

Utilisation réglementaire des analyses isotopiques des aliments

Dix ans d'expérience européenne

Giovanni Calderone, Claude Guillou et Norbert Naulet

Summary Official methods based on stable isotope techniques for analysis of food. Ten years' of European experience

The extensive studies on plant metabolism and natural fractionation of stable isotopes enabled access to an extremely useful tool in the fight against fraud in the food products domain. Several isotopic analyses are now official or standard methods in Europe and North America for testing the authenticity of food products. These methods are based on the measurement of stable isotope contents (^2H , ^{13}C , ^{18}O , ^{15}N , etc.) of a product or of a specific component such as an ingredient or a target molecule of the product. The determinations, carried out using NMR (nuclear magnetic resonance) and/or IRMS (isotope ratio mass spectrometry), provide information on the botanical and geographical origin which are often considered important characteristics of many food products either by the consumer or by European regulations.

Mots-clés Isotopes stables, RMN, SMRI, authenticité, règlements européens.

Key-words Stable isotopes, SNIF-NMR, IRMS techniques, authenticity, European regulations.

Actuellement, une multitude de produits ou de marchandises peuvent être l'objet de falsification, adultération ou contrefaçon. Ces pratiques frauduleuses ou tromperie des consommateurs sont également nuisibles économiquement pour les producteurs ou les fabricants honnêtes. Il est donc de plus en plus nécessaire de développer des méthodes de contrôle pour lutter contre ces pratiques.

Ces dernières années, la Communauté européenne s'est engagée dans cette voie, en particulier en ce qui concerne le contrôle de l'authenticité des produits alimentaires, tant pour protéger l'économie de l'Union que le consommateur.

De nombreuses méthodes de contrôle basées sur la détermination des teneurs en isotopes stables ont ainsi vu le jour. Ces méthodes utilisent principalement deux techniques analytiques :

1- La spectrométrie de masse de rapports isotopiques (SMRI), qui permet la mesure des teneurs moyennes en isotopes stables d'un composé organique choisi comme cible. Ainsi, la mesure des déviations isotopiques des isotopes lourds des cinq éléments majeurs de la matière organique (H, C, N, O, S) est aisément réalisée à l'aide de spectromètres dédiés à ces applications. Les développements, récents pour certains, de couplages avec un analyseur élémentaire ou avec un chromatographe en phase gazeuse permettent de réaliser automatiquement la

génération des gaz utilisables en SMRI (H_2 , CO_2 , N_2 , CO et SO_2) et la mesure de leurs déviations isotopiques.

2- La RMN quantitative du deutérium, RMN-FINS, développée au début des années 80 [1], permet la mesure des teneurs spécifiques site par site dans une molécule. La répartition non statistique observée est due aux fractionnements isotopiques qui ont régi la genèse de cette molécule et/ou les transformations qu'elle a pu subir ultérieurement.

Fractionnement isotopique naturel

Plusieurs causes sont à l'origine de la variabilité naturelle des abondances isotopiques. L'exemple du carbone est intéressant car le CO_2 atmosphérique est la source principale de carbone utilisé par les plantes lors de la photosynthèse. Ce CO_2 est isotopiquement homogène dans l'atmosphère terrestre, mais il peut être incorporé de deux manières différentes par les plantes.

Sous l'action de la ribulose-1,5-diphosphatocarboxylase (RuBP) à la lumière, le CO_2 se combine au ribulose-1,5-diphosphate pour donner naissance à deux molécules d'acide phosphoglycérique (premier produit stable synthétisé). Ce composé à trois atomes de carbone a donné son nom à ce mécanisme : C3. Ce cycle est aussi appelé « cycle de Calvin et Bassham » [2].

Pour le mécanisme C4 – appelé « cycle de Hatch et Slack » [3] –, c'est le rôle de la phosphoenolcarboxylase qui est prépondérant. La fixation primaire du CO_2 conduit à l'acide oxaloacétique qui est immédiatement converti en acides malique et aspartique. Ces acides (à quatre atomes de carbone) sont ensuite décarboxylés et le CO_2 libéré est repris par la RuBP.

Pour les plantes CAM (« crassulacean acid metabolism », dont le cycle fut mis en évidence par Whelan, Sackett et

Définition de δ

Les valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ sont calculées avec la formule suivante :

$$\delta = \left(\frac{R_{\text{échantillon}}}{R_{\text{standard}}} - 1 \right) \times 1000$$

où $R_{\text{échantillon}}$ est le rapport isotopique mesuré pour l'échantillon et R_{standard} , le rapport isotopique mesuré pour le standard, calibré contre le V-PDB.

