

LA RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE

Une réponse possible à des problématiques analytiques actuelles et futures

Résumé : Le développement en matière de méthodes d'analyse doit répondre aux besoins de plus en plus nombreux de recourir à des techniques spécifiques et précises capables de satisfaire aux exigences d'un contexte de production et de commercialisation internationalisé. Les méthodes spectroscopiques, rapides, propres, non destructives et permettant des déterminations multiples simultanément, constituent des outils privilégiés en réponse à ces besoins. En particulier, la méthode RMN haute résolution, encore peu répandue dans les laboratoires de contrôle, présente des caractéristiques et un potentiel de développement susceptible de répondre aux besoins de l'industrie laitière. Des résultats obtenus à ce jour apparaissent prometteurs.

De nouveaux objectifs analytiques :

Les besoins en méthodes d'analyse pour doser les composants du lait et des produits laitiers d'intérêt économique sont maintenant couverts tant sur le plan des méthodes de référence que pour les méthodes rapides de routine.

Toutefois, la recherche et développement en matière de méthode d'analyse doit maintenant faire face aux nouveaux besoins liés à la demande sociétale et notamment relative à la qualité des produits. Le secteur laitier ne peut échapper à cette tendance.

En effet, le souci de protection des consommateurs et de loyauté des échanges, dans un contexte croissant d'internationalisation des échanges, conduit à la mise en place d'une réglementation internationale de plus en plus complexe (CE, Codex) :

Ainsi preuves doivent ou devront à terme être faites

- des allégations nutritionnelles et santé,
- de l'absence de contaminations chimiques, biochimiques et microbiologiques,
- de la conformité des produits (falsification, adultération),
- de l'authenticité des produits AOP.

Par ailleurs, les besoins de contrôle s'ils portent principalement sur les produits mis à la consommation, peuvent également concerner la matière première, à l'exemple du lait dont la qualité est vérifiée régulièrement par l'interprofession laitière à travers son réseau de laboratoires de paiement du lait. Ainsi, à titre d'exemple, l'amélioration croissante des connaissances sur la matière grasse et son rôle sur le métabolisme pourrait conduire à une réflexion sur un classement différentiel des laits sur un critère de qualité nutritionnelle ou santé, moyennant de pouvoir en mesurer efficacement les traceurs ou molécules caractéristiques.

Compte tenu de la diversité et de la fréquence des contrôles imposés par l'accroissement des échanges commerciaux, un contrôle régulier de la qualité et de la conformité des produits est difficilement réalisable

avec des méthodes de référence, souvent longues, coûteuses, et pouvant demander une haute technicité. Pour être précises, l'identification et la quantification de molécules particulières dans un mélange complexe (matrice alimentaire) requièrent jusqu'à aujourd'hui une séparation préalable des analytes avant dosage, ces deux étapes étant spécifiques du type de composé à doser. C'est sur ce principe que sont établies les méthodes de référence. Un contrôle exhaustif d'un produit pour en établir ou vérifier la composition par rapport à un cahier des charges multiplie les analyses par autant de catégories d'analytes concernés, générant de fait un coût très important de l'information collectée.

Le développement de méthodes d'analyse rapides s'avère donc indispensable.

Les méthodes spectroscopiques

Les méthodes de spectroscopie sont devenues les outils privilégiés pour analyser la composition des produits laitiers en raison de leur rapidité, de leur caractère non destructif et non polluant et de leur aptitude à doser simultanément plusieurs analytes ou composants de la matrice.

A ce jour, dans le domaine laitier, les méthodes d'analyse rapides utilisées restent basées en majorité sur la spectrométrie d'absorption en moyen et proche infra-rouge. Elles sont encore peu spécifiques, se limitant à un nombre restreint de composants ou familles de composants (matière grasse, protéines, sucres, par exemple), donc peu adaptées à l'analyse fine de composition. La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire basse résolution y est également utilisée mais y tient une place plus réduite en raison d'un nombre limité d'applications (eau et matière grasse).

