

Partenariat Analyse Authenticité Arômes



Focus

Analyse isotopique dans le contrôle de la conformité des arômes naturels

Juillet 2024



www.aromalyse.com



www.betalabservices.com



www.eurofins.fr



www.sniaa.org



Ce document a été élaboré par le Comité Scientifique du Partenariat Analyse Authenticité Arômes (P3A). P3A, construit entre le SNIAA et plusieurs laboratoires d'analyses, a pour but de renforcer la confiance envers à la fois les résultats des laboratoires d'analyses et les productions des entreprises productrices d'arômes.

Les membres du partenariat P3A sont en effet fréquemment sollicités afin que soient pratiquées des analyses visant à confirmer la conformité des arômes naturels.

Le Comité Scientifique P3A a décidé la rédaction de plusieurs documents ayant pour objectif d'apporter des éléments pratiques et explicatifs du rôle de chacune de ces méthodes d'analyse dans le contrôle de la conformité des arômes naturels.

1. Isotopes et isotopomères

2. Les différentes données isotopiques

3. L'enrichissement des isotopes stables ou distribution isotopique

3.1. Cas du carbone-13

3.2. Cas du Deutérium (^2H) et de l'Oxygène-18

3.3. Cas de l'azote 15

3.4. Cas du soufre 34

4. Fractionnement isotopique lié aux procédés de fabrication des arômes

5. Techniques d'analyse isotopique

5.1. La Spectrométrie de Masse de Rapport Isotopique (SMRI ou IRMS en anglais)

5.1.1. Analyseur élémentaire (AE/SMRI ou EA-IRMS en anglais)

5.1.2. Couplage avec la chromatographie en phase gazeuse (CG-Combustion-SMRI ou GC-c/p-IRMS en anglais)

5.2. La Résonance Magnétique Nucléaire

6. Application de l'analyse isotopique au cas de la vanilline

7. Isotopie et conformité réglementaire

1. Isotopes et isotopomères

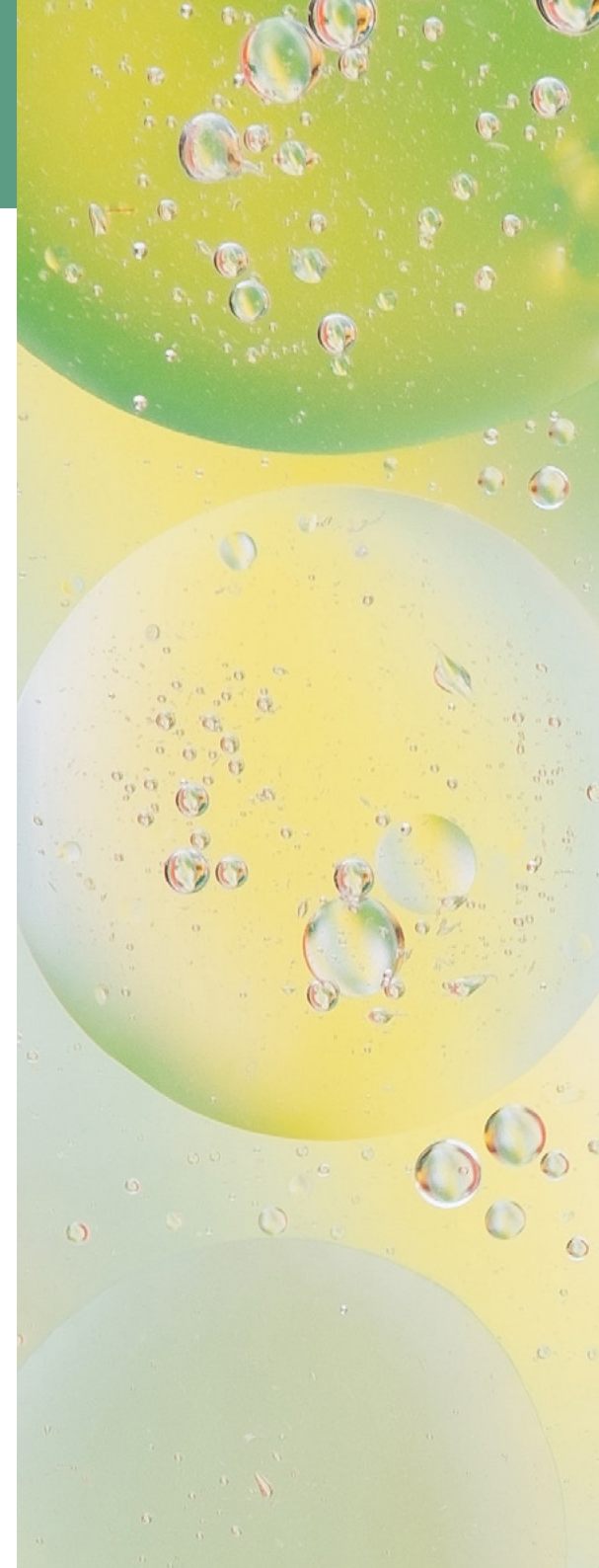
Un élément chimique est composé d'un noyau, lui-même composé de nucléons (protons et neutrons), autour duquel gravitent des électrons. Le numéro atomique Z , qualifiant à la fois le nombre de protons et d'électrons, permet de caractériser chaque élément. La masse du proton ($m_{\text{proton}}=1,67625.10^{-27}$ kg) et celle du neutron ($m_{\text{neutron}}=1,67495.10^{-27}$ kg) sont très proches et bien largement supérieures à celle de l'électron ($m_{\text{électron}}=9,10953.10^{-31}$ kg).

Ainsi, la masse de l'atome est alors quasiment assurée par celle du noyau et, de ce fait, est caractérisée par son nombre de masse, noté A , correspondant au nombre de nucléons (Z protons + $(A-Z)$ neutrons).

Les atomes qui ont le même numéro atomique Z mais un nombre de masse A différent, soit un nombre de neutrons différent, sont appelés *isotopes*. Ces derniers, ayant le même numéro atomique, appartiennent donc au même élément et sont en conséquence situés à la même position dans la classification périodique.

L'isotope de plus grand nombre de masse sera dit lourd (exemple pour le carbone : ^{13}C) par opposition à l'isotope léger (pour le carbone : ^{12}C) de plus faible nombre de masse¹.

¹ Cette notion s'applique particulièrement aux atomes de C, H, O, N et S les plus fréquemment rencontrés dans les molécules organiques telles que celles constituant les arômes.





On peut distinguer deux types d'isotopes :

- > les isotopes stables : ils sont pourvus d'un noyau de structure stable, qui ne subit aucune modification au cours du temps en l'absence d'apport d'énergie extérieure,
- > les isotopes radioactifs : ils sont pourvus d'un noyau instable qui se transforme spontanément en un autre avec émission d'un rayonnement ou d'une particule.