Tableau I - Exemples des plantes les plus communes des trois groupes décrits.

Plus de 95 % des plantes appartiennent au groupe des plantes C3 ; moins d'1 % sont des plantes C4.

Trois métabolismes différents		
plantes C3	plantes C4	plantes CAM
Betterave, pomme de terre, riz, orge, blé, soja, tournesol, olive, seigle, haricot, orange, raisin, arachide	Canne à sucre, sorgho, maïs, millet	Ananas, vanille, agave, cactus

Benedict [4]), les deux enzymes précédentes fonctionnent alternativement jour et nuit.

Le fractionnement isotopique provoqué par ces deux enzymes étant nettement différent, les gammes de déviation isotopique (δ , voir encadré) des plantes C3 et C4 sont parfaitement distinctes. La seule mesure du $\delta^{13}\text{C}$ d'un produit végétal permet de savoir si la plante dont il est issu est de type C3 ou C4. Des exemples de plantes de ces trois groupes sont donnés dans le *tableau I*.

Pour l'eau, seule source d'hydrogène pour la photosynthèse, les teneurs en isotopes lourds (^2H et ^{18}O) dépendent de sa situation géographique d'origine.

L'évapotranspiration des plantes est également un facteur de fractionnement isotopique. Ainsi, une plante « aérienne » comme la vigne présente une plus forte évapotranspiration que la betterave à sucre qui est une plante souterraine. Ceci se traduit par un plus fort enrichissement en deutérium dans les sucres photosynthésés par la vigne dans ceux issus de la betterave, et est mis à profit par la méthode RMN-FINS qui mesure l'enrichissement site par site de l'alcool de fermentation (*figure 1*).

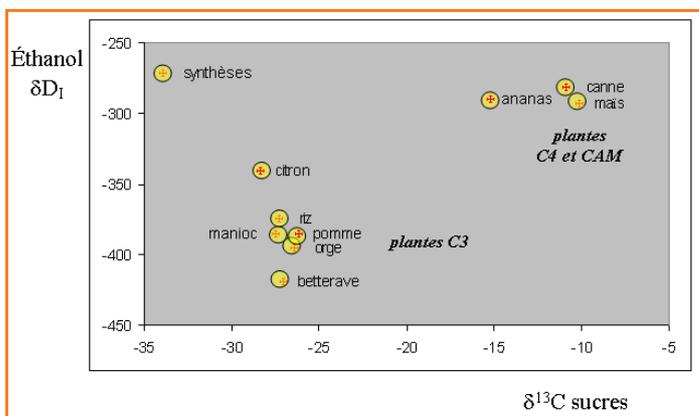


Figure 1 - La représentation bidimensionnelle de $\delta^{13}\text{C}$ des sucres contre le $\delta^2\text{H}$ des éthanol dérivés de leur fermentation met en évidence la relation sur la distribution isotopique.

Élaboration d'après un original de Martin *et al.* [14].

Règlements au sein de la CE

Les premiers règlements européens faisant appel aux techniques isotopiques concernaient surtout le contrôle d'origine et d'authenticité des vins.

Dès 1990, l'OIV (l'Office International de la Vigne et du Vin, qui a son siège à Paris) et l'Union européenne ont adopté la méthode ^2H -RMN-FINS pour l'analyse du vin comme méthode officielle afin de s'attaquer au problème de la chaptalisation (ajout de sucre au moût de raisin) [5-6].

Le principe de cette analyse est la détermination par RMN des rapports isotopiques spécifiques D/H dans la molécule

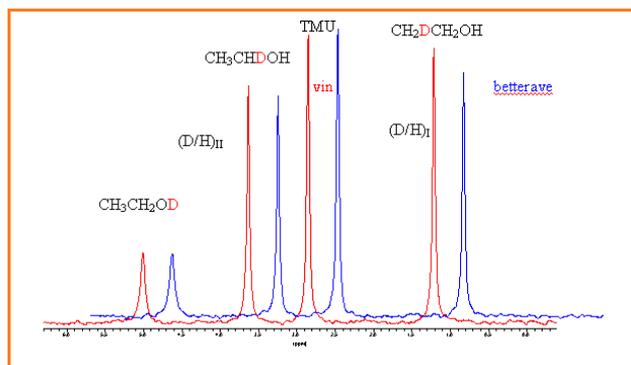


Figure 2 - Méthode RMN-FINS, spectres d'éthanol de vin et d'éthanol issu de sucre de betterave.

d'éthanol. La proportion des isotopomères monodeutérés $\text{CH}_2\text{D}-\text{CH}_2-\text{OH}$ et $\text{CH}_3-\text{CHD}-\text{OH}$ dépend, entre autre, de l'origine du sucre fermenté. On peut ainsi distinguer aisément des éthanol issus de sucre de canne, de betterave ou de moût de raisin, comme le montre la *figure 2*.

