

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

(11) N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 530 026

(21) N° d'enregistrement national : 82 12148

(51) Int CI³ : G 01 N 24/08, 27/62 // 33/14.

(12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 9 juillet 1982.

(71) Demandeur(s) : BENG SCH Eberhard Richard, GRIVET Jean-Philippe. — FR, SCHULTEN Hans-Rolf. — DE et BREVARD Christian. — FR.

(30) Priorité

(72) Inventeur(s) : Eberhard Richard Bengsch, Jean-Philippe Grivet et Hans-Rolf Schulten.

(43) Date de la mise à disposition du public de la demande : BOPI « Brevets » n° 2 du 13 janvier 1984.

(73) Titulaire(s) : BENG SCH Eberhard Richard, GRIVET Jean-Philippe. — FR et SCHULTEN Hans-Rolf. — DE.

(60) Références à d'autres documents nationaux appartenés :

(74) Mandataire(s) : Beau de Loménie.

(54) Procédé pour identifier et pour déterminer les origines bio- et/ou techno-synthétiques de substances organiques.

(57) La présente invention concerne un procédé pour identifier et pour déterminer les origines bio- et/ou techno-synthétiques de substances organiques. Le procédé est basé sur la détermination de la répartition caractéristique inter- et avant tout intramoléculaire d'isotopes légers, stables et magnétiquement actifs, en particulier du carbone-13 et/ou du deutérium, par une technique combinant comme élément essentiel la résonance magnétique nucléaire quantitative des noyaux précités avec la spactrométrie de masse à désorption de champs. Le procédé est applicable à l'analyse de produits concernant l'alimentation, les boissons, les arômes et les parfums, la pharmacologie et la médecine, la pollution, l'expertise et la médecine légale et analogues.

FR 2 530 026 - A1

Pour des substances organiques de toutes sortes, l'indication de leur origine peut être d'une grande importance. La présente invention concerne un procédé universel pour déterminer qualitativement, le cas échéant quantitativement, les origines bio- et/ou techno-synthétiques de substances organiques.

5 Les rares procédés existants sont généralement basés sur la mise en évidence d'un ou de plusieurs produits secondaires ou d'impuretés qui accompagnent de manière caractéristique le produit principal en fonction de son mode de synthèse. La possibilité d'éliminer ou d'ajouter un tel produit indicateur/marqueur, chimiquement différent du produit à examiner, permet de 10 fausser le résultat d'une éventuelle analyse dans le sens souhaité.

En conséquence, une analyse à l'abri de toute falsification ne peut être basée que directement sur la substance elle-même, à l'état chimiquement pur. Une substance pure est représentée par sa formule chimique structurale qui est identique pour un composé donné, quelle que soit son origine : bio- 15 logique, technique ou mixte.

Il convenait donc de rechercher des différences caractéristiques et reproductibles à l'intérieur de l'identité chimique, c'est-à-dire d'utiliser le fait que la formule chimique structurale n'est qu'une approximation de la réalité moléculaire qui couvre en effet des structures isotopiques différentes. Pour le procédé à développer, la formule structurale n'est donc plus la "dernière vérité" d'un procédé d'identification, mais au contraire une expression sommaire, dont les composants vont servir à résoudre le problème posé.

A titre d'explication du formalisme employé ci-après, nous développons 25 dans le tableau 1 un exemple simple, celui de l'isotopie carbone-13/carbone-12 pour l'acide acétique. Quatre espèces isotopiques sont théoriquement possibles. On parle d'isotopomères.

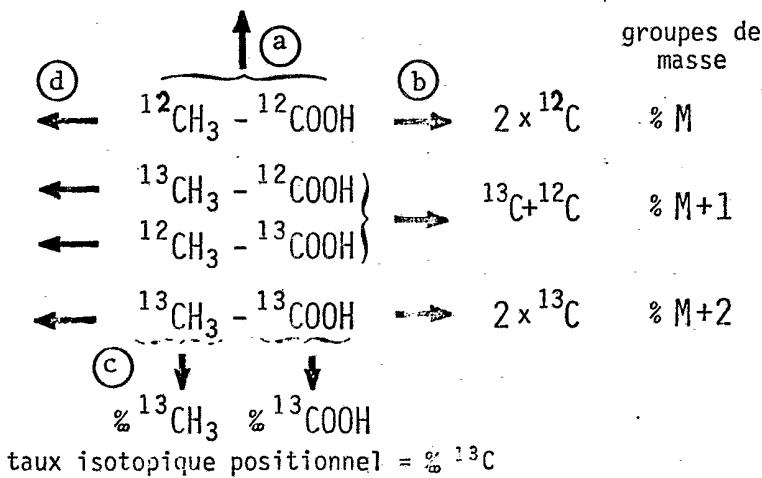
taux isotopique global
= % ^{13}C dans la molécule

