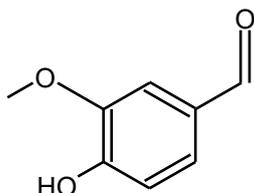


TP Dosage de la vanilline, de l'acide vanillique, de l'aldéhyde 4-hydroxybenzoïque et de l'acide 4-hydroxybenzoïque dans des extraits par HPLC

La gousse de vanille est le fruit d'une orchidée grimpante ; cette plante s'attache aux branches des arbres à l'aide de racines aériennes et peut atteindre 100 m de long. Les gousses de vanille de la Réunion, de Madagascar et de Tahiti sont réputées.

La vanille naturelle développe un parfum complexe formé de plusieurs centaines de composés aromatiques différents. La note dominante de l'arôme de la vanille naturelle est donnée par la molécule de vanilline ou 4-hydroxy-3-méthoxybenzaldéhyde, de formule brute $C_8H_8O_3$ et de formule topologique :



Les arômes alimentaires sont réglementés au plan communautaire par la directive cadre « arômes » 88/388/CEE, qui définit les différentes catégories d'arômes, ainsi que les conditions d'emploi du terme « naturel ». Cette directive a été transposée, en droit français par le décret du 11 avril 1991 relatif aux arômes alimentaires, pour ce qui est des définitions, et par l'arrêté du 11 juillet 1991 relatif aux critères généraux de qualité et de sécurité des arômes.

Cependant, ces dispositions d'ordre général ne précisent pas les spécifications propres aux différents types d'arômes. Parmi ceux-ci, les matières aromatiques qui reproduisent le goût vanille, soit naturellement (extraits et arômes naturels de vanille), soit artificiellement (vanille de synthèse), sont les plus employées dans l'aromatisation des denrées alimentaires.

I - Définition :

1- Vanille

La vanille est définie au plan réglementaire par le décret du 20 mai 1966 portant règlement d'administration publique pour l'application de la loi du 1^{er} Aout 1905 en ce qui concerne la vanille, comme le fruit de *Vanilla planifolia* et des espèces voisines. Pour l'application du décret, doit être entendue comme « espèces voisines » la seule *Vanilla tahitensis*.

La dénomination « vanille bourbon » s'applique à la vanille produite à Madagascar, à la Réunion, aux Comores et à Mayotte.

2- Extraits de vanille

Les extraits de vanille répondent à la définition des préparations aromatisantes au sens du décret n°91-366 du 11 avril 1991 relatif aux arômes alimentaires : ils sont obtenus à partir des gousses en utilisant les solvants d'extraction prévus par l'arrêté du 19 novembre 1990 modifié.

3- Arômes naturels vanille

Les arômes naturels vanille répondent à la définition des arômes naturels.

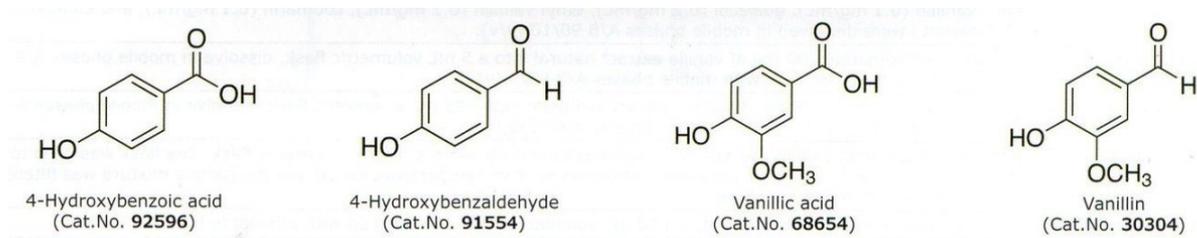
Il s'agit de mélanges d'extraits de vanille avec des préparations aromatisantes d'autres sources que la vanille, ou des substances aromatisantes naturelles telles que définies à l'article 4 du décret du 11 avril 1991 précité.

Pour l'interprétation de l'article 15 du décret du 11 avril 1991 précité, au moins 90% de la vanilline de l'arôme doit provenir des gousses de vanille.

II - Critère analytiques d'authenticité de la vanille

1- Ratios des principaux constituants de la vanille :

La vanilline, l'acide vanillique, l'aldéhyde 4-hydroxybenzoïque (aldéhyde p-hydroxybenzoïque) et l'acide 4-hydroxybenzoïque (acide p-hydroxybenzoïque) sont dosés par chromatographie liquide haute performance (CLHP) selon la méthode officielle de l'arrêté du 11 juin 1987.



