

Contribution de l'analyse à l'authentification des produits naturels

Marie-Florence Grenier-Loustalot* directeur de recherche CNRS, **Hervé Casabianca*** ingénieur de recherche CNRS

Summary : *Analysis contribution for determination of natural products*

This paper presents two analysis techniques for testing the adulteration of alimentary products.

One uses multidimensional gas chromatography on cyclodextrin derivatives to separate chiral compounds. The other uses isotope ratios mass spectrometry coupled with gaz chromatography to determine stable isotope ratios $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$.

Applications to fruits for the food industry is introduced, it is possible to discriminate between natural and adulteration samples.

Mot clés : *Adulteration, chiralité, GC multidimensionnelle, rapport isotopique agro-alimentaire.*

Key-words : *Adulteration, chirality, multidimensional GC, isotope ratios, agro-alimentary.*

Copier la nature est une tâche ardue à laquelle les chimistes se sont attachés en fournissant souvent une copie imparfaite. C'est ainsi que furent reproduites par voie chimique des molécules trouvées dans la nature, dont le savant mélange conduit aux arômes et parfums qui flattent nos narines.

C'est dans les années 80 que l'engouement pour le naturel, en provenance d'outre-Atlantique, atteint le marché européen et remet en cause les stratégies des industriels de l'agro-alimentaire.

La « vague verte » a considérablement bouleversé le comportement de l'individu (consommateur, acheteur...) devenu sensible au « naturel » « bio » et autres labels de ce type.

Ainsi, c'est la mutation du « produit » de l'industrie agro-alimentaire vers les produits naturels qui a suscité l'élaboration, le développement et l'étude de méthodes analytiques capables de répondre aux besoins des industriels ; puisque la chimie a permis la duplication moléculaire plus ou moins parfaite, un impératif s'impose pour l'industriel : savoir distinguer la différence de l'édifice chimique, afin de discriminer une origine « synthétique » d'une « naturelle ».

Si on examine, dans un premier temps, les causes de l'adulteration d'un produit naturel, c'est-à-dire l'utilisation justifiée de produits synthétiques, l'une des raisons les plus triviales est l'intérêt économique, puisque le produit naturel nécessite un coût bien plus onéreux que son homologue synthétique. A titre d'exemple, nous avons porté sur le *tableau I* quelques différences de prix moyens appliqués pour ce genre de produits à l'heure actuelle.

Les actes de fraude consistant à vendre des matières premières synthétiques au prix du naturel tentent bien certains

Tableau I - Quelques données sur les prix du naturel et du synthétique.

Molécule	Quantité	Prix de produit synthétique (FF)	Prix de produit naturel (FF)
Vanilline	100 g	≈ 100	25 000
γ -décalactone	100 g	800	6 000
Frambinone	100 g	360	350 000

acteurs du marché mais discréditent simultanément la probité des plus consciencieux.

Pendant, la notion de « fraude » n'est pas souvent aussi tranchée et se révèle être un paramètre plus complexe. En effet, il existe bien souvent une chaîne (fruits, purée, jus concentré de fruits) de transformation entre le fruit et sa forme commercialisée que ne contrôle pas impérativement une même industrie.

Les lacunes d'informations sur l'achat d'un produit (concentré de fruits par exemple) peuvent conduire éventuellement un industriel à aduler un produit en toute bonne foi. L'ajout de molécules synthétiques peut être également une incitation du marché : en effet, la matière première (les fruits) sont soumis à plusieurs aléas (climatiques, effets variétaux, terroir) et possèdent donc des qualités organoleptiques variables.

Cette variabilité sera ressentie par le consommateur (client) « plus ou moins exigeant » ou de pays aux réglementations drastiques et conduit inévitablement à l'utilisation et l'emploi de « correcteurs » synthétiques.

Quelles sont les conséquences de l'authentification de la naturalité d'une molécule ? En premier lieu, il s'agit de vérifier la qualité du produit acheté, afin de ne pas tomber dans le piège tendu par les fraudeurs et assurer par là-même la bonne gestion des dépenses d'une industrie agro-alimentaire ou de parfumerie. A plus long terme, les contrôles analytiques permettent une sélection des fournisseurs en testant la

* Unité de Service et de Recherche CNRS 059, BP 22, 69390 Vernaison.
Tél. : 04.78.02.22.00. Fax : 04.78.02.41.74.
E-mail : mf.grenier-loustalot@sca.cnrs.fr

crédibilité de leurs produits. En fait, il s'agit d'instaurer des relations de confiance avec les différents partenaires industriels (fournisseurs, transporteurs, distributeurs) et d'approfondir, par là-même, la connaissance des produits achetés. De même, en aval de la chaîne de production, cette relation de confiance doit être maintenue avec le consommateur ; il est clair que l'utilisation de produits naturels confère une image de marque et de qualité dont l'impact publicitaire semble être de forte ampleur auprès du grand public. La parfumerie a toujours été très liée aux substances naturelles et attache autant d'importance à la qualité actuelle de ses produits. Les relations structure/odeur sont d'une importance capitale et c'est pourquoi la notion de **chiralité** a particulièrement été étudiée ces dernières années [1].