30

tableau 1

35 isotopomères

40



On définit ainsi 4 paramètres d'identification isotopique :

a. Le taux isotopique global (α) qui correspond ici à l'abondance moyenne du carbone-13 dans les 2 positions possibles.

b. Les groupes de masse, dans lesquels on trouve la somme des concentrations des isotopomères présentant une masse identique, mais une répartition isotopique différente.

c. Le taux isotopique position par position. Le nombre de ces paramètres est égal au nombre des positions non équivalentes N susceptibles d'une substitution isotopique. Ici $^{12}\text{C} \rightarrow ^{13}\text{C}$ est égale à 2. Lorsque nous voulons, 10 dans la suite, caractériser semi-quantitativement une hétérogénéité intramoléculaire, par exemple un acide acétique plus pauvre en ^{13}C méthylique et plus riche en ^{13}C carboxylique, nous utilisons la symbolique suivante :



d. Les espèces à identité isotopique = isotopomères. L'isotopomère constitue le véritable corps chimique élémentaire. Il y a 2^N isotopomères lorsqu'il y a N positions non équivalentes, et $2^N(N'+1)\dots$ lorsqu'il y a en plus N' positions équivalentes, et ainsi de suite. Ainsi, le nombre des isotopomères pour l'acétate de sodium est $2^2 = 4$ par rapport à l'isotopie carbone-13/carbone-12, $3 + 1 = 4$ par rapport à deutérium/protium.

Les demandeurs ont essentiellement contribué à établir les connaissances systématiques sur les isotopomères : leurs préparations, leurs études par 25 résonance magnétique nucléaire et par spectrométrie de masse, les paramètres indispensables à leur identification et à leur analyse, et les effets isotopiques sur ces paramètres. Ces études ont été menées dans une première étape en milieu hautement enrichi, d'abord pour le deutérium,

- (E. BENGSCH, M. CORVAL. Préparation de l'éthanol deutérié CH₂DCH₂OH. Bull. 30 Soc. Chim. France 1963, 1867-68 - E. BENGSCH. Préparation de quelques homologues isotopiques de l'éthanol. Etude physico-chimique des conditions de leur synthèse et de leur purification. Diplôme d'Etudes Supérieures. Faculté des Sciences de Paris, mai 1966 - E. BENGSCH. Préparation et analyse spectroscopique des espèces isotopiques deutériées de l'éthanol C₂H_{5-n}D_nOH. Bull. 35 Soc. Chim. France 4B, 1971, 15 - E. BENGSCH. Isotopieeffekte in der Protonen- und Deuteronenresonanz der deutierierten Homologen des Athanols. Comptes-Rendus de l'Assemblée de la Société Chimique de l'Allemagne R.F., sept. 1971, p.171-2 - E. BENGSCH. Contribution à l'étude de la molécule d'éthanol par résonance magnétique nucléaire. Détermination et analyse positionnelle. Résonance du proton et du deuton. Effets d'isotopie. Doctorat d'Etat, Université 40

de Paris VI, juin 1972 - E. BENGSCHE, M. CORVAL, M. DELAUMONY. Préparation des éthanols deutériés $C_2H_{5-n}D_nOH$. Bull. Soc. Chim. France, 1973, 1788-93 - E. BENGSCHE. Résonance Magnétique Nucléaire du proton et du carbone-13 : effets d'isotopie observés avec les méthanol deutériés. Actualité Chimique, 1973, 5 n°4, 100 - E. BENGSCHE, M. CORVAL, G.L. MARTIN. Analyse isotopique de mélanges d'éthanols deutériés $C_2H_{5-n}D_nOH$. Organic Magnetic Resonance 6, 1974, 195-9) puis pour le carbone-13,
 (E. BENGSCHE, M. PTAK. Analyse des spectres RMN du carbone-13 pour quelques acides aminés enrichis et les peptides correspondants. Dans "Stable Isotopes 10 in the Life Sciences". Agence Internationale à l'Energie Atomique I.A.E.A., Vienne, Autriche, 1977, p.197-206 - E. BENGSCHE, J.-Ph. GRIVET, H.R. SCHUTEN. Non-statistical label distribution in biosynthesis ^{13}C enriched amino acids. 9ème Conférence Internationale de RMN dans les Systèmes Biologiques, 1-6 sept. Bendor/Marseille - E. BENGSCHE, J.-Ph. GRIVET, H.R. SCHUTEN. Non-statistical 15 label distribution in bio-synthetic enriched amino acids. Z. Naturf. 36b, 1981, 1989-1996 - E. BENGSCHE, J.-Ph. GRIVET, H.R. SCHUTEN. Inter- and intramolecular isotopic heterogeneity in bio-synthetic enriched amino acids. Proceed. 4th Intern. Conf. Stable Isotopes, Jülich, R.F.A., March 1981 (sous presse) - E. BENGSCHE, J.-Ph. GRIVET, H.R. SCHUTEN. Carbon isotope fractionation by photosynthesis. A publier dans Naturwissenschaften - E. BENGSCHE, J.-Ph. GRIVET, M. PTAK. A systematic study of carbon-13 NMR parameters in enriched molecules. En cours de rédaction pour Organic Magnetic Resonance).

