

# La RMN pour la caractérisation moléculaire de produits de consommation agroalimentaire

Stefano Caldarelli

## Résumé

La capacité de la RMN à identifier un grand nombre de composés bioorganiques a donné à cette technique un rôle privilégié pour la caractérisation et l'authentification de produits alimentaires. Si d'une part les méthodes classiques de la RMN sont capables de résoudre la structure de molécules spécifiques (par exemple des protéines ou des petites molécules avec des effets nutritionnels), ceci demande des étapes de purification. En revanche, la possibilité d'analyser directement les produits dans un état aussi proche que possible de leur mode de consommation devient de plus en plus commune. Dans cet article, quelques exemples sont illustrés de développements méthodologiques récents qui vont dans ce sens, adaptés à l'étude de produits de différente nature tels que des solides (fromages, viandes) ou des liquides (huiles).

## Mots-clés

**Aliments, RMN, HRMAS, statistiques multivariées.**

## Abstract

**NMR, a tool for the molecular characterization of food products**

The ability of NMR to identify a large number of bio-organic compounds has given this technique a privileged role in the characterization and authentication of food products. If on the one hand the classical methods of NMR are able to solve the structure of specific molecules (e.g. proteins or nutritionally relevant small molecules), this requires purification steps. However, the possibility to directly analyze the products in a state as close as possible to their mode of consumption is becoming increasingly common. In this paper, some examples are illustrated of recent methodological developments in this direction, adapted to the study of products of various kinds such as solids (cheese, meat) or liquids (oils).

## Keywords

**Foodstuff, NMR, HRMAS, multivariate statistics.**

Les composés qui constituent un produit de consommation agroalimentaire ou ses précurseurs sont pour une large majorité des molécules bioorganiques, de taille et concentration très variables. Le seuil de sensibilité de la RMN pour des appareillages standards est de l'ordre du micromolaire pour le cas de l'analyse du proton. De plus, dans le cas d'un mélange, les composés à concentration plus élevée ont tendance à obscurcir les signaux des autres molécules. Il est donc commun, dans un premier niveau d'analyse, de se concentrer sur les produits dominants. En effet, il s'agit là d'un problème commun à toute analyse de produits biologiques, comme cela est expliqué plus en détail dans l'article de B. Elena-Herrmann *et coll.* concernant la métabolomique (voir p. 59), dont l'étude par RMN d'aliments dans leur forme complexe peut être considérée comme une branche. Il n'est donc pas surprenant que les méthodes de la métabolomique, en utilisant en priorité les composés les plus concentrés, aient été appliquées à l'agroalimentaire, notamment pour des questions de profilage de produits en association aux aspects de plus en plus liés de nutrition et de santé. Des points d'investigation centraux dans ce cadre sont l'âge et l'origine géographique, et donc l'authenticité des labels AOP (appellation d'origine protégée) et la traçabilité d'un produit. Des exemples de ce type de recherches font l'objet de la première partie de cet article qui concerne la caractérisation de fromages et de viandes par RMN.

L'identification de composés très proches en nature et structure chimique reste l'un des défis de la chimie analytique. Bien que les méthodes chromatographiques

progressent rapidement, la RMN a su apporter, grâce à sa facilité à décomposer des signaux complexes dans plusieurs dimensions, un apport original et autonome des techniques séparatives. Mis à part le gain de temps qui peut être attendu pour des mesures sur un échantillon brut, une technique de séparation « spectrale » a l'avantage de pouvoir être utilisée en aveugle, ce qui n'est pas souvent le cas pour la chromatographie.

La seconde partie concernera un exemple tout récent de RMN séparative.

## Analyse de produits alimentaires solides (fromages, viandes...) : la RMN HRMAS

Traditionnellement, la RMN des mélanges s'est concentrée sur l'étude des solutions. Mais étant donné que la large majorité des produits de consommation agroalimentaire sont à l'état solide, la possibilité d'analyser des produits directement dans cette forme, sans une extraction préalable, est naturellement attrayante.