Des *isotopomères* sont des molécules de même composition et de même configuration dans lesquelles un des atomes a été substitué par un de ses isotopes les moins abondants. Du fait de l'abondance naturelle très faible des isotopes lourds (Tableau 1), la probabilité de détecter une molécule contenant deux ou plusieurs isotopes lourds du même élément est négligeable. Par conséquent, un isotopomère est défini comme étant une molécule ne possédant qu'un seul atome lourd.

Élément	Isotopes stables	Abondance naturelle moyenne (en %)
Hydrogène	^1H	99.9844
	^2H (ou D)	0.0156
Carbone	^{12}C	98.891
	^{13}C	1.108
Oxygène	^{16}O	99.759
	^{17}O	0.037
	^{18}O	0.204
Azote	^{14}N	99.635
	^{15}N	0.365

Tableau 1 : Isotopes stables des principaux éléments constitutifs des molécules aromatisantes, et leurs abondances naturelles.

2. Les différentes données isotopiques

Les paramètres servant à décrire et à mesurer les phénomènes de répartition isotopique sont définis comme suit :

L'*abondance isotopique*, notée A_i et exprimée en ppm, indique la proportion relative de l'isotope lourd considéré. C'est en quelque sorte une « fraction molaire isotopique » :

$$A_i = \frac{\text{isotope (lourd)}}{\text{isotope (lourd)} + \text{isotope (léger)}} \quad (\text{exemple du carbone } A_{\text{carbone}} = \frac{{}^{13}\text{C}}{{}^{13}\text{C} + {}^{12}\text{C}})$$

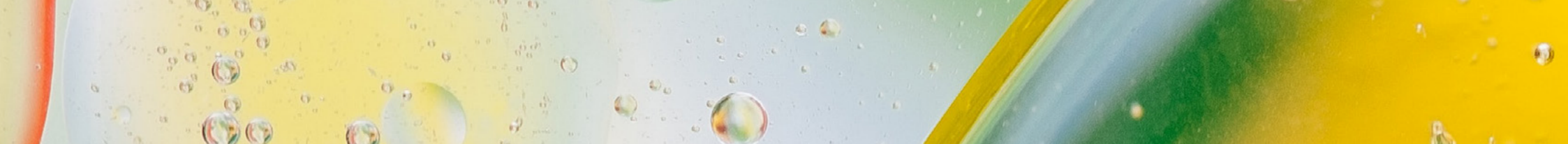
Le *rapport isotopique*, noté R_i et exprimé en ppm, est défini comme le quotient du nombre d'isotopes lourds sur le nombre d'isotopes légers d'un élément donné :

$$R_i = \frac{\text{isotope (lourd)}}{\text{isotope (léger)}} \quad (\text{exemple du carbone } R_{\text{carbone}} = \frac{{}^{13}\text{C}}{{}^{12}\text{C}})$$

Ces deux paramètres (R_i et A_i) sont variables d'un composé à l'autre. Cependant, leur valeur peut être difficile à manier, car on observe de faibles variations sur de faibles quantités. On préfère alors exprimer cette même réalité physique à l'aide d'un troisième paramètre relatif appelé *déviaton isotopique*, notée δ et exprimée en ‰, défini selon la formule suivante :

$$\delta = 1000 \times \frac{R_{\text{éch}} - R_{\text{ref}}}{R_{\text{ref}}}$$

$R_{\text{éch}}$ et R_{ref} étant respectivement les rapports isotopiques de l'échantillon à mesurer et de l'échantillon de référence.



L'utilisation des matériaux de référence calibrés par rapport aux références internationales (citées dans le Tableau 2) permet de réaliser une inter-calibration entre appareils de mesure mais également entre laboratoires.

Cette déviation isotopique permet ainsi d'apprécier de faibles différences de teneurs isotopiques.

Elément	Molécule	Désignation	Origine	A (ppm)	R (ppm)
Carbone	CaCO ₃	PDB (Pee Dee Belemnite)	Calcaire de Caroline du Sud	11112.33	11237.2 (±2.9)
Hydrogène	H ₂ O	V.SMOW (Vienna Standard Mean Ocean Water)	Mélange d'eaux océaniques	155.74	155.76 (±0.05)
Oxygène	H ₂ O	V.SMOW	Mélange d'eaux océaniques	2001.2	2005.2 (±0.43)
Azote	N ₂	Air	Azote atmosphérique	3663	3676.5 (±2.9)

Tableau 2 : Références internationales utilisées pour l'analyse isotopique

3.L'enrichissement des isotopes stables ou distribution isotopique

3.1. Cas du carbone-13

Au cours de la photosynthèse (Figure 1), l'assimilation du dioxyde de carbone atmosphérique par les végétaux s'effectue selon différents métabolismes. Seule cette partie de la photosynthèse, ayant un effet isotopique notable sur les plantes, sera expliquée ici.

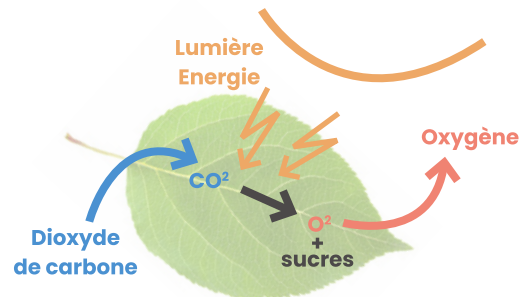


Figure 1 : Représentation simplifiée de la photosynthèse

Trois principaux types de métabolismes primaires sont possibles présentant un fractionnement isotopique différent conduisant à des distributions isotopiques différentes :

- > Le métabolisme C3 (car intermédiaire à 3 carbones), appelé cycle de Calvin, de loin le plus répandu avec 98% des plantes vertes qui y sont sujettes telles que la vigne, l'oranger, le blé, le tournesol et la betterave,
- > Le métabolisme C4 (car intermédiaire à 4 carbones), appelé Hatch et Slack, représenté par la canne à sucre et le maïs entre autres.
- > Le métabolisme CAM (Crassulacean Acid Metabolism), comparable au métabolisme C4, mais différencié dans le temps (les phases du métabolisme C4 ne se font pas en continu mais en alternance jour/nuit). Il est moins observé car il concerne seulement les plantes dites « grasses » comme le cactus, l'ananas, le vanillier ou encore l'agave.

Il est connu que les molécules naturelles issues de ces plantes conservent une signature isotopique spécifique de l'environnement et de ces modes de photosynthèse. Ainsi, les produits issus des plantes C4, tels que les sucres et l'alcool dérivé par fermentation, présentent des teneurs en carbone-13 plus élevées que celles de leurs homologues provenant des plantes C3. La mesure de la teneur en carbone-13 permet alors de détecter et quantifier le sucre d'origine C4 (sucre de canne ou isoglucose de maïs) ajouté aux produits dérivés des plantes de type C3 comme par exemple le vin ou le miel afin de conclure sur l'adultération du produit (notamment en cas d'allégation d'origine botanique).