Le besoin existe donc d'identifier de nouvelles méthodes d'analyse dotées des mêmes avantages (rapidité, propreté, non destructif) mais pouvant s'adresser à un plus grand nombre de molécules, de manière plus spécifique, dans les produits alimentaires, notamment laitiers, et d'en développer des applications.

La spectroscopie par Résonance Magnétique Nucléaire Haute Résolution (RMN HR)

Une méthode rapide avec du potentiel

En raison de son principe, la résonance magnétique nucléaire, plus particulièrement la résonance magnétique nucléaire haute résolution (RMN HR) apparaît comme une méthode susceptible de pouvoir relever le défi posé. En effet, dans son principe, la RMN s'adresse aux noyaux atomiques dont elle permet d'obtenir une signature spectrale caractéristique de l'environnement atomique et électronique de chaque atome de l'élément considéré.

Principe: Certain noyau atomique, par exemple l'atome d'hydrogène ou le carbone 13, soumis à un champ magnétique ont la capacité d'entrer en résonance sous l'excitation d'une onde électromagnétique à une fréquence spécifique liée à l'intensité du champ magnétique. La fréquence de résonance dépend de l'environnement électronique et atomique du noyau lequel modifie localement le champ magnétique et, en conséquence, la fréquence théorique d'un même noyau considéré isolément. La méthode RMN consiste à mesurer la différence relative de fréquence par rapport à la fréquence théorique, appelé déplacement chimique. Chaque molécule peut donc être caractérisée en théorie par l'ensemble des déplacements chimiques du type de noyau considéré, constituant ainsi le spectre caractéristique de la molécule. Dans un mélange de molécules, le spectre obtenu reflète la somme des spectres individuels.

Né aux USA en 1945, le principe de la RMN a valu le Prix Nobel de Physique en 1952 à ses deux principaux inventeurs, Edward M. Purcell et Félix Bloch. Elle a depuis été déclinée à plusieurs niveaux en fonction des différentes applications recherchées, conduisant à distinguer principalement deux types de RMN, la RMN basse résolution et la RMN haute résolution.

Si tous les éléments ne se prêtent pas nécessairement à l'analyse RMN, les principaux éléments constitutifs de la matière vivante (C, H, O, N, P) le peuvent, soit directement, soit à travers l'un de ses isotopes, ce qui, dans le cas des matrices alimentaires, confère potentiellement un avantage particulier à la méthode.

la RMN basse résolution : utilise des champs de faible intensité et utilise la résonance du noyau d'hydrogène pour lequel le maximum d'intensité de signal est obtenu. D'un coût relativement peu élevé et d'une instrumentation encore peu encombrante, elle est appliquée à l'analyse quantitative directe de certains éléments (eau et matière grasse) et est utilisée en analyse de routine pour le contrôle des produits. Elle permet notamment d'en distinguer

efficacement les différentes formes d'eau, liées ou libres sans séchage ou étuvage préalable. Elle est également utilisée pour l'étude de la répartition de l'eau dans des matrices organiques par imagerie nucléaire.

la RMN haute résolution : utilise des champs d'intensité élevée et a été longtemps réservée aux laboratoires de recherche, notamment dans le cadre de l'étude structurale et dynamique des composés organiques et des mécanismes réactionnels. Elle est potentiellement applicable à tous les noyaux « sensibles », c'est à dire de moments magnétiques non nuls. Outre un matériel coûteux, elle a longtemps requis une grande technicité face aux techniques variées d'exploitation de l'information.