Le procédé selon l'invention concerne l'abondance isotopique naturelle, qui est de 11,1% pour le carbone-13 et de 0,15% pour le deutérium. Un double 25 marquage devient ainsi peu probable, et les valeurs pour c et d/tableau 1 se rapprochent, c'est-à-dire l'enrichissement en carbone-13 méthyle provient essentiellement de l'isotopomère monomarqué correspondant, c'est-à-dire de l'espèce $^{13}CH_3COOH$.

En ce qui concerne les molécules biologiques, il est connu que la répartition globale et positionnelle des isotopes n'est ni statistique ni uniforme. Elle varie au contraire en fonction des perturbations des conditions intra-cellulaires du fait que les systèmes enzymatiques de la matière vivante préfèrent plus ou moins l'isotope naturel majoritaire, c'est-à-dire le carbone-12 au carbone-13, le protium au deutérium, etc. Il en résulte pour les substances biologiques une discrimination en isotope lourd, créée avant tout par quelques réactions clefs de la photosynthèse. Cette discrimination se maintient essentiellement à travers le métabolisme secondaire, le cas échéant également à travers la chaîne alimentaire plante-herbivore-carnivore, de telle sorte que l'on peut espérer remonter à l'origine végétale, c'est-à-dire

photosynthétique d'une substance donnée, lorsqu'on réussit à

1. déterminer un nombre suffisant de paramètres isotopiques a,b,c,d ;
2. systématiser, malgré la complexité des flux métaboliques, le phénomène de la répartition isotopique, c'est-à-dire se baser sur des standards reproductibles et prévisibles.

Au composé d'origine biologique, on se propose d'opposer le même composé en provenance d'une synthèse technique, totale ou partielle. Pour le produit technique, la répartition en isotopes est plutôt homogène, car les procédés techniques de base fonctionnent à des rendements proches de 100%. Ils évitent 10 la ramification du flux de la matière, la totalité ou presque est convertie, les compositions isotopiques initiales et finales sont égales. Les rares disproportions isotopiques sont limitées à quelques positions et prévisibles en fonction du procédé de synthèse employé.

Toutes les tentatives pour appliquer l'ensemble de ces enseignements au 15 développement d'un procédé d'analyse industriellement applicable se sont limitées à l'unique détermination du taux isotopique global (a) d'un composé, donnée insuffisante pour répondre au problème posé. Au cours des tentatives de développement d'une méthode, il s'est révélé indispensable de prélever un maximum de paramètres isotopiques, de réaliser l'analyse isotopique complète 20 à l'intérieur de la molécule, position par position.

Mais, pour ce faire, les difficultés méthodologiques étaient telles que, à titre indicatif, pour le rapport carbone-13/carbone-12, on n'a réussi jusqu'à présent l'analyse que pour deux composés biologiques ultra-simples. Le procédé utilisé consistait dans un enchaînement d'opérations précaires, 25 comprenant des dégradations chimiques quantitatives, la combustion des fragments, recueillis à l'état pur et sans perte, et la spectrométrie de masse des produits de combustion ($\text{CO}_2, \text{H}_2\text{O}$).

On se propose donc, selon l'invention, de remplacer ce procédé classique, laborieux, sensible à toute sorte d'impuretés et limité à quelques composés 30 simples, par un procédé direct, universel et non destructif de l'échantillon. En d'autres termes, l'état de la technique repose sur les paramètres (a) et (b), celui du procédé selon l'invention essentiellement sur (c) et (d), 35 l'idée inventive consiste à rendre facilement accessibles les paramètres (c) et (d) en milieu isotopique naturel et, le cas échéant, de les relier à des valeurs standards qui permettent de se prononcer, même si l'on ne dispose pas d'un composé biosynthétique témoin. De telles études ont été menées, par résonance magnétique nucléaire (R.M.N.) et par spectrométrie de masse comme technique conjuguée, surtout par les demandeurs (références citées en pages 2 et 3) et en milieux très enrichis en isotope concerné.

40 La réalisation de l'invention, c'est-à-dire la transformation de tels

essais en milieu particulier dans un procédé industriellement applicable, s'est heurtée essentiellement à trois préjugés techniques

1. On ne peut pas réaliser par R.M.N., en particulier du carbone-13, une analyse quantitative assez précise pour saisir les différences des abondances isotopiques, telles qu'elles résultent de la faible sélectivité d'une séquence de réactions chimiques et biologiques.