Cette méthode très performante ne permettait cependant pas de contrôler efficacement une autre technique d'adultération : le mouillage. L'origine géographique d'un vin se répercutant sur la teneur en ^{18}O de son eau, la CE adopte en 1997 la méthode utilisant la détermination du rapport isotopique $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ de l'eau du vin par SMRI [7] pour ce contrôle. Cette analyse permet aussi de détecter une fausse déclaration d'origine.

Ces deux exemples montrent tout l'intérêt de l'utilisation de plusieurs types d'analyse isotopique pour obtenir des informations complémentaires et indépendantes précieuses pour un contrôle très strict de l'authenticité d'un produit. Ainsi en 2001, l'OIV, via une autre résolution [8], a aussi adopté la mesure du rapport $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ par SMRI sur l'éthanol issu de la distillation d'un vin. La CE a très récemment (le 10 mars 2003) ajouté cette analyse aux méthodes officielles existantes [9].

En 1993, la Commission européenne a créé un bureau spécifique, le BEVABS (Bureau Européen des Vins, Alcools et Boissons Spiritueuses), pour fournir un support technique et scientifique aux DGs (directions générales) dans le domaine des vins et des boissons alcoolisées. Le BEVABS – dont les laboratoires sont hébergés au Centre Communautaire de Recherches d'Ispra en Italie dans l'Institute for Health and Consumer Protection – a aussi le rôle institutionnel de constituer et maintenir une banque de données, la « Wine Data Bank ». Les services des douanes des pays membres de la CE envoient chaque année des centaines de vins, certifiés authentiques, pour continuer à enrichir cette banque. C'est, bien sûr, par comparaison des teneurs isotopiques d'un vin à authentifier avec les résultats collectés dans une telle banque que l'on peut l'incriminer ou non d'être suspect.

Depuis, de nombreuses autres méthodes officielles sont venues s'y ajouter. En effet, la fraude sur les produits alimentaires (adultération, faux étiquetage, contrefaçon, etc.) est devenue un réel problème économique pour l'industrie et pour le consommateur. Il faut donc des méthodologies analytiques qui servent à garantir l'authenticité des produits et l'information donnée aux consommateurs.

Citons par exemple l'action du CEN/TC 174 (Comité Européen de Normalisation – Technical Commission 174 – la plupart des pays européens adhèrent à ses standards

Tableau II - Ensemble des méthodes officielles et des projets en cours.

Méthodes standard d'analyse (RMN et SMRI) $^2\text{H}/^1\text{H}$, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$		
Produits	Applications	Méthodes officielles ou objets d'étude
Vins	Chaptalisation, origine géographique, mouillage	UE n° 2676/90, n° 822/97, n° 440/2003, OIV rés. ENO 2/96 et ENO 17/2001, Wine-DB, GLYCEROL
Alcools	Origine botanique, éthanol	OIV, BEVABS
Boissons spiritueuses	Origine botanique	OIV, BEVABS
Sucres	Origine botanique	SUGAR ^{18}O
Miels	Ajout de sucres	AOAC method 991.41
Arômes et parfums	Origine botanique, anéthol, vanilline	GCC-IRMS
Produits laitiers-fromages	Origine géographique	MILK
Jus de fruit	Ajout de sucres, dilution	CEN/TC174 n 108, 109, 110, AOAC met. 995.17, SUGAR ^{18}O
Huiles et graisses	Origine	MEDEO
Poissons	Origine géographique, sauvage/élevage	COFAWS
Vinaigres	Origine botanique	OIV

techniques) qui, en 1996, a adopté trois méthodes standards par SMRI pour dépister d'éventuels édulcorations et mouillages de jus de fruits [10-12]. L'AOAC (Association of Analytical Communities) a adopté les mesures d'isotopes stables pour détecter l'ajout d'eau et de sucres aux jus de fruits et de sucres dans les miels.

Au niveau national, en France, l'arrêté du 19 février 2001 [13] formalise l'utilisation des mesures de $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ par CG-C-SMRI (chromatographie en phase gazeuse-combustion-spectrométrie de masse de rapports isotopiques) pour confirmer l'origine botanique ou synthétique de quelques arômes et parfums.

