Self coastus

50376 1998 63

### UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

N°2261

## **THESE**

pour obtenir le titre de

### **DOCTEUR**

Discipline: SPECTROCHIMIE

présentée par

**Christine WOJCIECHOWSKI** 



# APPORTS DE LA CHIMIOMETRIE A L'INTERPRETATION DES DONNEES DE LA SPECTROSCOPIE INFRAROUGE:

# CARACTERISATION DES MATIERES PREMIERES ET MATERIAUX D'EMBALLAGE EN AGRO-ALIMENTAIRE

soutenue le 27 mai 1998 devant la commission d'examen :

P. LEGRAND, Professeur, USTL Président

J.L. GARDETTE, Directeur de Recherches, CNRS Clermont-Ferrand Rapporteur

D. BERTRAND, Directeur de Recherches, INRA Nantes Rapporteur

E. PERRIN, Ingénieur de Recherche, DANONE Examinateur

N. DUPUY, Maître de Conférences, USTL Examinateur

J.P. HUVENNE, Professeur, USTL Directeur de thèse

			·		

Ce travail de thèse a pu être réalisé grâce au financement C.I.F.R.E entre CREALIS (Centre de Recherche de la branche Epicérie du Groupe DANONE, dirigé par Monsieur André CARRIER) et le L.A.S.I.R (Laboratoire de Spectrochimie Infrarouge et Raman, dirigé par Monsieur Daniel BOUGEARD). Que chacun de ces partenaires en soit remercié.

Je remercie Monsieur Pierre LEGRAND, Professeur à l'Université des Sciences et technologies de Lille et Directeur de l'Ecole Universitaires D'Ingénieurs de Lille d'avoir aimablement accepté la présidence de ce jury.

Je suis très sensible à l'honneur qu'ont bien voulu me faire Monsieur Jean-Luc GARDETTE, Directeur de Recherches CNRS à l'Université de Clermont-Ferrand et Monsieur Dominique BERTRAND, Directeur de Recherches à l'INRA de Nantes en acceptant d'être rapporteurs de ce travail.

Je tiens à exprimer mon profond respect et ma reconnaissance à Monsieur Jean-Pierre HUVENNE, Professeur à l'Université des Sciences et technologies de Lille et Responsable du Département IRTF du L.A.S.I.R pour avoir bien voulu diriger ces recherches et pour ses nombreux conseils et critiques indispensables à la progression de ce travail. Je lui dois également de m'avoir initiée à la recherche scientifique dès le D.E.A.

Je tiens également à remercier Monsieur Chi Dung TA, Ingénieur de Recherches et Responsable du Service de Biochimie à CREALIS, pour sa disponibilité et pour la confiance dont il a fait part à mon égard. Les commentaires et suggestions qu'il a formulés étaient indispensables à l'avancement de ce travail. Je regrette qu'il ne puisse participer au jury et lui souhaite un prompt rétablissement. Monsieur Emmanuel PERRIN, Responsable du Laboratoire de Biochimie, a accepté de représenter CREALIS dans le jury, je l'en remercie ainsi que pour sa disponibilité, son aide et ses conseils avisés qui ont contribué au succès de cette thèse.

J'exprime ma sincère reconnaissance à Mademoiselle Nathalie DUPUY, Maître de Conférences à l'Université des Sciences et technologies de Lille, de m'avoir fait bénéficier de ses connaissances en IRTF et en chimiométrie. Ses encouragements et conseils m'ont été particulièrement précieux pour la réalisation de ce travail. Je la remercie vivement pour sa participation dans ce jury.

Je tiens à exprimer mon profond respect à Monsieur Paul PRONNIER, Responsable du Service Analytique, qui m'a accueilli avec bienveillance à CREALIS.

Par ordre chronologique d'apparition, que Thierry, William, Cyril, Franck et Carole, sympathiques stagiaires, soient remerciés pour leur contribution.

Je remercie tout le personnel du L.A.S.I.R et en particulier Bernard SOMBRET pour sa disponibilité et ses compétences en spectroscopie. Je suis infiniment reconnaissante à Ludmila DOLMATOVA de son aide concernant l'application des Réseaux de Neurones Artificiels. Un grand merci à Lydie et Ludo pour les bons moments passés ensemble et dont l'amitié s'étend bien au delà du labo et des pauses cafés...

Je garderai un excellent souvenir de ces trois années à CREALIS où il y régne une convivialité quasi-permanente, une ambiance exceptionnelle et une solidarité à toute épreuve, même dans les moments les plus difficiles (l'incendie du 14 juin 97 en est la preuve). Merci à tous et spécialement à Patrick BARDEL, Jean-Claude COCHON et Pascale BESSON qui ont en plus manisfesté un intérêt pour ce travail ainsi qu'à mes collègues du laboratoire Annette et Léo (également compagnes de table), Elisabeth et Alain (également compagnons de bureau), Olivia, Odile, Evelyne et Gilbert pour leur gentillesse et leur aide technique et matérielle.

Les remerciements seraient incomplets si j'oubliais de nommer Isabelle et Sandra ainsi que Laurent, Laurence, Manu, Catherine, Jason, Jean, Etienne, Michel, Jean-Paul, Françoise, Dominique, Manu (l'autre), les stagiaires et les autres, pour leur soutien, les fous-rires et les moments de détente partagés lors des nombreuses activités extra-professionnelles...bref, merci pour leur amitié!

Et pour terminer, MERCI à toute la famille...

IDENTIFICATION ET CONTROLE DE CONFORMITE DES MA PREMIERES PAR LA CONSTITUTION D'UNE BASE DE DON	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·
1.1. LA SPECTROSCOPIE INFRAROUGE ET LES TECHNIQUES AS	SSOCIEES 6
1.1.1. la spectroscopie infrarouge	6
1.1.1.a. instrumentation	
1.1.1.b. paramètres d'optimisation d'un spectre	
1.1.1.c. la répétabilité	
1.1.2. les techniques associées	
1.1.2.a. la transmission	
1.1.2 b. la réflexion spéculaire et la théorie de Kramers-Krönig	11
1.1.2.c. la réflexion diffuse et la théorie de Kubelka-Munk	
1.1.2.d. la réflexion totale atténuée - ATR	15
1.2. LA BASE DE DONNEES	
1.2.1. constitution de la base de données	
1.2.1.a. les films	
1.2.1.b. les poudres	
1.2.1.c. les liquides, les pâtes	
1.2.1.d. spécificité des spectres	
1.2.2. principe de fonctionnement de la base de données	
1.2.2.a. optimisation de la comparaison entre deux échantillons	
1.2.2.c. le facteur F	
1.2.2.c. le lacteur l'	23
1.3. LES RESULTATS	
1.3.1. identification des matières premières, matériaux d'emballage	
1.3.1.a. les matériaux d'emballage.	24
1.3.1.b. les dérivés sucrés	
1.3.1.c. les matières grasses	
1.3.1.d. autres ingrédients	
1.3.2. <i>limites</i>	28
1.3.2.a. structures voisines	
1.3.2.b. concentrations faibles	29
1.4. CONCLUSION	30
Chapitre 2:	
ANALYSE QUANTITATIVE DE VITAMINES DANS UN MEL	ANGE
MULTICOMPOSANTS	
2.1. LES VITAMINES	

2.1.1.b. la vitamine B2	
2.1.1.c. la vitamine B6	
2.1.1.d. la vitamine PP	
2.1.2. les mélanges multivitamines	39
2.2. SELECTION DE LA METHODE D'ECHANTILLONNAGE	40
2.2.1. introduction	
2.2.2. la réflexion diffuse	
2.2.2.a. préparation de l'échantillon	
2.2.2.b. répétabilité	
2.2.3. la transmission sur "extrait sec"	41
2.2.3 a préparation de l'échantillon	
<b>A</b> •	
2.2.3.b. répétabilité	
2.2.4. la réflexion totale atténuée	
2.2.4.a. préparation de l'échantillon	
2.2.3 b. répétabilité	
2.2.3 c linéarité	
2.2.5. conclusion	48
2.3. L'ANALYSE MULTIVARIEE	49
2.3.1. introduction	49
2.3.2. l'outil chimiométrique	
2.3.2.a. définition	
2.3.2.b. principe de l'analyse quantitative	
2.3.2.c. l'algorithme PCR (régression sur les composantes principales)	
2.3.2.d. l'algorithme PLS (selon les moindres carrés partiels)	
2.3.2.e. estimation de la précision	
2.3.2.f. la reproductibilité des mesures de concentrations	
2.3.2.g. les pré-traitements informatiques	
2.3.2.g. les pre-traitements informatiques	
2.3.3. les echanimons sianauras	50
2.4. LES RESULTATS	
2.4.1. vitamine B1	
2.4.1.a. calibration	
2.4.1.b. validation	59
2.4.2. <i>vitamine B2</i>	60
2.4.2.a. calibration	60
2.4.2.b. validation.	61
2.4.3. vitamine B6	63
2.4.3 a. calibration	
2.4.3.b. validation.	
2.4.4. vitamine PP	
2.4.4.a. calibration	
2.4.4.b. validation.	
2.4.5. reproductibilité	
•	
2.5. CONCLUSION	69

# <u>Chapitre 3:</u> RECONNAISSANCE DE L'ORIGINE ET DES MODIFICATIONS DES AMIDONS

3.1 LES AMIDONS	73
3.1.1. <i>définitions</i>	73
3.1.2. les amidons modifiés	74
3.1.2.a. la réticulation	75
3.1.2.b. la stabilisation	
3.1.2.c. la prégélatinisation	
3.1.3. aspect législatif	76
3.1.4. méthodes classiques d'identification des amidons modifiés	
3.1.4.a. origine végétale	
3.1.4.b. modification physique	
3.1.4.c. modifications chimiques	
3.1.4.d. conclusion	
3.2. LES METHODES STATISTIQUES	79
3.2.1. l'analyse en composantes principales (PCA)	
3.2.2. la classification par PLS	
3.3. LES METHODES NEURONALES	79
3.3.1. historique des réseaux de neurones	79
3.3.1.a. architecture d'un neurone	80
3.3.1.b. généralisation au réseau de neurones	81
3.3.2. apprentissage non supervisé: le réseau de KOHONEN	
3.3.2.a. architecture	
3.3.2.b. algorithme d'apprentissage	
3.3.3. apprentissage supervisé: les réseaux multicouches	
3.3.3.a. les réseaux à couches	
3.3.3.b. les réseaux récurrents	
3.4. MATERIEL ET METHODES	89
3.4.1. les amidons	89
3.4.1.a. échantillonnage	89
3.4.1.b. codification des échantillons	92
3.4.2. les supports informatiques	
3.5. RESULTATS ET DISCUSSIONS	92
3.5.1. les méthodes non supervisées	92
3.5.1.a. l'analyse en composantes principales	92
3.5.1.b. classification sur carte de Kohonen	95
3.5.1.c. conclusion	97
3.5.2. les méthodes supervisées	97
3.5.2.a. paramètres de calibration par PLS	98
3.5.2.b. paramètres d'apprentissage par les réseaux de neurones	
3.5.2.c. comparaison des deux méthodes	
3.5.2.d. conclusion	
3.6. CONCLUSION	113

# <u>Chapitre 4</u>: APPORTS DE L'IRTF POUR L'ETUDE DES PRODUITS FINIS

4.1. LA MATIERE GRASSE	117
4.1.1. composition	117
4.1.2. phénomènes de dégradation	119
4.2. ETUDE DES INTERACTIONS CONTENANT - CONTE	NII 130
4.2.1 introduction	
4.2.2. matériel et méthodes	
4.2.2.a. le couplage microscopie - IRTF	
4.2.2 b. le protocole expérimental	
4.2.3. résultats et discussions	
4.2.3 a. caractérisation de la coupelle	
4.2.3.b. analyse des échantillons	
4.2.4. conclusion	129
4.3. SUIVI DES AGt DANS LES MATIERES GRASSES ET I	LES PLATS CHISINES 120
4.3.1 les acides gras trans (AGt)	
4.3.1.a. origine	
4.3.1.b. aspect nutritionnel	
4.3.1.c. quantification des AGt par CPG	
4.3.2. quantification des AGt par IRTF	
4.3.2.a. principe	
4.3.2.b. acquisition de spectres	
4.3.2.c. répétabilité spectrale	
4.3.2.d. échantillons standards	
4.3.2.e. calibration par PLS	
4.3.2.f. ajouts dosés	
4.3.2.g. validation	
4.3.2.h. reproductibilité - limite de détection	
4.3.3. influence de la nature de la matière grasse	
4.3.4. influence de la température	
4.3.5. influence des procédés de fabrication	
4.3.5.a. estimation des teneurs en AGt	
4.3.6. <i>conclusion</i>	149
4.4. CONCLUSION	149
4.4. CONCLUSION	149
CONCLUSION GENERALE	152
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	157

figure 1: spectre d'un emballage en polyamide obtenu par ATR	7
figure 2: principe d'un analyseur infrarouge	8
figure 3: principe de la réflexion spéculaire	11
figure 4: principe de la réflexion diffuse	13
figure 5: modèle de Kubelka-Munk (réflexion et transmission d'un milieu diffusant)	13
figure 6: principe du prisme ATR	15
figure 7: spectres par transmission (a) et par ATR d'un polymère bi-couche PE (b)/PP (c)	17
figure 8: spectres du polystyrène par réflexion diffuse (a) et par transmission (b)	17
figure 9: spectres par transmission (a), par réflexion diffuse (b) et par ATR (c) d'un mélange de vitamines	
figure 10: spectres par transmission (a) et par ATR (b) d'une huile de tournesol	19
figure 11: spectres par ATR de sirop de glucose(a), glucose en poudre (b)	20
figure 12: analyse comparative d'une vitamine (en poudre) avec la base de données "vitamine spectres enregistrés par réflexion diffuse	
figure 13: spectres par réflexion diffuse du saccharose dilué à 5% (a) et à 10% (b)	23
figure 14: analyse comparative de spectres de saccharose dilués à 5% et à 10%	23
figure 15: spectres par transmission de différents matériaux d'emballage: polypropylène (a), polyamide (b) et polyester (c)	25
figure 16: analyse comparative de spectres en réflexion diffuse de carraghénane (a) avec des hydrocolloïdes: fructose (b), carraghénane (c) et pectine (d)	26
figure 17: analyse comparative de spectres ATR de beurre avec les spectres de la base de données matières grasses: beurre (a), margarine (b) et huile d'olive (c)	27
figure 18: analyse comparative d'un amidon avec la base de données	28
figure 19: analyse comparative de spectres ATR d'antioxydants (a), (b) et (c) et d'huile d'arachide (d)	29
figure 20: formule de la vitamine B1	36
figure 21: spectre ATR d'une solution aqueuse (2g/l) de vitamine B1	36
figure 22: formule de la vitamine B2.	37
figure 23: spectre ATR d'une solution aqueuse (2 g/l) de vitamine B2	37
figure 24: formule de la vitamine B6.	38
figure 25: spectre ATR d'une solution aqueuse (2.25 g/l) de vitamine B6	38
figure 26: formule de la vitamine PP	39
figure 27: spectre ATR d'une solution aqueuse (15 g/l) de vitamine PP	39
figure 28: répétabilité (à différentes longueurs d'onde) de l'échantillonnage par réflexion différentes sur 10 spectres du même mélange polyvitamines	
figure 29: répétabilité (à différentes longueurs d'onde) de l'échantillonnage par transmission extrait sec déterminée sur 10 spectres du même mélange polyvitamines	sur 43

polyvitamines (b)	45
figure 31: spectres de solutions diluées à 250 g/l de mélange polyvitamines(a) et de glucos	e(b)45
figure 32: superposition de 10 spectres du même compound dilué à 250 g/l	46
figure 33: répétabilité (à différentes longueurs d'onde) de l'échantillonnage par ATR déterr sur 10 spectres du même mélange polyvitamines	
figure 34: spectres d'un mélange multivitamines à différentes concentrations: 50 g/l (a), 10 (b), 200 g/l (c) 300 g/l, (d) et 400 g/l (e)	_
figure 35: linéarité de la réponse spectrale sur la gamme de concentration 50- 400 g/l pour différentes fréquences spectrales	
figure 36: principe d'une analyse quantitative par traitements statistiques des données infrarouges	50
figure 37: profil spectral en dérivée première et en dérivée seconde d'un signal	55
figure 38: représentation des SEPc en fonction du nombre de facteurs pour la vitamine B1	59
figure 39: courbe de calibration pour la vitamine B1	59
figure 40: représentation des SEPc en fonction du nombre de facteurs pour la vitamine B2	61
figure 41: courbe de calibration pour la vitamine B2	61
figure 42: explication de la variance pour la vitamine B2 sur les 2 premiers facteurs	62
figure 43: représentation des SEPc en fonction du nombre de facteurs pour la vitamine B6	63
figure 44: courbe de calibration pour la vitamine B6	64
figure 45: explication de la variance pour la vitamine B6 sur les 2 premiers facteurs	65
figure 46: représentation des SEPc en fonction du nombre de facteurs pour la vitamine PP	66
figure 47: courbe de calibration pour la vitamine PP	67
figure 48: amylose (polymère linéaire)	73
figure 49: amylopectine (polymère ramifié)	73
figure 50: réactions entre les agents réticulants et les amidons	75
figure 51: réactions de substitution des amidons	76
figure 52: architecture d'un neurone artificiel	80
figure 53: exemple d'un réseau à 5 neurones en entrée, 3 en couche cachée et 2 en couche sortie	
figure 54: réseau avec architecture de type Kohonen	83
figure 55: fonctions de proximités typiques des corrections de poids	84
figure 56: exemple d'un réseau avec architecture de type FC	85
figure 57: exemple d'un réseau avec architecture de type FC-SC	86
figure 58: processus d'apprentissage de l'algorithme de rétropropagation de l'erreur	
figure 59: topologie d'un réseau récurrent de type Elman	89

figure 60: spectres ATR d'amidons de maïs (a), de riz (b), de manioc (c) et de pomme de terr (d) natifs.	е 90
figure 61: classification par PCA - projection des spectres selon PC2 et PC3	93
figure 62: représentation de la troisième composante principale en fonction des nombres d'ondes	94
figure 63: représentation de la deuxième composante principale en fonction des nombres d'ondes	95
figure 64: carte de Kohonen pour une classification neuromimétique non supervisée	96
figure 65: vue d'ensemble du réseau FC-SC	00
figure 66: représentation graphique des résultats des classifications supervisées (PLS) et réseaux de neurones (RN)	06
figure 67: représentation graphique des résultats des classifications supervisées (PLS) et réseaux de neurones (RN)	.07
figure 68: représentation graphique des résultats des classifications supervisées (PLS) et réseaux de neurones (RN)	.08
figure 69: représentation graphique des résultats des classifications supervisées (PLS) et réseaux de neurones (RN)	08
figure 70: représentation graphique des résultats des classifications supervisées PLS et résea de neurones (RN)	ux 09
figure 71: comparaison de quelques prédictions entre un réseau de type FC-SC (RN) et un réseau de type Elman (MetaANN)	12
figure 72: spectres par ATR d'huile de soja avant (a) et après (b) oxydation	19
figure 73: couplage microscope-IRTF1	22
figure 74: protocole expérimental 1	23
figure 75: identification des différentes couches de l'emballage	24
figure 76: spectres par transmission (microscopie/IRTF) des 25 premiers microns de la coupelle vide (a), en contact avec la sauce (b)	26
figure 77: spectres par microscopie /IRTF de l'emballage à différentes profondeurs: 0-20 μm (a), 20-40 μm (b), 40-60 μm (c), 60-80 μm (d) et 80-100μm (conditionnement 2 mois, 23°C 50%HR)	,
figure 78: spectres ATR caractéristiques de l'amidon (a) et de la crème fraîche (b)	27
figure 79: spectres des composés purs extraits	27
figure 80: évaluation de la profondeur de pénétration dans le PP après 10j, 40°C, 0%HR (a) 2mois, 23°C, 50%HR (b)	
figure 81: isomérisation cis-trans 1	29
figure 82: superposition de 10 spectres de beurre pour évaluer la répétabilité spectrale1	36
figure 83: calcul de la répétabilité de l'échantillonnage à différents nombres d'ondes	
figure 84: coube de calibration des AGt obtenue par PLS pour 2 facteurs	38