2. Si ceci était possible pour quelques cas exceptionnels et en milieu enrichi, il était impensable d'appliquer la méthode à des composés présentant seulement une abondance naturelle, par exemple en carbone-13 et en deutérium.

10 3. D'éventuelles règles trouvées sur la répartition intramoléculaire (c) systématique des isotopes dans les biomolécules, règles établies pour les milieux enrichis, ne sont pas transposables aux composés formés sous conditions d'abondance isotopique naturelle.

D'une manière surprenante et à l'encontre de l'opinion des spécialistes, 15 les demandeurs ont trouvé une solution à ces problèmes.

La mesure consiste à enregistrer par résonance magnétique nucléaire par transformée de Fourier, dans des conditions assurant une sensibilité suffisante et une parfaite proportionnalité entre le nombre des noyaux résonnantes et l'amplitude du signal, des spectres des noyaux concernés, en particulier du carbone-13 et du deutérium. L'exploitation quantitative est assurée par planimétrie et/ou par simulation spectrale itérative, c'est-à-dire que l'on modifie pour chaque isotopomère contribuant au spectre global et dont on connaît les paramètres spectroscopiques, son poids jusqu'à ce que les spectres simulés deviennent identiques aux spectres enregistrés.

25 L'exploitation quantitative peut être assistée par la détermination des groupes à masse égale (b) par spectrométrie de masse, de préférence à désorption par champ, méthode sans fragmentation des molécules et de fait particulièrement apte à des déterminations isotopiques quantitatives. Cette méthode qui utilise de préférence la cationisation à l'aide d'un métal mono-isotopique comme le sodium, convient particulièrement aux molécules biologiques qui sont dans la plupart des cas des molécules polaires peu volatiles et sujettes à fragmentation ; les méthodes classiques de la spectrométrie de masse ne laissent espérer aucun résultat pour ce type de molécules. L'obtention simple, rapide et précise des valeurs pour les groupes de masse (paramètres a et b du tableau 1) est assurée par l'utilisation d'un enregistreur permettant l'accumulation de spectres (W.D. LEHMANN, H.R. SCHULTEN. Quantitative Felddesorptions-Massenspektroskopie VI, Z. Anal. Chem. 289, 1978, 11-16 - H.M. SCHIEREL, H.R. SCULLEN. Depletion of ¹³Carbon in the Biosynthesis of Vitamin B₁₂. Naturwissenschaften 67, 1980, 256-257). En outre, cette méthode a l'avantage de n'exiger que quelques micromoles de substances.

Exemple typique de réalisation n°1 : détermination de l'origine de l'acide acétique.

La méthode est basée ici sur l'unique détermination par R.M.N. quantitative du rapport intramoléculaire $^{13}\text{CH}_3/\text{COOH}$.

5 L'acide acétique est un composé-clé dans la biosynthèse. Cette molécule ultra-simple est pratiquement la seule pour laquelle on a réussi à déterminer les distributions internes du carbone-13 par la technique antérieure (voir E.R. SCHMIDT, H. GRUNDMANN, I. FOGY. Intramolecular $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ Isotope Ratios of Acetic of Biological and Technical Origin. Biomedical Mass Spectrometry 8, 10 1981, 496-490 - W.G. MEINSHEIN, G.G.L. RINALDI, J.M. HAYES, D.A. SCHOELLER, Intramolecular Isotopic Order in Biologically Produced Acetic Acid 1, 1974, 172-174). Les résultats sont donc connus et le composé sert de substance-test pour le procédé selon l'invention.

Préparation des échantillons : l'échantillon purement biologique (I) a été obtenu à partir d'un vinaigre de vin 8,5°, résultant d'une fermentation de surface "à l'ancienne" pendant 21 jours (vinaigre "Vieille Réserve" MARTIN POURET, ORLEANS). Dans une installation à extraction continue, on extrait 1 L de ce vinaigre par 1,5 L d'éther isopropylique pendant au moins 24 heures. L'acide acétique ainsi extrait est isolé et purifié par distillations fractionnées. On obtient environ 60 g d'acide acétique, qui reproduit essentiellement la composition en carbone-13 de l'éthanol du vin de départ.

Comme l'échantillon d'origine technique (II) nous avons utilisé l'acide acétique glacial de RIEDEL-DE-HAEN (SEELZE, Allemagne R.F.). Ce composé est fabriqué à partir de l'éthylène, produit secondaire du procédé de craquage du pétrole, par oxydation via acetaldehyde (procédé WACKER-HÖCHST). L'acide acétique, obtenu à partir de cet acetaldehyde, est ensuite utilisé pour la fabrication d'acétate de polyvinyle. Par hydrolyse partielle de ce produit, on procède à une récupération d'une partie de cet acide acétique. Cet acide acétique dit de récupération est particulièrement pur du point de vue chimique et mis à la vente. Plusieurs étapes de ce mode de fabrication sont susceptibles d'entraîner un fractionnement des isotopes du carbone tel que le taux en carbone-13 du groupement carboxyle se trouve diminué unilatéralement. Cette répartition isotopique, confirmée en effet par le procédé d'analyse selon l'invention, est inverse de celle pour l'acide acétique d'origine bio-synthétique.