Un problème lié à l'analyse d'aliments solides dérive de leurs compositions moléculaires et de leurs structures physiques très variées. En particulier, des compartiments caractérisés par une mobilité moléculaire différente peuvent exister, comme par exemple pour une même molécule liée à une matrice (lipides, membranes, etc.) ou libre de diffuser dans une phase pseudo-liquide. Dans ces conditions, les spectres RMN  $^1\text{H}$  peuvent perdre en résolution. Ceci est

dû à trois effets principaux : la réduction de la mobilité moléculaire pour les molécules figées réintroduit des interactions anisotropes (et notamment les couplages dipolaires), la relaxation pour ces mêmes molécules devient plus efficace, et enfin, les variations de l'anisotropie de la susceptibilité magnétique entre départements, qui se traduisent par un élargissement des signaux.

Du fait de cette dégradation de la résolution et du grand nombre de molécules présentes, l'analyse devient impossible en absence de mesures spécifiques. La méthode dite de la rotation à l'angle magique (MAS, « magic-angle spinning ») à haute résolution (HRMAS) répond bien à cette problématique. Introduite en 1995 pour faciliter la caractérisation de résines fonctionnalisées dans le cadre de la chimie combinatoire [1], la technique n'est en effet rien de plus que la combinaison de la rotation à l'angle magique optimisée pour des mesures de spectres RMN  $^1\text{H}$  sur des phases hétérogènes de qualité proche de celles obtenues en solution (voir *figure 1*). Effectivement, mis à part la relaxation, les deux autres effets sont éliminés ou fortement réduits par la rotation à l'angle magique. La différence en temps de relaxation entre signaux a un effet bénéfique tant qu'elle contribue à amplifier l'observabilité des molécules les plus mobiles (d'un facteur inversement proportionnel à la différence en largeur de raie).

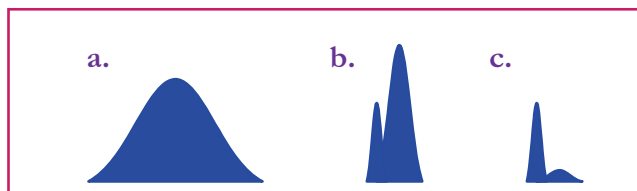


Figure 1 - La rotation à l'angle magique à haute résolution (HRMAS).

a. Le spectre RMN  $^1\text{H}$  d'un mélange hétérogène donne des signaux larges ; b. la rotation à l'angle magique récupère de la résolution si les molécules sont au moins partiellement mobiles ; c. un filtre de relaxation (CPMG ou similaire) peut être utilisé pour réduire l'intensité des signaux en provenance des molécules moins mobiles.

Il faut considérer que ces signaux fins peuvent apporter des éléments de discrimination importants, étant associés à des métabolites issus d'un processus caractéristique de la production (par exemple par protéolyse) ou liés à la provenance géographique (par l'alimentation ou par un métabolisme spécifique). Pour le cas où les raies larges dominent, les spectres peuvent être enregistrés avec un artifice, la séquence Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG), qui produit un écho de spin dont l'intensité décroît du fait de la relaxation. Dans ces conditions, l'analyse amplifie ultérieurement le signal des molécules les plus mobiles (ayant une relaxation plus lente).

L'une des toutes premières études complètes HRMAS réalisées sur des produits alimentaires a concerné l'évolution de la composition moléculaire du Parmigiano Reggiano pendant sa maturation [2-3]. La qualité spectrale obtenue pour la RMN  $^1\text{H}$  HRMAS de ce fromage à pâte dure, très élevée, est illustrée en *figure 2* pour deux échantillons d'âges différents.