figure 85: spectres des échantillons de beurre avec ajouts d'AGt	138
figure 86:teneurs en AGt dans le beurre en fonction des ajouts dosés	139
figure 87: spectres IRTF de 4 matières grasses à teneur en AGt croissantes 7,3 % (a),19 (b), 32,3% (c) et 54,5% (d)	,
figure 88: évolution de la clarté des huiles végétales avec la température	144
figure 89: évolution des spectres des huiles de tournesol (a), de maïs (b), d'olive (c) et d'arachide (d) chauffées 2 heures à 190°C	145

tableau 1: protocoles d'enregistrement des spectres	21
tableau 2: source et activités principales des vitamines B1, B2, B6 et PP	34
tableau 3: apports quotidiens recommandés en principales vitamines	35
tableau 4: échantillons utilisés pour l'étape de calibration	57
tableau 5: échantillons utilisés pour l'étape de validation	58
tableau 6: comparaison des résultats HPLC et IRTF (vitamine B1)	60
tableau 7: comparaison des résultats HPLC et IRTF (vitamine B2)	63
tableau 8: comparaison des résultats microbiologiques et IRTF (vitamine B6)	65
tableau 9: comparaison des résultats microbiologiques et IRTF (vitamine PP)	67
tableau 10: évaluation de la reproductibilité: détermination des concentrations en vitamines g/kg) et du coefficient de variation sur 10 analyses du même échantillon	
tableau 11: comparaison délai, coût pour le dosage des vitamines par IRTF et par méthode classiques	
tableau 12: teneurs en amylose et amylopectine de divers amidons	74
tableau 13: dénomination des amidons modifiés chimiquement	77
tableau 14: identification des 101 amidons	91
tableau 15: exemples de codification pour les amidons	92
tableau 16: nombre de facteurs et SEPc pour chacune des propriétés	98
tableau 17: comparaison avec les données théoriques (Th.) des résultats obtenus en validation par PLS et en test par les réseaux de neurones (RN)	
tableau 18: composition en acides gras majoritaires des matières grasses - valeurs usuelles.	. 118
tableau 19: échantillons standards pour la quantification des AGt	. 137
tableau 20: teneurs en AGt calculés sur les ajouts dosés	. 139
tableau 21: teneurs en AGt dans le beurre	. 139
tableau 22: estimation des teneurs en AGt par CPG et par IRTF	. 141
tableau 23: comparaison entre les méthodes IRTF et CPG	. 141
tableau 24: estimations en AGt pour différentes analyses du même échantillon	. 142
tableau 25: estimation des teneurs en AGt sur des corps gras par CPG et par IRTF	. 143
tableau 26: estimation par IRTF des teneurs en AGt dans des corps gras - comparaison aver les valeurs bibliographiques	
tableau 27: influence de la température sur la formation des AGt dans les huiles végétales .	. 146
tableau 28: estimations théorique et expérimentale de la teneur en AGt	. 147

# INTRODUCTION

La maîtrise de la qualité revêt de nos jours une importance considérable. Face à la concurrence, pour séduire le consommateur, un aliment doit être goûteux, appétissant, équilibré, bien emballé, tout en permettant au fabricant de fixer un coût qui génère un profit (FEINBERG, 1996). La qualité qui s'applique autant sur les produits finis que sur les matières premières, doit être constante d'un lot de fabrication sur l'autre. Dans le domaine de l'épicerie et de la diététique infantile, la variété des aliments (pâtes et plats cuisinés, surgelés, potages, condiments, sauce) implique une large gamme d'ingrédients dont le choix doit être adapté aux propriétés recherchées et dont l'utilisation doit respecter des critères de normalisation. La connaissance rapide de leurs caractéristiques chimiques est devenue une nécessité. Pour répondre à ces besoins sans cesse croissants, les industries agro-alimentaires se sont orientées au cours de ces dernières années vers de nouvelles techniques d'analyses physico-chimiques puissantes telles que la spectroscopie infrarouge par transformée de Fourier (ou IRTF).

La caractérisation des produits par méthode spectroscopique semble être une alternative séduisante pour des analyses de routine. Les progrès de l'instrumentation, l'apparition de nouvelles techniques d'échantillonnage mais surtout le développement de l'informatique (qui fournit des moyens efficaces de calculs) ont permis de valoriser la spectroscopie IRTF comme technique particulièrement adaptée à ces besoins (VAN DE VOORT, 1992, DUPUY & al., 1993, DEMENNA, 1989). Cette technique enregistre sous forme d'un spectre "l'empreinte digitale" d'un échantillon. Dans l'infrarouge moyen, les spectres, plus spécifiques que dans le proche infrarouge, constituent une base d'information intéressante pour résoudre les problèmes analytiques posés. La rapidité et la commodité de mise en oeuvre ainsi que son faible coût par comparaison aux méthodes classiques justifient pleinement son utilisation dans le domaine industriel.

Néanmoins, l'installation récente d'un spectromètre IRTF suppose la maîtrise de plusieurs aspects pour développer des méthodes de contrôles systématiques des produits. L'efficacité et la fiabilité d'une analyse sont subordonnées au choix d'une présentation adéquate de l'échantillon. Globalement, il est nécessaire d'établir pour chaque cas des procédures

strictement reproductibles en mettant en oeuvre des techniques d'échantillonnage adaptées. Une méthodologie de traitement des données doit ensuite être mise en place pour obtenir rapidement des résultats fiables présentés sous forme d'un bulletin d'analyse.

Depuis une dizaine d'années, la chimiométrie qui a fait son apparition dans les laboratoires de recherches, est employée pour exploiter au maximum les données expérimentales (DEFERNEZ & al., 1995, BARROS & al., 1997, CADET & al., 1991, DUPUY & al., 1995, LANHER, 1992). Les méthodes mathématiques, statistiques ou neuromimétiques, particulièrement adaptées à l'étude de fichiers volumineux générés par la spectroscopie, peuvent être utilisées pour l'élaboration de protocoles d'analyse quand les besoins analytiques sont de nature quantitative mais aussi pour caractériser un produit en vue d'une authentification.

Le but de ce travail est de combiner les méthodes chimiométriques et l'IRTF pour caractériser les ingrédients alimentaires afin d'identifier rapidement un lot défectueux, mais aussi pour vérifier la conformité des matériaux d'emballage ou encore pour acquérir une meilleure connaissance de l'évolution des produits au cours de leur fabrication.

La présentation des différentes techniques d'échantillonnage ainsi que la constitution d'une base de données spectrales de référence feront l'objet du premier chapitre. Une fois la bibliothèque constituée, son utilisation pourra être envisagée à des fins qualitatives pour procéder au contrôle-qualité des matières premières à réception.

Quelques ingrédients tels que les vitamines sont utilisés en fabrication sous forme d'un mélange complexe dont la composition doit être conforme à des spécifications. Par les méthodes classiques, le contrôle de ces mélanges est long et coûteux. La spécificité des spectres de vitamines pures permet d'envisager une analyse quantitative multicomposants. Dans le deuxième chapitre, une méthode de dosage simultané des vitamines B1, B2, B6 et PP dans un mélange sera établi par traitement statistique des spectres infrarouges en proposant un protocole réduisant au maximum les manipulations.

Etant donné la variété des amidons proposés en industrie alimentaire, leur authentification par les méthodes classiques de caractérisation pose quelques difficultés. L'intégration des données analytiques à des logiciels d'aide à la décision capables de prendre en compte des paramètres multiples et dépendants est alors envisagée. L'application des réseaux de neurones artificiels (song & al., 1995) ouvre une nouvelle porte aux traitements de données spectrales. Dans le troisième chapitre, parallèlement aux méthodes statistiques, les réseaux neuromimétiques seront appliqués à l'étude des amidons pour offrir la possibilité de discriminer les amidons natifs des amidons modifiés quelle que soit leur origine végétale, à partir de leur spectre infrarouge.

Outre les applications destinées au contrôle-qualité, la spectroscopie IRTF est employée pour des études particulières. De plus en plus, les emballages sont constitués de polymères multicouches (CHOMON, 1992) difficiles à caractériser pour des non spécialistes de ces matériaux. La microspectrométrie infrarouge apporte beaucoup d'informations dans ce sens puisque les performances en résolution spatiale, de l'ordre de 10 microns (MESSERSCHMIDT, 1988), sont en accord avec l'épaisseur moyenne des couches. La connaissance à l'échelle moléculaire d'un emballage permet d'étudier les interactions contenant-contenu. Celles existant entre une sauce blanche et une coupelle en plastique seront examinées dans la quatrième partie.

Enfin, la spectroscopie infrarouge est adaptée à l'étude des corps gras. Constituants principaux de la plupart des aliments, les matières grasses s'oxydent et se dégradent sous l'action de la température (VAN DE VOORT & al., 1994). Les modifications ainsi induites se caractérisent notamment par une isomérie cis-trans (SANDERS, 1988). Or, du point de vue nutritionnel, les acides gras possédant des insaturations trans seraient responsables de l'augmentation du risque de maladies cardio-vasculaires (STENDER & al., 1995). L'influence des procédés de fabrication sur l'évolution de différentes matières grasses et produits finis sera abordée dans le chapitre 4 après développement d'une méthode de quantification des acides gras trans par spectroscopie IRTF, utilisée comme technique d'investigation.

# CHAPITRE 1 IDENTIFICATION ET CONTROLE DE CONFORMITE DES MATIERES PREMIERES PAR LA CONSTITUTION D'UNE BASE DE DONNEES

Les industries alimentaires disposent, pour la fabrication de leurs produits, d'une variété de matières premières et de matériaux d'emballage assurant leur conservation. Leur choix est basé sur un respect des normes et sur l'obtention des mêmes caractéristiques d'un lot de fabrication sur l'autre, afin que le consommateur retrouve (la seconde fois) l'aliment qu'il a apprécié auparavant. Pour produire à grande échelle, il est indispensable de vérifier que les lots d'ingrédients provenant de chez le fournisseur soient conformes aux spécifications inscrites dans un cahier des charges très précis.

Implantée dans les laboratoires de recherche depuis la fin des années 70, la spectroscopie IRTF a été introduite dans le domaine alimentaire il y a moins de 10 ans (Van de VOORT, 1992, BELLON & al., 1994). Cette technique permet d'effectuer un contrôle de la qualité des produits et s'inscrit dans une optique d'analyse simple, fiable, rapide et peu coûteuse. Son utilisation en routine ne fait qu'augmenter et le contrôle de conformité se trouve parmi les analyses effectuées régulièrement.

La qualité d'une analyse par spectroscopie infrarouge débute par le choix de la technique d'échantillonnage. En fonction du produit, la variété des accessoires permet l'analyse des échantillons sous forme solide, liquide ou gaz et ce, avec un minimum de préparation et une utilisation quasi-absente de consommables. Plusieurs techniques d'acquisition de spectres par transmission ou réflexion peuvent être employées selon l'échantillon.

En vue de la caractérisation d'un échantillon inconnu ou le contrôle de conformité vis à vis de normes internes, il est nécessaire de constituer une base de données contenant les matières premières, ingrédients et matériaux d'emballage. Les spectres obtenus dits "spectres de référence" sont archivés sous forme de bibliothèques spectrales, et la recherche de similitudes est effectuée de façon automatique. Cette base de données est indispensable pour promouvoir les analyses de routine et constitue une faisabilité de différentiation d'échantillons à partir de leur spectre.

### 1.1. LA SPECTROSCOPIE INFRAROUGE ET LES TECHNIQUES ASSOCIEES

### 1.1.1. la spectroscopie infrarouge

Lorsqu'elles sont soumises à un rayonnement infrarouge, la plupart des substances chimiques absorbent de manière sélective certaines longueurs d'onde du spectre. L'absorption est caractéristique des liaisons chimiques qui constituent le composé. Cette méthode d'analyse structurale révèle la nature des liaisons entre atomes dans une molécule et correspond à des changements énergétiques affectant essentiellement les états de vibration des liaisons entre atomes (BRAME & al., 1977, MENEZ, 1987).

Le résultat d'une analyse se traduit par un spectre infrarouge qui se compose de plusieurs bandes d'absorption. Dans l'infrarouge moyen (4000 - 450 cm<sup>-1</sup>), elles correspondent aux différents modes fondamentaux de vibrations de la molécule auxquelles s'ajoutent certaines harmoniques (absorption au nombre d'onde multiple du mode normal) et combinaisons (somme ou différence des fréquences fondamentales). Parmi les modes de vibration des molécules, il y a les vibrations d'élongation et les vibrations de déformation. L'attribution de toutes les bandes n'est pas facile. Toutefois, l'identification de certaines d'entre-elles permet de reconstituer la structure de l'échantillon.

L'interprétation d'un spectre se fait à partir de 3 facteurs: la position des bandes, les intensités relatives et leur forme. Une bande d'absorption est repérée par sa position exprimée en nombre d'onde (cm<sup>-1</sup>) qui est l'inverse de la longueur d'onde. Elle dépend de la nature des atomes, de la force de liaison et de l'environnement du groupe considéré. L'intensité est fonction de la polarité du groupement (et de la nature des atomes liés) et enfin, la forme des bandes d'absorption dépend de l'état physique du composé. Le spectre du polyamide par exemple est identifié par la présence de bandes vers 3030, 1650 et 1540 cm<sup>-1</sup> caractéristiques de la fonction amide (figure1).

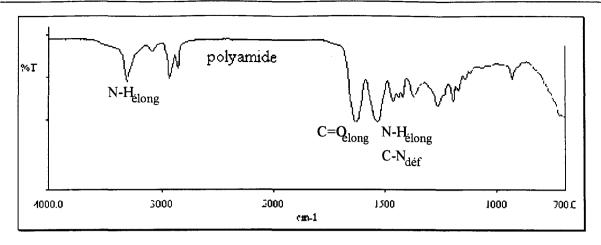


figure 1: spectre d'un emballage en polyamide obtenu par ATR

L'état physique de l'échantillon influence la forme des bandes mais également leur position et leur intensité; en effet, les spectres d'un même composé en phase gazeuse, liquide ou solide ne sont pas identiques.

### 1.1.1.a. instrumentation

A la base de tout analyseur IRTF, se trouve un interféromètre. En ce qui concerne l'interféromètre de Michelson, le rayonnement infrarouge incident est envoyé sur un miroir semi-transparent (la séparatrice) incliné à 45°, réfléchissant une partie du faisceau et laissant passer l'autre. Le faisceau réfléchi est ensuite envoyé sur un miroir fixe tandis que le rayonnement transmis est envoyé sur un miroir mobile. Les deux miroirs sont placés perpendiculairement aux faisceaux qu'ils reçoivent. Les deux faisceaux sont alors renvoyés dans la direction incidente et sont recombinés. Lors de la recombinaison, il se produit des interférences résultant du déphasage directement dépendant de la position du miroir mobile. Le signal finalement obtenu est un interférogramme contenant l'ensemble des contributions des longueurs d'onde du faisceau incident, permettant de faire une analyse globale.

Le rayonnement infrarouge ainsi modulé traverse ensuite l'échantillon à analyser puis il est capté par un détecteur qui délivre un signal proportionnel à l'intensité reçue. Le but d'une analyse IRTF étant de savoir quelles fréquences IR ont été absorbées par l'échantillon, après collecte du signal par le détecteur, la transformée de Fourier de l'interférogramme restitue l'ensemble du spectre d'absorption (figure 2). Afin de ne sélectionner que l'information

caractéristique de l'échantillon, il est indispensable d'enregistrer préalablement à l'échantillon le spectre simple faisceau de la source appelé aussi spectre de référence ou background. Ce dernier représente les absorptions causées par toutes substances autres que l'échantillon (dioxyde de carbone, vapeur d'eau...).

L'appareil utilisé est un spectromètre infrarouge à transformée de Fourier modèle 2000 PERKIN ELMER, muni d'une séparatrice en KBr et d'un détecteur DTGS (Deutérium Tri Glycine Sulfate) fonctionnant à température ambiante. Le logiciel SPECTRUM sous Windows permet l'acquisition de spectres.

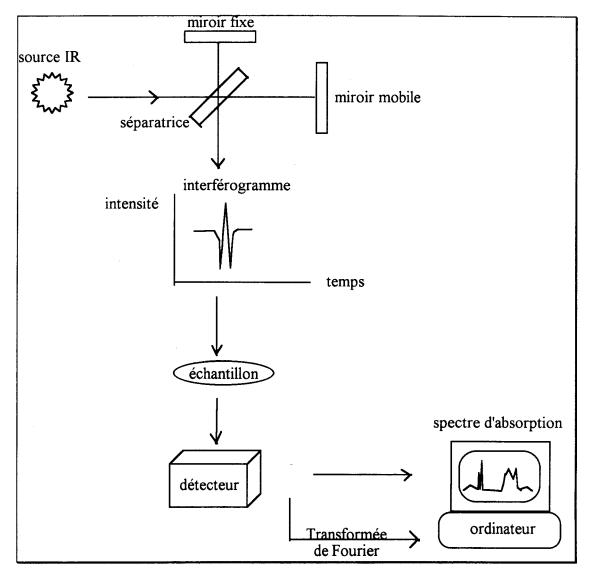


figure 2: principe d'un analyseur infrarouge

### 1.1.1.b. paramètres d'optimisation d'un spectre

Les spectres témoins constituant la base de données doivent être de bonne qualité pour permettre une identification ultérieure fiable. Pour l'optimisation de la qualité spectrale, le choix des paramètres d'acquisition est aussi important que celui de l'accessoire d'échantillonnage.

### le nombre d'acquisitions

Dans l'interféromètre, un cycle de déplacement du miroir mobile correspond à un balayage et donc à une acquisition d'interférogramme. Le rapport signal/bruit étant proportionnel à la racine carrée du nombre de balayages, cela permet d'estimer le nombre de balayages à accumuler pour réduire le bruit de fond et optimiser le signal surtout quand les échantillons sont peu absorbants.

### la résolution

La résolution se définit comme un intervalle spectral minimum de distinction entre deux bandes proches l'une de l'autre. Une résolution élevée se caractérise par un nombre de points plus important permettant d'obtenir des bandes plus fines (dans la limite de la largeur naturelle de la bande). Cependant, plus la résolution est élevée, plus le niveau de bruit est élevé (en doublant la résolution, le rapport signal/bruit diminue d'un facteur 2). Le choix de la résolution est un compromis entre la nécessité de séparer deux bandes d'absorption et l'obtention d'un spectre avec un bruit de fond faible.