Concernant les valeurs types, les plantes C3 possèdent une déviation $\delta^{13}\text{C}$ entre - 33‰ et -20‰ en moyenne. Pour les plantes C4, cette valeur se situe entre -14‰ et -9‰. Ainsi, chaque substance naturelle possède une déviation isotopique caractéristique (Figure 2). Par conséquent être capable de mesurer avec une précision suffisante les rapports isotopiques du carbone ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) d'une molécule permet de remonter au métabolisme primaire du végétal qui l'a produite. En s'appuyant sur des bases de données ad hoc, l'isotopie apparaît comme un véritable traceur des origines botaniques ou géographiques et permet par ailleurs de différencier des molécules selon l'origine naturelle ou synthétique des atomes de carbone qu'elles contiennent.

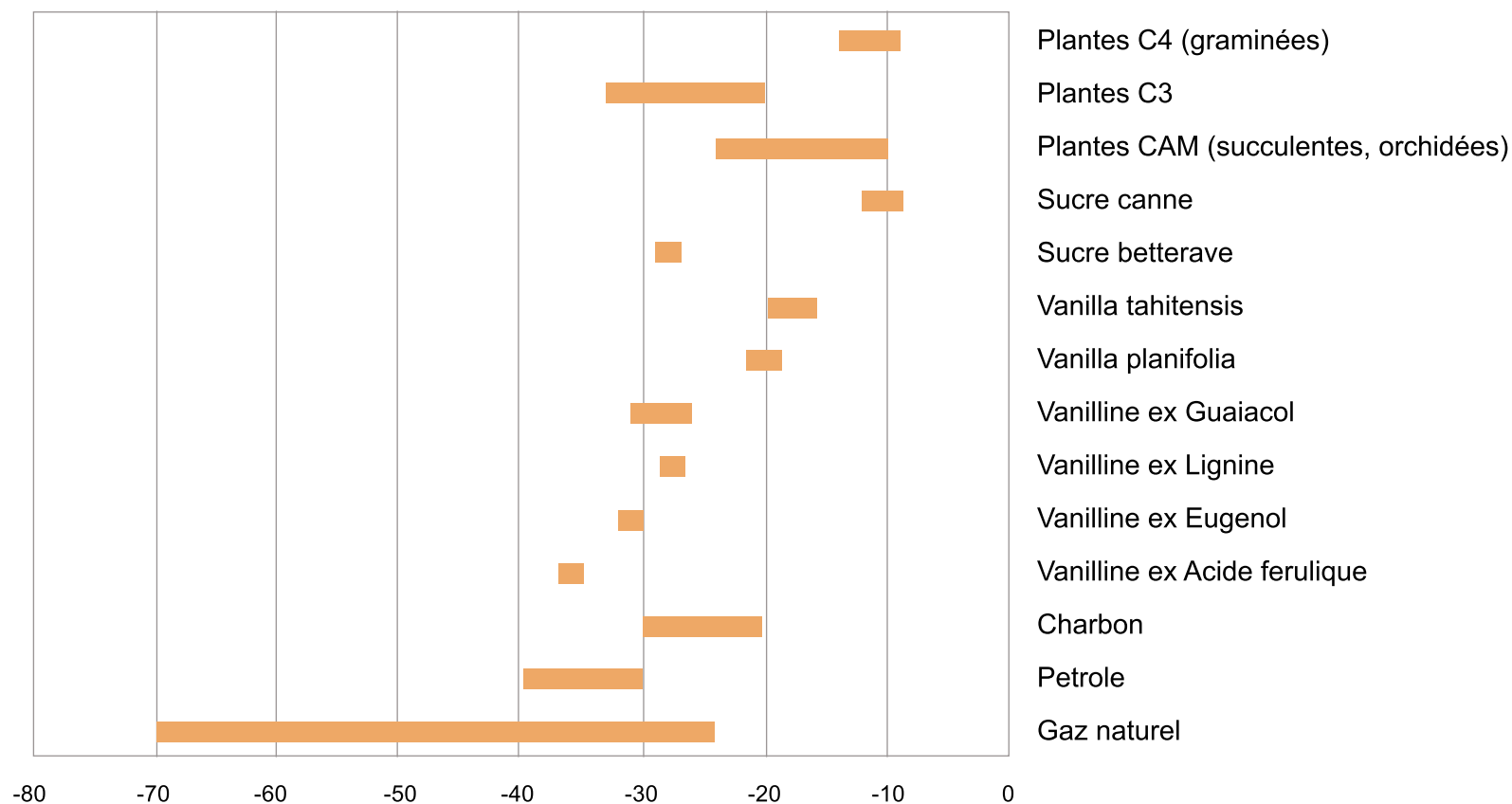


Figure 2 : Déviations isotopiques $\delta^{13}\text{C}$ moyennes (en ‰) de différents produits naturels.

3.2. Cas du Deutérium (^2H) et de l'Oxygène-18

L'eau douce (pluie, irrigation, ...) est la seule source d'hydrogène (^1H) pour la photosynthèse. À la différence des valeurs de déviations isotopiques du carbone-13 qui restent globalement identiques quel que soit la zone géographique dont est issue la plante, les teneurs en deutérium (^2H) dans les végétaux peuvent beaucoup varier. Les teneurs en isotopes lourds ^2H et ^{18}O de l'eau d'irrigation dépendent de nombreux facteurs parmi lesquels des facteurs géographiques, climatiques, de latitude, d'altitude... Tous ces facteurs induisent une grande disparité des rapports isotopiques en deutérium de l'eau, qui, à son tour, influence l'abondance isotopique en deutérium dans la biomasse.

L'évapotranspiration des plantes est également un facteur de fractionnement isotopique important. Ainsi une plante aérienne comme la vigne présente une plus forte évapotranspiration que les plantes souterraines comme la betterave. Ceci va se traduire par un enrichissement plus important en deutérium dans les sucres issus du raisin que dans ceux issus de la betterave.

La mesure de la déviation isotopique du deutérium permet la plupart du temps de vérifier l'origine naturelle ou synthétique d'une substance. En première intention, cette mesure identifie donc l'utilisation d'un procédé de synthèse chimique (non naturel) lors de l'obtention d'une substance.



Plus généralement, la valeur de la déviation isotopique du deutérium est utilisée combinée avec la valeur de déviation isotopique du carbone-13 lorsque l'analyse de la déviation isotopique du carbone ne porte pas un caractère suffisamment discriminant pour statuer sur la naturalité ou l'origine d'une substance (Figure 3).