L'influence sur les mesures de l'état de mobilité des éléments dans les matrices a conduit à distinguer la RMN des solides avec lesquels une haute résolution est moins aisée qu'avec les liquides et pour lesquels ont dû être développées des techniques particulières. C'est notamment au niveau des modalités de présentations de l'échantillon qu'a été accompli un gain de résolution très significatif, avec l'introduction de la rotation d'angle magique (MAS). Une rotation de l'échantillon selon un angle particulier de $54^{\circ}44''$ permet en effet d'annuler plusieurs effets, notamment d'interactions entre noyaux (effets de couplage direct) et d'hétérogénéité de l'échantillon. Dans le cas favorable de produits avec une mobilité moléculaire partielle (semi-solides), il est alors possible d'atteindre une résolution proche de celle obtenue avec les liquides, la technique prenant le nom de RMN haute résolution à rotation d'angle magique (HR-MAS). Particulièrement efficace dans le cas de matrices hétérogènes polyphasiques (ex. pâtes et gels), cette technique a permis d'ouvrir une voie importante pour une analyse fine des aliments et produits alimentaires.

Un outil régulièrement amélioré

La RMN HR n'a vu son réel développement qu'avec le progrès de la technologie des électroaimants supraconducteurs, de l'électronique et du traitement du signal et de l'information spectrale.

Avec les développements scientifiques, techniques et technologiques de ces dix dernières années, la sensibilité et la résolution de la méthode ont connu des améliorations considérables, la rendant de plus en plus adaptée à l'analyse quantitative et qualitative directe dans les produits complexes :

- technologie des aimants améliorée (champs plus réguliers, plus puissants, protégés),
- porte échantillon de plus grandes dimensions (accroissement du signal)
- sondes basse température (meilleur rapport signal/bruit)

- sondes multiples permettant la scrutation simultanée de plusieurs noyaux (accroissement de la spécificité),
- électroniques améliorées (meilleur rapport signal/bruit),
- rapidité du traitement du signal accrue (déconvolution, Transformée de Fourier),
- traitement de l'information spectrale grâce aux progrès de l'informatique et des logiciels.

Néanmoins, la volonté des fabricants de rendre la méthode accessible à un plus grand nombre d'utilisateurs a conduit à la mise au point de systèmes automatisés conviviaux où la micro-informatique et des logiciels dédiés de traitement prennent une place déterminante (par exemple, AVANCE INCA™ et Metabolic Profiler, de Bruker ; Varian NMR System, de Varian Inc.).

Notamment, des systèmes intégrés ont été développés pour associer des séparations chromatographiques préalables aux dosages RMN, à l'exemple de la chromatographie liquide avec la LC-NMR (Spraul et al, 2005).

Avec les besoins d'extension du marché, les fabricants tendent à s'intéresser de plus en plus à des applications de terrains. Ainsi des applications dédiées aux laboratoires de routine de l'agroalimentaire commencent à se développer à travers des collaborations avec des laboratoires de recherche et développement.

Les travaux dans le domaine de l'analyse en agroalimentaire restent à ce jour encore en nombre limité et orientés vers un aspect plus qualitatif que quantitatif plus souvent associés à la caractérisation des produits. Les exemples de travaux en analyse quantitative restent encore rares à ce jour.

Développement en analyse quantitative spécifique :

Un exemple d'application possible au domaine laitier est donné par les travaux de De Angelis Curtis et al (2000) qui, outre qu'ils proposent un mode de suivi de l'affinage du fromage Grana Padano, permettent d'en établir les profils en acides aminés en cours d'affinage par RMN ¹H (proton) à 500MHz.

La composition en acides aminés est un élément majeur de la valeur nutritionnelle d'un aliment et, dans le cas d'aliments dédiés à des populations sensibles (aliments pour nourrissons par exemple) son contrôle est à ce jour limité par le manque de technique analytique rapide sinon économique. Ce besoin prend un caractère accru avec l'usage de lyophilisats de protéines non nécessairement d'origine laitière et de valeurs nutritionnelles différentes. La RMN pourrait donc être une option

envisageable pour établir une aminogramme par scrutation directe d'un échantillon dans le cadre du contrôle des produits.

Développement en analyse qualitative et caractérisation :

La méthode RMN connaît son premier succès dans le domaine agroalimentaire dans les années 80 avec la technique de mesure du rapport isotopique de l'hydrogène pour la détection de la chaptalisation en vinification (SNIF-NMR®). La méthode, depuis déclinée sur d'autres applications, est basée sur l'identification préalable d'un traceur (par exemple l'éthanol) dont on détermine l'empreinte spectrale qui est supposée varier avec le facteur à identifier (par exemple, nature et origine des sucres fermentés).