### les répétitions

La prise d'essai pour une analyse IRTF est faible. L'enregistrement successif de différents prélèvements provenant du même échantillon et le calcul du spectre moyen a l'avantage de minimiser les problèmes d'hétérogénéité des échantillons. En effet, l'accumulation d'un nombre important de balayages conduit à un meilleur signal/bruit mais ne résoud pas les problèmes d'hétérogénéité éventuelle.

### 1.1.1.c. la répétabilité

La répétabilité est une étape primordiale pour la réussite de tout traitement mathématique des mesures obtenues. Elle se définit comme l'écart entre des mesures issues d'un protocole d'analyse effectué sur des prises multiples d'un échantillon homogène, par le même opérateur avec une méthode unique et dans un intervalle de temps court (au regard de la durée d'une mesure) (FEINBERG, 1996). La mesure correspond à l'intensité du signal mesurée au sommet des bandes à un nombre d'onde donné.

La répétabilité est déterminée selon la formule (DUPUY & al., 1994)

$$r\acute{e}p\acute{e}tabilit\acute{e} = 100 \times \frac{\sqrt{\sum_{i}^{M} (x_i - x_m)^2 / (M - 1)}}{x_m}$$
 (éq.1)

où xi représente l'absorption pour un spectre à un nombre d'onde donné, xm est la moyenne des absorptions de tous les spectres à ce même nombre d'onde et M est le nombre de spectres.

Dans ce calcul, sont prises en compte les perturbations dues à l'environnement telles que la température ou la pression et les contraintes physiques de l'appareillage comme les fluctuations de l'alimentation électrique.

### 1.1.2. les techniques associées

Chaque famille ou type de produit demande une préparation et une présentation d'échantillon adéquates et déterminées par leurs caractéristiques physico-chimiques.

### 1.1.2.a. la transmission

L'échantillon est placé sur le trajet du rayonnement IR provenant du système optique.

L'intensité transmise par l'échantillon (I) à une longueur d'onde donnée est comparée à l'intensité incidente (Io) à la même fréquence par application de la loi de Beer-Lambert:

$$A = -\log \frac{1}{I_0} = \varepsilon cl$$
 (éq.2)

où l est l'épaisseur de l'échantillon, c à sa concentration, et  $\varepsilon$ , le coefficient d'extinction molaire est une constante caractéristique de l'échantillon à une longueur d'onde donnée.

La transmission s'applique aux films de polymères transparents et de faible épaisseur, aux liquides ainsi qu'aux poudres après préparation de disques fins. L'analyse des liquides est obtenue en déposant l'échantillon dans une cuve adaptée ou entre 2 fenêtres transparentes dans l'infrarouge (DUMAS & al., 1989). Elle est peu employée aujourd'hui car tout d'abord, elle nécessite une dilution afin d'éviter une saturation des bandes d'absorption mais aussi, peu de solvants sont suffisamment transparents dans l'infrarouge.

Le pastillage, indispensable pour l'analyse des poudres consiste à mélanger et broyer finement l'équivalent de 1 % d'échantillon dans une poudre transparente dans l'infrarouge (comme le KBr ou bromure de potassium) puis à presser fortement l'ensemble dans un moule à l'aide d'une presse hydraulique de manière à obtenir une pastille transparente. Cette opération impose des contraintes physiques susceptibles de modifier l'échantillon.

Tous les échantillons ne peuvent pas être analysés par transmission. En mode réflexion, le faisceau infrarouge est réfléchi sur l'échantillon. Selon le mode d'interaction du faisceau avec l'échantillon, il existe différents types de réflexion.

### 1.1.2.b. la réflexion spéculaire et la théorie de Kramers-Krönig

La réflexion spéculaire appelée aussi réflexion de Fresnel est une méthode de mesure non destructive où le faisceau est réfléchi par l'échantillon (figure 3). L'angle d'incidence et l'angle de réflexion sont identiques.

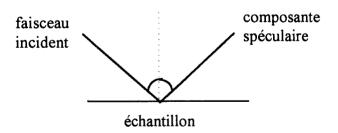


figure 3: principe de la réflexion spéculaire

L'importance de la lumière réfléchie par un matériau absorbant dépend de l'angle d'incidence (a), de l'état de la surface, de l'indice de réfraction (n) et des propriétés

d'absorption de l'échantillon, variables selon les produits. Ces paramètres peuvent être la cause de distorsion de bandes (déplacement, modification et même inversion d'intensité).

Dans un milieu transparent, l'indice de réfraction est un nombre réel. Par contre, dans un milieu absorbant, c'est un nombre complexe :

$$n = n + ik (éq.3)$$

avec n: indice de réfraction et k: indice d'absorption.

La réflectance de Fresnel, fonction de l'angle d'incidence, varie avec la géométrie optique de l'accessoire (BRIMMEL & al., 1987). En première approximation, la réflectance r pour un solide à incidence normale ( $\alpha = 0$ ) est donnée par la formule:

$$r = \frac{(n-1)^2 + n^2 k^2}{(n+1)^2 + n^2 k^2}$$
 (éq.4)

avec n et k constantes optiques à une fréquence donnée.

Au voisinage de l'incidence normale (dans les régions de transparence), k devient négligeable. Ainsi,

$$r = \frac{(n-1)^2}{(n+1)^2}$$
 (éq.5)

par conséquent, au contraire des régions de forte absorbption, r est faible et les bandes sont peu observables sur le spectre infrarouge.

Un spectre de réflexion spéculaire ressemble davantage à un spectre dérivé avec des inversions de bandes qu'à un spectre en transmission avec des bandes d'absorption. Pour permettre une interprétation qualitative, il est nécessaire de recalculer le spectre de réflexion à des angles différents ou à l'aide des relations de Kramers-Kronig (KRISHNAN & al., 1990).

Les intensités étant relatives, les analyses quantitatives avec ce mode d'échantillonnage ne sont pas envisageables (MORADI, 1993, Spectrum for Windows, 1997). Cette méthode convient plus particulièrement aux matériaux réfléchissants ayant subi des traitements en surface (JACOBSEN, 1979).

### 1.1.2.c. la réflexion diffuse et la théorie de Kubelka-Munk

Le faisceau pénètre à l'intérieur de la poudre et subit un grand nombre de réflexions, réfractions ou dispersions avant de ressortir de manière diffuse dans toutes les directions (figure 4).

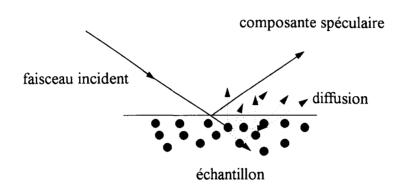


figure 4: principe de la réflexion diffuse

Un spectre enregistré en réflexion diffuse contient les informations issues de la radiation diffusée ainsi que celles de la radiation provenant de la composante spéculaire qu'il faut éliminer au maximum à l'aide d'un accessoire approprié (HARRICK, 1963). Le spectre est exprimé en réflectance et pour permettre les analyses quantitatives ou semi-quantitatives, il doit être transformé en équivalent absorbance grâce aux fonctions de Kubelka-Munk.

La théorie de Kubelka-Munk est fondée sur un modèle unidimensionnel dans lequel le champ de radiation est divisé en 2 flux, I<sup>+</sup> se déplaçant de la surface illuminée dans l'échantillon, I<sup>-</sup> se déplaçant vers la surface illuminée (MORADI, 1993) (figure 5).

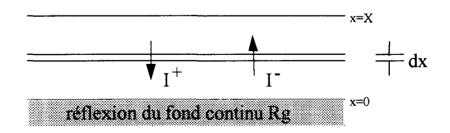


figure 5: modèle de Kubelka-Munk (réflexion et transmission d'un milieu diffusant)

En conséquence, dans la couche dx sous irradiation, une fraction de l'intensité KI<sup>+</sup> dx sera absorbée, alors qu'une fraction SI<sup>+</sup> dx sera perdue par diffusion en retour, et le flux de radiation I<sup>-</sup> va par contre contribuer par une fraction diffusée SI<sup>-</sup> dx à l'intensité dans la

direction -x. K et S sont des constantes représentant l'absorption et la diffusion respectivement. S est proportionnel à la taille moyenne des particules (KUBELKA & al., 1931).

Ainsi:

$$d I^{+} = -(S+K)I^{+} dx + SI \cdot dx$$
 (éq.6)

$$d I^{-} = (S+K)I^{-} dx - SI^{+} dx$$
 (éq.7)

d  $I^- = (S+K)I^- ux - SI^- ux$ en combinant ces 2 équations et en posant la réflectance  $R = \frac{I^-}{I^+}$ x = X

$$\frac{dR}{Sdx} = R^2 - 2(\frac{S+K}{K}) + 1 \tag{\'eq.8}$$

La fonction de Kubelka-Munk (KUBELKA & al., 1931) intervient en intégrant pour  $x \to \infty$ :

$$F(R\infty) = \frac{(1 - R\infty)^2}{2R\infty} = \frac{K}{S} = \frac{2\varepsilon c}{S}$$
 (éq.9)

Elle est reliée à la réflectance (représentée par R∞) mais aussi à la concentration car K est équivalent à 2 & (BURNS & al.). Cette fonction est approximative et, quand la composante spéculaire résiduelle est faible et que l'échantillon est peu absorbant, un spectre en réflexion diffuse a le même profil qu'un spectre en transmission.

Les produits concernés par cette technique se présentent généralement sous forme de poudre (BURGER & al., 1987, FULLER & al., 1978). Le protocole de préparation des échantillons, spécifique à chaque technique constitue l'échantillonnage. En réflexion diffuse, cela consiste à mélanger de façon homogène et à broyer finement l'échantillon dans une poudre transparente dans l'infrarouge. La proportion de l'échantillon représente environ 5 % du mélange et peut varier avec l'absorption du produit. Le mélange est ensuite déposé sur la coupelle et la surface est aplanie. La dilution, dans un diffuseur idéal tel que le KBr a pour effet de réduire au maximum la réflexion spéculaire et ainsi d'améliorer la linéarité de la fonction de Kubelka-Munk (HEMBREE & al., 1989).

L'analyse des échantillons rigides et indéformables tels que les bouteilles d'eau est possible grâce à un support abrasif avec lequel une faible quantité du matériau est prélevé puis déposé directement sur la coupelle (dans ce cas, le spectre de référence correspond au support abrasif seul).

L'échantillonnage par réflexion diffuse, rapide et efficace pour l'analyse qualitative est donc envisagé pour la constitution de la base de données.

### 1.1.2.d. la réflexion totale atténuée - ATR

Les radiations infrarouges lumineuses pénètrent dans un prisme permettant ainsi une réflexion interne créant une onde évanescente à la surface de celui-ci (figure 6). Cette onde pénètre dans l'échantillon gardé en parfait contact avec le prisme. La réflexion interne (ou réflexion totale) a lieu quand l'angle d'incidence à l'interface entre l'échantillon et le prisme est plus grand que l'angle critique qui dépend de l'indice de réfraction des deux milieux. Il est nécessaire pour cela que le prisme soit plus réfringent que l'échantillon. Le faisceau pénètre une fraction de longueur d'onde au delà de la surface réfléchissante, et, quand le matériau absorbant la radiation sélectionnée est en contact étroit avec la surface réfléchissante, le faisceau perd de l'énergie à la longueur d'onde où le matériau absorbe (FAHRENFORT, 1961).

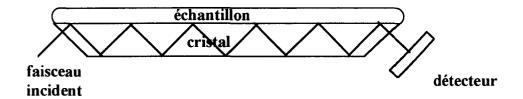


figure 6: principe du prisme ATR

La spectroscopie par ATR est une technique d'analyse dite de surface et la profondeur de pénétration du faisceau à l'intérieur du produit  $(d_p)$  est fonction de la longueur d'onde  $(\lambda)$ , des indices de réfraction du cristal  $(n_1)$  et de l'échantillon  $(n_2)$  et de l'angle d'incidence  $(\theta)$ .

$$dp = \frac{\lambda}{2\pi n!} \sqrt{\sin^2\theta - (\frac{n^2}{n!})^2}$$
 (éq.10)

Le cristal utilisé est un cristal en séléniure de zinc (ZnSe) avec un angle d'incidence de 45°, à 6 réflexions et avec un indice de réfraction de 2,4. Comme la plupart des produits organiques ont un indice inférieur à 1,5, la profondeur de pénétration du faisceau est faible, de l'ordre de 0,2λ, et donc non constante sur tout l'intervalle spectral. Cela limite l'étude de solutions très diluées (pour lesquelles le spectre est peu intense vers 3000 cm<sup>-1</sup>).

Cette technique permet d'étudier des échantillons épais et absorbants (DEVAUX & al., 1993, LAI & al., 1994) à condition qu'ils soient assez souples et qu'ils aient une surface plane pour assurer le contact avec le prisme. L'accessoire ATR est idéal pour les liquides (WILSON, 1988) et films (HARRICK, 1963, MANDANIS, 1993) car il ne nécessite pas ou peu de préparation. Après analyse, le cristal ATR est généralement nettoyé à l'eau puis à l'éthanol. L'obtention d'un spectre de poudre est rendue possible avec l'utilisation d'une presse sur le cristal ou en imprégnant la poudre d'un liquide volatil non miscible (supprimant l'air) dans le but d'améliorer le contact (le protocole est décrit dans le troisième chapitre concernant l'étude des amidons).

Les performances sont intéressantes du point de vue répétabilité d'où la possibilité d'envisager des analyses quantitatives (DUPUY & al., 1994).

### 1.2. LA BASE DE DONNEES

L'identification d'un composé lors de contrôles de conformité des matières premières et matériaux d'emballage peut être effectuée manuellement par analyse des groupes fonctionnels. Cependant, quand les différences spectrales sont faibles (similarité de structure ou présence d'impuretés en faible proportion), la discrimination entre 2 composés devient difficile. L'interprétation et l'identification des spectres peut être automatisée et facilitée par les analyses statistiques. Après constitution d'une bibliothèque de spectres de référence, le traitement informatique estime la similitude entre une référence (A) appartenant à la base de données et un échantillon inconnu (B). La comparaison entre 2 produits pouvant être affectée par la préparation de l'échantillon et le choix de la technique d'échantillonnage, la qualité des spectres est indispensable à la fiabilité d'une analyse d'identification des matières premières et de matériaux d'emballage.

### 1.2.1. constitution de la base de données

### 1.2.1.a. les films

Les films d'emballage peuvent être enregistrés par transmission s'ils sont constitués d'un seul matériau. Par contre, si l'emballage est composé de deux couches de polymère, le spectre

en transmission représentera les bandes caractéristiques de ces deux constituants. De plus, ces emballages multicouches souvent épais conduisent à des phénomènes de saturation des bandes d'absorption. Pour parvenir à identifier chacun des polymères, il est nécessaire d'utiliser l'accessoire ATR et d'analyser successivement les 2 faces du matériau (figure 7).

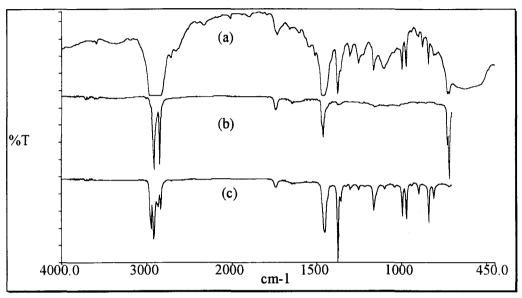


figure 7: spectres par transmission (a) et par ATR d'un polymère bi-couche PE (b)/PP (c)

Si le polymère est indéformable et donc impossible à analyser ni en transmission (trop épais), ni en ATR (mauvais contact avec le cristal), un spectre de cet échantillon peut être obtenu en réflexion diffuse après avoir récupéré une quantité suffisante à l'aide d'un support abrasif (figure 8). La qualité du spectre est comparable à celle d'un film de même nature analysé en transmission.

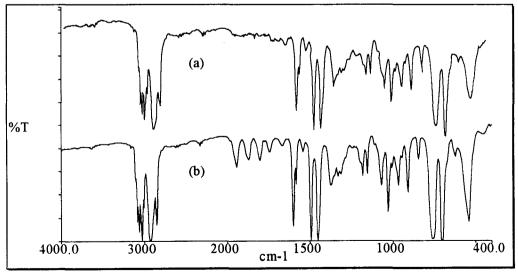


figure 8: spectres du polystyrène par réflexion diffuse (a) et par transmission (b)

### 1.2.1.b. les poudres

La plupart des matières premières se présentent sous forme poudre (vitamines, amidons, glucides simples, hydrocolloïdes mais aussi exhausteurs de goût et certains émulsifiants...). Leur spectre peut être obtenu de trois manières: transmission après dilution et pastillage, réflexion diffuse après dilution ou encore ATR par dépot direct sur le support. Dans ce cas, une presse de la taille du cristal est utilisée pour favoriser le contact.

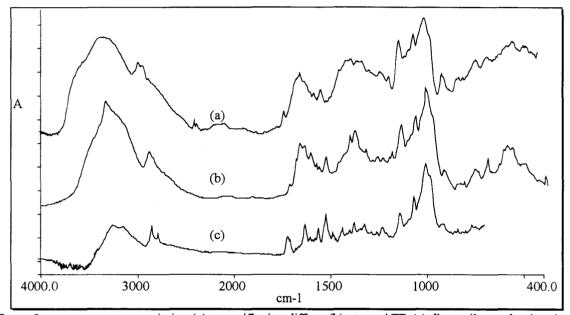


figure 9: spectres par transmission (a), par réflexion diffuse (b) et par ATR (c) d'un mélange de vitamines

Bien que les bandes d'absorption se situent aux mêmes nombres d'onde, les spectres du même échantillon d'un mélange de vitamines ne sont pas identiques (figure 9).

Le spectre obtenu en ATR est moins intense et son signal est coupé à 700 cm<sup>-1</sup>. La qualité d'un spectre ATR est directement reliée à l'adhérence de l'échantillon avec le cristal. Le contact est difficile à obtenir avec des poudres dont la granulométrie est parfois élevée. Cette technique n'est pas retenue pour l'acquisition des spectres de référence.

Le spectre en réflexion diffuse présente des bandes d'absorption plus fines qu'en transmission. De plus, l'absence de pastillage imposant des contraintes thermodynamiques importantes conduit à préférer la réflexion diffuse à la transmission pour la constitution de la base de données spectrales des échantillons sous forme poudre.

### 1.2.1.c. les liquides, les pâtes

Les liquides peuvent être analysés par transmission en disposant quelques gouttes de l'échantillon entre 2 fenêtres transparentes dans l'infrarouge. Le matériau des fenêtres est par exemple le KBr (hygroscopique) pour les solutions hydrophobes ou le BaF<sub>2</sub> pour les solutions aqueuses. Les analyses de liquides et pâtes sont également effectuées à l'aide de l'accessoire ATR. L'échantillon est alors directement déposé à la surface du cristal.

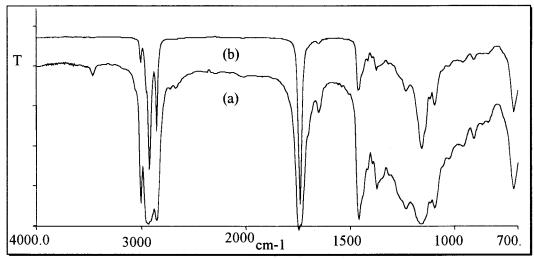


figure 10: spectres par transmission (a) et par ATR (b) d'une huile de tournesol

Par ATR, le chemin optique est fonction de la longueur d'onde, ce qui conduit à des bandes d'absorption de plus faible intensité vers les grands nombres d'onde. De ce fait, les bandes d'absorption sont rarement saturées. Les spectres obtenus sont comparables aux spectres de transmission (figure 10). L'analyse par ATR a l'avantage de supprimer les franges d'interférences souvent visibles en transmission. De plus, les bandes d'absorption sont plus fines. C'est donc cette technique qui sera choisie pour enregistrer les spectres des échantillons pâteux (sirop, matières grasses) ou liquides (colorants, arômes).