Perspectives

De la traçabilité du poisson au faux étiquetage, de l'adultération des huiles à la détection de glycérol ajouté dans les vins, en passant par les produits de l'agriculture biologique, le champ d'application de ces techniques est très vaste. C'est la raison pour laquelle de nombreux laboratoires européens, privés et institutionnels, travaillent en coopération pour faire face à ces demandes avec comme objectif l'élaboration de nouvelles méthodes officielles. Les nouveaux projets ont parfois des noms évocateurs (voir *tableau II*) :

- GLYCEROL : le glycérol, une sonde supplémentaire pour tester l'authenticité d'un vin ;
- COFAWS : Confirmation of the Origin of Farmed and Wild Salmon and other fish ;
- MEDEO : METHODS for the DETECTION of adulteration of Olive oil with hazelnut oil.

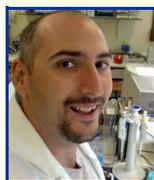
Actuellement, le BEVABS participe à ces projets et mène également en autonomie des études spécifiques à la demande des DGs pour appliquer l'acquis des techniques isotopiques à une multitude de problèmes, et pour en tester les nouvelles applications.

Citons aussi un projet en cours qui vise à élaborer et certifier des matériaux de référence utilisables tant en CG-C-SMRI qu'en AE-SMRI (analyse élémentaire-spectrométrie de masse de rapports isotopiques). Lors des mesures, des produits de référence bien connus, testés et fiables sont toujours nécessaires. Cela est encore plus urgent quand il s'agit d'un sujet sensible, celui des sophistications et des

fraudes, réglé par la CE dans des règlements qui vont conditionner les pays membres dont le nombre est destiné à augmenter bientôt.

Références

- [1] Martin G.J., Martin M.L., Brevet CEE 81-22710, USA 85-4550082, 1981.
- [2] Calvin A.M., Bassham J.A., *The photosynthesis of carbon compounds*, Benjamin, New York, 1962.
- [3] Hatch M.D., Slack C.R., *C.R. An. Rev. Plant Physiol.*, 1962, 21, p. 141.
- [4] Whelan T., Sackett W.M., Benedict C.R., *Plant Physiol.*, 1973, 51, p. 1051.
- [5] OIV, *Méthodes internationales d'analyse des vins*, 1990.
- [6] E.C. Regulation n° 2676/90, *Official Journal of the European Communities*, 1990, n° L 272, vol. 33, p. 64.
- [7] E.C. Regulation n° 822/97 amending E.C. Regulation n° 2676/90, *Official Journal of the European Communities*, 1997, n° L117/10.
- [8] OIV, Résolution OENO/SCMA/00/177, Détermination du rapport isotopique de l'éthanol, 2001.
- [9] E.C. Regulation n° 440/2003 amending E.E.C. Regulation n° 2676/90 determining *Community methods for the analysis of wines*.
- [10] *Determination of the stable carbon isotope ratio ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) of sugars from fruit juices - Method using Isotope Ratio Mass Spectrometry*, 29 Feb. 1996, CEN/TC174 n° 108.
- [11] *Determination of the stable oxygen isotope ratio ($^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$) of water from fruit juices - Method using Isotope Ratio Mass Spectrometry*, 29 Feb. 1996, CEN/TC174 n° 109.
- [12] *Determination of the stable hydrogen isotope ratio ($^2\text{H}/^1\text{H}$) of water from fruit juices - Method using Isotope Ratio Mass Spectrometry*, 29 Feb. 1996, CEN/TC174 n° 110.
- [13] Arrêté du 19 février 2001, *Journal officiel*, 7 mars 2001, n° 56, p. 3538.
- [14] Martin G.J. et al., *J. Sci. Food Agric.*, 1991, 56, p. 419.



G. Calderone

Giovanni Calderone

est doctorant en sciences agroalimentaires à l'université de Nantes et boursier auprès du CCR-Ispra¹.

Claude Guillou

est responsable du laboratoire du BEVABS².



C. Guillou

Norbert Naulet

est professeur à l'université de Nantes³.



N. Naulet

¹ BEVABS-TP740, via Fermi 2, 21020 Ispra, Italie.
Tél. : +39 (332) 78 5668. Fax : +39 (332) 78 9303.
E-mail : giovanni.calderone@jrc.it

² BEVABS-TP740, via Fermi 2, 21020 Ispra, Italie.
Tél. : +39 (332) 78 5678. Fax : +39 (332) 78 9303.
E-mail : claude.guillou@jrc.it

³ Laboratoire d'analyse isotopique et électrochimique de métabolismes, 2 rue de la Houssinière, 44322 Nantes Cedex 3.
Tél. : 02 51 12 57 08. Fax : 02 51 12 57 12.
E-mail : Norbert.Naulet@chimbio.univ-nantes.fr