35 On utilise également un mélange équimoléculaire (III) des échantillons I et II.

On utilise comme quatrième échantillon (IV) l'acide acétique glacial de MERCK (DARMSTADT, Allemagne R.F.) pour lequel on trouve une distribution intramoléculaire strictement "biologique". Comme nous avons pu constater ultérieurement, ce produit provient de la distillation du bois.

Aux quatre échantillons d'acide acétique, on ajoute environ 20 % en volume d'eau lourde. Par adjonction de traces de trichlorure de gadolinium ($GdCl_3$), on s'arrange pour établir un temps moyen de relaxation magnétique T_2 du carbone-13 autour d'une seconde. L'échantillon est alors de 0,002 à 0,005 molaire par rapport au gadolinium. On ajoute le sel disodique de l'acide éthylènediaminetetracétique = EDTA (TITTRIPLEX III, MERCK) comme complexant, en quantité molaire double par rapport au gadolinium.

Mesure de la répartition isotopique par résonance magnétique nucléaire du carbone-13.

10 Les conditions décrites ci-dessus pour la R.M.N. quantitative sont valables pour tous les exemples de réalisation et concernent également le noyau de deutérium, cité ultérieurement. Les spectres sont enregistrés sur des spectromètres BRUKER WH 90, WP 200 SY et WM 400.

On prend soin d'assurer un rapport signal/bruit suffisant et une proportionnalité entre le nombre des noyaux résonnantes et l'amplitude des signaux en réalisant les conditions expérimentales suivantes :

Le nombre des passages accumulés est de 5 000 à 20 000, de préférence 10 000.

La résolution numérique est de 0,5 à 0,05 Hz/point, de préférence 0,2.

20 La stabilisation interne du signal est assurée pour le carbone-13 par le noyau deutonique d'un solvant deutérié, la plupart des cas de l'eau lourde. Pour la R.M.N. du deutérium, on travaille sans stabilisation interne.

On établit un angle de mutation de 90°C.

On réalise un découplage total des protons. Pour éviter toute altération du résultat par des effets d'isotopie sur l'effet nucléaire OVERHAUSER, on supprime ce dernier par la méthode de l'irradiation alternée décrite par R. FREEDMAN, H.D. HILL et R. KAPTEIN (Proton-Decoupled NMR Spectra of Carbon-13 with the Nuclear OVERHAUSER Effect Suppressed. J. Magn. Res. 1, 1972, 327-329).

Pour assurer le rétablissement quasi parfait de l'équilibre de BOLTZMANN après chaque irradiation, on observe après chaque passage un temps d'attente T_3 qui correspond à 10 fois les temps de relaxation $T_2 \neq T_1$ du noyau le plus lent.

Afin de réduire les temps de relaxation du carbone-13 à des valeurs de l'ordre d'une seconde, on ajoute des agents relaxants connus décrit dans la partie concernant la préparation des échantillons. Quand l'échantillon ne doit pas être contaminé par des ions paramagnétiques, il faut accepter une durée d'enregistrement plus longue pouvant atteindre plusieurs jours lorsqu'on veut tenir compte de carbones quaternaires.

Les surfaces spectrales (paramètres du tableau 1) sont intégrées par planimétrie manuelle (planimétrie OTT, type 131 L, KEMPTEN, Allemagne R.F.) avec une précision de 0,1 %.

En cas de superposition des signaux à analyser ou lorsqu'on veut déterminer des isotopomères (paramètres δ du tableau 1), on procède à des simulations spectrales (programmes BRUKER IIR CAL et LAOCOON à B) en modifiant itérativement la contribution qu'apporte chaque espèce isotopique au spectre global, 5 le cas échéant à l'aide d'une planimétrie différentielle entre les spectres expérimentaux et simulés jusqu'à ce qu'il y ait identité. Pour ce faire, il faut tenir compte des paramètres R.M.N. : positions des signaux, les largeurs des raies, le cas échéant des couplages et des effets d'isotopie sur ces paramètres.

10 Dans l'exemple de l'acide acétique, on procède à la simple intégration des deux signaux de carbone-13 qui sont éloignés de 160 ppm.