Au-delà de l'aspect réglementaire ou commercial de cette analyse fine, on rentre là de plein-pied dans le domaine de l'olfaction qui entretient des relations très étroites avec le souvenir comme en témoignent la madeleine de Marcel Proust [2] ou le « passé restauré » de Charles Baudelaire [3]. Les odeurs et donc la chiralité jouent un rôle très occulte dans notre inconscient et peuvent influencer notre psychologie [4], notre comportement, voire s'attacher à des notions abstraites de beauté ou de sympathie.

Cet avant-propos, quoique illustré de quelques exemples bien précis, a pour but d'indiquer brièvement et de manière générale, à quelles intersections se situe la notion d'authentification ; les problèmes industriels, économiques et publicitaires ou plus académiques, qu'elle permet de résoudre, se révèlent divers et variés. Quoique le caractère principal des quelques travaux présentés ci-après aient une tendance fortement analytique du fait des travaux du laboratoire [5], il faut garder toutefois à l'esprit que le domaine des arômes et des odeurs ne se résume pas aussi facilement par les quelques notions précédemment évoquées, mais laisse entrevoir des champs d'investigation beaucoup plus vastes et complexes puisqu'il s'agit de chimie des plantes en relation étroite avec notre perception et notre psychologie.

Comment authentifier un arôme ?

Cela consiste d'abord à connaître, si possible et de manière simple, le ou les produit(s) odorant(s) présent(s). En effet, la nature, dans toute sa complexité, nous propose les mélanges les plus divers du point de vue qualitatif et quantitatif, car les molécules odorantes appartiennent à toutes sortes de familles chimiques (alcools, aldéhydes, cétones, acides, terpènes, esters...) et leur contribution à l'arôme est très variable.

Ainsi, une seule molécule peut être à l'origine d'un arôme (comme le menthol-1) dans la menthe, mais souvent l'arôme est constitué d'un mélange plus complexe d'une dizaine de molécules (exemple : famille des lactones dans la pêche) mais quelquefois, dans les cas extrêmes, aucune molécule isolée des autres ne semble participer à la note dominante.

Aussi, l'accès des molécules odorantes, c'est-à-dire leur extraction sélective, hors de la matière, l'identification, la caractérisation sont des problèmes très importants qui se posent à l'analyste.

Quel est la méthodologie analytique ?

Mieux que détailler les différents chemins inhérents au processus d'authentification, il s'agit pour l'analyste d'élaborer, a priori, un concept global qui peut être qualifié de « stratégie analytique ».

Cette dernière détermine, en fait, le choix de molécules ciblées et le traitement des informations chirale et isotopique les plus incontestables possibles.

Cette stratégie est susceptible de constituer un modèle d'approche globale en vue de l'authentification d'un produit naturel non encore étudié.

Choix des molécules ciblées

Ce choix résulte de plusieurs paramètres moléculaires inhérents aux constituants des produits.

Ils doivent satisfaire à l'adéquation qualité/quantité. Ce choix devra tenir compte des domaines d'application en fonction de la volatilité, l'extractibilité et de la thermo- et stéréostabilité (résumé sur le *tableau II*).

Tableau II - Caractéristiques d'une plante vis-à-vis de l'analyse en laboratoire.

Plante	Laboratoire
Seuil de détection olfactive	Importance aromatique
Concentration	Extractibilité seuil de détection de l'appareillage
Thermostabilité	Identification moléculaire
Stéréostabilité	Fiaabilité de l'information chirale

Analyse chirale

L'analyse chirale est basée sur une chromatographie en phase gazeuse multidimensionnelle. L'appareillage consiste en un couplage de deux chromatographes capillaires à deux fours indépendamment programmables en température. La première colonne est achirale et réalise la séparation chromatographique classique du mélange injecté ; en revanche, la seconde colonne chirale assure uniquement la séparation des énantiomères des molécules sélectionnées à partir de la première colonne. L'intérêt de cet appareillage réside dans le fait qu'il est particulièrement bien adapté à l'analyse de mélange complexe. La première chromatographie achirale constitue un outil de purification, rapide et maniable dont l'efficacité est difficilement accessible par les moyens de purification classique. Tout se passe comme si l'on injectait sur la deuxième colonne un extrait quasi pur des molécules ciblées.

Certaines molécules possèdent une perception olfactive très différente selon leur image optique, par exemple le *R*-limonène rappelle la fraîcheur citronnée, alors que l'odeur du *S*-limonène semble beaucoup plus amère. La carvone est encore plus discriminante dans la mesure où l'isomère (*R*) possède une odeur de menthe alors que l'isomère (*S*) évoque le cumin.

