

Quelques rappels et définitions

Catherine Lamoureux

La notion d'isotope est encore trop souvent associée à celle de radioactivité et donc à l'idée de danger. Ce terme recouvre, en fait, un ensemble d'éléments chimiques ayant le même nombre d'électrons et donc de protons, qui ne se différencient que par leur nombre de neutrons et donc par leur masse atomique. Dans le tableau de Mendeleïev, tous les isotopes d'un même élément se situent au même endroit (du grec *iso*, même, et *topos*, lieu). Une minorité d'entre eux, la plus médiatisée, possède un noyau instable qui se désintègre avec éventuellement émission de radioactivité, tandis que la majorité silencieuse est pourvue d'un noyau de structure stable.

Vous trouverez ci-dessous des rappels plus axés sur les aliments, mais qui se généralisent pour toute branche utilisant les isotopes stables.

Quelques rappels sur les isotopes stables et le fractionnement isotopique

La matière vivante, constituée principalement de carbone, hydrogène, oxygène et azote, est ainsi un mélange d'isotopes stables de ces quatre éléments. L'isotope le plus léger – ^1H , ^{12}C , ^{14}N et ^{16}O – est de loin majoritaire, tandis que le ou les plus lourds ont une abondance naturelle beaucoup plus faible (*tableau I*). La composition en isotopes stables d'un bioélément n'est pas constante, elle varie en fonction de son origine. Les différences observées sont liées non seulement à la composition isotopique des matières premières, mais aussi au fractionnement isotopique consécutif aux diverses transformations qui ont conduit à l'élaboration de la molécule ; en effet, la présence d'un isotope lourd dans une molécule induit un comportement (propriétés physiques, cinétique de réaction...) légèrement différent, lié à l'augmentation de taille et de masse.

L'eau est la source primaire unique d'hydrogène [1] et, avec le dioxygène, une des principales sources primaires d'oxygène pour la biosynthèse des molécules organiques. L'évaporation et la condensation dans le cycle global de l'eau donnent lieu à un épuisement en isotopes lourds dans la vapeur et les nuages, et à un enrichissement relatif pour les précipitations ; cela entraîne pour l'eau des teneurs en deutérium décroissantes de l'équateur vers les pôles, des côtes vers l'intérieur des terres, et avec l'altitude. L'évaporation de l'eau des plantes est accompagnée d'un enrichissement en isotopes lourds.

La source de carbone, pour les plantes terrestres, est le gaz carbonique atmosphérique. Les plantes sont classées en trois groupes selon le fractionnement isotopique lié aux différents mécanismes de fixation du carbone lors de la photosynthèse. La première catégorie, dite « C3 » car l'assimilation du CO_2 passe par un intermédiaire à 3 atomes de carbone, rassemble la majorité des plantes cultivées (raisin, betterave, céréales autres que le maïs, pomme de terre, pomme, orange...), et montre des déviations isotopiques $\delta^{13}\text{C}$ (cf. encadré) variant de - 23 à - 30 ‰. Le deuxième groupe, dit « C4 » car l'intermédiaire a 4 carbones, comprend le maïs, la canne à sucre, le sorgho et le millet comme plantes d'un réel intérêt économique, et les $\delta^{13}\text{C}$ varient de - 9 et - 13 ‰. Le dernier, dit « CAM » (« crassulacean acid metabolism »), de mécanisme intermédiaire, regroupe des plantes tels l'ananas, l'agave et le vanillier et présente des $\delta^{13}\text{C}$ allant de - 12 à - 18 ‰. Il paraît donc facile de détecter la présence d'un produit issu d'une plante « C4 » tel la canne ou le maïs par mesure du $\delta^{13}\text{C}$, mais en revanche, la distinction entre les produits issus des nombreuses plantes « C3 » semble plus complexe.

Toute étape supplémentaire dans l'élaboration d'un composé induit un fractionnement isotopique complémentaire

Tableau I - Abondances naturelles moyennes des isotopes stables couramment étudiés.

élément	hydrogène		carbone		azote		oxygène		
isotope	^1H	^2H ou D	^{12}C	^{13}C	^{14}N	^{15}N	^{16}O	^{17}O	^{18}O
masse	1	2	12	13	14	15	16	17	18
abondance naturelle relative (%)	99,984	0,0156	98,891	1,108	99,635	0,365	99,759	0,037	0,204

Tableau II - Références internationales utilisées pour les mesures isotopiques.

isotope	^2H	^{13}C	^{15}N	^{18}O
molécule de référence	H_2O	CaCO_3	N_2	H_2O
étalon international	V-SMOW <i>Vienna standard mean ocean water</i>	V-PDB <i>Vienna Pee Dee Belemnite</i>	AIR	V-SMOW <i>Vienna standard mean ocean water</i>
	mélanges de différentes eaux océaniques	carbonate fossile de Caroline du Sud	azote atmosphérique	mélanges de différentes eaux océaniques
R rapport isotopique	155,76 ppm	1,12372 ‰	0,36765 ‰	0,20052 ‰

qui conduit généralement à des teneurs en isotopes lourds plus faibles.