### 1.2.1.d. spécificité des spectres

Les spectres enregistrés dans le moyen infrarouge sont spécifiques d'un échantillon pour une forme physique donnée (poudre, liquide, film, sirop...). Les spectres de glucose en poudre et de sirop de glucose seront différents même si la technique d'échantillonnage utilisée est la même. Par exemple, compte tenu de la présence d'eau, le spectre du sirop de glucose,

enregistré par ATR, présente une moins bonne résolution que celui du glucose en poudre (figure 11).

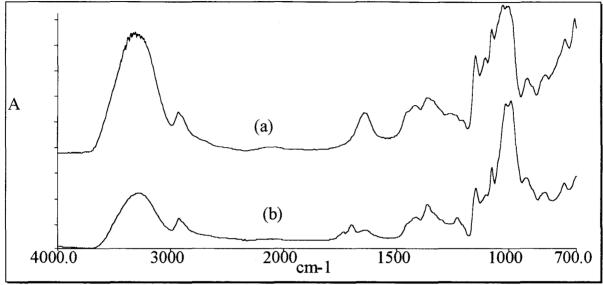


figure 11: spectres par ATR de sirop de glucose(a), glucose en poudre (b)

La spécificité des spectres en fonction de l'aspect de l'échantillon conduit à enregistrer, à l'aide de l'échantillonnage adapté, toute matière première et à incrémenter la base de données avec le spectre correspondant.

### 1.2.2. principe de fonctionnement de la base de données

Quand le spectre d'un échantillon inconnu est enregistré, une recherche automatique d'identification fournit, à partir de la bibliothèque spectrale, une série de composés dont les spectres sont les plus proches de l'échantillon analysé. Face à chaque composé figurent un coefficient de corrélation et un facteur F.

### 1.2.2.a. optimisation de la comparaison entre deux échantillons

Les conditions ambiantes influent sur la qualité des spectres. La présence de bandes d'absorption dues au CO<sub>2</sub> (intervalle 2390 - 2280 cm<sup>-1</sup>) ou à la vapeur d'eau (vers 3500-3300 cm<sup>-1</sup> et 1600 cm<sup>-1</sup>) ne peut pas être totalement évitée. Il est donc parfois difficile de déterminer si les différences spectrales correspondent à des interférences ou si elles sont significatives du

composé. Pour limiter des interprétations erronées, la variation due aux conditions atmosphériques peut être minimisée. En effet, le logiciel de comparaison de spectres possède des fonctions permettant de sélectionner des filtres mathématiques. Ces derniers suppriment les régions spectrales caractéristiques de ces perturbations pour optimiser la qualité des spectres et faciliter la recherche en bibliothèque.

Outre l'influence du CO<sub>2</sub> et de l'humidité, un filtre supplémentaire atténue de façon automatique et systématique l'influence des données où le rapport signal/bruit (S/B) est trop faible. Dans ce cas, un spectre moyen est utilisé comme fonction de pondération (Mc GRATTAN & al., 1989). Il correspond à la moyenne entre le spectre de l'échantillon et le spectre de la base de données avec lequel il est comparé.

Pour constituer efficacement la bibliothèque, les conditions opératoires pour chaque technique d'échantillonnage sont établies (tableau 1). Des répétitions et moyennes sur 3 spectres du même échantillon sont effectuées de manière à améliorer la répétabilité et limiter les problèmes d'hétérogénéité des échantillons. La réflexion spéculaire n'est pas utilisée pour enregistrement des spectres de référence.

tableau 1: protocoles d'enregistrement des spectres

	transmission	réflexion diffuse	ATR
prise d'essai	film:Ø 13 mm poudre: ≈2mg dans	poudre: ≈10 mg dans 200mg de KBr	liquide, pâte: 1 ml film: 2x5 cm
	100mg de KBr		poudre: 2 à 3 g
nombre d'acquisitions	25	25	50
résolution	4 cm <sup>-1</sup>	4 cm <sup>-1</sup>	4 cm <sup>-1</sup>
domaine spectral	4000-450 cm <sup>-1</sup>	4000-450 cm <sup>-1</sup>	4000-700 cm <sup>-1</sup>
filtres	optimisation S/B, $H_2O + CO_2$	optimisation S/B, H <sub>2</sub> O + CO <sub>2</sub>	optimisation S/B, H <sub>2</sub> O + CO <sub>2</sub>
référence	film: air poudre: KBr	poudre: KBr	film: cristal+ air poudre: cristal+ air pâte: cristal+ air sol. aq.:cristal + eau
spectre témoin	moyenne de 3 spectres du même échantillon		

### 1 2 2 b le coefficient de corrélation

Le coefficient de corrélation exprime la similitude entre deux spectres et correspond à la formule suivante (spectrum for Windows, 1997):

$$coefficient de correlation = \frac{\sum wiAiBi}{(\sum wiAiAi)^{1/2} \times (\sum wiBiBi)^{1/2}}$$
 (éq.11)

où Ai et Bi sont les intensités du spectre de référence A et du spectre de l'échantillon B à la fréquence i. Et wi est un facteur qui dépend des paramètres sélectionnés pour optimiser l'identification. Un coefficient proche de 1 indique une bonne corrélation entre les spectres.

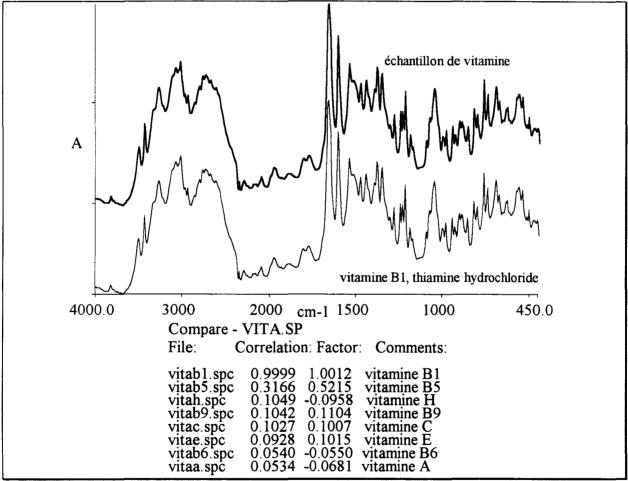


figure 12: analyse comparative d'une vitamine (en poudre) avec la base de données "vitamines". spectres enregistrés par réflexion diffuse

Le spectre en réflexion diffuse d'une vitamine inconnue comparé à celui des vitamines référencées en base de données est superposable avec celui de la vitamine B1 (figure 12). D'ailleurs, le coefficient de corrélation entre ces deux spectres est très proche de 1 (0,9999)

alors que les autres sont inférieurs à 0,32. Cela permet d'identifier cet échantillon comme étant de la vitamine B1.

# 1.2.2.c. le facteur F

Le facteur F représente le rapport moyen entre les absorbances des spectres A et B mesuré à chaque nombre d'onde. Le facteur doit être le plus proche de 1 en complément du coefficient de corrélation.

Un spectre en réflexion diffuse de saccharose en poudre dilué à 5% dans le KBr n'est pas identique à celui du même mélange à 10% (figure 13). Les bandes d'absorption sont situées aux mêmes nombres d'onde mais n'ont pas la même intensité.

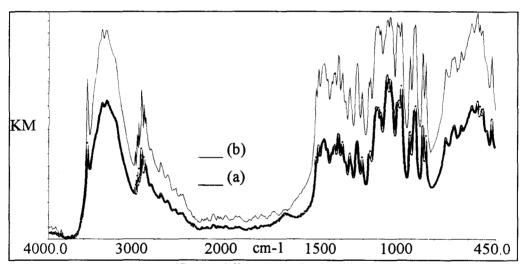


figure 13: spectres par réflexion diffuse du saccharose dilué à 5% (a) et à 10% (b)

La comparaison entre ces deux spectres à l'aide du logiciel confirme la similarité entre les échantillons car le coefficient de corrélation est de 0,9752. Compte tenu de la dilution différente dans le KBr, la valeur de F indique un rapport moyen entre les absorbances de 0,6176 (figure 14).

Compare - sacch	Compare - saccharose10%.SP				
File:	Correlation:	Factor:	Comments:		
saccharose10%.s	spc 0.9974	1.0072	saccharose dilué à 10%		
saccharose5%.sp	oc 0.9752	0.6176	saccharose dilué à 5%		

figure 14: analyse comparative de spectres de saccharose dilués à 5% et à 10%

Afin que le facteur soit proche de 1, il est indispensable de procéder à la préparation des échantillons selon le même protocole lors de la constitution de la base de données et pour la reconnaissance des matières premières.

Les valeurs du coefficient de corrélation et du facteur F comme critères d'acceptation ou de refus d'un lot sont variables selon le type d'échantillon et les normes de qualité nécessaires. Les identifications sont fiables quand le facteur est compris entre 0,90 et 1,10 et quand le coefficient de corrélation est supérieur à 0,95 (à condition toutefois que l'écart avec le coefficient de corrélation suivant sur la liste soit supérieur à 0,2).

# 1.3. LES RESULTATS

# 1.3.1. identification des matières premières, matériaux d'emballage

# 1.3.1.a. les matériaux d'emballage

En industrie agro-alimentaire, le contrôle-qualité du matériau d'emballage est aussi important que celui des matières premières. La qualité du contenu est primordiale et la conservation de celui-ci ne peut se faire dans de bonnes conditions sans un emballage adéquat. Chaque polymère a des propriétés particulières étudiées selon les besoins de chaque produit (CHOMON, 1992). Le polyester (PET), soudable, est utilisé pour l'operculage alors que le polyamide (PA) présente une résistance mécanique non négligeable. Le polypropylène (PP) offrant une excellente tenue à la chaleur, est idéal dans les emplois en stérilisation. Même si l'aspect visuel des films est le même (souple et transparent), une analyse spectrale permet une identification fiable et rapide du matériau (figure 15). Un spectre de polyamide, par exemple, comparé avec la base de données des polymères confirme la nature du matériau par un coefficient de corrélation proche de 1 avec le PA (alors que les valeurs pour les autres polymères sont proches de 0). Cela confirme la différence spectrale importante entre les polymères.

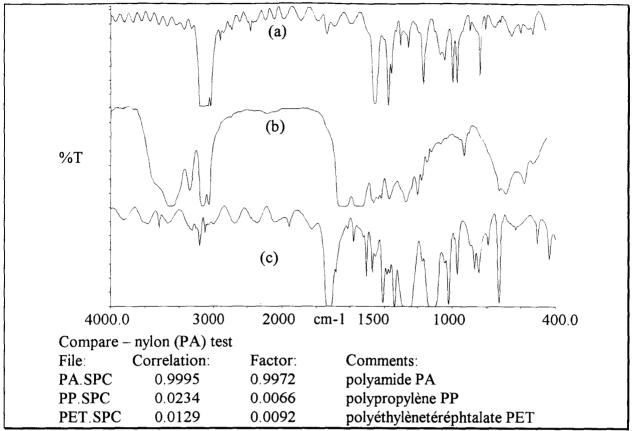


figure 15: spectres par transmission de différents matériaux d'emballage polypropylène (a), polyamide (b) et polyester (c)

# 1.3.1.b. les dérivés sucrés

La distinction entre un dérivé glucidique simple (type fructose) et un hydrocolloïde (type carraghénane ou pectine) est très difficile. Pourtant, leur utilisation est différente: le premier présente un pouvoir sucrant alors que le second possède un rôle de gélifiant ou d'épaississant alimentaire (HANSSEN, 1987). Une analyse par spectroscopie infrarouge permet d'identifier rapidement et avec fiabilité la nature d'un ingrédient

Par exemple, un échantillon de carraghénane est comparé avec d'autres hydrocolloïdes (figure 16). Seul le coefficient de corrélation du carraghénane est proche de la valeur cible. Même s'il s'agit du même échantillon de carraghénane, les valeurs des coefficients de corrélation (0.9654) et du facteur (1.0856) ne sont pas égaux à 1 puisqu'ils prennent en considération la préparation de l'échantillon pour un enregistrement par réflexion diffuse.

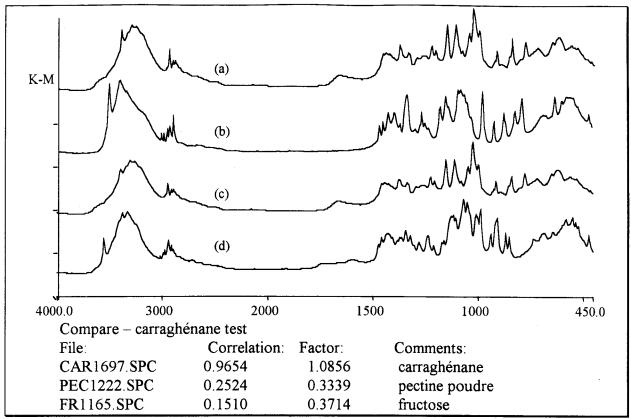


figure 16: analyse comparative de spectres en réflexion diffuse de carraghénane (a) avec des hydrocolloïdes: fructose (b), carraghénane (c) et pectine (d)

# 1.3.1.c. les matières grasses

Principalement constituées de triglycérides et d'acides gras, les matières grasses peuvent être d'origine animale ou végétale. Le profil spectral est globalement le même pour toutes les matières grasses (figure 17). Les spectres présentent tous une bande caractéristique des esters d'acides gras vers 1745 cm<sup>-1</sup>. Toutefois, il existe des différences permettant de les distinguer: vers 1150 cm<sup>-1</sup> ( $\spadesuit$ ) et vers 3300 cm<sup>-1</sup> (où le beurre, contenant de l'eau, présente une bande supplémentaire). La bande d'absorption située à 1150 cm<sup>-1</sup> est attribuée à l'acide linoléique (DUPUY & al., 1996) dont la teneur varie selon que la matière grasse est animale ou végétale et selon l'origine (tournesol, maïs, lait, saindoux...).

En analyse de routine, un échantillon de beurre est facilement différentié d'une huile d'olive (le coefficient de corrélation vaut 0.9021) et de la margarine (coefficient de corrélation égal à 0.9047).

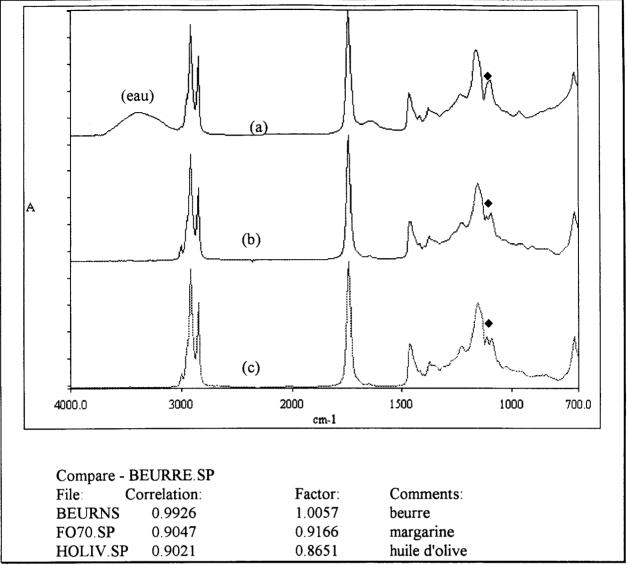


figure 17: analyse comparative de spectres ATR de beurre avec les spectres de la base de données matières grasses: beurre (a), margarine (b) et huile d'olive (c)

# 1.3.1.d. autres ingrédients

La caractérisation d'autres ingrédients tels que les vitamines, les exhausteurs de goût, les conservateurs, les colorants ou les émulsifiants... est efficace par analyse automatique et comparative des spectres infrarouges. Dans la plupart des cas, les coefficients de corrélation entre les 2 premiers produits de référence sont assez différents pour permettre une identification fiable.

## 1.3.2. limites

#### 1.3.2.a. structures voisines

Lors d'une recherche d'identification, il arrive parfois que plusieurs coefficients de corrélation sont très proches et voisins de 1. C'est le cas pour l'amidon, le glucose et la maltodextrine. Cette dernière est obtenue après hydrolyse d'amidons de façon à rompre les liaisons entre les cycles glucosidiques. Ainsi, sa structure chimique est intermédiaire entre celle du glucose et celle d'un amidon et les spectres infrarouges sont très ressemblants. Même si la recherche de similitudes oriente la caractérisation d'un amidon testé correctement vers un amidon plutôt qu'une maltodextrine ou un glucose (coefficients de corrélation égaux à 0,92 et 0,89 respectivement), l'identification avec la base de données ne satisfait pas aux critères de précision attendus (figure 18). Parmi la liste d'échantillons les plus ressemblants, le coefficient de corrélation est supérieur à 0,96 avec tous les amidons de maïs cireux d'où la difficulté de déterminer avec fiabilité l'amidon testé est modifié ou prégélatinisé.

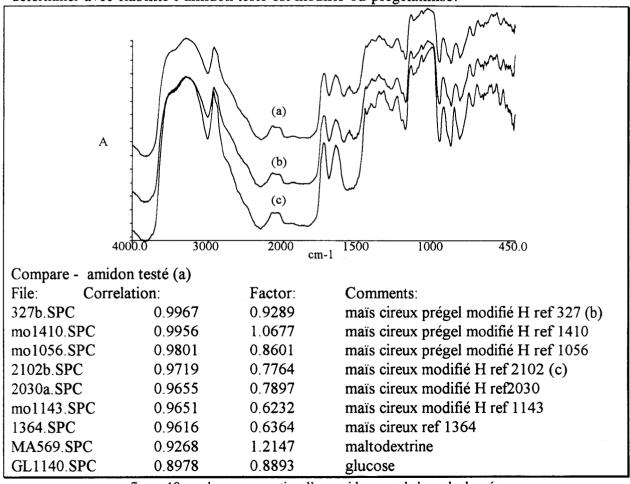


figure 18: analyse comparative d'un amidon avec la base de données

# 1.3.2.b. concentrations faibles

Parfois, les matières premières ne sont pas réceptionnées pures mais diluées. Les arômes, les colorants ou les antioxydants sont dilués dans des matrices aqueuses, alcooliques ou lipidiques. La concentration du produit est si faible que le spectre de l'échantillon est très proche de celui de la matrice. Par exemple, compte tenu de la matrice lipidique, les spectres des antioxydants ressemblent aux spectres des matières grasses (figure 19). Quand l'ingrédient est très dilué, comme le romarin par exemple, le spectre est plus caractéristique de la matrice que de l'ingrédient caractéristique de l'échantillon. Par exemple, le coefficient de corrélation entre le romarin liquide (dans une matrice huileuse) et l'huile d'arachide est égal à 0.9408.