Les teneurs de ces constituants sont caractéristiques de la vanille et des produits vanillés et peuvent être utilisées comme élément d'appréciation pour leur contrôle.

En particulier, pour la vanille et les extraits standards de vanille, les ratios suivants sont observés (vanille Bourdon) :

[vanilline] / [aldéhyde p-hydroxybenzoïque]	: compris entre 10 et 20 ;
[vanilline] / [acide p-hydroxybenzoïque]	: compris entre 40 et 110 ;
[vanilline] / [acide vanillique]	: compris entre 12 et 29 ;
[acide vanillique] / [aldéhyde p-hydroxybenzoïque]	: compris entre 0,53 et 1,5 ;
[acide p-hydroxybenzoïque] / [aldéhyde p-hydroxybenzoïque]	: compris entre 0,15 et 0,35.

III Teneur en vanilline

1- Gousses

La teneur en vanilline des gousses ne fait pas l'objet de spécifications réglementaires. Cependant, la teneur moyenne des gousses étant d'environ 2%, une teneur anormalement basse par rapport à cette valeur constituerait une tromperie pour l'acheteur, qu'il soit professionnel ou consommateur final, en l'absence d'information qualitative relative au produit concerné.

2- Extraits de vanille et arômes naturels de vanille industriels

Selon les usages, les extraits standards de vanille doivent contenir un minimum de 2g de vanilline par kg.

Les arômes naturels vanille présentant une plus grande variété de formulation que les extraits de vanille, il n'est pas nécessaire de prévoir une teneur minimum en vanilline. En revanche, afin d'assurer une bonne information de l'acheteur, il convient que celui-ci soit informé de l'équivalence en gousses de l'arôme ou de sa teneur en vanilline.

Si une équivalence en gousses est mise en avant, le chiffre moyen de 2% de vanilline sera utilisé comme référence. Ainsi, un extrait ou un arôme naturel vanille présenté comme équivalent à 150 grammes de vanille contiendra au moins 3 g de vanilline par kg d'arôme.

3- Arômes naturels vanille destinés au consommateur final

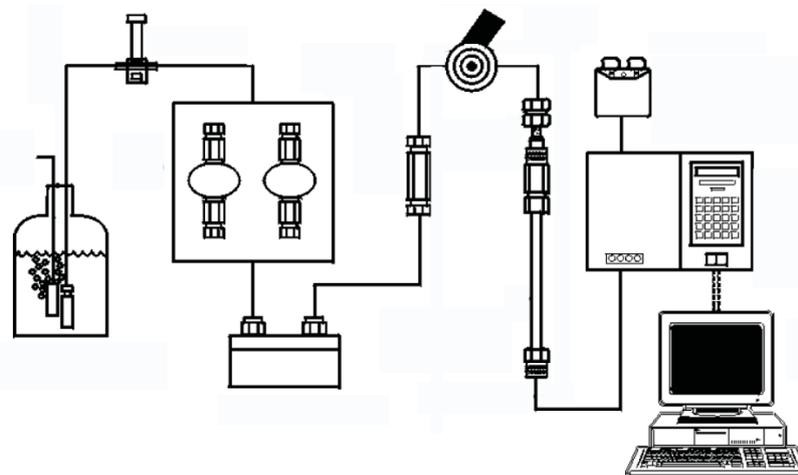
Différents types d'arômes naturels vanille peuvent être vendus au consommateur final, tels que des extraits de vanille ou du sucre vanillé. L'acheteur n'étant pas dans ce cas un professionnel, la mention d'une équivalence en gousses n'est pas toujours informative. En conséquence une teneur minimale en vanille mise en œuvre est mieux adaptée.

TP 1 : Influence de la composition de la phase mobile sur la rétention

Etude de la séparation de la vanilline, de l'acide vanillique, de l'aldéhyde 4-hydroxybenzoïque et de l'acide 4-hydroxybenzoïque par chromatographie en phase liquide à polarité des phases inversée.