Ainsi, la composition en isotopes stables d'un composé constitue une sorte de curriculum reflétant la matière d'origine et l'histoire des différents processus de transformation subis.

Les techniques analytiques

Les deux techniques analytiques principalement utilisées pour mesurer les rapports en isotopes stables des aliments et boissons sont la spectrométrie de masse de rapport isotopique pour le carbone 13, l'azote 15, l'oxygène 18 et le deutérium, et la résonance magnétique nucléaire pour la répartition intramolécule du deutérium.

La spectrométrie de masse de rapport isotopique (SMRI)

La SMRI permet, sur les gaz simples – dioxyde de carbone ou diazote – résultant de la dégradation du composé, de mesurer l'enrichissement ou l'appauvrissement global en isotope lourd. Les différents isotopomères de ces gaz (molécules ne se différenciant que par leur composition isotopique) sont, après ionisation, séparés dans un champ magnétique constant et récupérés sur différents collecteurs (un par faisceau d'ions). Le rapport R = lourd/léger obtenu pour l'échantillon est comparé à celui d'un étalon et la valeur de la déviation isotopique δ peut être établie (cf. encadré).

SMRI ^{15}N d'un composé organique

Le calcul de la déviation isotopique $\delta^{15}\text{N}$ (air) s'effectue à partir de l'abondance des isotopomères de masse 28 ($^{14}\text{N}^{14}\text{N}$) et 29 ($^{15}\text{N}^{14}\text{N}$) de l'azote isolé après combustion puis réduction du composé transformant respectivement l'azote organique en oxydes d'azote (NO_x), puis ces oxydes d'azote en azote moléculaire (N_2).

SMRI ^{13}C d'un composé organique

Les rapports des différents isotopomères de masse 44 ($^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$), 45 ($^{13}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$ et $^{12}\text{C}^{17}\text{O}^{16}\text{O}$), et 46 ($^{12}\text{C}^{18}\text{O}^{16}\text{O}$) ($^{13}\text{C}^{17}\text{O}^{16}\text{O}$ et $^{12}\text{C}^{17}\text{O}^{17}\text{O}$ pouvant être négligés étant donné leur faible abondance) du dioxyde de carbone isolé après combustion du composé sont mesurés. Le calcul de la déviation isotopique $\delta^{13}\text{C}$ (PDB) est alors effectué à partir de l'abondance des isotopomères de masse 45 corrigée de la contribution de l'isotopomère $^{12}\text{C}^{17}\text{O}^{16}\text{O}$.

La quantification des isotopes stables

L'étude de la répartition des isotopes lourds par rapport aux isotopes légers revient à observer de très faibles variations, de l'ordre du ppm (parties par million). Afin de manipuler des valeurs plus « palpables », la notion de déviation isotopique par rapport à un étalon international, notée δ , a été introduite :

$$\delta E_{(\text{éch}/\text{STD})} = \frac{R_{\text{éch}} - R_{\text{STD}}}{R_{\text{STD}}} \times 1000 (\text{‰})$$

R étant le quotient des concentrations d'isotopes lourd sur léger de l'élément E pour l'échantillon *éch* et l'étalon international *STD*. La valeur δE représente un enrichissement ou un appauvrissement en isotope lourd de l'élément E pour le composé relativement à une référence internationale (cf. tableau II) représentant le point zéro de l'échelle δ . Ainsi, plus une déviation isotopique est négative, moins il y a d'isotopes lourds.

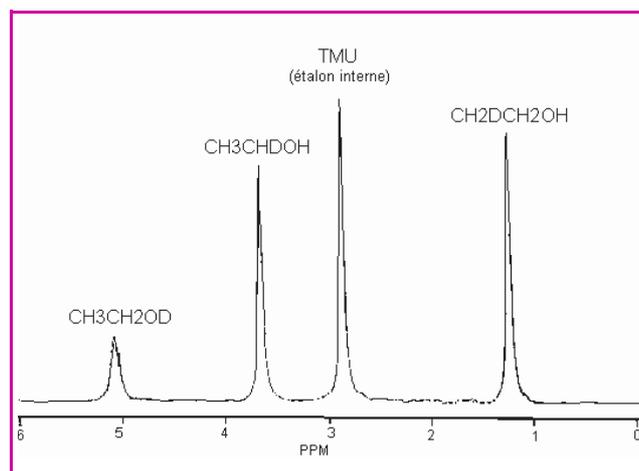
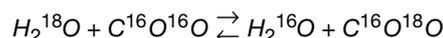


Figure 1 - Spectre RMN du deutérium en abondance naturelle de l'éthanol.

SMRI ^{18}O d'une eau

Le calcul de la déviation isotopique $\delta^{18}\text{O}$ (V-SMOW) s'effectue à partir de l'abondance des isotopomères de masse 44, 45 et 46 du CO_2 recueilli après équilibration de l'eau d'un échantillon avec un gaz carbonique :



la teneur en oxygène 18 du CO_2 après équilibration reflétant celle de l'eau.