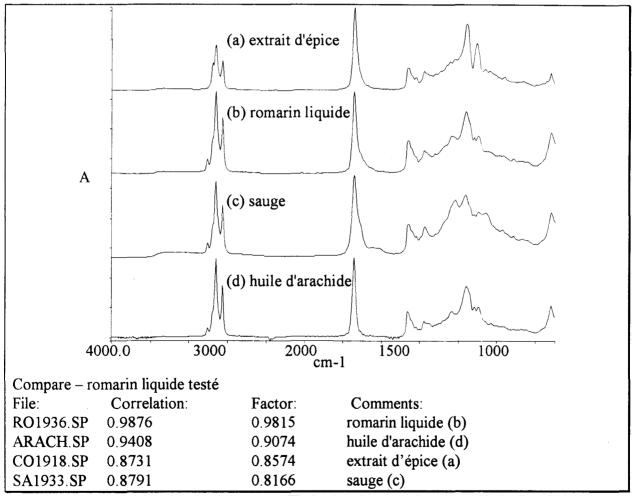


figure 19: analyse comparative de spectres ATR d'antioxydants (a), (b) et (c) et d'huile d'arachide (d)

Une solution consiste à extraire la matrice or, la soustraction spectrale de cette matrice est difficilement réalisable dans la mesure où sa nature exacte n'est pas connue. Il faudrait alors

procéder à une préparation préalable de l'échantillon avant enregistrement afin de supprimer la matrice (lyophilisation, extraction...).

# 1.4. CONCLUSION

L'absorption spécifique des rayonnements infrarouges permet la caractérisation de la plupart des échantillons testés lorsque l'échantillonnage est approprié. Dans le cadre de la faisabilité de différentiation des matières premières, ingrédients et matériaux d'emballage, à condition que les compositions chimiques soient suffisamment spécifiques, il n'existe aucun problème d'identification. Une fois l'archivage terminé (bien qu'il ne soit jamais exhaustif), l'analyse qualitative d'un échantillon consiste à effectuer une recherche de similitudes entre son spectre et ceux de la bibliothèque pour l'accepter ou le refuser en contrôle-qualité. Les protocoles d'échantillonnage présentés sont facilement réalisables. Les analyses sont donc très rapides. Les critères de conformité sont variables selon les produits mais d'une manière générale, le coefficient de corrélation doit être supérieur à 0,95.

L'utilisation de la base de données en contrôle-qualité des matières premières a ses limites: la technique d'analyse est spécifique (identification d'un composé) mais sa sensibilité n'est pas suffisante pour mettre en évidence une éventuelle contamination. Dans ce cas, il faut employer d'autres techniques d'analyse telles que la chromatographie.

En ce qui concerne les ingrédients dilués (dans l'eau, l'huile ou l'alcool), les différentiations sont parfois difficiles et nécessiteraient des préparations d'échantillons lourdes pour être facilitées. Or, le gain de temps par rapport aux techniques d'analyses classiques référencées serait négligeable et donc la mise au point d'un protocole de préparation d'échantillon spécifique devient inutile.

Pour l'analyse des amidons par exemple, l'observation du spectre et du coefficient de corrélation ne permettent pas de distinguer avec fiabilité un amidon natif d'un amidon modifié. Afin de contourner ces difficultés, une solution consiste à développer des méthodes faisant appel à la chimiométrie en traitant les données infrarouges avec des outils plus performants.

La base de données permet de contrôler la qualité d'un ingrédient complexe (composé de plusieurs matières premières) mais l'analyse n'est pas suffisante pour s'assurer que les concentrations des différentes constituants correspondent aux spécifications. Les spectres de la plupart des matières premières sont assez spécifiques pour entreprendre leur quantification après mise au point de méthodes d'analyses spécifiques.

Enfin, en proposant des protocoles avec une préparation d'échantillon plus longue et délicate (de manière à augmenter l'intensité du signal ou améliorer la répétabilité spectrale), certaines informations spectrales peuvent être mises en valeur. Ainsi, des études plus spécifiques peuvent être envisagées.

# CHAPITRE 2 ANALYSE QUANTITATIVE DE WITAMINES DANS UN MELANGE MULTICOMPOSANTS

Les 3 premières années de la vie représentent une période déterminante pour l'enfant. L'alimentation est un facteur essentiel pour assurer sa croissance et son développement. Afin de satisfaire à ces besoins, la consommation en lipides, protides, glucides, sels minéraux et vitamines doit être équilibrée et contrôlée régulièrement. Même si les situations cliniques liées à des déficits massifs en vitamines sont devenues exceptionnelles dans les pays industrialisés, des carences biologiques peuvent parfois apparaître.

L'alimentation infantile appelée babyfood doit répondre à des contraintes physiologiques et législatives strictes. Elle est de ce fait enrichie en vitamines pour compenser les dégradations observées au cours des traitements thermiques lors du process de fabrication et pour couvrir les besoins de l'enfant. Cet ajout doit compléter les besoins nutritionnels de façon à ce que la couverture vitaminique soit égale à la couverture énergétique des aliments afin d'obtenir une densité nutritionnelle idéale. Au cours de la fabrication, la proportion de vitamines ajoutée est très faible (car inférieure à 0.1% de la masse totale de la production) par comparaison avec les autres ingrédients (légumes, fruits, viandes...), aussi, pour faciliter l'homogénéisation et leur répartition au sein du produit, les vitamines, sous forme poudre, sont préalablement mélangées et additionnées de glucose. Le mélange multivitamines ainsi obtenu est appelé compound polyvitamines. A chaque type de babyfood (légumes, légumes/viandes, fruits, potages...) correspond un mélange spécifique dont la composition varie selon la concentration et le nombre de vitamines. Tous les mélanges se présentent sous forme d'une poudre de couleur orangée caractéristique de la vitamine B2 présente dans toutes les variétés de compounds.

Dans un souci de qualité et de sécurité des aliments, il est indispensable de s'assurer de la conformité de ces ingrédients avant leur incorporation dans la chaîne de fabrication des petits pots. L'outil analytique doit être capable de fournir une analyse précise et fiable dans les meilleurs délais pour répondre aux besoins de la production. Les techniques conventionnelles de dosage des mélanges vitaminiques (chromatographiques et microbiologiques) sont longues et assez onéreuses. En revanche, la spectroscopie IRTF associée à des traitements statistiques est potentiellement une technique avantageuse car l'analyse est rapide, peu coûteuse, non destructive, non polluante et nécessite peu d'échantillon.

La présente étude porte sur la mise au point d'une méthode de quantification simultanée de 4 vitamines hydrosolubles (B1, B2, B6 et PP) dans une variété de compound dont la matrice constituée de glucose représente plus de 90% de sa masse. A terme, la conformité de chaque lot de cette variété pourra être contrôlée.

## 2.1. LES VITAMINES

Les vitamines sont des substances organiques, sans valeur énergétique propre (SOUCCAR & al., 1996), nécessaires à l'organisme pour maintenir un métabolisme cellulaire fonctionnel et constituant un groupe de molécules chimiquement très hétérogène. Elles jouent toutes un rôle différent dans l'organisme (LE GRUSSE & al., 1993). La thiamine (vitamine B1) par exemple améliore le métabolisme des glucides et participe à la transmission de l'influx nerveux et musculaire. La riboflavine (vitamine B2) qui améliore le métabolisme des glucides, lipides et protéines est indispensable à la réaction d'oxydation et à la synthèse d'autres vitamines. La pyridoxine (vitamine B6) quant à elle, permet à l'organisme d'utiliser les protéines apportées par l'alimentation en intervenant dans le métabolisme des protéines et de l'hémoglobine. Enfin, la niacine (vitamine PP) est sollicitée pour la production d'énergie à partir des glucides, lipides et protéines apportés par l'alimentation et intervient dans le métabolisme des acides gras et de certains systèmes enzymatiques. Les effets de la carence en vitamines sont variés (tableau 2).

tableau 2: source et activités principales des vitamines B1, B2, B6 et PP

vitamine	principales sources	effets de la carence	
B1 (thiamine)	abats, viandes, lait, oeufs, céréales, légumineuses, levures	fatigue, perte de poids, faiblesse musculaire	
B2 (riboflavine)	abats, viandes, lait et dérivés, céréales	lésions cutanées et oculaires, retard de croissance	
B6 (pyridoxine)	abats, levures, viandes, oeufs, lait, céréales, certains légumes et fruits	fatigue, vertiges, troubles nerveux	
PP (niacine)	viandes, abats, poissons, légumes secs, certains fruits	lésions cutanées et des muqueuses, accidents digestifs	

Les vitamines sont classiquement divisées en 2 groupes (tableau 3) en fonction de leur solubilité dans les solvants organiques (liposolubles) ou dans l'eau (hydrosolubles).

tableau 3: apports quotidiens recommandés en principales vitamines

	vitamine	apports quotidiens préconisés	
	B1	nourrissons: 0.4 mg	
	B2	6-12 mois: 0.6 mg	
	PP (ou B3)	6 à 12 mois: 6 mg	
HYDROSOLUBLES	B5	nourrissons à 3 ans: 3 mg	
	В6	6-12 mois: 0.6 mg	
	H (ou B8)	enfants: 50 à 90 μg	
	В9	nourrissons: 50 μg	
	B12	1 à 3 ans: 1 μg	
LIPOSOLUBLES	POSOLUBLES A enfants: 400 à 800 μg		
	E	nourrissons: 3 à 4 mg	

# 2.1.1. les vitamines et la spectroscopie infrarouge

Du point de vue spectroscopique, chaque vitamine possède une formule chimique particulière et donc des modes de vibrations fondamentales spécifiques conduisant à des spectres infrarouges différents. La constitution de la base de données des vitamines pures n'a d'ailleurs posé aucun problème d'identification.

Afin de s'assurer de la sélectivité des bandes d'absorption, les spectres de chacune des vitamines sont enregistrés par ATR après dilution aqueuse des poudres (le spectre de référence correspond à celui de l'eau). La dilution des vitamines est représentative de la proportion que l'on aurait dans une solution de compound polyvitamines dilué à 250 g/l. L'absorption importante de l'eau et la baisse du signal vers les grands nombres d'onde limitent l'intervalle spectral à 2000-700 cm<sup>-1</sup>.

# 2.1.1.a. la vitamine B1

La thiamine est une molécule composée d'un cycle pyrimidique et d'un cycle thiazolique soufré et azoté. Ces 2 cycles sont reliés par un pont méthylène (figure 20).

figure 20: formule de la vitamine B1

Le spectre infrarouge d'une solution aqueuse de thiamine (figure 21) met en évidence la présence de la fonction soufrée par une bande large à 1060 cm<sup>-1</sup> caractéristique des vibrations C-S dans un noyau aromatique. Les bandes vers 1640 et 1600 cm<sup>-1</sup> sont attribuables aux vibrations C-C et C-N du noyau pyrimidique, celle située à 1547 cm-1 correspond aux vibrations de déformation N-H des amines.

L'intensité négative du spectre, vers 1750-1700 cm<sup>-1</sup>, résulte de la compensation incomplète de l'eau et de la dilution importante de la vitamine B1 (2 g/l).

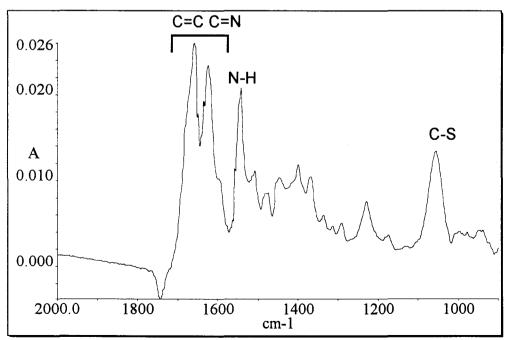


figure 21: spectre ATR d'une solution aqueuse (2g/l) de vitamine B1

# 2.1.1.b. la vitamine B2

La riboflavine (figure 22) résulte de la combinaison d'un hétérocycle à 3 noyaux (flavine) et d'un sucre à 5 atomes de carbone (ribose)

figure 22: formule de la vitamine B2

Le profil spectral de cette molécule est différent de celui de la thiamine (figure 23). Comme pour la vitamine B1, la dilution est de 2 g/l, cependant, l'intensité est 10 fois supérieure.

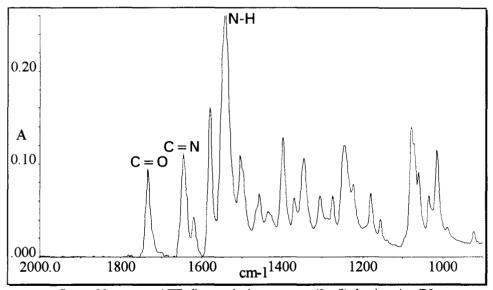


figure 23: spectre ATR d'une solution aqueuse (2 g/l) de vitamine B2

Les bandes à 1740 cm<sup>-1</sup> et 1645 cm<sup>-1</sup> sont significatives des vibrations C=O et C=N des flavines respectivement, celle intense à 1545 cm<sup>-1</sup> provient des déformations N-H dans les amides secondaires. Dans l'intervalle 1350-1000 cm<sup>-1</sup> se trouvent les vibrations fondamentales des fonctions hydroxy.

## 2.1.1.c. la vitamine B6

La pyridoxine est un dérivé de la pyridine (figure 24).

figure 24: formule de la vitamine B6

La bande fine et intense à 1550 cm<sup>-1</sup> (figure 25) résulte des vibrations C=C et C=N de la pyridine. Comme pour la vitamine B2, la région 1350-1000 cm<sup>-1</sup> est caractéristique des fonctions hydroxy, avec notamment les élongations C-O (à 1045 cm<sup>-1</sup>) et les déformations C-O-H des alcools primaires. La structure chimique étant différente, les bandes d'absorption n'ont pas le même profil et ne se situent pas aux mêmes nombres d'onde.

L'intensité spectrale est du même ordre de grandeur que celle de la vitamine B1. D'ailleurs, vers 1700-1600 cm<sup>-1</sup>, l'absorption de l'eau n'est pas complètement compensée. Ce phénomène est accentué car la vitamine B6 ne présente aucune absorption caractéristique dans cet intervalle.

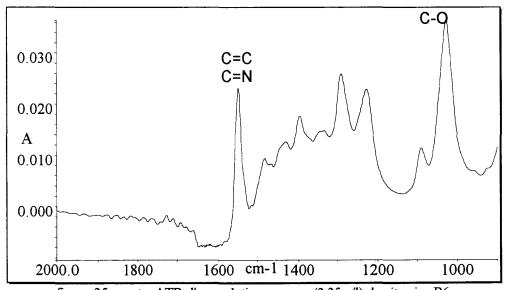


figure 25: spectre ATR d'une solution aqueuse (2.25 g/l) de vitamine B6

## 2.1.1.d. la vitamine PP

La niacine correspond à la pyridine substituée en C3 par une fonction amide (figure 26).

figure 26: formule de la vitamine PP

Bien que la formule chimique soit comme pour la vitamine B6 à base de pyridine, les spectres sont différents (figure 27). La bande d'absorption à 1680 cm<sup>-1</sup> correspond aux vibrations d'élongation C=O. Le doublet à 1620-1610 cm<sup>-1</sup> est attribuable aux vibrations N-H dans les amides primaires et aux vibrations C=C et C=N de la pyridine respectivement. L'intensité spectrale est satisfaisante pour une solution à 15 g/l mais elle est toutefois inférieure à celle de la vitamine B2 beaucoup plus diluée.

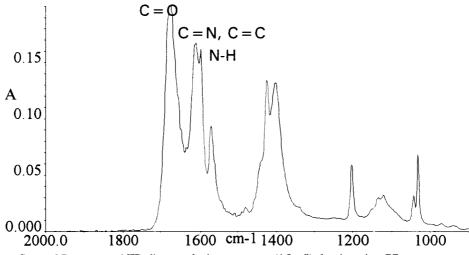


figure 27: spectre ATR d'une solution aqueuse (15 g/l) de vitamine PP

# 2.1.2. les mélanges multivitamines

Les compounds polyvitamines (en conditionnement de 1 kg) sont réceptionnés à l'usine et prêts à être employés. Pour leur préparation, les vitamines nécessaires sont mélangées ensemble puis la masse est complétée avec du sucre. L'identification de la nature du compound à partir de la bibliothèque spectrale est fiable mais s'agissant d'une analyse qualitative, elle ne

permet pas de vérifier si la concentration en vitamines correspond aux spécifications. Dans le mélange considéré pour l'étude, la matrice correspond au glucose, et 1kg de compound est composé de 8 à 9 g de thiamine, de riboflavine et de pyridoxine et de 60 g de niacine. Ces 4 vitamines hydrosolubles sont les plus importantes en quantité.

Même s'il y a des bandes d'absorption situées aux mêmes nombres d'onde (compte tenu des fonctions chimiques communes aux vitamines), les spectres des vitamines pures sont suffisamment spécifiques pour envisager une détermination simultanée et rapide de leur concentration dans un mélange.

Ainsi, bien que la vitamine B2 soit 6 fois moins concentrée que la niacine, l'intensité maximale de son spectre est plus forte. Mais aussi, les absorbances spectrales pour les vitamines B1 et B6 sont très faibles. Ces différences d'absorption aux rayonnements infrarouges permettent de prévoir des difficultés éventuelles pour quantifier certaines vitamines.

La difficulté majeure du dosage multicomposant réside dans le fait que les vitamines se trouvent en très faible quantité dans une matrice glucose et que cette dernière risque de masquer le signal correspondant à chacune des vitamines, surtout en ce qui concerne la thiamine et la pyridoxine dont les bandes d'absorption sont peu intenses dans l'infrarouge.

# 2.2. SELECTION DE LA METHODE D'ECHANTILLONNAGE

## 2.2.1. introduction

La première étape à franchir dans la mise au point d'une méthode d'analyse est de choisir la méthode d'échantillonnage la mieux adaptée pour obtenir un spectre exploitable. Les mélanges multivitamines se présentent sous forme de poudre. Plusieurs méthodes d'échantillonnage sont envisageables.

Les performances de chaque support analytique sont évaluées par la qualité du spectre infrarouge et par la répétabilité. En vue des applications chimiométriques, un test de répétabilité est pratiqué sur 10 échantillons préparés suivant le même mode opératoire. L'intensité du signal par rapport au bruit de fond, indispensable pour doser les vitamines

présentes en faible quantité dans la matrice glucidique contribue à la qualité d'un spectre. Une bonne répétabilité est primordiale pour la réussite de toute méthode d'analyse quantitative.

Le choix de la technique d'échantillonnage est effectué sur un lot de compound pour lequel la méthode doit être développée. La méthode par transmission, qui consiste à effectuer un pastillage par dilution dans du bromure de potassium est la plus ancienne mais elle est peu répétable (DE LENE MIROUZE, 1992) et conduit à des erreurs de l'ordre de 10%. Elle ne peut pas être envisagée pour une analyse quantitative précise.

## 2.2.2. la réflexion diffuse

Le principal intérêt de la réflexion diffuse par rapport aux méthodes classiques comme le pastillage est un échantillonnage simple. D'autre part, elle n'impose pas de contraintes physiques importantes aux matériaux. Ces qualités font de cette technique une méthode a priori intéressante pour l'analyse quantitative des poudres.

# 2.2.2.a. préparation de l'échantillon

Le profil d'un spectre dépend très fortement de la concentration (DE LENE MIROUZE, 1992). Les déformations (liées à la réflexion spéculaire) s'atténuent quand l'échantillon est dilué, et finissent par disparaître quand la dilution dans le KBr s'approche de 10%. La répétabilité est calculée sur des préparations d'échantillons dilués à 5% en masse dans du KBr.

Le support échantillon, une petite coupelle, reçoit une quantité très faible d'échantillon (de l'ordre de 500 mg). Après remplissage, la surface de la coupelle est compactée et arasée à l'aide d'une spatule.