1- MATERIEL

1.1. Système chromatographique



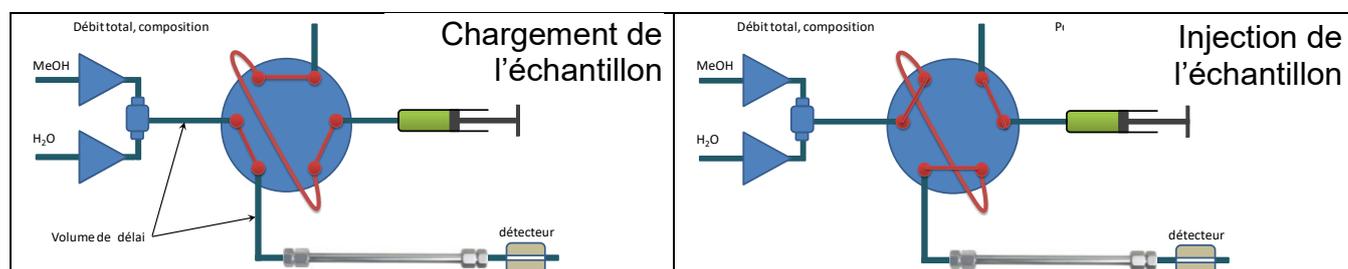
Colonne : silice greffée C₁₈, diamètre interne 4,6 mm. Porosité estimée 70%

Solvants : Méthanol – Eau (+0,1 % d'acide formique) et Acétonitrile

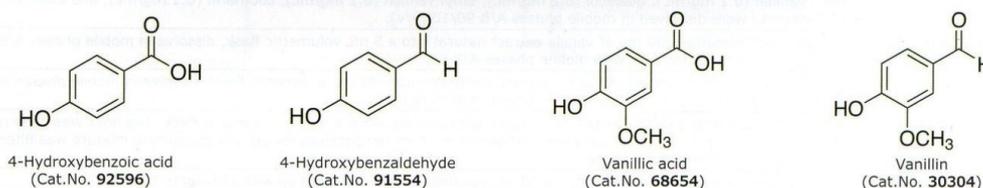
Injection automatique : 1- 25 µL

Détection - UV : barrette de diodes, longueur d'onde variable

Position de la vanne chargement / injection :



1.2. Solutés



Des solutions standards de vanilline, d'acide vanillique, d'aldéhyde 4-hydroxybenzoïque et d'acide 4-hydroxybenzoïque chacune à 5 mg.L⁻¹ et une solution des 4 en mélange.

2- MANIPULATION

2-1. Choix des conditions opératoires de départ

- ✓ Identification des différents modules du système chromatographique.
- ✓ Purger les pompes pour remplir les canalisations avec les solvants appropriés si nécessaire.
- ✓ Dimension de la colonne :
 - Longueur :
 - Diamètre interne :

- Diamètre de particule :

- ✓ A partir des caractéristiques de votre colonne, calculer le volume mort estimé de la colonne (porosité *estimée* : 0.7) et le débit de phase mobile à imposer au système pour travailler à la vitesse demandée. Calculer le temps mort que vous attendez.

Diamètre des particules	Vitesse de phase mobile <i>demandée</i>
5 μm	0,1 cm/s
3 et 3.5 μm	0.15 cm/s

⇒ Comment pouvez-vous justifier le choix de la vitesse de phase mobile ?

- ✓ Choix de la longueur d'onde de mesure (Cf annexes) :

2.2. Influence de la composition de la phase mobile sur la séparation

Influence sur les grandeurs de rétention (facteur de rétention et sélectivité).

- Equilibrer la colonne avec une composition initiale de phase mobile Eau-Méthanol (70-30), puis après équilibrage (5 à 10 volume mort) de la colonne injecter le mélange de solutés.

Comment peut-on identifier les solutés ?

Calculer k , α et R_s pour les différentes paires de solutés.

	tr	k	Calculer les différentes sélectivités (α)	R_s (1,2)	R_s (2,3)	R_s (3,4)	$R_{s_{\min}}$
Thiourée							
Vanilline (V)							
Acide vanillique (AV)							
Aldéhyde p-hydroxybenzoïque							
<i>Acide p-hydroxybenzoïque</i>							

- Modifier la teneur en modificateur organique de la phase mobile (80-20) puis après équilibrage de la colonne injecter le mélange de solutés.

Effectuer les mêmes calculs que précédemment

	tr	k	Calculer les différentes sélectivités (α)	Rs (1,2)	Rs (2,3)	Rs (3,4)	Rs _{min}
Thiourée							
Vanilline (V)							
Acide vanillique (AV)							
Aldéhyde p-hydroxybenzoïque							
<i>Acide p-hydroxybenzoïque</i>							

- Modifier une deuxième fois la teneur en modificateur organique de la phase mobile (90-10) puis après équilibrage de la colonne injecter le mélange de solutés.