Un point important à remarquer est que l'addition de quelques microlitres d'eau deutériée, nécessaires pour stabiliser le champ statique (« lock ») et homogénéiser le champ magnétique (« shim »), facilite certainement la dynamique moléculaire. En effet, les spectres HRMAS

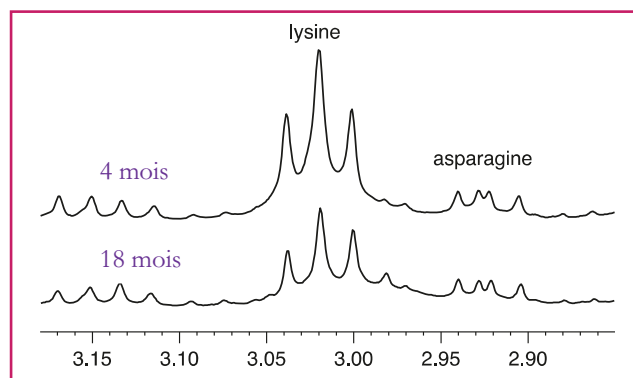


Figure 2 - Détail du spectre RMN  $^1\text{H}$  HRMAS d'échantillons de Parmigiano Reggiano à deux stades de maturation différents (d'après [2]).

obtenus dans ces conditions correspondent assez bien, en ce qui concerne les molécules hydrophiles, aux spectres mesurés sur un extrait. L'intérêt de la HRMAS ici est de fournir, en même temps que les résultats, une mesure de la teneur en lipides et d'autres espèces hydrophobes, ce qui permet de suivre l'évolution de la composition de l'échantillon d'une façon plus globale (voir *figure 3*).

Les spectres obtenus sont, par complexité et composition, du même type que ceux rencontrés dans les études de métabolomique par RMN (voir B. Elena-Herrmann

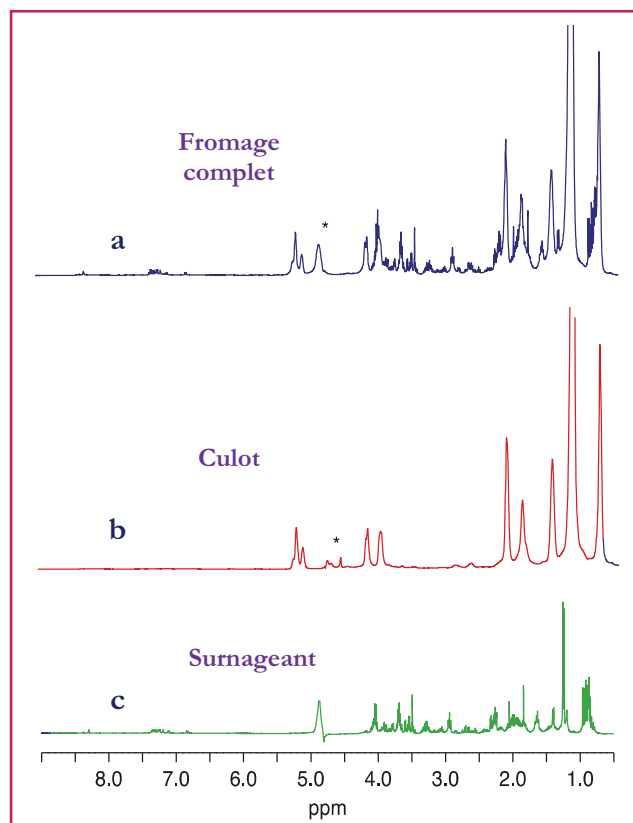


Figure 3 - HRMAS d'un fromage.

RMN HRMAS  $^1\text{H}$  sur un échantillon de fromage râpé (Parmigiano Reggiano) (a) et du même fromage centrifugé plusieurs fois : culot (b) et surnageant (c). Cette comparaison permet de comprendre la capacité de la méthode à caractériser un grand nombre de molécules de faible taille moléculaire (signaux fins) en même temps que d'autres de mobilité plus réduite (ici les lipides).