## 2.2.2.b. répétabilité

Les 10 spectres du même échantillon sont enregistrés en accumulant 100 acquisitions sur l'intervalle 2000-450 cm<sup>-1</sup>, avec une résolution de 4 cm<sup>-1</sup>. Les calculs sont effectués à 5 nombres d'onde, en relevant les intensités spectrales en unités de Kubelka-Munk.

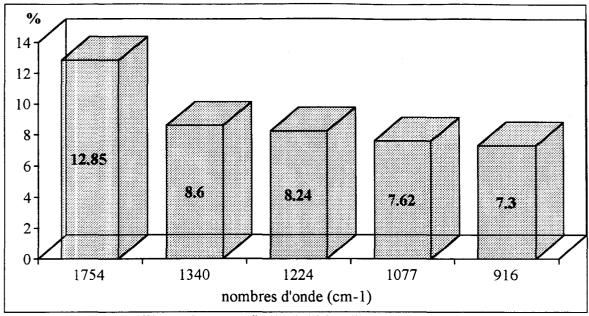


figure 28: répétabilité (à différentes longueurs d'onde) de l'échantillonnage par réflexion diffuse déterminée sur 10 spectres du même mélange polyvitamines

L'erreur systématique est constante sur l'intervalle spectral étudié et la moyenne est évaluée à 8.92% (figure 28). La répétabilité est supérieure à 10% dans le domaine d'absorption de l'eau car le KBr est très hygroscopique et l'humidité ambiante suffit à perturber le signal vers 1700 cm<sup>-1</sup>.

Les vitamines présentes dans le compound ainsi que le glucose n'ont pas la même granulométrie; or cette propriété physique du matériau influence la répétabilité spectrale en réflexion diffuse et un soin particulier doit être apporté au broyage. Il faudrait pouvoir maîtriser la granulométrie. D'autre part, la quantité de compound nécessaire pour obtenir un spectre n'est pas représentative d'une prise d'essai homogène de l'échantillon. Ces facteurs, non négligeables, conduisent à envisager une autre méthode d'échantillonnage.

# 2.2.3. la transmission sur "extrait sec"

Les vitamines que l'on veut quantifier dans le mélange sont des vitamines hydrosolubles. La dilution du compound dans l'eau supprime les problèmes d'hétérogénéité éventuels et de granulométrie, mais apporte un facteur supplémentaire à maîtriser: la contribution de l'eau. Une technique d'analyse sur extrait sec a été conçue et mise au point dans le proche infrarouge (MEURENS & al., 1990) puis adaptée dans le moyen infrarouge (DUPUY & al., 1992). Le principe consiste

à analyser, par transmission, après évaporation de l'eau, un échantillon déposé à l'état liquide sur un support.

# 2.2.3.a. préparation de l'échantillon

Un disque de silicium de 11 mm de diamètre est recouvert de 30 µl d'une suspension aqueuse de fluorure de calcium (50/50). Après évaporation de l'eau sous une lampe infrarouge, 10 µl de mélange vitaminique dilué à 100 g/l est ensuite déposé sur la couche de CaF<sub>2</sub> puis l'eau est à nouveau séchée sous la lampe. Le fluorure de calcium, peu absorbant dans le moyen infrarouge, a l'avantage de diffuser l'échantillon de façon uniforme sur la pastille. La référence est obtenue avec la pastille de silicium recouverte de CaF<sub>2</sub>.

# 2.2.3.b. répétabilité

Par rapport à l'échantillonnage par réflexion diffuse, il y a une perte d'information et le signal infrarouge n'est plus assez énergétique en dessous de 700 cm<sup>-1</sup>.

Les 10 spectres sont enregistrés après 100 accumulations sur l'intervalle 2000-700 cm<sup>-1</sup> avec une résolution de 4 cm<sup>-1</sup>.

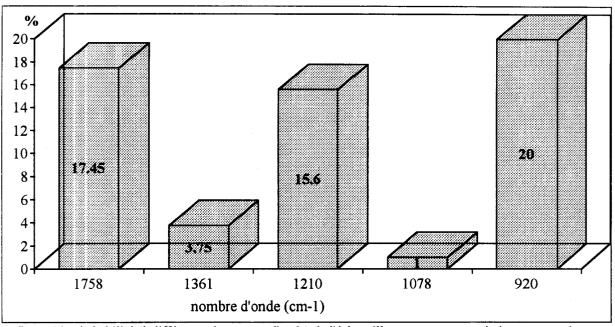


figure 29: répétabilité (à différentes longueurs d'onde) de l'échantillonnage par transmission sur extrait sec déterminée sur 10 spectres du même mélange polyvitamines

Sur le domaine spectral considéré, la répétabilité est très hétérogène et trop élevée pour poursuivre l'étude (figure 29). Cela peut s'expliquer par la sensibilité des vitamines à la chaleur et à la lumière (LE CORRE & al., 1987). La thiamine, la riboflavine et la pyridoxine sont particulièrement sensibles à la lumière et, lors de l'évaporation de l'eau sous la lampe infrarouge, la durée d'exposition (de 3 minutes) est suffisante pour dégrader chimiquement les vitamines.

La valeur de la répétabilité est très élevée vers 1758 cm<sup>-1</sup> et 920 cm<sup>-1</sup> où se trouvent les bandes d'absorption les plus intenses de la vitamine B1, mais aussi vers 1210 cm<sup>-1</sup> où absorbent les vitamine B2 et B6 confirmant ainsi la sensibilité non négligeable de ces composés à l'exposition sous la lampe.

La spectroscopie par extrait sec adaptée au dosage des sucres dans les jus d'orange (DUPUY & al., 1992) ne peut pas être utilisée dans ce cas.

## 2.2.4. la réflexion totale atténuée

# 2.2.4.a. préparation de l'échantillon

Le dépôt d'une solution aqueuse concentrée de mélange polyvitamines à la surface d'un cristal ATR combine les avantages suivants: prise d'essai suffisante pour s'affranchir des problèmes d'hétérogénéité de l'échantillon et absence de contraintes dues à la granulométrie par une dilution des poudres.

L'ATR est une technique d'analyse de surface. La profondeur de pénétration est faible, ce qui permet d'étudier les milieux fortement absorbants comme les solutions aqueuses. En effet, la profondeur de pénétration n'est pas suffisante pour que les bandes d'absorption de l'eau présentent des phénomènes de saturation.

Les bandes caractéristiques des constituants du compound sont de faible intensité et sont masqués par l'eau (figure 30).

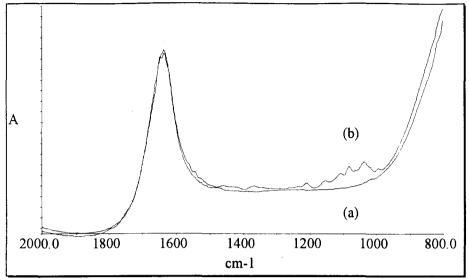


figure 30: spectres ATR de l'eau (a) et d'une solution diluée à 250 g/l de mélange polyvitamines (b)

Pour s'affranchir du signal de l'eau, la solution consiste à prendre l'eau comme spectre de référence. Ainsi, sa contribution est compensée et le spectre du compound est de meilleur qualité (figure 31). Malgré tout, le domaine d'application du moyen infrarouge reste limité à l'intervalle 2000-800 cm<sup>-1</sup> au lieu de 4000-700 cm<sup>-1</sup> (domaine d'utilisation du cristal en ZnSe).

Le signal obtenu alors est très proche de celui du glucose et caractérisé par une bande large et intense dans la région 1200-950 cm<sup>-1</sup> correspondant aux vibrations C-O et C-O-H des cycles glucosidiques. Cette ressemblance est due à la teneur en glucose élevée (de l'ordre de 90 % en masse).

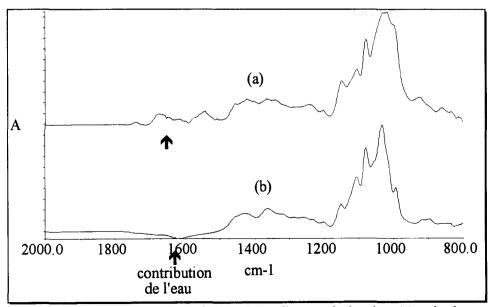


figure 31: spectres de solutions diluées à 250 g/l de mélange polyvitamines (a) et de glucose (b) (la référence est l'eau)

La répétabilité de l'échantillonnage ATR est calculée sur des solutions diluées à 250 g/l dans l'eau distillée. Le volume déposé à la surface du cristal étant de 2 ml, l'échantillon est obtenu par dilution de 1 g de compound dans 4 ml d'eau distillée. Cela permet d'avoir une prise d'essai 20 fois plus importante que lors de la préparation de l'échantillon pour l'utilisation de l'accessoire de réflexion diffuse.

# 2.2.3.b. répétabilité

Les spectres des 10 préparations sont enregistrés sur l'intervalle 2000-700 cm<sup>-1</sup> avec une résolution de 4 cm<sup>-1</sup> après 100 accumulations (figure 32).

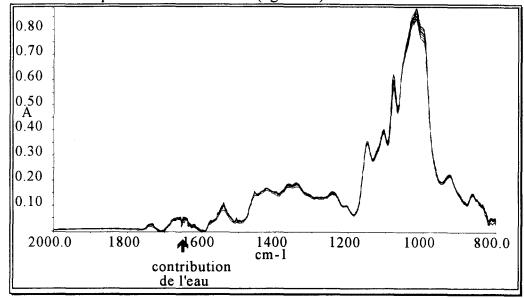


figure 32: superposition de 10 spectres du même compound dilué à 250 g/l

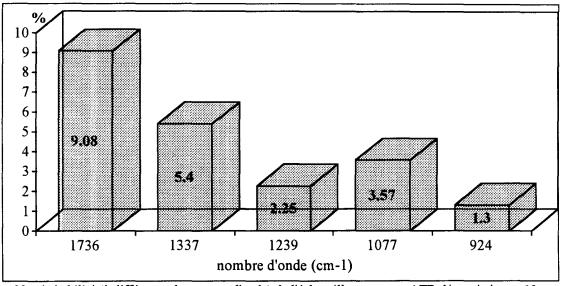


figure 33: répétabilité (à différentes longueurs d'onde) de l'échantillonnage par ATR déterminée sur 10 spectres du même mélange polyvitamines

La répétabilité de l'échantillonnage par ATR (figure 33) est meilleure que celles calculées avec les autres techniques d'échantillonnage. Sa valeur moyenne, inférieure à 5 %, est satisfaisante pour poursuivre l'étude. La présence d'eau influence la répétabilité spectrale vers 1750 cm<sup>-1</sup>.

Pour les 3 méthodes d'échantillonnage testées (réflexion diffuse, transmission sur extrait sec et ATR), les répétabilités ne sont pas mesurées aux mêmes nombres d'onde car les intensités maximales ne se situent pas exactement aux mêmes positions; ce phénomène est dû à l'environnement chimique de l'échantillon qui n'est plus présenté sous la même forme au faisceau infrarouge (poudre, poudre diluée puis séchée, solution aqueuse).

## 2.2.3.c linéarité

Les spectres ATR obéissent à une loi de type Beer-Lambert (FAHRENFORT, 1961); cela signifie que la réponse optique est proportionnelle à la concentration de l'échantillon. La dilution de l'échantillon, pour l'analyse quantitative, devra nécessairement se trouver dans la gamme de linéarité. Il faut donc déterminer la plage de concentration pour laquelle la réponse spectrale reste linéaire.

Des dilutions sont préparées entre 50 et 400 g/l de compounds. Les spectres de solutions présentent une absorbance croissante avec la concentration (figure 34).

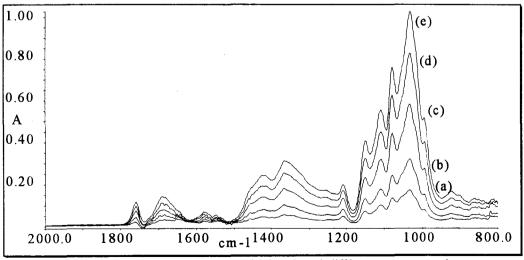


figure 34: spectres d'un mélange multivitamines à différentes concentrations: 50 g/l (a), 100 g/l (b), 200 g/l (c) 300 g/l, (d) et 400 g/l (e)

Pour chaque concentration, les absorbances sont relevées à plusieurs nombres d'onde 1760, 1210, 1079 et 1033 cm<sup>-1</sup> afin de visualiser la linéarité sur le domaine spectral étudié (figure 35).

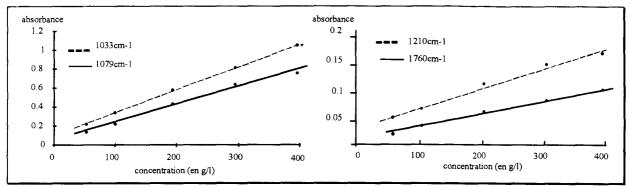


figure 35: linéarité de la réponse spectrale sur la gamme de concentration 50- 400 g/l pour différentes fréquences spectrales

Les droites ont les coefficients de corrélation très satisfaisants : 0.983 (à 1760 cm<sup>-1</sup>), 0.975 (à 1210 cm<sup>-1</sup>), 0.993 (à 1079 cm<sup>-1</sup>) et 0.997 (à 1033 cm<sup>-1</sup>). Elles indiquent que pour une dilution des échantillons dans cette gamme de concentration, la loi de Beer-Lambert est vérifiée même si les intensités relevées pour des solutions peu concentrées sont faibles.

## 2.2.5. conclusion

La réflexion diffuse, tout d'abord proposée pour l'analyse des poudres, nécessite une granulométrie assez fine et homogène et entraîne une répétabilité insuffisante pour envisager une quantification. L'échantillonnage par extrait sec, proposé dans un deuxième temps, ne convient pas au dosage des vitamines car ces dernières, sensibles à la chaleur et à la lumière, sont dégradées au cours de la préparation de l'échantillon. Par contre, 1 ml d'une solution à 250 g/l de compound polyvitamines déposé sur le cristal ATR fournit une réponse linéaire et conduit à une répétabilité inférieure à 5 % permettant ainsi de poursuivre la faisabilité de l'analyse quantitative multicomposantes.

## 2.3. L'ANALYSE MULTIVARIEE

## 2.3.1. introduction

L'analyse quantitative a pour objectif de déterminer la concentration d'un constituant dans un produit. Pour cela, il doit exister une relation entre la grandeur à quantifier (la teneur en un composant) et une grandeur physique (l'intégration d'une bande d'absorption infrarouge). Sur le spectre d'un composé multi-éléments, il n'est pas possible d'isoler une bande d'absorption propre pour chaque constituant à cause du chevauchement de bandes. Il n'existe pas de possibilité d'intégrer une seule bande. Par le biais de la chimiométrie, l'analyse multivariée convertit les absorbances à un grand nombre de longueurs d'onde en une information précise et pertinente grâce à une fonction mathématique appelée équation de calibration.

# 2.3.2. l'outil chimiométrique

## 2.3.2.a. définition

La chimiométrie, née vers 1970, désigne l'ensemble des techniques mathématiques et statistiques appliquées à la chimie (LANTERI & al., 1996). Les techniques chimiométriques rassemblent l'ensemble des méthodes informatiques, statistiques et mathématiques adaptées aux besoins spécifiques des chimistes et qui permettent une exploitation maximale des données collectées. Toutes les techniques chimiométriques impliquent l'utilisation d'outils mathématiques plus ou moins complexes. Contrairement aux méthodes "hauteur" ou "surface" de bandes, les algorithmes utilisés en analyse quantitative, basés sur des méthodes globales linéaires de condensations de données, offrent le moyen de réduire le nombre de données expérimentales disponibles (très nombreuses) en un nombre plus restreint de données numériques en ne gardant de la masse d'informations contenues dans un spectre que les combinaisons les plus significatives pour l'analyse. Ce nouveau concept de travail dans un espace de facteurs plutôt que sur les données spectrales effectue un filtrage et atténue le bruit non corrélé aux constituants.

# 2.3.2.b. principe de l'analyse quantitative

L'analyse quantitative correspondant à un traitement supervisé du signal est basée sur la loi de Beer-Lambert. Une gamme d'échantillons connus (dont les concentrations sont données par des méthodes de référence) est utilisée en tant qu'étalons à partir duquel un logiciel calcule directement la concentration d'un constituant dans un mélange inconnu (MARTENS, 1979). La mise au point d'une méthode de dosage se déroule en plusieurs étapes (figure 36).

Tout d'abord, la calibration; elle a pour objectif de relier les données expérimentales (les spectres) d'un certain nombre d'échantillons à des données de références (les concentrations) de ces mêmes échantillons via une fonction mathématique dite équation de calibration. C'est l'étape la plus longue. Nécessaire mais non suffisante, cette étape est suivie de la validation.

La validation utilise cette équation sur des échantillons différents de ceux utilisés précédemment pour vérifier la qualité de la calibration et ce, par un contrôle des différences entre les valeurs des concentrations données par l'équation et les valeurs de concentrations de référence.

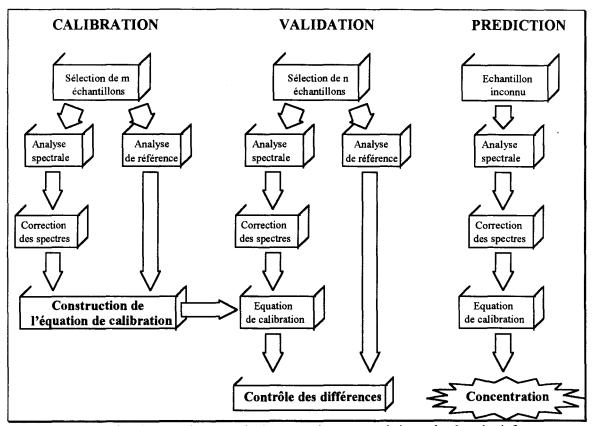


figure 36: principe d'une analyse quantitative par traitements statistiques des données infrarouges

Enfin, une fois validée, la méthode est utilisable en routine pour déterminer la concentration de chacun des constituants à doser dans un échantillon inconnu, c'est la prédiction. C'est à ce niveau que les avantages de l'IRTF sont appréciés car juste après acquisition du spectre, la concentration des constituants d'un mélange est connue.

Pour construire cette équation de calibration et modéliser statistiquement une relation entre les données spectrales (X) et les concentrations (C), plusieurs algorithmes de régression sont possibles.

Les algorithmes les plus utilisés sont PCR et PLS (MARTENS & al., 1989, HAALAND, 1991). Ils ont l'avantage d'utiliser toute la région spectrale plutôt que des bandes isolées (HAALAND & al., 1988), et laissent la possibilité de déterminer la concentration d'un composant dans un mélange sans connaître celles de tous les autres constituants. Cet avantage justifie son utilisation pour l'analyse de ce mélange complexe contenant d'autres vitamines que les B1, B2, B6 et PP mais en quantité encore plus faible.

# 2.3.2.c. l'algorithme PCR (régression sur les composantes principales)

La régression sur les composantes principales combine la condensation de données par une analyse en composantes principales (PCA) et une régression inverse.