Il n'est toutefois pas acquis de pouvoir identifier des traceurs spécifiques pertinents adaptés à tous les besoins. Aussi des approches plus globale utilisant des traitements statistiques multidimensionnels (ACP, AD) pour l'exploitation des spectres RMN des produits, ont-elles vu le jour. Elles permettent d'établir des reconnaissances et classements en fonction de combinaison de zones spectrales différentes qu'il est possible de relier à différents traceurs biochimiques, qui ensemble peuvent caractériser les produits.

Ainsi la méthode RMN a pu montrer son efficacité dans la caractérisation de produits dans différents secteurs agroalimentaires. Par exemple, le secteur des jus d'orange pour lesquels l'origine, la naturalité (à partir de concentré ou non) et le traitement thermique peuvent être identifiés par RMN HR du proton à 400MHz, tout comme l'apport de jus d'autres fruits avec leurs identifications et proportions respectives (Spraul et al, 2005). Les mêmes auteurs mentionnent avec la même technique la discrimination entre type de bière sur la base des céréales ayant servi à la préparation du malt. Le domaine des huiles est également un exemple où la méthode RMN permet de caractériser l'origine au vu de travaux réalisés sur des huiles d'olive de différents pays (Royer et al, 1997).

Dans le secteur laitier, des travaux récents conduits au sein du laboratoire TRACES des universités de Provence et Paul Cézanne de Marseille, ont montré la possibilité de caractériser les différents stades d'affinage du fromage Parmigiano Reggiano par application de la technique HR-MAS en RMN ¹H à 400MHz et parallèlement d'assigner les raies spectrales aux principaux éléments marqueurs de l'affinage (Shintu et al, 2004).

Une étude ultérieure menée par la même équipe sur une population de 20 fromages d'Emmental de cinq pays européens en utilisant la même technique a

permis d'établir une nette discrimination des fromages en fonction du pays d'origine et également permis de mettre en évidence les fromages issus de lait traité thermiquement (Shintu et al, 2006).

La protection des produits d'appellation d'origine contrôlée (AOC, AOP) et notamment des fromages peut donc trouver dans cette méthode une alternative à la panoplie des méthodes traditionnelles nécessaires (mais peut-être non toujours suffisantes) pour établir l'authenticité de l'origine d'un produit et de sa conformité à un cahier des charges de type AOC. Le besoin de contrôle rapide se trouve notamment accru avec le développement de la commercialisation sous forme de parts pour lesquelles toute référence à la meule ou tomme d'origine n'est plus possible pour le consommateur.

Les hypothèses et conjectures par rapport aux besoins émergents

Dans la compétition pour les parts de marché, les allégations nutritionnelles et santé prennent de plus en plus d'importance et les allégations se rapportant à une composition particulière doivent pouvoir être vérifiées tant par les fabricants eux-mêmes que par les services de contrôle de la réglementation.

L'incidence de la qualité des matières grasses alimentaires sur la santé humaine s'inscrit dans cette problématique, que ce soit pour réglementer la teneur maximale en acides gras trans, que pour garantir des teneurs minimales en acides gras insaturés et poly-insaturés. A terme, les recherches permettront vraisemblablement de déterminer avec précision l'incidence bénéfique ou non de tel ou tel acide gras, ou encore des équilibres particuliers en acides gras, ce qui pourra conduire à la définition de nouveaux critères de qualité de la matière grasse.

L'analyse quantitative spécifique rapide de ces acides gras pourrait alors devenir nécessaire pour établir des profils d'acides gras caractéristiques.

A ce jour, les travaux de différents auteurs ont permis d'établir, pour nombre d'acides gras, des tableaux de déplacements chimiques pour les noyaux ^1H et ^{13}C en différentes positions dans les molécules, avec une prise en compte également des isoméries cis des trans, et où il est notamment possible d'apprécier les différences spectrales entre acides gras.