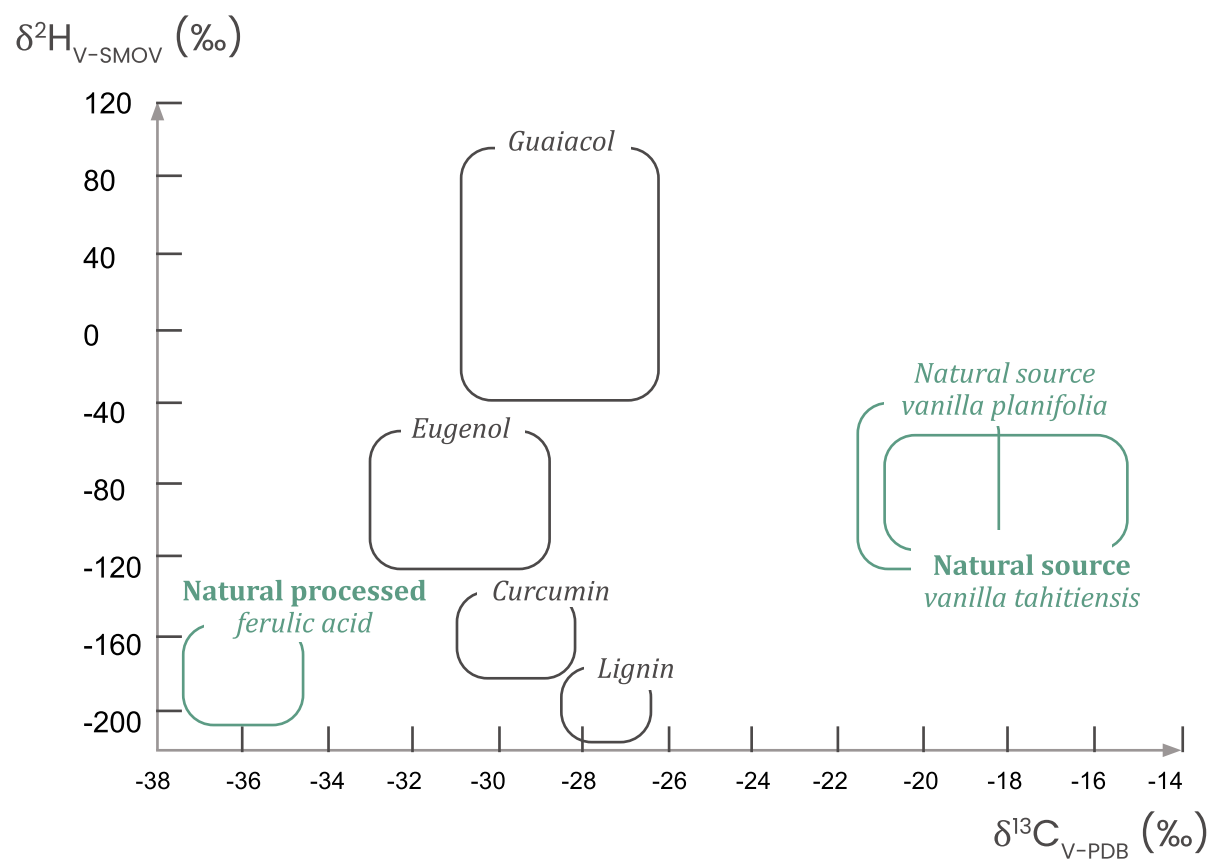


Figure 3 : Déviations isotopiques $\delta^{13}\text{C}/\delta^2\text{H}$ moyennes (en ‰) de vanilline²

² Christoph N, Schellenberg A, Zander W, Krammer G. Stable isotope ratio analysis for authenticity control. Handbook of Odour, Springer 2016, 439-458

3.3.Cas de l'azote 15

La déviation isotopique de l'azote donne une information sur le niveau trophique du composé : dans la nature, une origine minérale ou fossile aura une déviation proche de 0‰ (vs AIR), une origine végétale aux environs de 3‰ et une origine animale aux environs de 6‰.

Par ailleurs, dans le cas de réactions chimiques attaquant les fonctions/groupements chimiques contenant de l'azote, le paramètre $\delta^{15}\text{N}$ va devenir un vrai traceur d'origine du produit.

Par exemple la caféine naturelle présente des déviations entre -1‰ et +6‰ alors que la caféine synthétique a des valeurs beaucoup plus négatives, entre -10‰ et -30‰.

Le paramètre $\delta^{15}\text{N}$ est aussi intéressant pour vérifier la naturalité des acides aminés (leucine, cystéine, ...), et pour vérifier le caractère biologique ou conventionnel de certains produits. C'est aussi un paramètre pertinent pour le contrôle d'origine (céréales, viandes, miel, laits et produits laitiers).

3.4. Cas du soufre 34

Le rapport des isotopes du soufre $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ est également un paramètre permettant de tracer l'origine du produit. En effet, il est impacté par la proximité de la mer (dépôts marins) et est également fortement dépendant des activités anthropogéniques. Il va donc être un paramètre informatif pour le contrôle d'origine des produits (animaux notamment qui en contiennent plus que les végétaux).

Également lors des synthèses organiques, l'utilisation de groupements soufrés va induire un enrichissement de la teneur en isotopes du soufre. Il est mesuré par rapport au standard international CDT (Canyon Diablo Troilite). Plus récent dans son utilisation en routine dans les laboratoires en raison de ses contraintes (dangerosité du gaz de référence SO_2 , risque de colmatage, ...), il est depuis le début des années 2010 bien maîtrisé en raison de progrès technologiques instrumentaux et est intégré dans les packages de contrôle d'origine car très informatif.



4. Fractionnement isotopique lié aux procédés de fabrication des arômes

L'écart de masse entre les isotopes confère aux atomes et aux molécules des propriétés physiques et chimiques sensiblement différentes. Lors d'un procédé de fabrication impliquant une transformation, on admet qu'il y a *fractionnement isotopique* lorsque le rapport de deux isotopes d'un même élément est différent dans les molécules initiales et dans les molécules produites. Ce fractionnement est la conséquence de deux types d'effets isotopiques, cinétique et thermodynamique, et accompagne souvent la transformation d'espèces chimiques.

Ce fractionnement isotopique peut varier selon :

- > L'espèce/varété botanique utilisée et son origine géographique : on parle alors de distribution isotopique (cf. partie 3.),
- > Les transformations physiques, chimiques ou biochimiques intervenant lors de l'élaboration d'un produit.

Comme expliqué précédemment, la mesure de la déviation isotopique en isotopes stables permet non seulement de tracer l'origine géographique et/ou l'origine botanique d'une substance mais également d'obtenir des indices sur le mode de fabrication de celle-ci (procédé naturel ou de synthèse).

Lorsque l'on désire mesurer la déviation isotopique d'un composé présent au sein d'une matrice complexe et que pour ce faire une étape de purification / extraction est nécessaire, il est important de s'assurer préalablement que les procédés physico-chimiques mis en œuvre n'induisent pas une ségrégation isotopique qui influencerait sur le résultat analytique.

5. Techniques d'analyse isotopique

5.1. La Spectrométrie de Masse de Rapport Isotopique (SMRI ou IRMS en anglais)

La Spectrométrie de Masse de Rapport Isotopique (SMRI – plus communément nommée selon l'acronyme anglais IRMS) est un outil incontournable de l'analyse isotopique. L'utilité de cette méthode est démontrée dans le domaine de l'authenticité car elle permet la détermination exacte du rapport isotopique d'un élément (H, C, O, N ou S) au sein d'une molécule.