Effectuer les mêmes calculs que précédemment

	tr	k	Calculer les différentes sélectivités (α)	Rs (1,2)	Rs (2,3)	Rs (3,4)	Rs _{min}
Thiourée							
Vanilline (V)							
Acide vanillique (AV)							
Aldéhyde p-hydroxybenzoïque							
<i>Acide p-hydroxybenzoïque</i>							

Vérifier l'efficacité de la colonne utilisée (ce calcul sera effectué pour des conditions expérimentales conduisant à des facteurs de rétention supérieurs à 1).

Débit	N Théorique	N observé

Quel est le rôle de l'acide formique dans la phase aqueuse ?

Représenter graphiquement l'évolution de :

$\ln(k) = f(\% \text{ modificateur organique})$

$t_r = f(\% \text{ modificateur organique})$

et $R_{s \text{ min}} = f(\% \text{ modificateur organique})$

$\alpha_{\text{min}} = f(\% \text{ modificateur organique})$

La superposition de ces courbes permet de faciliter l'interprétation des données.
Discussion sur l'intérêt de ces différentes représentations

Remplacer le méthanol par l'acétonitrile en se plaçant dans une gamme de force isoéluante.
Commenter les résultats obtenus (rétention, sélectivité, résolution) en milieu Acétonitrile.

⇒ Discuter des résultats.

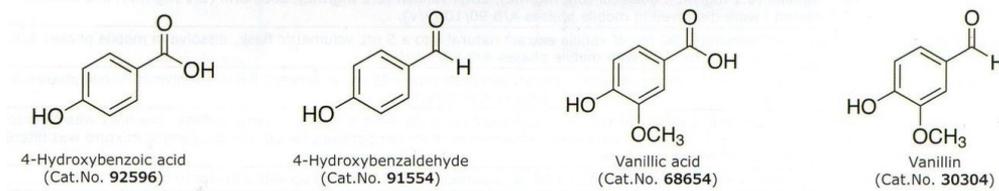
En fin de TP, merci de conditionner la colonne dans un mélange solvant/organique 80/20 (pour éviter de dégrader la colonne par hydrolyse en milieu aqueux) et ensuite d'arrêter le débit de la pompe.

TP 2. Analyse quantitative

Dosage de la vanilline, de l'acide vanillique, de l'aldéhyde 4-hydroxybenzoïque et de l'acide 4-hydroxybenzoïque contenus dans des extraits

1. MATERIEL

- Solutés



Solutions à disposition :

Des solutions standards de vanilline, d'acide vanillique, d'aldéhyde 4-hydroxybenzoïque et d'acide 4-hydroxybenzoïque chacune à 5 mg.L⁻¹.

Concentration (µg/L)

	Acide 4-hydroxybenzoïque	Aldéhyde 4-hydroxybenzoïque	Acide vanillique	Vanilline
= > STD 1	7	20	100	2100
= > STD 2	10	40	200	5200
= > STD 3	50	80	300	10200
= > STD 4	100	400	400	19700
= > STD 5	200	800	500	29400

Echantillons :

Vanille bourbon d'une eau de toilette (53,7 mg dilué dans 20 mL)

Oléorésine bourbon (22 mg dilué dans 50 mL)

- Système chromatographique

Colonne : silice greffée C₁₈, porosité estimée 70%.

Diamètre interne :

Diamètre des particules :

Longueur de la colonne :

- **Détection** : détecteur UV à barrette de diodes, longueur d'onde variable.

-**Phase mobile** : Acétonitrile / Eau (avec 0,1 % d'acide formique) : 13%/87%

Informations données :

Détecteur DAD :

- Détection à 260 nm, Bw : 4nm, Ref : 360nm, Bw : 100nm

Response time : >0.05min (1s)

Volume d'injection : 10 µL

2. MANIPULATION

2-1. Choix des conditions opératoires de départ

- ✓ Dimension de la colonne :
 - Longueur :
 - Diamètre interne :
 - Diamètre de particule :
- ✓ A partir des caractéristiques de votre colonne, calculer le volume mort estimé de la colonne (porosité *estimée* : 0.7) et le débit de phase mobile à imposer au système pour travailler à la vitesse demandée. Calculer le temps mort que vous attendez.

Diamètre des particules	Vitesse de phase mobile <i>demandée</i>
5 μm	0,1 cm/s
3 et 3.5 μm	0.15 cm/s

- ✓ Injecter un marqueur de temps mort, à partir du temps mort déterminer la porosité réelle de la colonne.