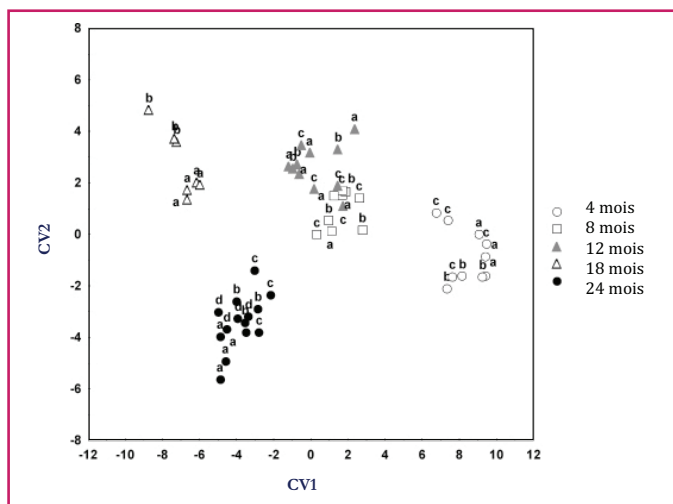


Figure 4 - Analyse canonique associée à une statistique supervisée (ADL) des spectres RMN HRMAS de cinq groupes de Parmigiano à différents âges de maturation (d'après [3]).

et coll. p. 59). Ainsi, le protocole d'analyse suivi peut être celui de la métabolomique :

- attribution des signaux et identification des composés par RMN 2D (TOCSY, HSQ...);
- classification des échantillons par rapport à leur qualité alimentaire (typiquement l'âge, la provenance géographique) par l'étude d'un nombre suffisant de cas et une analyse chimiométrique adaptée. Cette étape permet, dans des cas favorables, d'identifier des marqueurs moléculaires de qualité.

Une démonstration de ce protocole pour la détermination de l'âge d'affinage du Parmigiano Reggiano est illustrée sur la *figure 4* qui résume l'analyse HRMAS sur quinze échantillons de cinq âges de maturation : 4, 8, 12, 18 et 24 mois. Le graphe a été construit en utilisant une statistique supervisée (voir [4] pour une introduction aux méthodes chimiométriques en RMN). Ici, il s'agissait de l'analyse discriminante linéaire (ADL), qui a permis de condenser les variations significatives du spectre RMN (16 K points, donc 16 K variables) à juste deux variables (dites « canoniques » dans ce cas) [5-6]. Un aspect intéressant de cette analyse est que l'hétérogénéité structurale intrinsèque du fromage se traduit en une dispersion des points représentant les produits d'un même âge. Il est donc avisé d'échantillonner un même fromage plusieurs fois, pour avoir une description claire de cette variabilité en composition. L'effort de classification par RMN HRMAS est significatif seulement si cette dispersion de concentration (*intragroupe*) est inférieure aux changements induits par l'âge (*intergroupe*). Dans le cas du Parmigiano, il est intéressant de remarquer la présence de deux chemins métaboliques (les deux variables réduites du graphe) au long du processus de maturation. L'analyse de la composition des variables réduites montre qu'au long du premier de ces chemins (CV1), on observe la parution d'acides aminés due à la protéolyse, tandis que la deuxième variable (CV2) pointe vers la variation de composés spécifiques (la citrulline et la tyrosine, par exemple).

L'analyse de l'origine géographique, liée par exemple à des questions d'AOP, est un autre aspect intéressant pour établir la qualité et la valeur à la vente d'un produit. Une démonstration de la capacité de la HRMAS à apporter une contribution dans ce domaine a été faite avec une étude sur de l'Emmental en provenance de Suisse, France, Allemagne,

Autriche et Finlande [7-8]. Dans ce cas, les sources de variabilité moléculaire sont bien plus importantes (nature du lait, alimentation et origine des vaches, traitement du lait...). Cependant, la RMN HRMAS a permis de suggérer des marqueurs capables de faire la différence entre les différentes typologies d'Emmental analysées (*figure 5*). Notamment, les fortes différences observées entre Emmental au lait cru ou pasteurisé confirment un impact de cette procédure de stérilisation sur la qualité finale du produit.