10 000 passages, 0,2 : Hz/point, $T_3 = 10$ sec

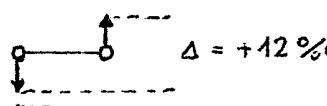
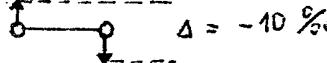
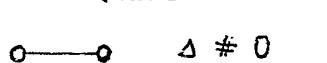
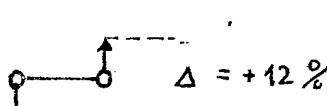
Selon le type de sonde R.M.N., on utilise 0,7 ml (tubes de 5 mm) ou 2 ml (tubes de 10 mm) de l'échantillon.

15 Distinction de l'origine de l'acide acétique

Les caractéristiques isotopiques suivantes ont été déterminées pour les échantillons.

tableau 2

20

		Taux relatif positionnel en carbone-13 $\text{CH}_3 - \text{COOH}$
échantillon		
25	I	
	II	
30	III	
	IV	

35 Le procédé décrit permet donc de faire d'une manière directe, rapide et non destructive une distinction nette entre l'acide 100 % à la base de vin (I) qui présente une position hydrophile (-COOH) 12 % plus riche en carbone-13 que la position hydrophile (CH_3) et l'échantillon technique utilisé (II) où la situation est presqu'inversée. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus à l'aide de la technique antérieure. Dans un mélange comme l'échantillon 40 III, les concentrations relatives peuvent être déterminées avec une précision

d'environ 20 %, précision qui augmentera avec le progrès technique dans l'appareillage R.M.N. Pour l'échantillon IV, l'acide acétique MERCK provenant du bois, les caractéristiques presque identiques à celles de l'échantillon II du tableau 2 démontrent son origine bio-synthétique.

5

Exemple de réalisation n° 2: Détermination de l'origine d'acides aminés, particulièrement de l'acide aspartique

Les conditions expérimentales sont identiques à celles décrites dans l'exemple n° 1.

10 Préparation des échantillons

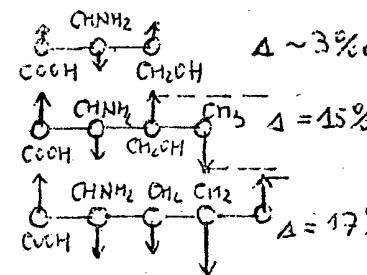
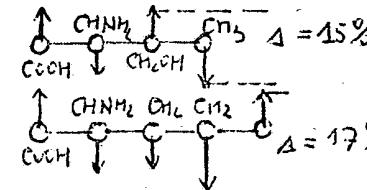
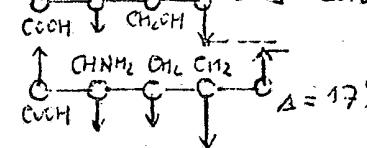
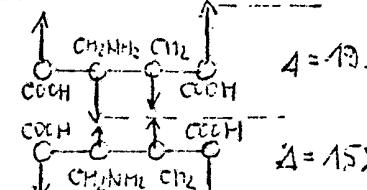
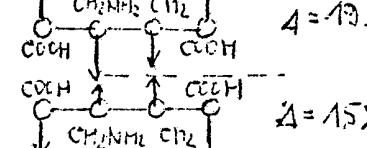
On utilise les acides aminés sérine (Ser), thréonine (Thr), acide glutamique (Glu) et acide spartique (Asp). Leurs isomères optiques L proviennent des firmes MERCK (DARMSTADT, Allemagne R.F.) et FLUKA (BUCHS, Suisse). Ils sont fabriqués en culture sous-marine par des mutants de micro-organismes qui produisent sélectivement un seul acide aminé. Pour Asp, on examine également la racémate D/L, produit d'origine technique, qui est fabriqué à partir du gaz de craquage du pétrole ou de gaz de cokerie pour l'intermédiaire de l'anhydride maléïque.

On prépare des solutions de ces acides aminés dans l'eau lourde. Afin d'augmenter la solubilité, on établit un milieu acide (acide chlorhydrique). Pour réduire 20 les temps de relaxation du carbone-13, on ajoute des traces de chlorure de gadolinium comme décrit précédemment.

Résultats

Les caractéristiques isotopiques suivantes ont été déterminées pour les cinq échantillons :

25 tableau 3

	échantillon	origine	concentration mol/l	pH	taux relatif positionnel en carbone-13
30	L-Ser	biol.	4,5	2,2	
	L-Thr	biol.	2,5	0,5	
	L-Glu	biol.	2,0	0,1	
40	L-Asp	biol.	2,4	0,5	
	D/L-Asp	techn.	2,4	0,4	

Comme il a été déjà observé pour l'acide acétique d'origine biologique, on trouve pour tous les acides aminés biologiques du tableau 3 que les positions à caractère hydrophile et/ou facilement recyclables pendant le métabolisme, sont enrichies en carbone-13 par rapport à la teneur isotopique moyenne de la molécule, les positions à caractère hydrophobe par contre sont appauvries en ce même isotope. Le groupement C_α des acides aminés se comporte comme une positions à caractère hydrophobe.