2-2. Tracer les droites d'étalonnage pour les 4 solutés.

A partir des solutions mises à disposition, tracer pour chaque soluté l'évolution de l'aire et de la hauteur des pics en fonction de la concentration.

Commenter ces courbes.

2-3. Doser les différents solutés dans les échantillons

Injecter dans les mêmes conditions les échantillons et déterminer la concentration de chaque soluté dans ces échantillons.

- ⇒ *Attention, entre chaque analyse d'échantillon, il est nécessaire de laver la colonne avec du solvant !*

2-4. Conclusion sur les échantillons

En vous aidant des informations données dans le contexte, commenter vos résultats

3. Expériences complémentaires optionnelles

- Injecter 5 fois la même solution : Conclusion

- Injecter un échantillon après avoir modifié le débit de la phase mobile :

=> Interprétation / Conclusion

- Injecter un échantillon après avoir modifié la composition de la phase mobile :

=> Interprétation / Conclusion

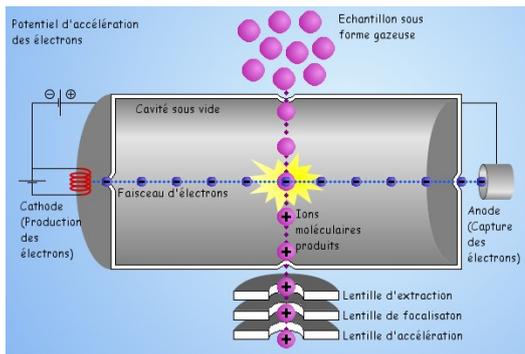
- Injecter la solution 5 (le mélange des 4 solutés à haute concentration) en réduisant le volume injecté (8, 4 et 2 μL par exemple) :

=> Interprétation / Conclusion

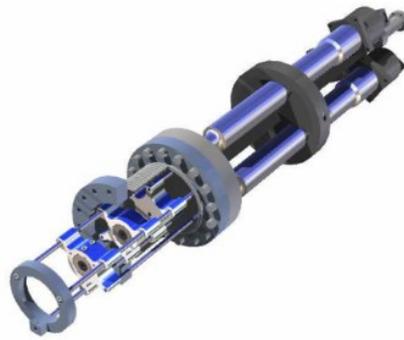
En fin de TP, merci de conditionner la colonne dans un mélange solvant/organique 80/20 (pour éviter de dégrader la colonne par hydrolyse en milieu aqueux) et ensuite d'arrêter le débit de la pompe.

TP 2. Analyse par Chromatographie Gazeuse couplé à la spectrométrie de Masse

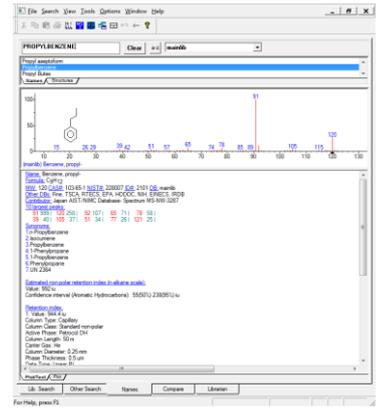
Analyse de différents échantillons



Source : Impact électronique (wikipedia)



Analyseur Simple Quad



Base de données NIST

Objectif : réaliser la séparation des composés présents dans différentes solutions, identifier des molécules par interrogation de la base NIST (spectre de masse et indices de Kovats).

Accès sur le site web : <http://webbook.nist.gov/chemistry/>

Activité préalable au TP :

Consulter la base NIST pour trouver le spectre de masse de l'hexanol et de l'éthylbenzène, leurs ions principaux ainsi que l'indice de Kovats de ces produits sur une phase stationnaire de type polydiméthylsiloxane.

1- Analyse d'un mélange test pour la prise en main de l'instrument :

Echantillon : Mélange de nonane (alcane en C9), décane (alcane en C10), hexanol et Ethylbenzène en solution dans l'heptane.

Méthode GC :

Colonne de type HP1 (longueur 30m/ diamètre interne 0,25 mm et épaisseur de film 0,25mm)
Température du four : isotherme à 85°C
Débit de gaz : 1,5 mL/min ($u=45$ cm/s – $t_m=1,11$ min) ; Split Ratio 10, température de l'injecteur 250°C et de la ligne de transfert 200°C

Méthode MS :

Start time (solvant delay) 1,5 min ; Scan 33-233 10Hz de 1,5 à 6 min ; Mode positif

Question de départ :

Quel est la nature du gaz vecteur et pourquoi ?