L'étape PCA s'inspire de l'analyse factorielle recherchant les directions de variances maximales (F) (appelées composantes principales ou facteurs loadings) à partir de la matrice de variance-covariance des données spectrales (X). La décomposition en valeurs propres et vecteurs propres de cette matrice créée une nouvelle base vectorielle (V). Le premier facteur extrait représente le maximum de variance, les facteurs suivants expriment la variance résiduelle de l'extraction précédente. L'objectif de PCR n'est pas d'extraire le maximum de facteurs mais de conserver les plus significatifs pour la régression. Parmi les valeurs propres calculées, certaines sont très voisines de zéro et, pour l'application à l'analyse multivariée, seules celles qui correspondent aux plus fortes valeurs propres sont significatives et interprètent le mieux la variance des spectres, les autres ne modélisent que les fluctuations aléatoires et ne sont pas d'un grand intérêt pour l'analyse.

Cette étape d'analyse en composantes principales est suivie d'une régression inverse entre les projections des spectres (scores) dans la nouvelle base vectorielle et la matrice des concentrations (C) permettant de calculer la matrice de calibration (Y).

En prédiction, l'obtention des concentrations d'échantillons inconnus (C) est obtenue par projection de la matrice spectrale (X) sur l'espace vectoriel (V) puis application de l'équation de calibration (Y). Une calibration est de qualité si les variables sélectionnées (les nombres d'onde) sont significatives des propriétés (concentrations) à modéliser.

La régression avec l'algorithme PCR est une méthode de spectre complet et ne demande pas de connaître les concentrations de tous les constituants du mélange. En revanche, bien que couramment utilisée en analyse quantitative multicomposantes en infrarouge, elle s'applique sur la variance calculée sur les informations spectrales (1ère étape) sans vérifier sa corrélation aux concentrations ce qui la rend parfois plus aléatoire.

# 2.3.2.d. l'algorithme PLS (selon les moindres carrés partiels)

L'algorithme PLS inspiré de la méthode d'orthonormalisation de Gram-Schmidt a la particularité d'extraire les facteurs en utilisant la covariance spectres/concentrations. Comme la méthode PCR, l'extraction de facteurs constituant une nouvelle base de travail est suivie d'une régression inverse. Les données spectroscopiques (X) et les concentrations (C) sont exploitées de la même manière dans la calibration. Toute composante extraite des données spectrales correspond en même temps à une variation sur l'espace de concentrations.

L'objectif lors de la mise au point de la méthode est de rechercher le nombre optimal de facteurs loadings (F) qui expriment la variance-covariance maximale entre les spectres (X) et les concentrations des échantillons (C) pour prédire les nouveaux échantillons. Ensuite, les spectres (X) sont projetés sur ce facteur loading (F) pour en extraire un facteur loading spectral (p) par une résolution selon les moindres carrés. Parallèlement et de la même façon, les concentrations (C) sont projetées sur ce facteur loading (F) pour en extraire un facteur loading concentration (q).

Les contributions des composantes extraites (p) et (q) sont soustraites aux matrices spectrales (X) et de concentration (C) pour obtenir de nouvelles matrices respectivement  $(X_{résiduelle})$  et  $(C_{résiduelle})$  et ainsi de suite (FULLER & al., 1988).

Si le nombre de facteurs extraits est trop faible, certaines informations significatives ne sont pas prises en compte dans le modèle, et au contraire, s'il est trop élevé, il y a "surajustement" ou *overfitting* et la prédiction peut être de mauvaise qualité. L'observation des facteurs loadings de la calibration indique dans quelles zones spectrales l'information est extraite, ce qui peut aider l'interprétation des résultats.

Afin d'effectuer une première validation de la méthode, chaque standard est successivement enlevé du jeu calibration et testé en validation interne sur la calibration calculée avec les n-1 autres échantillons. Cette fonction correspond à la "full cross validation" (LORBER & al., 1990) (ou validation croisée). La prédiction sur un échantillon connu au cours de la calibration a pour objectif de faciliter le choix du nombre de facteur donnant le minimum d'erreur.

Parmi les algorithmes de régression par les moindres carrés partiels, PLS2 calibre toutes les propriétés simultanément avec les mêmes paramètres alors que PLS1 quantifie chaque propriété individuellement, permettant de choisir les paramètres optimum pour chacune des variables. La mise au point d'une méthode par régression PLS1 est de ce fait plus longue mais souvent plus efficace que PLS2 (MARTENS & al., 1989). Les vitamines n'absorbant pas de la même manière et dans la même région les rayonnements infrarouges, l'algorithme de régression PLS1 sera préféré à PLS2.

# 2.3.2.e. estimation de la précision

Lorsque l'équation de calibration est établie, l'erreur standard de prédiction pour la calibration (SEPc) est calculée :

$$SEPc = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{N} (Cith\acute{e}orique - Ciestim\acute{e})^{2}}{(N-1-p)}}$$
 (éq.12)

où  $Ci_{théorique}$  est la valeur de référence,  $Ci_{estimé}$  est la concentration calculée par l'équation de calibration, N est le nombre d'échantillons dans la calibration et p est le nombre de variables indépendantes dans la régression. Elle est exprimée dans l'unité de la valeur de référence.

Une valeur de SEPc faible ne suffit pas pour apprécier la qualité prédictive du modèle. L'évaluation de la performance de la calibration est estimée au cours de la validation, sur des échantillons différents de ceux utilisés en calibration, par calcul de l'erreur standard de prédiction (SEP):

$$SEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{M} (Cith\acute{e}orique - Ciestim\acute{e})^{2}}{(M-1)}}$$
 (éq.13)

où M est le nombre d'échantillons en validation.

# 2.3.2.f. la reproductibilité des mesures de concentrations

Pour l'analyse quantitative, la reproductibilité mesure la fidélité des réponses. Elle se définit par l'écart type entre les résultats des mesures successives d'une même grandeur, effectuées selon la même méthode, par le même manipulateur sur le même instrument mais à des moments différents. La grandeur mesurée correspond à la valeur des concentrations exprimées par la méthode établie. Elle prend en compte non seulement les perturbations aléatoires comme pour le calcul de la répétabilité des spectres mais aussi la fiabilité et la stabilité d'un modèle dans le temps (BELLON-MAUREL & al., 1995). La reproductibilité est exprimée par un coefficient de variation (CV), facteur de mesure de l'incertitude de la méthode très important dans un environnement industriel automatisé.

$$CV = 100 \times \frac{\sqrt{\sum_{i}^{M} (C_i - C_m)^2 / (M - 1)}}{C_m}$$
 (éq.14)

où Ci représente la concentration calculée pour un spectre, Cm est la moyenne des concentrations de tous les spectres, et M est le nombre de spectres.

# 2.3.2.g. les pré-traitements informatiques

Pour parvenir à des valeurs de SEC les plus faibles, il est possible de limiter l'intervalle spectral et de supprimer par exemple les bandes parasites, c'est-à-dire celles n'apportant pas d'information supplémentaire et qui au contraire auraient tendance à réduire la qualité de la calibration. Mais encore, des pré-traitements informatiques sur les données spectrales peuvent ajuster davantage la linéarité du signal vis-à-vis de la concentration.

La <u>différentiation</u> est utilisée pour réduire les effets de superposition de bandes et permet en outre un pré-traitement de correction de ligne de base (spectrum Quant+, 1997). L'inconvénient majeur de ce traitement est l'augmentation du bruit de fond. Ce dernier peut être contrôlé par le nombre de points utilisés dans le calcul. Il est souvent associé à un pré-traitement de lissage. L'aspect du spectre sera différent en fonction du degré de la dérivée. Un spectre en dérivée première aura une valeur nulle quand la position est maximale sur le spectre en absorbance. Quand la dérivée est du second degré, la valeur est minimale là où elle est maximale en absorbance (figure 37). Ce traitement est utile pour identifier des positions de bandes dans les régions complexes.

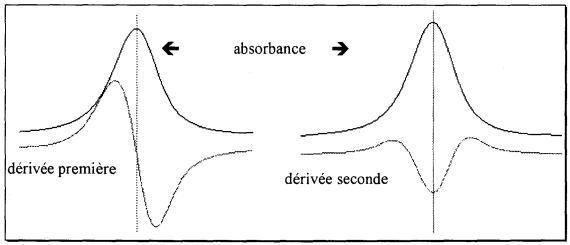


figure 37: profil spectral en dérivée première et en dérivée seconde d'un signal

Le <u>lissage</u> a pour effet d'améliorer de façon artificielle le rapport signal/bruit sans avoir à accumuler un nombre important d'acquisitions (le rapport signal/bruit est proportionnel au carré du nombre d'acquisitions). L'algorithme selon Savitsky-Golay (SAVITZKY & al., 1964) fait un ajustement d'un polynôme de degré variable selon une régression par les moindres carrés. Ce

pré-traitement peut se traduire par un élargissement des bandes et donc une perte de la résolution. Un compromis entre l'amélioration du rapport signal/bruit et l'élargissement des bandes s'effectue par un choix du degré de lissage approprié se traduisant par le choix d'un nombre de points.

La correction MSC (Multiplicative Scatter Correction) est une fonction de normalisation (ISAKSSON & al., 1988). Elle compense les variations produites par la diffusion de la lumière en spectroscopie par réflexion (BURGER & al., 1997). Pendant le calcul, la diffusion de chaque échantillon est corrigée et formalisée de façon à ce qu'elle soit identique à la diffusion moyenne de tous les échantillons. Sur des spectres de mélanges vitaminiques enregistrés par ATR, son utilisation pourrait être justifiée pour corriger la diffusion provenant d'une dissolution incomplète des vitamines, notamment celle de la vitamine A présente en très faible quantité mais non soluble dans l'eau.

## 2.3.3. les échantillons standards

La méthode est destinée au dosage des vitamines dans un compound particulier. Les échantillons utilisés pour l'étalonnage doivent être représentatifs de ce compound avec des concentrations en vitamines variables, encadrant les spécifications. Généralement, pour l'analyse dans le moyen infrarouge de *n* composants, (2*n*+2) standards sont nécessaires au minimum pour la calibration (BECCARD, 1987). La méthode concerne le dosage de 4 constituants: les vitamines B1, B2, B6 et PP, nécessitant au moins 10 échantillons. Pour améliorer la qualité de l'équation de calibration, 18 échantillons sont utilisés en calibration et 12 pour la validation. Afin de disposer d'une trentaine d'échantillons avec des concentrations vitaminiques sur toute la gamme, des échantillons synthétiques sont préparés de manière très précise à partir d'un lot dont la composition exacte est connue grâce au certificat d'analyse joint. La préparation est faite par ajout dosé de vitamines et de glucose dans le compound de manière à encadrer les spécifications et atteindre leurs valeurs limites. Les concentrations varient entre 6,9 et 9,4 g/kg pour la thiamine, 6,2 et 9,8 g/kg pour la riboflavine, 8 et 11,8 g/kg pour la pyridoxine et 45 et 65 g/kg pour la niacine. Chaque échantillon doit être unique et il faut aussi éviter les situations

redondantes où 2 constituants se trouvent dans un rapport de concentration constant. L'homogénéité est améliorée après agitation grâce à des billes de verre.

Les mélanges ainsi préparés (20 grammes chacun), dont les compositions sont détaillées tableaux 4 et 5, sont conservés à 4 °C et constituent les échantillons standards.

tableau 4: échantillons utilisés pour l'étape de calibration

g/kg	vitamine B1	vitamine B2	vitamine B6	vitamine PP
A	6.96	6.93	8.70	47.83
В	8.97	8.36	10.36	58.39
C	7.45	6.22	11.81	60.06
D	7.59	7.07	8.83	50.35
E	7.24	9.42	9.07	57.35
F	8.56	9.96	11.57	55.87
G	7.71	9.42	7.75	65.85
H	7.14	9.82	12.64	49.42
J	7.78	7.78	9.73	53.50
K	8.39	8.41	8.26	45.92
L	7.49	7.31	12.01	51.32
<u>M</u>	8.79	8.80	11.15	53.89
N	7.90	9.08	11.86	64.36
0	8.23	9.57	10.36	52.78
<u> </u>	8.52	6.44	8.05	62.00
Q	8.16	6.41	10.58	63.50
R	8.31	7.84	10.47	61.47
S	9.43	6.78	8.47	46.61

Les techniques classiques d'analyse longues et onéreuses, n'ont pas été réalisées sur la totalité des standards synthétiques mais sur une dizaine d'entre eux (dont 6 sont utilisés pour la validation). Le dosage de la thiamine et de la riboflavine est effectué par HPLC (Méthodes officielles de dosage des vitamines B1 et B2), et les teneurs en pyridoxine et en niacine sont déterminées par méthodes microbiologiques (Méthodes de dosage des vitamines B6, Méthodes officielles de dosage des vitamines PP).

tableau 5: échantillons utilisés pour l'étape de validation

g/kg	vitamine B1	vitamine B2	vitamine B6	vitamine PP
1	8.00	8.00	10.00	55.00
2	8.34	7.96	11.95	56.83
3	7.92	7.92	9.90	64.36
4	8.55	9.14	9.98	54.91
5	7.95	9.90	11.53	56.68
6	9.03	6.59	10.71	50.36
7	8.29	6.95	11.44	65.62
8	9.03	7.68	11.09	58.92
9	7.94	8.91	11.11	55.86
10	7.27	7.27	9.09	49.97
11	7.65	8.40	10.57	49.21
12	8.33	6.56	11.88	53.28

Les spectres sont enregistrés avec l'accessoire ATR selon les spécifications établies précédemment après dilution de l'échantillon standard à 250 g/l, c'est-à-dire 100 accumulations sur l'intervalle 2000-800 cm<sup>-1</sup>, avec une résolution de 4 cm<sup>-1</sup> et une référence eau. Le spectre d'un échantillon correspond à la moyenne de 3 répétitions de cet échantillon.

## 2.4. LES RESULTATS

Les calculs de régression suivant l'algorithme PLS1 sont effectués à l'aide du logiciel QUANT+, PERKIN ELMER.

## 2.4.1. vitamine B1

# 2.4.1.a. calibration

Les spectres sont enregistrés sur l'intervalle 2000-800 cm<sup>-1</sup>. Le bruit important en dessous de 1000 cm<sup>-1</sup> et l'absence de signal après 1700 cm<sup>-1</sup> sur le spectre de vitamine B1 pure conduisent à effectuer les calculs sur le domaine 1700-1000 cm<sup>-1</sup>.

Le SEPc minimum est obtenu pour 6 facteurs avec un lissage à 5 points sur des dérivées premières à 5 points.

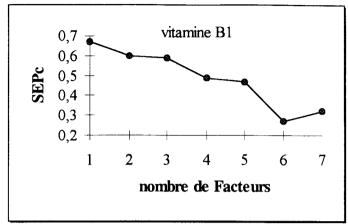


figure 38: représentation des SEPc en fonction du nombre de facteurs pour la vitamine B1

Les valeurs des erreurs de prédiction (SEPc) évoluent à mesure que l'algorithme réalise les itérations successives. L'erreur diminue progressivement jusqu'à atteindre un minimum (0,27 g/kg) après extraction de 6 facteurs, expliquant 91 % de la variance (figure 38).

Les concentrations en vitamines sont calculées par le logiciel puis comparées avec les valeurs théoriques (figure 39): la plupart des échantillons standards (symbolisés par des lettres) se situent à proximité de la droite.

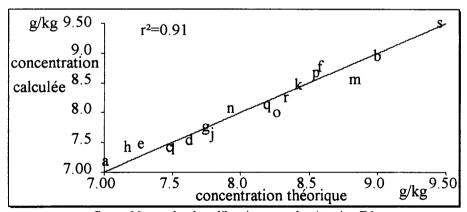


figure 39: courbe de calibration pour la vitamine B1

# 2.4.1.b. validation

Les teneurs en vitamines sont ensuite prédites pour 12 échantillons différents de ceux ayant servi à construire l'équation. L'erreur standard de prédiction (SEP) vaut 0,35 g/kg. Elle

est supérieure à la SEPc. La validation est une étape qui succède et qui dépend de la calibration. Ainsi, les erreurs provenant de la calibration sont reportées lors de la validation conduisant à des valeurs de SEP souvent plus importantes.

Parmi ces compounds, 6 d'entre eux ont été également analysés par HPLC après extraction de la thiamine par hydrolyse acide et enzymatique. La thiamine a ensuite été oxydée puis dosée par fluorimétrie après isolement par chromatographie liquide haute performance. Cette méthode est longue et nécessite l'utilisation de plusieurs réactifs chimiques.

tableau 6: comparaison des résultats HPLC et IRTF (vitamine B1)

	données théoriques	données expérimentales (en g/kg)				
échantillons	(en g/kg)	IRTF	HPLC			
1	8.0	7.7	7.8			
4	8.6	8.7	7.9			
5	7.9	7.8	7.8			
7	8.3	7.9	7.7			
8	9.0	8.4	8.6			
11	7.7	7.8	7.1			

SEP (g/kg)	0.36	0.52

Par les deux méthodes testées, les SEP sont faibles (tableau 6). Toutefois, le dosage de la vitamine B1 semble plus précis par spectroscopie que par chromatographie.

# 2.4.2. vitamine B2

#### 2.4.2.a. calibration

Les régions spectrales contribuant essentiellement au bruit induit par la vapeur d'eau sont éliminées pour le calcul. Ce dernier est finalement effectué avec les régions 1800-1700 cm<sup>-1</sup> et 1450-850 cm<sup>-1</sup>.

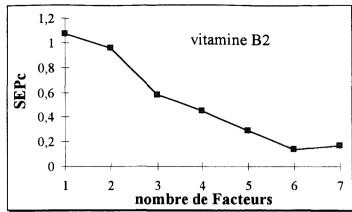


figure 40: représentation des SEPc en fonction du nombre de facteurs pour la vitamine B2

Comme pour la vitamine B1, le SEPc minimum est obtenu pour 6 facteurs avec un lissage à 5 points sur des dérivées premières à 5 points. L'erreur diminue progressivement jusqu'à atteindre un minimum (0,14 g/kg) expliquant 98 % de la variance (figure 40).

Le coefficient de détermination (r²) entre les concentrations calculées et les concentrations théoriques est de 0,97 (figure 41). En effet, les points sont bien alignés sur la droite.

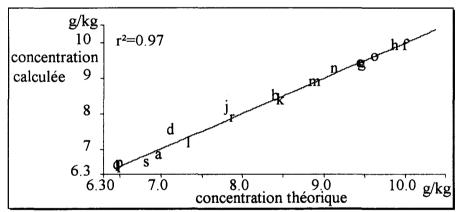
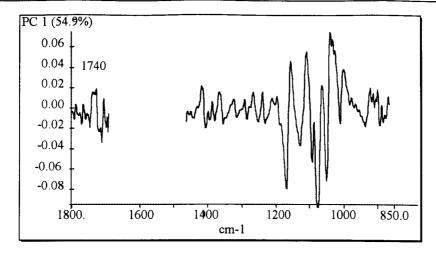


figure 41: courbe de calibration pour la vitamine B2

# 2.4.2.b. validation

Pour les 12 échantillons sélectionnés en validation, l'erreur standard de prédiction est estimée à 0,59 g/kg, valeur sensiblement plus importante que la valeur de SEPc. Les 2 premières composantes principales (figure 42), qui expliquent près de 75% de la variance, indiquent que l'information est extraite vers 1740 cm<sup>-1</sup> ainsi que dans la région 1000-1200cm<sup>-1</sup> (commune avec le glucose).



