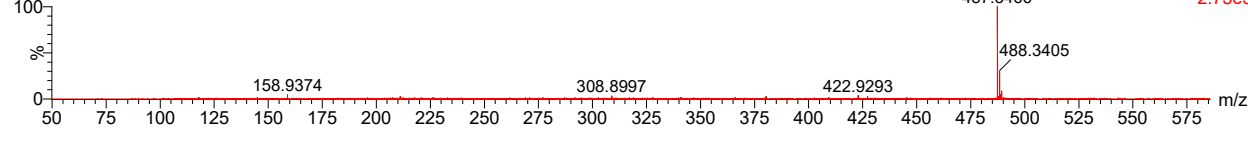
01E22_asiatic acid_x1_MSMS 405 (6.864)

1: TOF MSMS 487.35ES-
1.29e5



01E22_asiatic acid_x1_MSMS 275 (4.666)

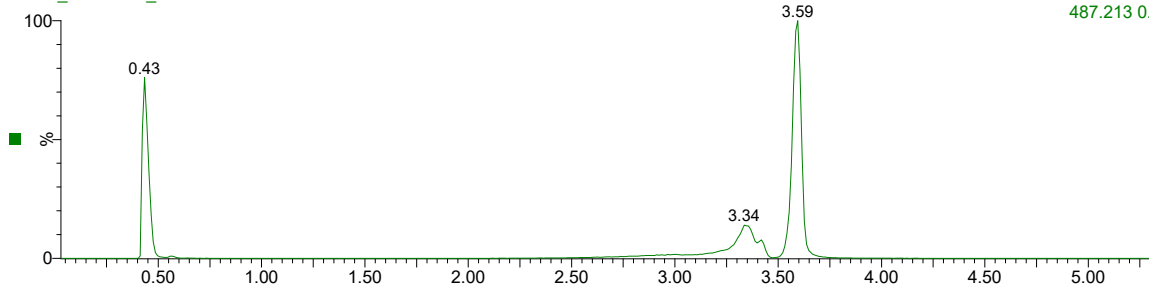
1: TOF MSMS 487.35ES-
2.75e3



xiv. Vardenafil ([M-H]⁻ = 487,2132987 m/z)

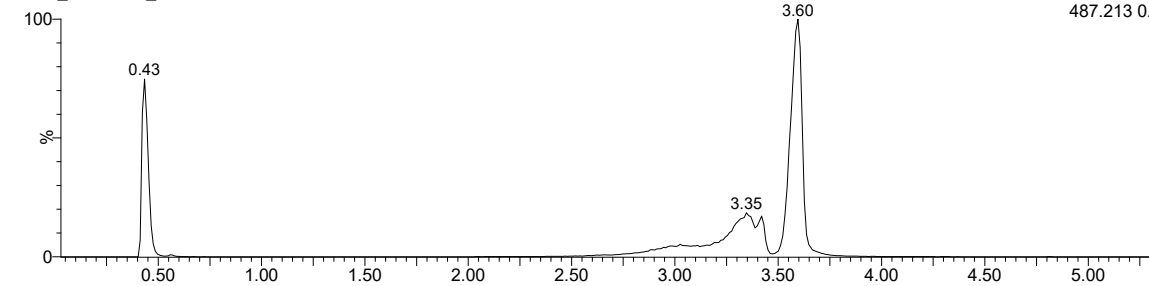
1 dose dilue
23F22_Vardenafil_x1

23-Jun-2022 13:41:42
1: TOF MS ES-
487.213 0.1000Da
5.10e6



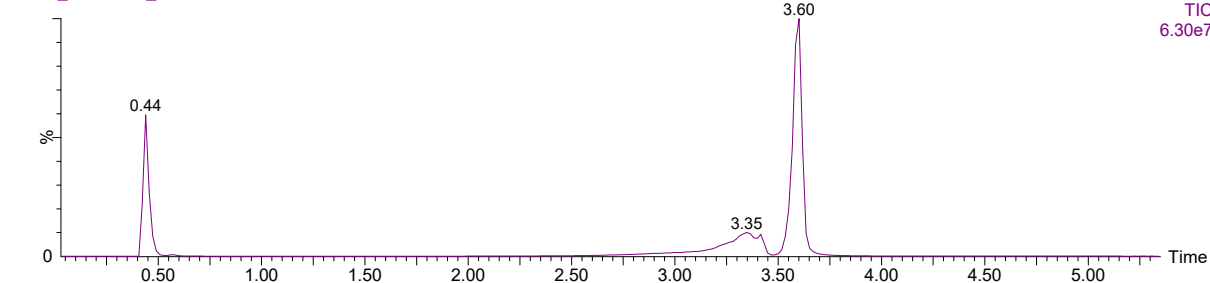
23F22_Vardenafil_x2

1: TOF MS ES-
487.213 0.1000Da
5.91e6



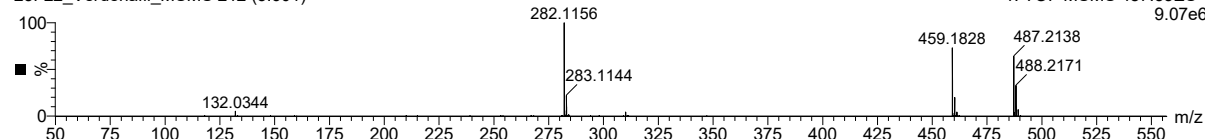
23F22_Vardenafil_MSMS

1: TOF MSMS ES-
TIC
6.30e7



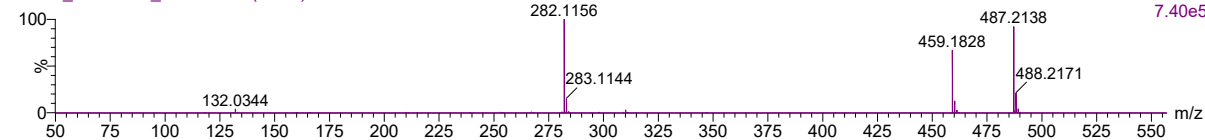
487.3037 3.6924 min
23F22_Vardenafil_MSMS 212 (3.601)

23-Jun-2022 14:13:56
1: TOF MSMS 487.33ES-
9.07e6



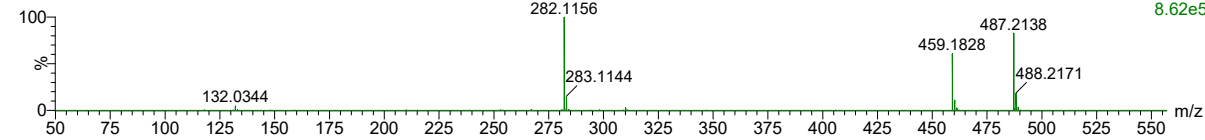
23F22_Vardenafil_MSMS 201 (3.415)

1: TOF MSMS 487.33ES-
7.40e5



23F22_Vardenafil_MSMS 197 (3.347)

1: TOF MSMS 487.33ES-
8.62e5



23F22_Vardenafil_MSMS 25 (0.439)

1: TOF MSMS 487.33ES-
5.26e6