Il n'était pas prévisible que la complexité quasi illimité des interactions biologiques aboutit à un schéma de répartition isotopique finale aussi simple et 10 généralement valable, schéma qui dans son application analytique permet une première orientation rapide, sans devoir faire recours à un composé de référence.

L'acide aspartique technique (D/L) présente une répartition isotopique presque inverse par rapport à celle pour le composé biologique (L-Asp). Bien que les deux produits sont considérés comme étant chimiquement identiques, le procédé selon 15 l'invention permet de déterminer sans ambiguïté leur origine respective.

Le taux isotopique global en carbone-13 (paramètre du tableau 1) a été déterminé pour l'acide glutamique L. La molécule contient 10,70 % ^{13}C et présente donc un appauvrissement de 0,32 % en valeur absolue et de 30 % en valeur relative par rapport à l'abondance naturelle moyenne de cet isotope (11,12 % ^{13}C). Pour obtenir 20 le taux global en carbone-13, on utilise pour les petites molécules (< 20 atomes de carbone) la combustion totale et l'analyse du rapport $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ (technique ancienne), alors que pour des molécules plus grandes, la spectrométrie de masse à desorption par champs est plus avantageuse.

25 Exemple de réalisation n° 3: Détermination de l'origine de l'alcool éthylique

L'alcool éthylique présente, en fonction de son origine, des modifications assez spectaculaires de son taux en deutérium. Mais il s'est vite avéré que ces modifications sont extrêmement sensibles à des facteurs géographiques, climatiques, de l'environnement et de la morphologie de la plante d'origine, de telle sorte qu'elles ne peuvent pas servir d'unique critère pour déterminer l'origine d'un alcool. Lorsqu'on compare les alcools de différentes origines bio-synthétiques, on touche également le problème important de la chaptalisation des vins. L'origine d'un alcool ne peut être déterminée qu'en utilisant simultanément les taux isotopiques globales (paramètre a du tableau 1) et positionnelles (paramètres c) et en deutérium 35 et en carbone-13. Les effets sont moins spectaculaires pour le carbone-13, mais moins sensibles aux facteurs variables de l'environnement.

Un procédé particulièrement précis est basé sur la détermination des rapports des isotopomères essentiels de l'alcool (paramètres d). Parmi les 2^N ($N'+1$) ($N''+1$) = $2^2(3+1)$ ($2+1$) = 48 isotopomères possibles de l'éthanol

(N = 2 positions non équivalents du carbone,

N' = 3 positions équivalents d'hydrogène méthylique,

N'' = 2 positions équivalents d'hydrogène méthylénique)

le protone hydroxylique échangeable n'est pas compté), les six isotopomères

5 suivants participent avec une probabilité plus élevée que 0,01 % :

$^{12}\text{CH}_3^{12}\text{CH}_2\text{OH}$, $^{13}\text{CH}_3^{12}\text{CH}_2\text{OH}$, $^{12}\text{CH}_3^{13}\text{CH}_2\text{OH}$, $^{13}\text{CH}_3^{13}\text{CH}_2\text{OH}$, $^{12}\text{CH}_2\text{D}^{12}\text{CH}_2\text{OH}$ et
 $^{12}\text{CH}_2^{12}\text{CHDOH}$. Dans le tableau 4 ci-dessous, le rapport de ces isotopomères

ressort semi-quantitativement.

Préparation des échantillons

10 10 Les alcools ont été préparés et/ou extraits selon un procédé classique (L. GATTERMANN, H. WIELAND, Praxis des Organischen Chemikers, Walter de Gruyter-Verlag, BERLIN, 1954 p. 350-1).

Nous avons utilisé de l'alcool en provenance d'un vin de table rouge, 10° de Beziers et d'un vin rouge d'Algérie 12° qui ont à peu près les mêmes caractéristiques isotopiques (échantillon I), d'un vin blanc Sylvaner 10° qui montre une chaptalisation (II), de l'alcool de provenance de sucre de betterave (III), de sucre de canne et glucose de maïs (IV). Nous avons également examiné un alcool techno-synthétique (V) à base d'éthylène, gaz de craquage de produits de pétrole.

20 Résultats

Les résultats semi-quantitatifs sont présentés dans le tableau 4, en utilisant pour la répartition positionnelle des isotopes la symbolique définie et déjà utilisée ci-dessus. Les taux isotopiques globaux (appauvrissement en isotope lourd) sont exprimés en ‰ par rapport au standard isotopique international.

25 tableau 4

échantillon	taux isotopique. (%)			
	deuterium		carbone-13	
	global	positionnel	global	positionnel
I (vigne)	- 50		- 25	
II (vigne + sucre)	- 40		- 22	
III (sucre betterave)	- 20		- 20	
IV (sucre canne, glucose de maïs)	- 20		- 5	
V (produits pétroliers)	- 60		- 30	

$\Delta = 10 - 30 \text{ ‰}$

$\Delta = 10 - 15 \text{ ‰}$

Une distinction nette entre les alcools biologiques (I - IV) et l'alcool technique (V) se manifeste par tous les paramètres.