Comment choisir la vitesse du gaz vecteur en GC ?

Comment sont définis les indices de Kovats et leur intérêt ?

Quelles sont les espèces détectées dans un spectromètre de masse avec une source d'ionisation par impact électronique ?

Quelle est, outre sa compatibilité avec la chromatographie gazeuse, l'intérêt de ce mode d'ionisation ?

I- Réaliser l'analyse puis identifier les pics à l'aide de la base de données NIST

A partir des données en mode Scan, générer les chromatogrammes sur les ions caractéristiques de chacun des composés du mélange.

Conclure sur les possibilités d'analyse quantitative en l'absence de séparation complète des solutés.

II - On choisira ensuite un mode GC gradient que l'on conservera identique **pour toutes les analyses suivantes** afin de pouvoir exploiter les données NIST relatives aux indices de Kovats.

Méthode GC :

Colonne de type HP1 (longueur 30m/ diamètre interne 0,25 mm et épaisseur de film 0,25mm)
Température du four : Gradient de température de 80°C à 320°C avec une rampe à 20°C/min.
Débit de gaz : 1,5 mL/min ($u=45$ cm/s – $t_m=1,11$ min) ; Split Ratio 10, température de l'injecteur 250°C et de la ligne de transfert 200°C

Méthode MS :

Start time (solvant delay) 1,5 min ; Scan 35-350 10 Hz; Mode positif

a- Analyser le mélange d'alcane C9 à C19 dilué dans l'heptane pour connaître les temps de rétention de ces alcanes sur le gradient choisi.

Etablir un tableau reliant les temps de rétention des différents alcanes aux indices de Kovats correspondant.

Quel est l'intérêt d'étalonner la méthode avec les indices de Kovats.

b- Authentification de la naturalité d'une huile essentielle de wintergreen (*Gaultheria genus*) par HC-MS.

Contexte :

L'huile essentielle de gaulthérie (wintergreen), extraite par distillation à la vapeur des feuilles du genre *Gaultheria*, est principalement utilisée en aromathérapie. En raison de sa très forte concentration en ester aromatique (salicylate de méthyle), la gaulthérie est reconnue dans le domaine des huiles essentielles. Le salicylate de méthyle représente plus de 99% de la composition de la plupart des espèces de gaulthéries après un processus de bidistillation [Cong et al., 2015; Nikolić et al., 2013; Singh et al., 2018]. Le parfum de gaulthérie peut être utilisé en parfumerie, en cosmétique et dans l'industrie alimentaire, mais ses principales utilisations concernent l'aromathérapie, les soins bucco-dentaires et son utilisation comme conservateur en cosmétique. De nombreuses pommades utilisées en aromathérapie sont composées d'huile essentielle de gaulthérie [Mukhopadhyay et al., 2016] en raison de ses propriétés analgésiques et anti-inflammatoires [Delplancq, 2015; Liu et al., 2013; Michel et al., 2014; Park et al., 2011], qui soulagent efficacement la douleur causée par la fièvre musculaire [Ribnicky et al., 2003]. Des propriétés antispasmodiques, vasodilatatrices et stimulants hépatiques d'huile essentielle ont également été signalés [Franchomme et al., 2012]. La gaulthérie possède d'autres propriétés utiles pour diverses applications. Par exemple, l'huile essentielle de gaulthérie est utilisée comme biopesticide [Dayan et al., 2009] dans les cultures vivrières et dans les emballages alimentaires en raison de ses propriétés repoussantes pour certains

insectes et animaux [Jeyasankar, 2012; Prakash et Prakash, 2015], et il est utilisé comme conservateur naturel en cosmétique en raison de ses activités antioxydantes et antibactériennes. Cependant, en raison de sa facilité d'adultération avec un matériau synthétique, il est nécessaire de contrôler la naturalité des échantillons avec précision. En effet, les fournisseurs souhaitant augmenter illégalement leurs bénéfices sont enclins à l'adultérer de leur produit naturel en ajoutant des matières synthétiques qui sont moins chers. Pour la récolte 2018, le prix de l'huile essentielle de La Chine se situait entre 50 et 65 euros le kilogramme. La méthode d'adultération la plus courante de l'huile essentielle de gaulthérie est l'addition ou substitution du salicylate de méthyle synthétique. Cette molécule synthétique peut être préparé par plusieurs voies chimiques différentes (Fig. 1).