CG-C-SMRI ^{13}C et ^{15}N

Le système de couplage, chromatographie en phase gazeuse – combustion/réduction – spectrométrie de masse isotopique, permet la détermination des teneurs isotopiques en carbone 13 ou en azote 15 des différents constituants d'un mélange préalablement séparé par chromatographie.

La SMRI est une technique simple et rapide qui ne nécessite que de très petites quantités d'échantillon (de l'ordre du milligramme et même inférieures), elle s'applique à tous les composés isolés ou en mélange, mais ne permet de quantifier qu'une teneur isotopique moyenne.

La résonance magnétique nucléaire du deutérium

La technique RMN-FINS [2] (fractionnement isotopique naturel spécifique) permet une quantification sur les différents sites deutérium d'une molécule, apportant ainsi une « empreinte » très précise du composé. La teneur en deutérium mesurée en RMN s'exprime directement en rapport isotopique absolu $^2\text{H}/^1\text{H}$.

Pour l'éthanol, par exemple, le spectre de la figure 1 caractérise les isotopomères suivants : (I) $\text{CH}_2\text{D}-\text{CH}_2-\text{OH}$, (II) $\text{CH}_3-\text{CHD}-\text{OH}$ et (III) $\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{OD}$ (les composés avec deux isotopes lourds étant statistiquement très peu probables). Le calcul des rapports $^2\text{H}/^1\text{H}$, (D/H)I et (D/H)II pour les deux principaux sites s'effectue à partir des surfaces de raies, et par étalonnage interne au moyen de TMU (N,N,N',N'-tétraméthylurée) de teneur en deutérium précisément connue. Les raies étant fines et de même largeur, la mesure des surfaces peut être limitée à celle des hauteurs. La teneur

en deutérium (D/H) du site méthyle de l'éthanol ou site (I) reflète l'origine botanique de l'alcool, tandis que celle (D/H)II du site méthylène ou site (II) est liée à la composition isotopique de l'eau du milieu de fermentation.

Compte tenu d'un manque de sensibilité lié à la faible abondance naturelle du deutérium, la méthode réclame une prise d'essai assez importante (de l'ordre du gramme). Si pour l'éthanol, isoler une telle quantité ne pose pas trop de

problème, cela peut constituer un facteur limitant pour d'autres composés tels les arômes.

Note et référence

- [1] Si des engrais ammoniacés sont utilisés, leur hydrogène prendra, par échange chimique, la même teneur en deutérium que l'eau assimilée par la plante.
[2] Martin G., *Ann. Fals. Exp. Chim.*, **1982**, 85, p. 249.



Catherine Lamoureux

est ingénieur chargée des méthodes isotopiques au laboratoire des Douanes de Paris*.

* Laboratoire des Douanes de Paris, 1 rue Gabriel Vicaire, 75141 Paris Cedex 03.

Tél. : 01 44 54 21 32. Fax : 01 42 77 46 92.

E-mail : catherine.lamoureux@douane.finances.gouv.fr

Index des sigles et expressions rencontrés dans le dossier

- **AFD** : analyse factorielle discriminante.
- **AOAC** : Association of Analytical Communities.
- **AREVA/COGEMA** : société dont les usines produisent et traitent matériaux et composants nécessaires aux installations nucléaires.
- **BEVABS** : Bureau Européen des Vins, Alcools et Boissons Spiritueuses.
- **BIPM** : Bureau International des Poids et Mesures.
- **CCQM** : Comité Consultatif pour la Quantité de Matières.
- **CCR** : Centre Communautaire de Recherches (Ispra, Geel, Petten, Karlsruhe).
- **CEA** : Commissariat à l'Énergie Atomique.
- **CEN/TC** : Comité Européen de Normalisation/Technical Commission.
- **CIPM** : Comité International des Poids et Mesures.
- **CLPG** : chromatographie liquide à haute pression.
- **CPG** : chromatographie en phase gazeuse.
- **GC-C-SMRI** : chromatographie en phase gazeuse-combustion-spectrométrie de masse des rapports isotopiques.
- **HEPT** : hauteur équivalente à plateau théorique.
- **HPLC** : de l'anglais « high performance liquid chromatography ».
- **ICP-MS** : inductively coupled plasma-mass spectrometry.
- **IDMS** : isotope dilution mass spectrometry.
- **IHCP** : Institute for Health and Consumer Protection.
- **IMEP** : International measurement evaluation program.
- **INM** : Instituts Nationaux de Métrologie.
- **INRDIM** : Institut National de Recherche et Développement pour les Technologies Isotopiques et Moléculaires.
- **IRMM** : Institut des Matériaux et Mesures de Référence du CCR.
- **OIV** : Office International de la Vigne et du Vin.
- **RMN-FINS** : résonance magnétique nucléaire appliquée au fractionnement isotopique naturel spécifique (SNIF-NMR en anglais).
- **SI** : système international d'unités.
- **SMRI** : spectrométrie de masse des rapports isotopiques.
- **SNIF** : site specific natural isotope fractionation.
- **TMS** : spectromètres de masse à thermo-ionisation (d'après l'anglais).
- **V-SMOW** : Vienna standard mean ocean water.