A partir de la valeur de ce rapport, une différenciation peut être faite entre deux molécules de structures identiques mais d'origines différentes. Cette détermination peut être réalisée grâce à l'alliance de la technique d'IRMS avec des méthodes de séparation chromatographiques, des analyseurs élémentaires ou des systèmes de pyrolyse ou d'équilibration. Ces couplages permettent l'analyse de toutes sortes d'échantillons : solides, liquides ou gazeux, y compris des mélanges complexes.

La rapidité, la spécificité et la sensibilité de la détection de l'IRMS facilitent le dosage des éléments et des composés ciblés présents en très faibles quantités, tout en fournissant des informations sur les teneurs isotopiques en abondance naturelle.

Le principe de l'IRMS consiste à mesurer les rapports isotopiques d'un analyte transformé en gaz simples, qui sont représentatifs de l'échantillon initial. Le système peut mesurer les rapports isotopiques D/H, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ ou $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ présents dans la structure de la molécule.



5.1.1. Analyseur élémentaire (AE/SMRI ou EA-IRMS en anglais)

L'analyseur élémentaire (AE) permet d'obtenir le pourcentage en carbone, hydrogène, azote, oxygène et soufre d'un échantillon organique et convertit l'échantillon en gaz élémentaires analysables par le spectromètre de masse isotopique (Figure 4). L'absence d'étape de séparation moléculaire limite l'utilisation de ce couplage à des composés de grande pureté. Ce couplage revêt aussi un intérêt certain pour l'analyse de

composés inorganiques, de polymères ou autres composés thermolabiles et non analysables par chromatographie gazeuse tel que l'acide férulique (précurseur de la vanilline obtenue par procédé biotechnologique).

Un autre intérêt de ce couplage réside dans le fait qu'il permet l'utilisation d'une grande partie des étalons internationaux de l'IAEA (International Atomic Energy Agency,

en français l'AIEA) qui sont majoritairement non analysables par chromatographie gazeuse tels que le NBS22 (huile), le SLAP (eau), le GISP (eau), l'IAEA-CH-3 (cellulose), l'IAEA-CH-6 (sucrose), ... nécessaires à la calibration des gaz de référence.

Les échantillons à analyser peuvent être sous forme solide ou liquide suivant le type de passeur installé sur l'appareil.

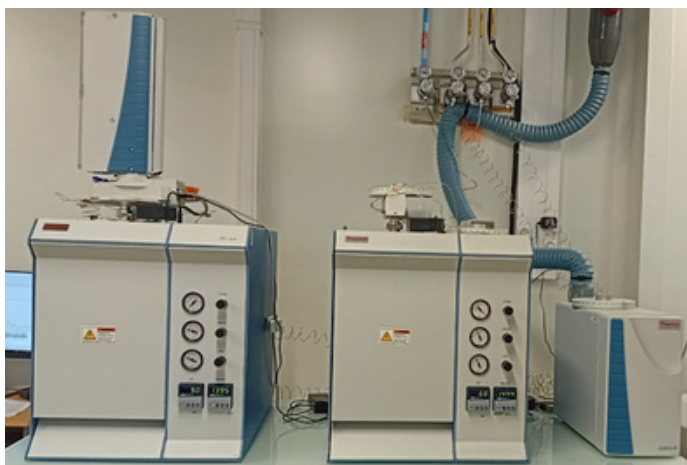


Figure 4 : Exemple de couplage EA/IRMS

5.1.2. Couplage avec la chromatographie en phase gazeuse (CG-Combustion-SMRI ou GC-c/p-IRMS en anglais)

Le couplage d'un spectromètre de masse à rapport isotopique avec un chromatographe en phase gazeuse rend possible les analyses isotopiques des molécules présentes dans des mélanges complexes avec ou sans étapes préalables de purification.

Le pouvoir séparatif de la chromatographie en phase gazeuse permet d'isoler une molécule cible de manière à la transformer en gaz élémentaire par l'intermédiaire d'un four de combustion ou de pyrolyse. Les différents isotopomères (ions de différentes combinaisons isotopiques) constituant le gaz élémentaire³ formé sont ensuite analysés par l'IRMS sur la base de leurs différences de masse afin de déterminer la signature isotopique de la molécule d'intérêt.

³On entend par gaz élémentaire, les gaz issus de la combustion ou pyrolyse de la substance analysée tels que CO_2 , H_2 , O_2 , N_2 ...

5.2. La Résonance Magnétique Nucléaire

La spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) est une technique non-destructive de caractérisation de molécules, exploitant les propriétés magnétiques des noyaux (Figure 5). Elle permet notamment de déterminer la structure développée d'une molécule ainsi que sa conformation dans l'espace. Elle peut être utilisée pour des échantillons à l'état liquide, solide ou cristal liquide. Beaucoup utilisée en synthèse organique sur les noyaux hydrogène et carbone-13 pour identifier les composés synthétisés, la RMN est aussi intrinsèquement quantitative. Commercialisée couramment en haut champ (minimum 400MHz), elle permet donc de quantifier la distribution des isotopes sur chaque site de la molécule.



Figure 5 : Exemple d'un spectromètre RMN

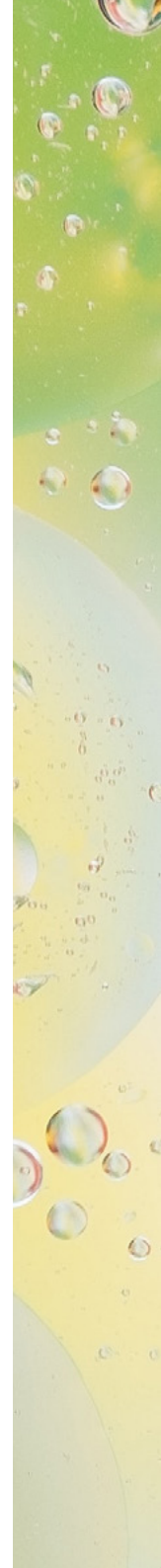
La technique RMN-FINS (SNIF-NMR® en anglais pour Site-specific Natural-Isotope Fractionation by Nuclear Magnetic Resonance) permet la quantification de l'enrichissement en deutérium ou ^{13}C sur les différents sites d'une molécule, apportant des possibilités de discrimination supplémentaires par rapport à l'IRMS. En effet, la distribution en deutérium et carbone-13 sur les différents sites d'une molécule n'est pas organisée de manière statistique mais dépend directement de l'origine de la molécule et de sa biosynthèse. Cette mesure apporte donc une « empreinte » très précise du composé analysé. Le calcul des rapports isotopiques pour les différents sites s'effectue à partir des surfaces des différents pics du spectre RMN, converties en rapports ou déviations isotopiques par étalonnage interne au moyen d'un composé de référence dont la composition isotopique est précisément connue, ou par mesure du ratio global en IRMS.