Cependant, deux obstacles majeurs peuvent survenir lors de l'analyse chirale :

- Aucun support disponible ne permet la séparation des énantiomères.

• Le mélange naturel se révèle être racémique donc identique à un produit de synthèse (cas rare).

L'analyse isotopique

L'authentification par analyse isotopique repose sur la différence des teneurs en ^{13}C , ^2H , ou autres isotopes, entre une molécule naturelle et une molécule synthétique. Le principe consiste à effectuer la transformation du carbone de toutes les molécules organiques en une même espèce chimique carbonée, le CO_2 sur lequel sont effectuées les études de répartition des isotopes stables du ^{12}C et ^{13}C . On peut distinguer trois parties principales dans l'appareillage :

1. une chromatographie en phase gazeuse permettant la séparation des constituants de l'extrait,
2. un four ($T = 800\text{ }^\circ\text{C}$) permettant la combustion des produits élués et la formation d'entités gazeuses CO_2 et eau),
3. un spectromètre de masse isotopique analysant le dioxyde de carbone sous toutes ces combinaisons isotopiques du carbone et de l'oxygène.

A ce titre, l'expérience acquise au sein du Service Central d'Analyse [5] montre qu'il n'existe pas un produit synthétique mais plusieurs issus de différents fournisseurs et différentes voies de synthèse, leur conférant par conséquent des teneurs isotopiques variables. Cette dernière remarque montre les difficultés rencontrées et implique donc le fait de constituer, dans la mesure du possible, une banque de données concernant les différentes valeurs isotopiques d'un même produit synthétique, avant de procéder à l'authentification sur des produits naturels.

Quant au dosage isotopique du ^{13}C , il peut arriver que molécule naturelle et molécule synthétique identique (synthétique NI) aient des plages de valeurs isotopiques communes, excluant par là-même toute tentative d'authentification. Deux voies d'investigations isotopiques sont toutefois exploitables : l'analyse isotopique locale, contribution isotopique de chaque site moléculaire (cas de la SNIF-RMN [6]), soit la filiation isotopique lors du processus de formation des molécules dans la plante. Certaines d'entre elles sont destinées à être les précurseurs d'autres molécules dont la formation interviendra à une étape plus avancée dans la maturité de la plante.

Application : Exemples des fruits à lactones (cas des pêches, abricots, noix de coco, mirabelles...)

Les arômes de la pêche [7] (*Prunus Persical*) et de la nectarine (*Prunus Persica Nucipersica*) ont suscité de nombreuses études, notamment de leurs composants aromatiques clés. Dans ces deux fruits, la γ -déalactone joue un rôle important, alors que les autres lactones contribuent plus modérément à « un bruit de fond à note de pêche ».

Leur distribution dans la nectarine est donné sur la *figure 1*.

Par ailleurs, le γ -déalactone possède un seuil de détection olfactive très bas (11 ppb dans l'eau) et n'apparaît dans les deux fruits qu'essentiellement sous sa forme énantiomère « R » représentative de l'odeur de pêche (*tableau III*).

L'analyse des lactones dans la pêche et la nectarine constitue une source très riche d'informations. Outre les

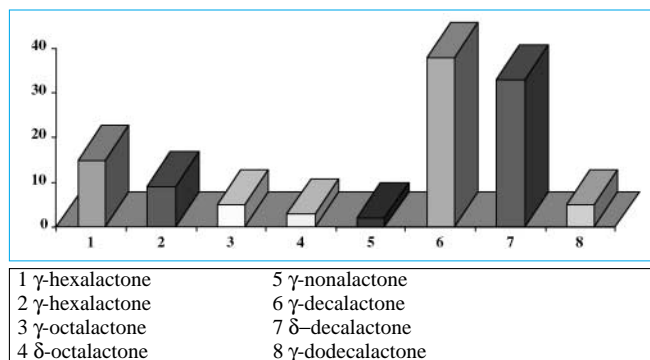


Figure 1 - Distribution des lactones dans la nectarine.

Tableau III - Distribution énantiomérique de lactone dans la pêche.

Molécule	R %	S %
γ -déalactone	89	11
δ -déalactone	87	13

excès énantiomères dont les valeurs croissent au fur et à mesure de l'augmentation de la taille des γ -lactones (50 % d'excès énantiomère pour la γ -octalactone et 100 % d'excès énantiomère pour le γ -dodécacalactone), l'information isotopique apporte également des renseignements précieux. En particulier, les teneurs les plus appauvries en ^{13}C concernent les γ et δ -déalactone [7].