A l'intérieur des échantillons biologiques, la différence est très nette entre l'alcool en provenance de la vigne (I, II) et de la betterave (III) d'une part (plantes C₃, dont le produit primaire de la photosynthèse est une molécule à trois atomes de carbone) et l'alcool à base de canne à sucre ou de maïs (IV) d'autre part (plantes C₄, dont le produit primaire est une molécule à 4 carbones). Le critère ici est le taux global en carbone-13.

Il existe également une différence entre l'alcool en provenance de la vigne (I) et celui en provenance de la betterave (III, aussi bien pour le deutérium que pour le carbone-13. Mais le taux en deutérium est extrêmement sensible aux facteurs extérieurs et saisonniers. Il décroît particulièrement

- avec la latitude géographique
- avec l'altitude
- 15 - lorsque la température baisse
- lorsque on s'éloigne de l'influence maritime
- en passant de la Méditerranée à l'océan atlantique
- lorsque le fruit est recueilli prématurément.

On propose donc selon l'invention, pour les analyses de routine comme pour 20 la détection de la chaptalisation du vin, de mémoriser les compositions standard ainsi que les facteurs de modification dans un micro-processeur et de procéder à une analyse automatisée.

Un élargissement de l'idée inventive résulte des possibilités universelles d'application sur tous les domaines de la chimie, de la biologie, de la chimie 25 alimentaire, de la médecine, de la pharmacologie par exemple, partout où il importe d'élucider l'origine d'une substance organique. Plus que la molécule à examiner est grande, plus la contribution de la spectrométrie de masse à desorption par champs devient alors importante.

REVENDICATIONS

1. Procédé pour identifier et, le cas échéant, pour déterminer quantitativement les origines bio- et/ou techno-synthétiques de substances organiques en fonction de leur taux global et avant tout de leur matrice caractéristique de répartition intramoléculaire en isotopes légers, stables et magnétiquement actifs, en particulier en carbone-13 et/ou en deutérium, procédé applicable à l'analyse des produits d'alimentation humaine et d'animaux, des boissons, des arômes et des parfums, des principes pharmacologiques actifs, à la recherche de preuves pour l'expertise et pour la médecine légale, par exemple d'explosifs et de poisons, et à la recherche de l'origine des polluants, au diagnostic médical et vétérinaire de métabolismes anormaux et semblables, caractérisé en ce que l'on détermine les caractéristiques isotopiques précitées, en particulier pour les noyaux carbone-13 et/ou deutérium, par résonance magnétique nucléaire quantitative par transformée de Fourier, le cas échéant combinée à la spectroscopie de masse, en particulier à désorption de champs.

15 2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'on utilise pour le composé biosynthétique, lorsqu'on ne dispose pas d'un échantillon de référence ou lorsqu'il s'agit d'une première orientation rapide, comme moyen standard d'analyse, une matrice de répartition isotopique prédéterminée par la formule chimique structurale, schéma isotopique interne selon lequel, en particulier pour l'élément carbone, les positions à caractère hydrophile et/ou facilement recyclables pendant le métabolisme, sont enrichies en isotope lourd par rapport à la teneur isotopique moyenne de la molécule, les positions à caractère hydrophobe par contre sont appauvries en isotope lourd, tandis que le composé techno-synthétique présente une répartition isotopique 25 plutôt homogène, une disparité éventuelle étant limitée à quelques positions et prévisible en fonction du mode de fabrication.

3. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que, dans une forme préférentielle de réalisation et particulièrement pour des molécules plus complexes, l'analyse repose uniquement sur la détermination de quelques-30 uns des $2^N, (N'+1), (N''+2) \dots$ isotopomères possibles, respectivement sur la prise en considération de seulement certaines, de préférence deux positions particulièrement révélatrices, quant à leur taux en isotope lourd, l'un par rapport à l'autre.

4. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que, pour des analyses de routine et de précision, la réponse à la question sur les origines biologiques et/ou techniques d'une substance organique est obtenue d'une manière automatique à l'aide d'un microprocesseur dans lequel on mémorise d'abord des compositions isotopiques standard, par exemple pour les substances

en provenance de plantes C₃, C₄, CAM ou de cultures sous-marines et pour les substances techniques ; on introduit ensuite certains termes correctifs qui tiennent compte de facteurs climatiques, géographiques, de l'environnement et de la morphologie de la plante d'origine, facteurs qui provoquent des fluctuations isotopiques ; enfin on introduit les caractéristiques spectrales de l'échantillon concernant préférentiellement les isotopes carbone-13 et/ou deutérium.