À l'origine la méthode SNIF-NMR fut développée en réponse à un appel d'offres gouvernemental par le Pr Gérard Martin et son équipe à l'université de Nantes, dans le but de détecter l'ajout de sucre dans les vins (chaptalisation) et l'enrichissement des moûts de raisin. (G. Martin et al, 1981⁴). Elle a ensuite été étendue à de nombreuses substances naturelles à forte valeur ajoutée, dont les substances aromatisantes.

Une des limitations de la RMN du deutérium provient de son manque de sensibilité, directement lié à la faible abondance naturelle de cet isotope, réclamant ainsi à la technique une prise d'essai importante (de l'ordre du gramme) ou un temps d'analyse relativement long (quelques heures) et une grande pureté de la molécule cible ce qui peut constituer des facteurs limitants pour les composés souvent présents en faible quantité dans les arômes.

L'analyse isotopique d'un spectre RMN peut être exprimée en termes de rapports isotopiques spécifiques à chaque site de la molécule. Cette mesure de rapport isotopique (défini dans la partie 2.) est déterminée par rapport à une référence. Cette référence possède un rapport isotopique unique et connu.

⁴ Martin GJ, Martin ML. Tetrahedron Lett.;22:3525-8 (1981)



Prenons le cas d'une molécule analysée en RMN isotopique du deutérium. Pour cette analyse, la référence est une référence interne, la molécule de tétraméthylurée (TMU). Pour chaque signal de la molécule à analyser, on déterminera un rapport isotopique sur la base de cette référence interne à l'aide de la formule :

$$(D/H)_i = \text{Intensité (site } i) \times C$$

Cette équation montre que le rapport isotopique spécifique au site i , $(D/H)_i$ – rapport du nombre de deutérium D sur le nombre de hydrogène H – est alors fonction de l'intensité du signal attribué au site i sur le spectre et d'un facteur C dont tous les paramètres sont connus par la préparation de l'échantillon.

Ce facteur C comprend de multiples paramètres : le rapport isotopique connu de la référence, l'intensité du pic de la référence, les masses pesées dans le tube pour l'échantillon et la référence, les masses molaires de la molécule étudiée et de la molécule de référence, la pureté de la référence, la pureté de

l'échantillon, les nombres d'atomes équivalents considérés sous le signal respectif du site de la molécule et de la référence. L'intensité du signal d'intérêt pour lequel on souhaite calculer le rapport isotopique ne possède pas d'unité. La seule unité qui prévaut dans la formule de la constante est due au rapport isotopique de la référence, exprimé en ppm. Par conséquent, le rapport isotopique spécifique du site sera exprimé en ppm.

Les analyses SNIF-NMR se sont également développées pour des mesures isotopiques du carbone-13. Dans le cas des analyses du carbone-13, les méthodes ont été développées sans référence interne. Les mesures isotopiques site-spécifiques sont alors comparées à une valeur qui sera considérée comme référence pour la SNIF-NMR et obtenue par une autre technique analytique, la Spectrométrie de Masse à Rapport Isotopique (IRMS).



6. Application de l'analyse isotopique au cas de la vanilline

Une analyse IRMS peut être réalisée soit par EA-IRMS sur la molécule pure soit par GC-c/p-IRMS après une étape d'extraction sur un produit complexe (extrait de vanille, arôme naturel de vanille, produit aromatisé à vanille...).

On aura une première information globale via le $\delta^{13}\text{C}$ qui permettra une première discrimination qui restera cependant partielle (Figure 6). Ainsi une vanilline issue de la gousse de vanille présentera une valeur de $\delta^{13}\text{C}$ de l'ordre de -20‰ .

Une vanilline issue d'acide férulique de riz aura une valeur de $\delta^{13}\text{C}$ de l'ordre de -37‰ et enfin une vanilline issue de gaïacol, d'eugénol ou de curcumine aux alentours de -30‰ . Cependant comme illustré par la Figure 6, un mélange 50/50 de vanilline issue de la gousse de Vanille et de vanilline issue de l'acide férulique de riz présentera également une valeur d'environ -30‰ . Ainsi la valeur seule de $\delta^{13}\text{C}$ ne permet pas de s'assurer complètement de l'origine de la vanilline analysée.

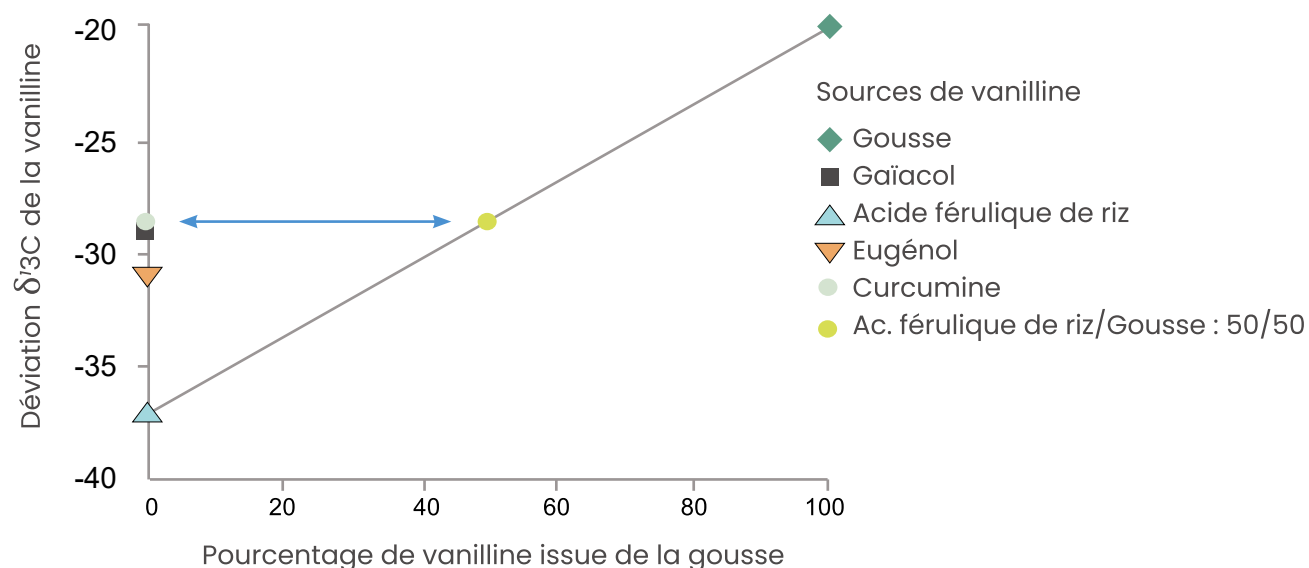


Figure 6 : $\delta^{13}\text{C}$ de la vanilline (AE-SMRI ou CG-C-SMRI) - un indicateur partiel du précurseur

Grâce à la RMN isotopique, les isotopomères de la vanilline peuvent être observés avec 5 sites pour l'hydrogène et 8 sites pour le carbone. L'hydrogène en position n°2 trop labile aura tendance à s'échanger en solution et ne doit donc pas être pris en compte pour la partie interprétation des résultats (Figure 7).