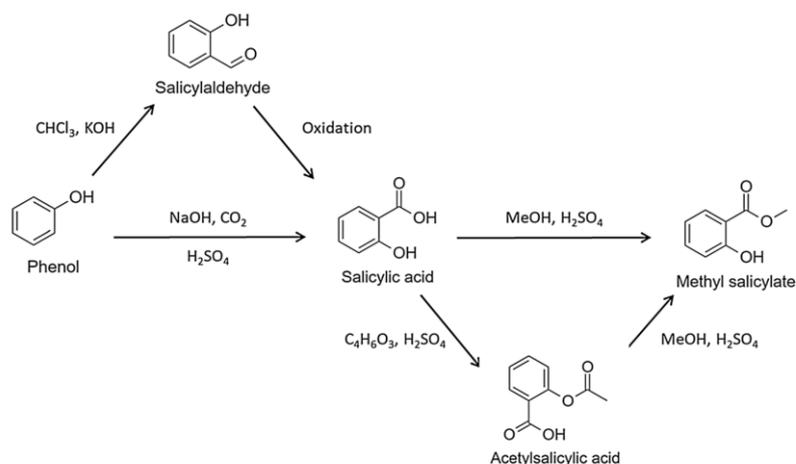


Fig. 1. Principal synthetic paths to synthesize methyl salicylate.

Il est donc nécessaire de développer des méthodologies pour authentifier cette huile essentielle. L'huile essentielle de gaulthérie authentique peut être distinguée des huiles frelatées en examinant leurs compositions. La détection des marqueurs synthétiques du salicylate de méthyle (4-hydroxybenzoate de méthyle, 4-hydroxyisophtalate de diméthyle) ou 2-hydroxyisophtalate de diméthyle) ou l'absence de plusieurs les métabolites secondaires (salicylate d'éthyle) contribuent à l'authentification.

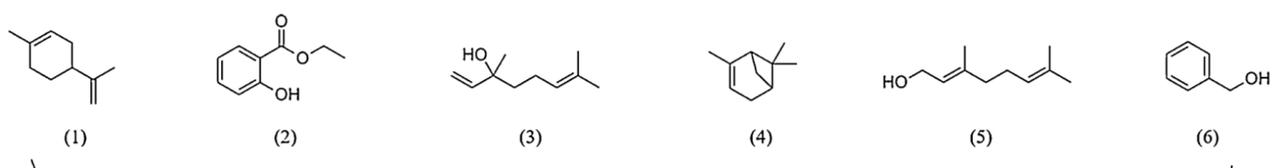


Fig. 2. Structure of major compounds of the essential oil of wintergreen and of resultant impurities from methyl salicylate synthesis. (1) Limonene; (2) ethyl salicylate; (3) linalool; (4) α -pinene; (5) geraniol; (6) benzyl alcohol.

Composés	Cas	Indice de Kovats (colonne HP1)	Huiles authentic de gaultheria	Methyl salicylate	Huile adultérée
			Min-Max	Min-Max	Min-Max
α -Pinene	80-56-8	932	0.00-0.05	0	0.00-0.59
Benzyl alcohol	100-51-6	1004	tr.-0.04	0	0.00-0.02
Limonene	470-82-6	1023	0.00-0.01	0	0
Linalool	78-70-6	1083	tr.-0.11	0	0.00-0.46
Geraniol	106-24-1	1233	0.00-0.06	0	0.00-00.01
Methyl Salicylate	119-36-8	1169	97.36-99.71	96.36-99.93	94.94-99.76
Ethyl Salicylate	118-61-6	1245	0.05-0.5	0.00-0.04	0.00-0.05
Methyl 2-Hydroxybenzoate	606-45-1	1295	0.00-0.01	0.00-0.08	0.00-0.01
Methyl 4-Hydroxybenzoate	202-785-7	1410	Nd	0.00-0.06	0.00-0.04
Dimethyl 4-Hydroxyisophtalate	5985-24-0	1573	Nd	0.00-0.19	0.00-0.068
Dimethyl 2-Hydroxyisophtalate	36669-06-4	1611	Nd	0.00-trace	0.00-0.03

Le suivi des methyl hydroxybenzoate et methyl hydrophthalate peut être réalisé à partir des données suivante : Les paramètres SIM étaient comme suit: les ions de masse ciblés (m / z) étaient de 91 (ion tropylium), 121 (M - CH₃O) et 152 (ion moléculaire) pour détecter le méthyle 4-Hydroxybenzoate et 120 (réarrangement ortho), 147 (double perte de CH₃OH (méthanol) et CH₃O), 178 (perte de CH₃OH) et 210 (ion) pour détecter le 4-hydroxyisophtalate de diméthyle et le 2-hydroxyisophtalate de diméthyle.