Sur le plan du développement de méthodes d'analyse, différents auteurs font état de l'analyse quantitative d'acides gras insaturés (AGMI, AGPI, ω -3) dans des matrices grasses variées (telles que huiles végétales et graisses de poisson) par RMN du proton et du carbone 13 (Knothe 2005). C'est le cas, par exemple, de l'établissement de profils en C18:0, C18:1 et

C18:2 dans les huiles végétales par dosage direct en RMN ^1H à 400MHz (Knothe et al, 2004).

Néanmoins, les travaux publiés à ce jour ne concernent encore qu'un nombre limité d'acides gras particuliers dans des matrices relativement homogènes et simples.

La composition particulièrement variée de la matière grasse laitière (nombre, nature et proportions des acides gras) reste certainement un handicap par rapport aux huiles végétales, eu égard à la complexité des spectres RMN. Toutefois, les développements techniques réalisés dans le domaine RMN, associés aux possibles couplages avec des techniques séparatives, permettent d'attendre des possibilités accrues en terme de reconnaissance de molécules et de quantification.

Aussi, n'est-il pas exclu que la RMN puisse être porteuse également de solutions alternatives rapides applicables à la matière grasse laitière, pour suppléer au moins en partie aux méthodes longues et coûteuses actuellement requises pour l'établissement de profils d'acides gras.

Conclusion

La méthode RMN est encore mal connue et peu implantée dans le secteur laitier, toutefois des voies d'application aux produits laitiers se dessinent à travers différentes études menées depuis l'année 2000. La méthode présente un caractère séduisant en raison de la polyvalence tant au niveau des matrices laitières analysables que des éléments dosables dans ces produits. L'approche qualitative en rapport avec la caractérisation de la qualité des produits apparaît la plus avancée, tandis que les développements en analyses quantitatives sont à évaluer en fonction des composés à doser et des produits laitiers à l'aune des possibilités actuelles de la technique.

Des axes de développement et des priorités seront donc à définir.

Olivier LERAY

ACP :	Analyse en Composantes Principales
AD :	Analyse Discriminante
AGMI :	Acides gras monoinsaturés
AGPI :	Acides gras polyinsaturés
LC-NMR :	Liquid Chromatography Nuclear Magnetic Resonance
RMN HR :	Résonance Magnétique Nucléaire Haute Résolution
HR-MAS :	High Resolution with Magic Angle Spinning

SNIF-NMR : Site-Specific Natural Isotope
Fractionation Magnetic Nuclear
Resonance

Shintu L. , Caldarelli S., (2006): Towards the determination of the geographical origin of Emmental cheese via High Resolution MAS NMR : A preliminary investigation. (envoyé pour publication).

Références bibliographiques

De Angelis Curtis S., Curini R., Delfini M., Brosio E., D'Ascenzo F., Bocca B., (2000) : Amino acid profil in the ripening of Grana Padano cheese : A NMR study. *Food Chemistry*, Vol. 71, 4, 495-502.

Knothe G., (2005) : ^1H NMR Spectroscopy of Fatty Acids and their derivatives – Quantitation by ^1H NMR. The Lipid Library, www.lipidlibrary.co.uk.

Knothe G., Kenar J.A., (2004) : Determination of the fatty acid profil by ^1H NMR spectroscopy. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 106, 88–96 (2004).

Shintu L. , Caldarelli S., (2004) : High-Resolution MAS NMR and chemometrics : Characterization of the ripening of Parmigiano Reggiano cheese. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*.

Spraul M., Humpfer E., Schäfer H., (2005) : Application of hyphenated NMR to the study of food. From « Magnetic Resonance in Food Science : The Multivariate Challenge. The Royal Society of Chemistry 2005. ISBN 0-85404-648-8.

Royer A., Naulet N., Lees M., Martin G.H., (1997) : Isotopic analysis for the authentication of extra-virgin oils. *Food Authenticity 4th European Symposium*, La Baule, 4-6 juin.