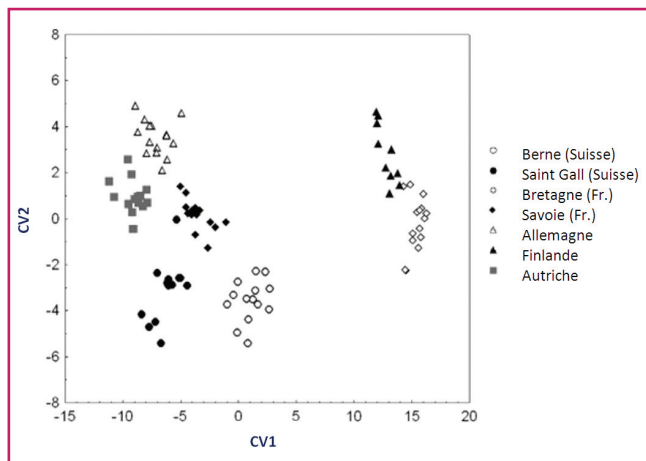


Figure 5 - Analyse canonique associée à une statistique supervisée (ADL) de la RMN HRMAS de fromages de type Emmental produits dans différents lieux. Les groupes d'échantillons à valeurs élevées de CV1 correspondent à des produits pasteurisés (d'après [7]).

La possibilité d'appliquer la HRMAS pour l'analyse de qualité de produits à base de viande est compliquée par le grand nombre de facteurs qui peuvent contribuer au profil métabolique de l'échantillon. En effet, aux variations possibles du métabolisme d'animaux de races différentes, élevés dans des conditions spécifiques, s'ajoutent les effets génétiques et le fait que les différentes parties du corps de l'animal n'ont pas la même constitution. Une étude exploratoire de l'applicabilité de la HRMAS pour la caractérisation de la traçabilité de la viande séchée a confirmé ces difficultés [9]. Bien qu'une minimisation des facteurs de variation ait été introduite dans la conception du protocole (certification de l'origine du bœuf, préparation de l'échantillon à partir d'un muscle spécifique), l'analyse HRMAS a permis de construire un modèle interprétatif/prédictif, mais moins performant que dans le cas du fromage (*figure 6*).

## La RMN maximum quantum : un exemple de RMN « séparative »

Bien que les méthodes RMN multidimensionnelles courantes soient déjà très performantes pour identifier un grand nombre de composés, la richesse et la variabilité en composition des produits agroalimentaires pourraient profiter d'une finesse d'analyse accrue. Un exemple dans ce sens est la technique de la RMN maximum quantum (RMN MaxQ) introduite en 2010 [10] (*figure 7*). Ici, une résolution accrue est obtenue grâce à l'excitation d'un signal particulier dû à la combinaison de plusieurs protons de façon cohérente (cohérence à plusieurs quanta). En effet, le signal RMN classique (1Q) d'un proton donné prend souvent la forme