Expérience complémentaire optionnelle : Analyser un parfum dilué dans l'heptane : rechercher le linalol et le benzoate de benzyl sur le chromatogramme.



Bibliographie :

- Cong, F., Joshi, K.R., Devkota, H.P., Watanabe, T., Yahara, S., 2015. Dhasingreoside: new flavonoid from the stems and leaves of *Gaultheria fragrantissima*. Nat. Prod. Res. 29,1442–1448.
- Dayan, F.E., Cantrell, C.L., Duke, S.O., 2009. Natural products in crop protection. Bioorg.Med. Chem. Modern Trends Agrochem. 17, 4022–4034.
- Delplancq, C., 2015. Derives salicyles issus de *Gaultheria yunnanensis*: activites anti-inflammatoires et analgesiques, toxicite et données pharmacocinetiques.
- Nikolić, M., Marković, T., Mojović, M., Pejin, B., Savić, A., Perić, T., Marković, D., Stević, T., Soković, M., 2013. Chemical composition and biological activity of *Gaultheria procumbens* L. essential oil. Ind. Crops Prod. 49, 561–567.
- Franchomme, P., Jollois, R., Penoel, D., 2012. L'aromatherapie exactement : encyclopedie de l'utilisation therapeutique des huiles essentielles : fondements, demonstration, illustration et applications d'une science medicale naturelle. Roger Jollois, Limoges.
- Jeyasankar, A., 2012. Antifeedant, insecticidal and growth inhibitory activities of selected plant oils on black cutworm, *Agrotis ipsilon* (Hufnagel) (Lepidoptera: Noctuidae). Asian Pac. J. Trop. Dis. 2, S347–S351.
- Singh, V., Gunjan, Ali, M., 2018. Isolation of volatile constituents and biological studies of aerial parts of *Gaultheria procumbens* L. Int. J. Green Pharm. IJGP 11.
- Liu, W.-R., Qiao, W.-L., Liu, Z.-Z., Wang, X.-H., Jiang, R., Li, S.-Y., Shi, R.-B., She, G.-M., 2013. *Gaultheria*: phytochemical and pharmacological characteristics. Molecules 18, 12071–12108.
- Michel, P., Dobrowolska, A., Kicel, A., Owczarek, A., Bazylko, A., Granica, S., Piwowarski, J., Olszewska, M., 2014. Polyphenolic profile, antioxidant and anti-inflammatory activity of eastern teaberry (*Gaultheria procumbens* L.) leaf extracts. Molecules 19, 20498–20520.
- Mukhopadhyay, M., Bantawa, P., Mondal, T.K., Nandi, S.K., 2016. Biological and phylogenetic advancements of *Gaultheria fragrantissima*: economically important oil bearing medicinal plant. Ind. Crops Prod. 81, 91–99.
- Park, I.-K., Seo, S.-M., Kim, J., 2011. Nematicidal activity of plant essential oils and components from *Gaultheria fragrantissima* and *Zanthoxylum alatum* against the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. Nematology 13, 87–93.
- Prakash, K., Prakash, B., 2015. Assessment of toxicity, antifeedant activity, and biochemical responses in stored-grain insects exposed to lethal and sublethal doses of *Gaultheria procumbens* L. essential oil. J. Agric. Food Chem. 63, 10518–10524.

Relations de chromatographies

Facteur de rétention :

$$k = \frac{tr_i - t_m}{t_m}$$

où

 tr_i : temps de rétention du composé i t_m : temps mort de la colonne

Sélectivité :

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1}$$

où

 k_2 : facteur de rétention du 2^{ème} composé k_1 : facteur de rétention du 1^{er} composé

Résolution :

$$Rs = \frac{\sqrt{N}}{2} \times \frac{(tr_2 - tr_1)}{(tr_2 + tr_1)}$$

où

N : efficacité de la colonne

 tr_2 : temps de rétention du 2^{ème} composé tr_1 : temps de rétention du 1^{er} composé

Spectres UV Visibles :