A titre d'exemple, nous avons porté, sur la *figure 2*, l'analyse en composante principale (ACP) de pêches et nectarines utilisant cinq paramètres :

- Trois vecteurs inhérents à la chiralité (excès énantiomère de la γC8 (ee), γC10 (ee) et δC10 (ee) (composante 2).
- Deux vecteurs isotopiques (rapport isotopique des γ octa- (γC8d) et décalactones ($\gamma\text{C10}\delta$) (composante 1).

La position sur la carte (*figure 2*) des différents points représentatifs d'une série de produits étudiés au laboratoire [5] représente à 93 % la variété des caractéristiques de naturalité des divers produits étudiés.

La première analyse globale dénote l'existence de deux groupes : l'un à gauche rassemblant des échantillons synthétiques (en rouge), l'autre sur la partie droite concernant les échantillons naturels (en vert). On remarque que les vecteurs les plus discriminants concernent l'excès énantiomère de la γC10 ainsi que la teneur isotopique en ^{13}C de la γC8 .

Parmi les échantillons naturels, il est possible de déterminer trois groupes bien distincts :

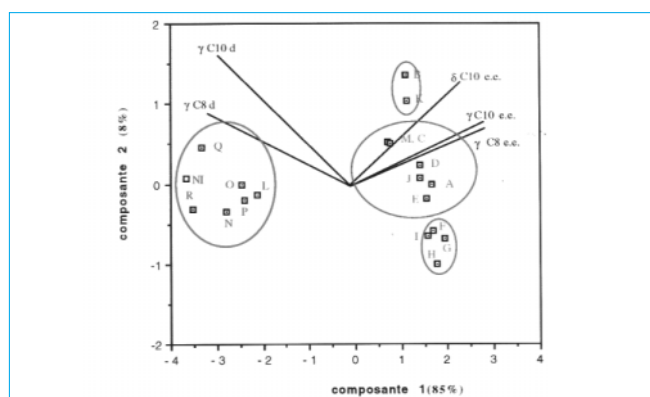


Figure 2 - Analyse en composante principale.

Le premier, dans le cas de l'ACP, possède les teneurs en ^{13}C les plus faibles pour les lactones considérées et rassemble deux nectarines (F et G) et deux pêches sanguine (H) et blanche Golo (I). Or, la pêche sanguine est issue du croisement de deux pêches blanches, ce dernier caractère étant génétiquement récessif. La cohérence du regroupement de l'ACP est donc ici souligné.

Le deuxième groupe réunit les pêches jaunes (A, C, E) et deux pêches Pavie (D et J). Là encore, il est cohérent de trouver ces échantillons regroupés dans la mesure où la pêche de Pavie, utilisée dans l'industrie agro-alimentaire, provient d'un croisement génétique avec la pêche jaune également très appréciée des industriels pour ses qualités gustatives (troisième groupe), seuls les nectars commerciaux (points K et B) peuvent être assimilés à des produits naturels.

Conclusion

A partir de cet exemple, mais qui peut être généralisé à différents secteurs de l'industrie de l'arôme et du parfum, on peut conclure à la fiabilité de l'authentification basée sur la complémentarité des techniques évaluant la chiralité et la teneur isotopique d'une molécule.

Le pouvoir discriminant de ces deux méthodes absolument indépendantes l'une de l'autre est fortement inféodé

aux différences attribuées par la nature aux diverses molécules ciblées.

Ces analyses posent le problème de la conformité de l'étiquette et du contenu.

C'est entrer de plein pied dans le domaine complexe de législation de la CEE qui a caractérisé, dans la période 1988 à 1993, la nature des produits et arômes circulant au sein des temps de la communauté. De sérieux vides juridiques restent à combler, et l'élaboration de banques de données fiables et sur une période assez large dans le temps, devrait permettre de contribuer à adapter les lois en vigueur à la réalité du marché.

Références

- [1] Berger R.G., *Volatile Compounds in Food and Beverages*, Ed. Henk Maarse Publ. Dekker, **1991**.
- [2] Proust M., *Du côté de chez Swann*, **1919**.
- [3] Baudelaire C., *Les fleurs du mal, Spleen et idéal* [XXXXVIII (III)], **1857**.
- [4] Rounitska E., *Le parfum*, Que sais-je, PUF, p. 53 et p. 101, **1969**.
- [5] Casabianca H., Graff J.B., Guillaumet S., *Eppos*, **1996**, p. 244 ; Casabianca H., Graff J.B., *J. Chromatography*, **1994**, 684, p. 360 ; Casabianca H., Graff J.B., Jame P., Perruchietti C., *I high Resol., J. Chromatography*, **1995**, 18, p. 279.
- [6] Hanneguelle S., Thibault J.N., Naulet N., Martin G., *J. Agric. Food. Chem.*, **1992**, 40, p. 81.
- [7] Engel K.H., Flath R.A., *J. Agric. Food Chem.*, **1988**, 36, p. 549.