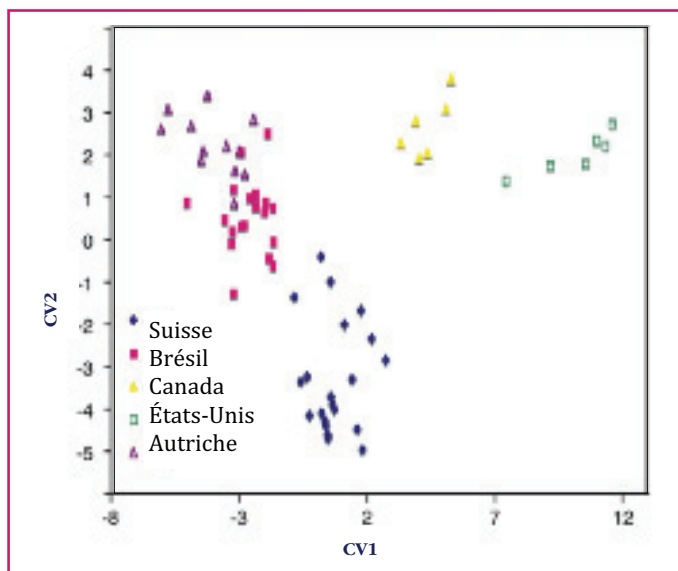


Figure 6 - Analyse statistique supervisée (ADL) de la RMN HRMAS d'échantillons de viande séchée préparée avec du bœuf élevé dans différents pays (d'après [9]).

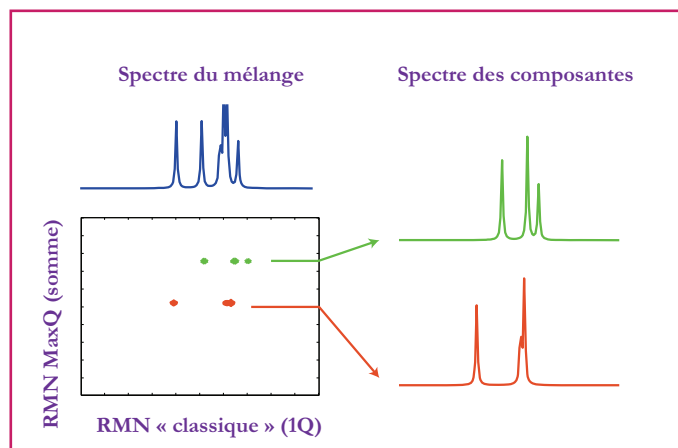


Figure 7 - La RMN maximum quantum (RMN MaxQ).

Cette méthode permet la résolution de spectres chevauchés de deux (ou plusieurs) systèmes de spins mutuellement couplés si la somme des déplacements chimiques des protons de chaque système est différente.

d'un multiplet du fait du couplage scalaire J avec d'autres protons le voisinant. Cependant, si tous les protons impliqués dans ce couplage mutuel sont excités dans la cohérence à plusieurs quanta correspondante, il ne reste plus de partenaire de couplage (spins passifs) et le signal est donc un simple singulet. Le spectre de corrélation correspondant prend la forme d'un hybride entre une TOCSY, qui révèle les fragments moléculaires par leur couplage J, et une DOSY, qui aligne des molécules dans la deuxième dimension selon un schéma très simple.

L'application de la RMN MaxQ à la spéciation des molécules phénoliques dans une huile d'olive extra-vierge est démontrée en figure 8, avec la différenciation de seize molécules grâce à l'analyse de la région aromatique des spectres de corrélation à 3Q et 4Q [11].

L'attribution de ces signaux à des structures moléculaires peut être faite en comparant les déplacements chimiques et les formes de couplage des signaux avec les données de la littérature, même si lorsque les sous-spectres