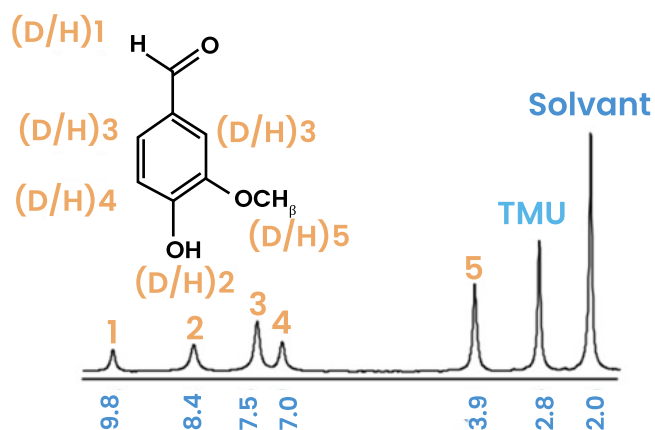


Figure 7 : Molécule de la vanilline et spectre obtenu en SNIF-NMR du deutérium

Ici Solvant = acétonitrile et
TMU = tétraméthylurée, référence interne
calibrée (standard international)

Afin de déterminer les précurseurs de la vanilline, une analyse en composantes principales⁵ (ACP) sur les valeurs de rapports isotopiques spécifiques (D/H)1, (D/H)3, (D/H)4, (D/H)5 est réalisée (Figure 8).

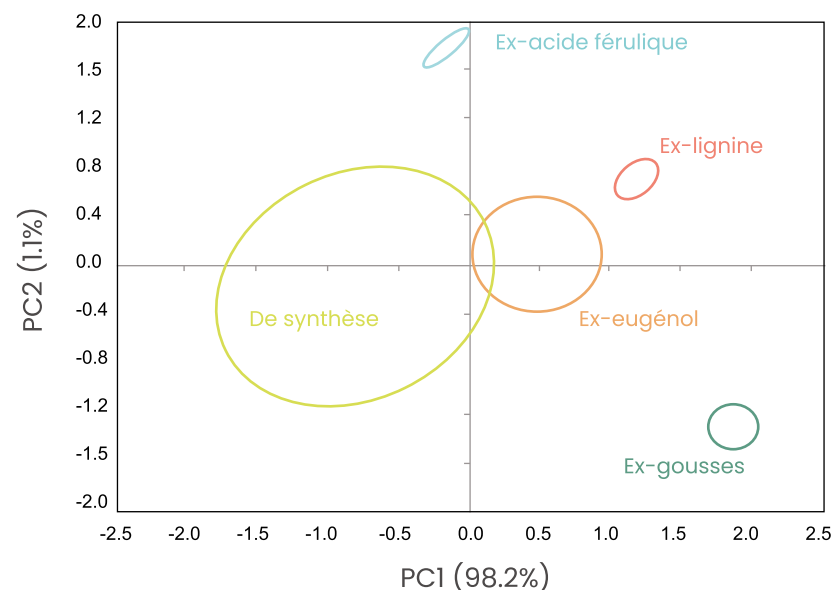


Figure 8 : Analyse en Composantes Principales (ACP) permettant de discriminer les principaux précurseurs par SNIF-NMR du deutérium de la vanilline

⁵ L'analyse en composantes principales (ACP) est une méthode d'analyse des données qui permet passer d'un set de données en 3 dimensions en 2 dimensions en regroupant les informations. Elle permet ainsi de résumer l'information en réduisant le nombre de variables, et ainsi de transformer une représentation complexe en représentation graphique simple.

Cependant comme évoqué au paragraphe 5.2, la quantité de vanilline nécessaire est importante (~1g) et la durée d'acquisition des spectres est longue (~15 heures).

La SNIF-NMR ^{13}C permet de diminuer la quantité de vanilline à analyser (~250mg) et la durée d'acquisition des spectres (~1 heure par spectre). Elle permet également une meilleure discrimination entre les différents groupes (Figure 9 et 10).

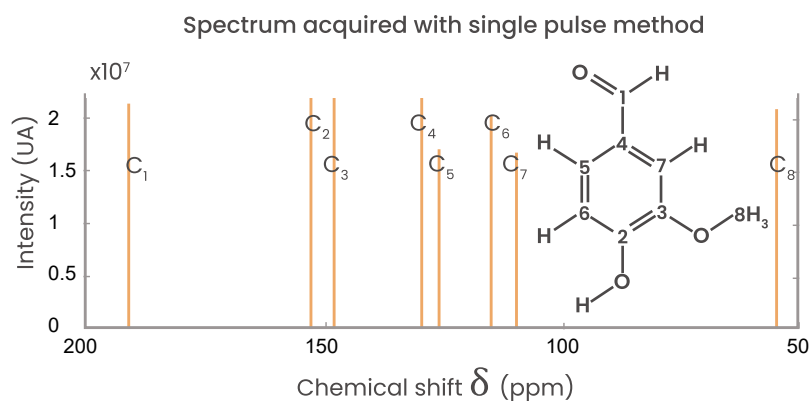


Figure 9 : Molécule de la vanilline et spectre obtenu en SNIF-NMR du carbone- 13 ⁶

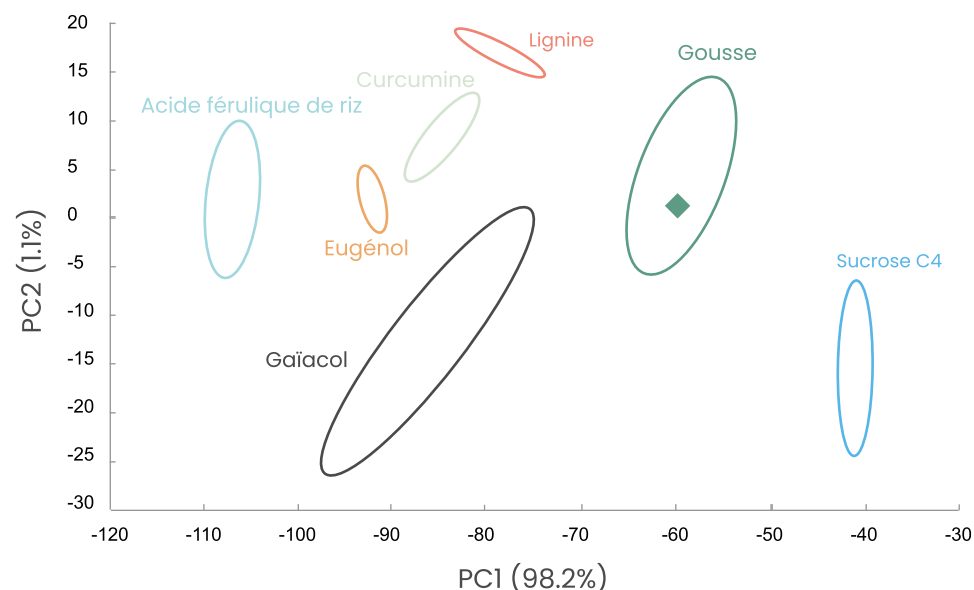


Figure 10 : Analyse en Composante Principale (ACP) permettant de discriminer les principaux précurseurs par SNIF-NMR ^{13}C de la vanilline⁶

Il est aussi possible de se servir des deux dimensions ^2D et ^{13}C pour une séparation optimale. Cependant il est peu fréquent de pousser l'analyse aussi loin.