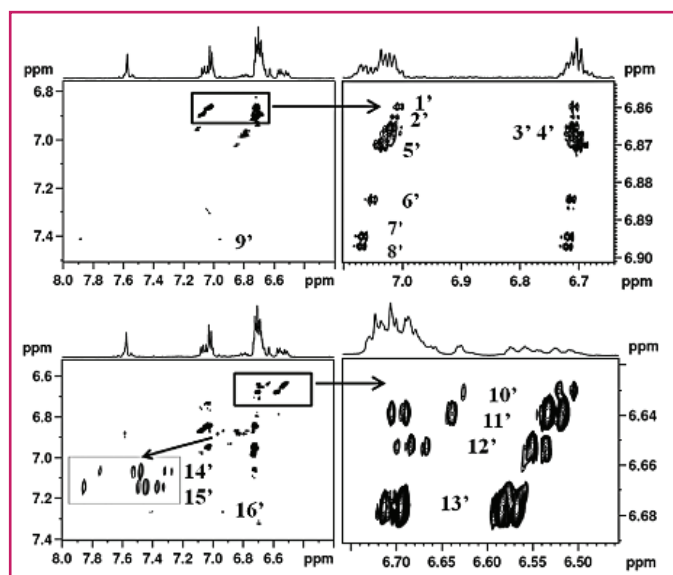


Figure 8 - Analyse RMN MaxQ d'un extrait polaire d'une huile d'olive extra-vierge, pour caractériser les molécules phénoliques (d'après [11]).

des composantes sont très proches (voir le spectre en figure 7), la reconnaissance précise des composantes reste un défi.

## Références

- [1] Anderson R.C., Stokes J.P., Shapiro M.J., Structure determination in combinatorial chemistry - Utilization of magic-angle-spinning HMQC and TOCSY NMR-spectra in the structure determination of Wang-bound lysine, *Tetrahedron Lett.*, **1995**, 36, p. 5311.
- [2] Shintu L., Ziarelli F., Caldarelli S., Is high-resolution magic angle spinning NMR a practical speciation tool for cheese samples? Parmigiano Reggiano as a case study, *Magnetic Resonance in Chemistry*, **2004**, 42, p. 396.
- [3] Shintu L., Caldarelli S., High-resolution MAS NMR and chemometrics: characterization of the ripening of Parmigiano Reggiano cheese, *J. of Agric. and Food Chem.*, **2005**, 53, p. 4026.
- [4] Trygg J., Lunstedt T., Chemometrics techniques for metabonomics, *Handbook of Metabonomics and Metabolomics*, J. Lindon, J.K. Nicholson, E. Holmes (eds), Elsevier, **2006**.
- [5] Analyse canonique des corrélations ([http://fr.wikipedia.org/wiki/Analyse\\_canonique\\_des\\_corr%C3%A9lations](http://fr.wikipedia.org/wiki/Analyse_canonique_des_corr%C3%A9lations)).
- [6] Analyse discriminante linéaire ([http://fr.wikipedia.org/wiki/Analyse\\_discriminante\\_lin%C3%A9aire](http://fr.wikipedia.org/wiki/Analyse_discriminante_lin%C3%A9aire)).
- [7] Shintu L., Caldarelli S., Toward the determination of the geographical origin of emmental(er) cheese via high resolution MAS NMR: A preliminary investigation, *J. of Agric. and Food Chem.*, **2006**, 54, p. 4148.
- [8] Pillonel L., *Analytical development and traceability in food chemistry. Examples of application to Swiss and foreign Emmental cheese*, University of Neuchâtel (Suisse), **2004**.
- [9] Shintu L., Caldarelli S., Franke B.M., Pre-selection of potential molecular markers for the geographic origin of dried beef by HR-MAS NMR spectroscopy, *Meat Science*, **2007**, 76, p. 700.
- [10] Reddy G.N.M., Caldarelli S., Demixing of severely overlapping NMR spectra through multiple-quantum NMR, *Anal. Chem.*, **2010**, 82, p. 3266.
- [11] Reddy G.N.M., Caldarelli S., Maximum-quantum (MaxQ) NMR for the speciation of mixtures of phenolic molecules, *Chemical Comm.*, **2011**, 47, p. 4297.



### Stefano Caldarelli

est professeur à l'Institut des Sciences Moléculaires de Marseille (ISM2)\*.

\* ISM2, UMR 7313 CNRS/Aix Marseille Université, Service 512, Campus scientifique de Saint-Jérôme, F-13397 Marseille Cedex 20 ; et UPR 2301 ICSN CNRS Gif-sur-Yvette.  
Courriel : s.caldarelli@univ-amu.fr