⁶ Vanillin isotopic intramolecular ^{13}C profile through polarization transfer NMR pulse sequence and statistical modelling V. Portaluri, F. Thomas, E. Jamin, B. Lorandel, V. Silvestre, S. Akoka, G. Remaud. Food Control, 108345 (2021)

7. Isotopie et conformité réglementaire

Au niveau européen, c'est le Règlement (CE) n°1334/2008 qui établit les exigences réglementaires relatives aux arômes et à certains ingrédients alimentaires possédant des propriétés aromatisantes.

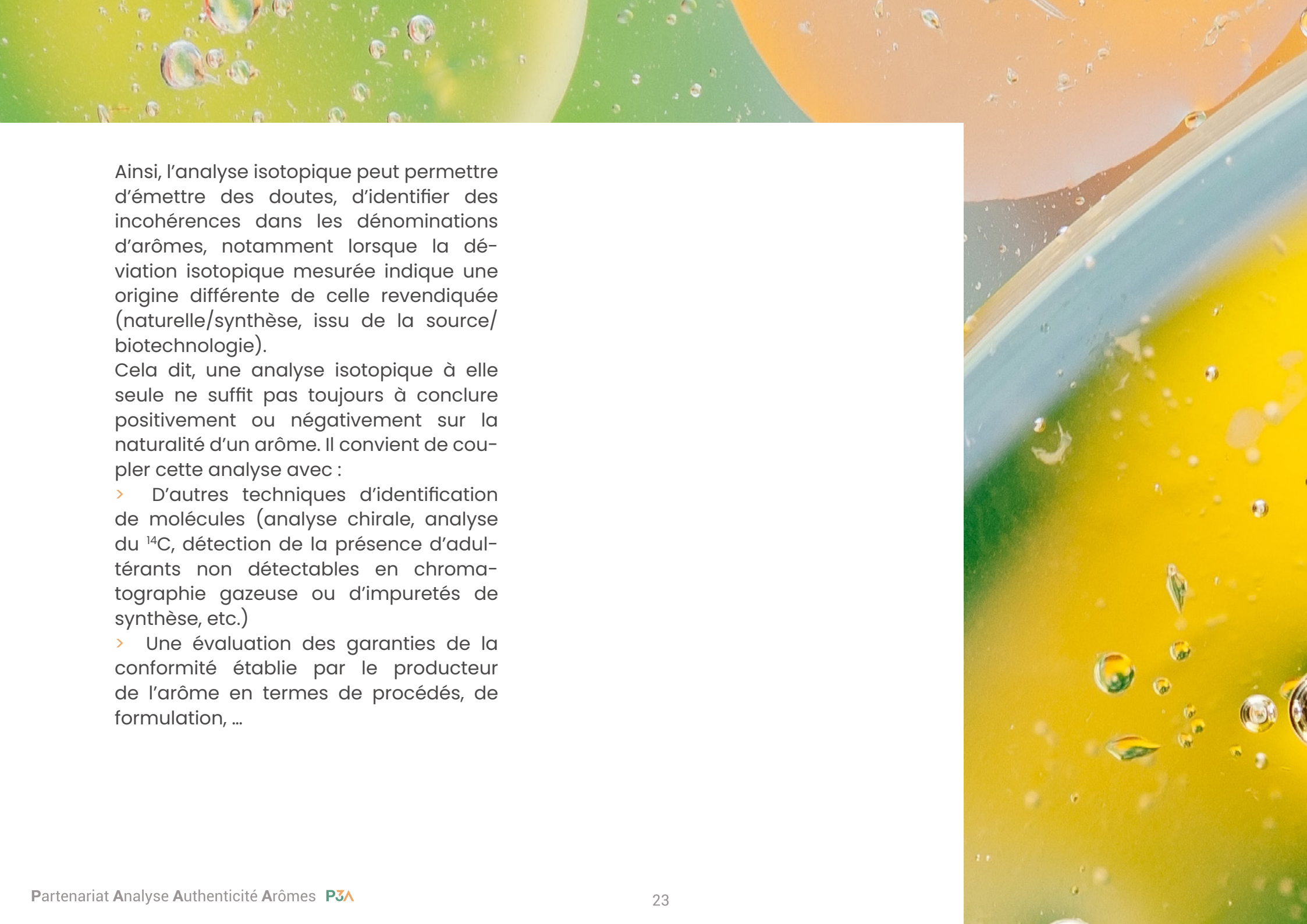
La conformité réglementaire des arômes à statut naturel est multifactorielle comme détaillé dans le document intitulé « [Contrôles analytiques et conformité réglementaire des arômes naturels](#) » rédigé par la plateforme P3A.

La détermination de l'abondance relative de certains isotopes stables permet de collecter des indices pertinents sur l'origine des ingrédients aromatiques. Elle permet notamment de discriminer une molécule naturelle d'une molécule de synthèse (issue de la pétrochimie).

Dans le cas des molécules naturelles, les analyses isotopiques peuvent permettre de tracer l'origine botanique et l'origine géographique d'un composé.

En aromatique, c'est l'analyse isotopique du ^{13}C et du ^2H qui sont les plus utilisées. Le rapport D/H reste plus difficile à interpréter, mais peut cependant mettre en évidence l'utilisation de procédés de production/synthèse non conformes au Règlement (CE) n°1334/2008. Les analyses isotopiques peuvent parfois, tout en concluant à l'origine naturelle d'une molécule, révéler des incohérences avec le process de fabrication indiqué par le fournisseur. Il reste primordial de disposer d'une base de données solide car il s'agit d'une analyse essentiellement comparative.





Ainsi, l'analyse isotopique peut permettre d'émettre des doutes, d'identifier des incohérences dans les dénominations d'arômes, notamment lorsque la déviation isotopique mesurée indique une origine différente de celle revendiquée (naturelle/synthèse, issu de la source/biotechnologie).

Cela dit, une analyse isotopique à elle seule ne suffit pas toujours à conclure positivement ou négativement sur la naturalité d'un arôme. Il convient de coupler cette analyse avec :

- > D'autres techniques d'identification de molécules (analyse chirale, analyse du ^{14}C , détection de la présence d'adulterants non détectables en chromatographie gazeuse ou d'impuretés de synthèse, etc.)
- > Une évaluation des garanties de la conformité établie par le producteur de l'arôme en termes de procédés, de formulation, ...

Partenariat Analyse Authenticité Arômes

P3A



www.aromalyse.com



www.betalabservices.com



www.eurofins.fr



www.sniaa.org