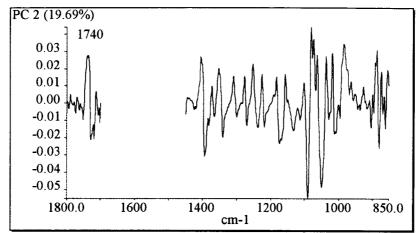


figure 42: explication de la variance pour la vitamine B2 sur les 2 premiers facteurs.

L'intervalle 1200-1400 cm<sup>-1</sup> ne semble pas riche en information spectrale mais sa suppression donne des résultats moins bons. L'information significative de la teneur en vitamine B2 est située dans le domaine d'absorption du glucose. Elle est difficile à extraire dans le compound malgré un spectre de produit pur spécifique.

Par HPLC, l'analyse d'un échantillon est longue car la riboflavine est extraite par hydrolyse acide et enzymatique, séparée par HPLC puis dosée par fluorimétrie.

Bien que le signal infrarouge de la vitamine B2 soit plus intense que celui de la vitamine B1, la valeur de la SEP est plus importante (tableau 7).

	données théoriques	données expérimentales (en g/l		
échantillons	(en g/kg)	IRTF	HPLC	
1	8.0	8.4	7.4	
4	9.1	8.6	8.6	
5	9.5	8.9	8.2	
8	6.6	6.9	6.0	
7	7.0	7.6	6.4	

tableau 7: comparaison des résultats HPLC et IRTF (vitamine B2)

**SEP** (g/kg) 0.55 0.79

8.1

7.8

La quantification par IRTF semble plus fiable. Elle est surtout plus rapide que celle par HPLC et ne nécessite pas l'utilisation de solvants d'extractions toxiques.

8.4

#### 2.4.3. vitamine B6

11

#### 2.4.3 a calibration

L'absence de bandes dans la région 2000-1600 cm<sup>-1</sup> et la faible intensité du signal conduisent à supprimer cette zone dans l'élaboration de la courbe de calibration. Les différents essais de calculs effectués ont montré que les SEPc étaient plus faibles sans les régions 1155-1100 cm<sup>-1</sup> et 920-800 cm<sup>-1</sup>.

Les spectres sont lissés comme précédemment mais la dérivée seconde à 5 points semble mieux corrélée que les spectres en absorbance ou la dérivée première.

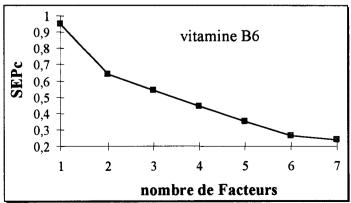


figure 43: représentation des SEPc en fonction du nombre de facteurs pour la vitamine B6

La valeur minimale du SEPc, égale à 0,24 g/kg, correspond au septième facteur (figure 43) mais l'erreur standard pour le sixième facteur est peu différente (0,26 g/kg) et explique 95% de la variance. De ce fait, les calculs suivants sont effectués avec les 6 premiers facteurs.

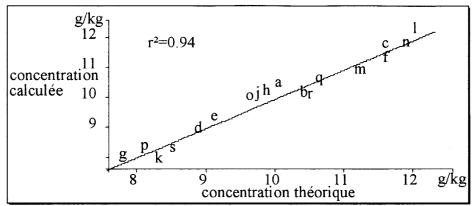
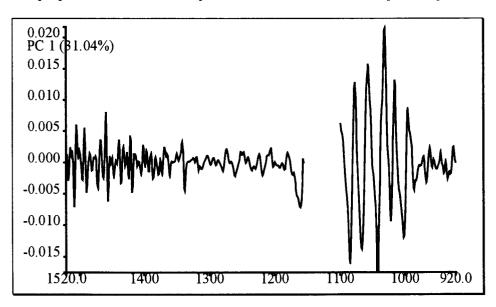


figure 44: courbe de calibration pour la vitamine B6

Le coefficient de détermination entre les concentrations calculées et théoriques est de 0,94 (figure 44).

#### 2.4.3.b. validation

L'erreur standard de prédiction vaut 0,77 g/kg. Les 2 premiers facteurs n'expliquent que 60 % de la variance et ont déjà un signal très faible (figure 45). La superposition des bandes caractéristiques avec celles des autres constituants du compound et la faible absorption de la vitamine B6 expliquent les difficultés à quantifier cette vitamine avec plus de précision.



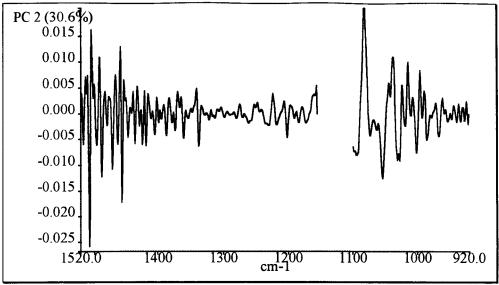


figure 45: explication de la variance pour la vitamine B6 sur les 2 premiers facteurs

Parmi les échantillons qui testent la validation de la méthode, six sont analysés parallèlement par méthode microbiologique: une levure avec laquelle la vitamine B6 est un facteur de croissance est ajoutée à l'échantillon après hydrolyse acide de celui-ci. L'évaluation du développement bactérien est fait par mesure néphélométrique et la densité optique obtenue pour le produit traduit une concentration en vitamine B6.

tableau 8: comparaison des résultats microbiologiques et IRTF (vitamine B6)

	données théoriques données expérimentales (en g/kg)				
échantillons	(en g/kg)	IRTF microbiologi			
1	10	11.3	10.3		
2	11.9	11.2	11.9		
3	9.9	10.6	9.8		
8	11.1	11.3	11.3		
10	9.1 9.8 9		9.4		
12	11.9	11.0	11.7		

1	ļ	
CED ( // )	0.00	l 0.00 l
SEP (g/kg)	1 0.98	I 0.23 II
527 (8 1.8)	0.70	<u> </u>

Les valeurs déterminées par dosage microbiologique sont plus proches des valeurs théoriques que celles calculées à l'aide de l'algorithme PLS1 à partir des données infrarouges (tableau 8) car le SEP correspondant est plus faible.

# 2.4.4. vitamine PP

#### 2.4.4.a. calibration

La niacine est la vitamine la plus concentrée dans le mélange. La calibration est établie sur le domaine spectral 1750-800 cm<sup>-1</sup> (il n'y a aucune information caractéristique de la vitamine PP dans la région 2000-1750 cm<sup>-1</sup>). A l'inverse des autres courbes de calibration, la correction MSC a légèrement amélioré les résultats. Les spectres sont lissés et ont subi la dérivée première à 5 points.

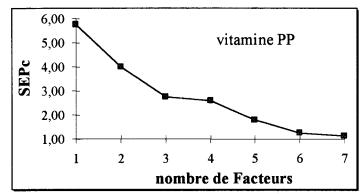


figure 46: représentation des SEPc en fonction du nombre de facteurs pour la vitamine PP

La valeur du SEPc vaut 1,23 g/kg pour le sixième facteur (figure 46), ensuite elle se stabilise. Le coefficient de détermination entre les concentrations calculées et théoriques pour la calibration vaut 0,97 (figure 47). Avec 7 facteurs, bien que la SEPc soit plus faible, il y a probablement *overfitting* car la variance est de 99,99% et laisse supposer une corrélation parfaite entre le calcul et la théorie. En fait, quand le nombre de facteurs est trop grand le bruit des données est introduit dans le modèle, la droite de calibration est peut être meilleure mais la qualité prédictive est détériorée. Le modèle finalement gardé est celui avec 6 facteurs.

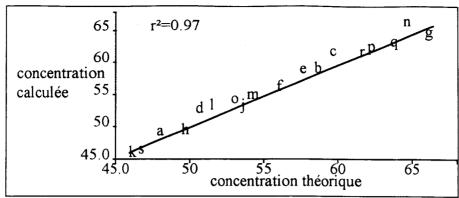


figure 47: courbe de calibration pour la vitamine PP

# 2.4.4.b. validation

La SEP calculée en validation entre les valeurs calculées et les valeurs théoriques pour les 12 échantillons est de 3,18 g/kg.

Les teneurs en vitamine PP ont été également déterminées par microbiologie sur 6 de ces échantillons (tableau 9). Le principe de dosage microbiologique est le même que pour la vitamine B6 excepté le fait que la souche bactérienne est dans ce cas sensible à la vitamine PP et que l'échantillon subit une hydrolyse chimique.

Par rapport aux concentrations théoriques et pour le même nombre d'échantillons, l'erreur standard de prédiction est deux fois plus faible par dosage microbiologique.

tableau 9: comparaison des résultats microbiologiques et IRTF (vitamine PP)

	données théoriques	données expérimentales (en g/		
échantillons	(en g/kg)	IRTF	microbiologie	
1	55.00	58.9	54.9	
2	56.83	56.83 54.0		
3	64.36	62.0	63.9	
8	58.92	59.4	57.6	
10	49.97	49.97 47.4		
12	53.28	50.2	52.2	

**SEP** (g/kg) 2.94 1.26

# 2.4.5. reproductibilité

Le coefficient de variation (CV) est calculé sur les concentrations en vitamines après 10 analyses du même échantillon, dans les mêmes conditions et à des intervalles de temps différents. Ce coefficient permet d'évaluer la reproductibilité de la méthode.

Les valeurs du coefficient de variation reflètent à la fois la répétabilité spectrale et la fiabilité de la méthode.

Pour la pyridoxine, peu concentrée dans le mélange et dont le spectre est peu intense, le SEP est le moins bon des 4 calibrations établies. Le coefficient de variation est également le plus élevé. Ces résultats confirment la difficulté (par rapport aux autres vitamines B1, B2 et PP) à calibrer la vitamine B6 dans le mélange.

tableau 10: évaluation de la reproductibilité: détermination des concentrations en vitamines (en g/kg) et du coefficient de variation sur 10 analyses du même échantillon

coefficient de variation sur 10 analyses du même échantifion							
	vitamine B1	vitamine B2	vitamine B6	vitamine PP			
échantillon	(en g/kg)	(en g/kg)	(en g/kg)	(en g/kg)			
valeur de référence	7.87	8.21	10.67	56.97			
1	7.54	9.50	12.64	54.54			
2	7.66	9.58	11.56	58.15			
3	7.19	9.32	10.92	58.41			
4	7.52	8.43	11.25	56.44			
5	7.41	7.80	9.63	59.50			
6	7.33	9.25	12.36	54.56			
7	7.55	9.44	11.55	56.95			
8	7.21	9.38	11.38	57.76			
9	7.48	8.74	11.44	57.16			
10	7.43	8.23	9.99	60.09			
moyenne	7.43	8.96	11.27	57.54			
Coefficient de Variation (%)	2.03	6.96	8.21	3.23			

#### 2.5. CONCLUSION

La combinaison de l'analyse quantitative statistique et de la spectroscopie IRTF conduit à des performances correctes pour le dosage de vitamines dans un mélange complexe. Ce travail a fait l'objet d'une publication (wojciechowski & al, 1997). La méthode est reproductible et les SEP, par rapport aux données théoriques, sont faibles et peu différentes des SEP calculées pour les méthodes de références. Ces résultats sont en accord avec des études bibliographiques comme par exemple le dosage par spectroscopie ATR/IRTF des sucres dans les jus d'orange (concentration totale d'environ 100g/l) où l'erreur varie entre 3 et 5 % selon le glucide dosé (glucose, fructose, saccharose) (DUPUY & al., 1992).

Même si elle semble plus fiable, la méthode de quantification par microbiologie est délicate et ne permet pas une utilisation fréquente. De plus, les délais d'obtention des résultats plus longs par les méthodes classiques (tableau 11) posent des problèmes de gestion des flux.

tableau 11: comparaison délai, coût pour le dosage des 4 vitamines par IRTF et par les méthodes classiques

	méthodes	IRTF	
	HPLC (B1 et B2)	(B1, B2, B6 et PP)	
durée d'obtention des résultats	2 jours	4 jours	1h
coût	≈ 500 F/vitamine	≈ 350 F/vitamine	≈ 300 F pour les 4 vitamines

A réception, la méthode par IRTF avec laquelle la concentration en vitamines B1, B2, B6 et PP est obtenue au bout d'une heure peut être utilisée pour contrôler la conformité du compound vis-à-vis des spécifications, et cela avant incorporation dans le produit fini. Mais aussi, le dosage des vitamines par IRTF est globalement 4 fois moins onéreux. En plus, la préparation de l'échantillon est répétable, rapide et ne nécessite l'emploi d'aucun solvant toxique contrairement aux techniques d'analyses par HPLC. L'intérêt industriel est triple: gain en sécurité, en consommation de produits et en temps d'analyse.

Cette méthode d'analyse est limitée au dosage de chaque lot d'un compound spécifique mais généralisable à d'autres variétés. Elle ne peut pas être utilisée pour quantifier les vitamines B1, B2, B6 et PP dans une autre variété de compound pour 2 raisons: tout d'abord, la présence d'autres vitamines conduit à un profil spectral différent donc les informations extraites par l'algorithme de régression PLS1 ne sont plus valables; ensuite, la fiabilité de la méthode n'est pas vérifiée par extrapolation des valeurs de la calibration. Ainsi, les variétés de compounds qui ont la même composition mais des concentrations en vitamines en dehors de la gamme de calibration ne peuvent pas être analysées par cette méthode. Pour d'autres variétés de mélanges polyvitamines, la méthodologie reste la même ce qui conduit à un développement de méthode beaucoup plus rapide. Seuls diffèrent les échantillons utilisés en calibration et validation car ils sont préparés de façon à encadrer les valeurs théoriques des concentrations des vitamines hydrosolubles à quantifier. Ultérieurement, il sera possible de vérifier, dans des délais courts, que le lot réceptionné correspond aux spécifications.

# CHAPITRE 3 RECONNAISSANCE DE L'ORIGINE ET DES MODIFICATIONS DES AMIDONS

Les ingrédients dans les industries de l'épicerie sont diversifiés mais les pizzas, les soupes, les sauces et les plats cuisinés ont tous au moins un ingrédient en commun: l'amidon. Les amidons présentent un intérêt industriel en raison de la diversité de leurs caractéristiques physiques ou chimiques. Selon son origine végétale et ses modifications éventuelles, son organisation moléculaire est susceptible de subir des changements. Ces changements concourent à l'établissement de textures caractéristiques (CHAMPENOIS, 1994) et s'opèrent sous diverses conditions dont les paramètres les plus importants sont la présence d'eau et la température.

Le développement de nouveaux produits et l'amélioration de ceux existants sont souvent liés à une augmentation de la qualité et une réduction des coûts. L'utilisation de l'amidon le mieux adapté issu de l'industrie amidonnière contribue à atteindre ces objectifs.

Les amidons dits modifiés sont considérés comme des additifs et leur utilisation, strictement définie par la législation, est contrôlée. Aussi, pour s'assurer du choix de l'ingrédient approprié, il faut disposer de moyens de reconnaissance. L'organisation moléculaire variant d'un amidon à un autre, la spectroscopie IRTF semble être une technique d'analyse adaptée à cette étude. Pourtant, les amidons ont des spectres infrarouges très ressemblants et le calcul de corrélation utilisé dans le chapitre 1 pour un contrôle-qualité rapide des matières premières ne permet pas une identification fiable de toutes les variétés d'amidons. Les informations issues de la spectroscopie infrarouge doivent alors être traitées avec des méthodes chimiométriques plus complexes pour tenter d'établir une classification. Cette classification consiste à assigner des objets à des classes en fonction des propriétés physiques pour prédire ensuite à quel groupe appartient un échantillon inconnu.

Une première faisabilité de différentiation des amidons est étudiée statistiquement par analyse en composantes principales des spectres infrarouges puis par régression PLS. Les réseaux de neurones artificiels, outils d'interprétation de données puissants, s'appliquent à une grande variété de domaines, des sciences (MUNK & al., 1996) à la gestion en passant par la reconnaissance d'écriture (DACS technical Report, 1997). Les performances des applications neuromimétiques pour la classification et la reconnaissance des formes dépassent parfois celles de techniques plus classiques. Aussi, dans un deuxième temps, les mêmes données spectrales

sont traitées par ces logiciels d'aide à la décision. Les résultats de classification obtenus par les méthodes classiques et par les réseaux de neurones artificiels sont finalement comparés.

# 3.1 LES AMIDONS

#### 3.1.1. définitions

Les amidons sont utilisés dans l'industrie alimentaire comme agents épaississants, liants, stabilisants ou gélifiants. Source d'hydrate de carbone, l'amidon est une des matières organiques les plus répandues du monde végétal. Les amidons de maïs, riz ou blé proviennent de céréales alors que les amidons de pomme de terre et manioc sont extraits de tubercules. Si tous les amidons possèdent une valeur nutritive similaire, leurs propriétés rhéologiques dépendent de leur origine et de leur constitution (BOURSIER, 1994).

Chimiquement, l'amidon est un homopolymère de D-glucose comprenant deux polymères, l'amylose (figure 48) et l'amylopectine (figure 49). La première est une molécule pratiquement linéaire où les maillons de glucose sont reliés par des liaisons de type  $\alpha$ 1,4 alors que la seconde est une macromolécule ramifiée où le réseau est consolidé par des liaisons  $\alpha$ 1,6.

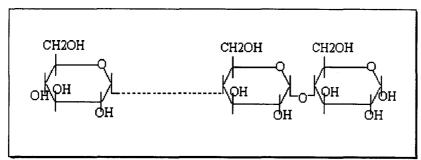


figure 48: amylose (polymère linéaire)

figure 49: amylopectine (polymère ramifié)

Les proportions relatives en amylose et amylopectine varient d'une plante à l'autre (tableau 12). Selon leur rapport, ces deux polymères confèrent aux amidons des propriétés différentes. La mise au point par manipulation génétique de nouvelles espèces végétales a conduit à l'apparition d'amidons enrichis en l'une ou l'autre des deux macromolécules, comme le maïs cireux (99% d'amylopectine, 1% d'amylose).

tableau 12: teneurs en amylose et amylopectine de divers amidons

	% amylose	% amylopectine
maïs standard	24.0	76.0
maïs cireux	0.8	99.2
pomme de terre	20.0	80.0
riz	18.5	81.5
tapioca	16.7	83.3
blé	25.0	75.0

Dans l'industrie, l'utilisation des amidons natifs est limitée. Les empois d'amidons donnent parfois au refroidissement des gels indésirables correspondant à une cristallisation de l'amidon. Cela correspond à la rétrogradation. Ultérieurement, les gels évoluent avec une séparation de phases. C'est la synérèse, phénomène irréversible. En général, leur comportement est satisfaisant dans les systèmes à cuisson courte ou rapidement consommés. Dans les aliments stérilisés ou surgelés, les imperfections de l'amidon peuvent être corrigées par des techniques de modification.

#### 3.1.2. les amidons modifiés

Les amidons modifiés alimentaires sont des amidons dont l'une ou plusieurs des propriétés originelles ont été modifiées au moyen d'un procédé physique, enzymatique, chimique ou d'une combinaison de ces traitements.

# 3.1.2.a. la réticulation

L'objectif de cette modification est d'améliorer la résistance des amidons aux traitements thermiques et plus précisément à la rupture. C'est la modification chimique la plus fréquente. La réticulation consiste à créer des ponts entre les molécules d'amidon par l'emploi d'un agent réticulant pour renforcer les liaisons hydrogènes déjà existantes. Ces agents sont essentiellement des phosphates et des adipates (figure 50). Le taux de réticulation est faible car les amidons phosphatés possèdent moins de 0,4% de phosphore.

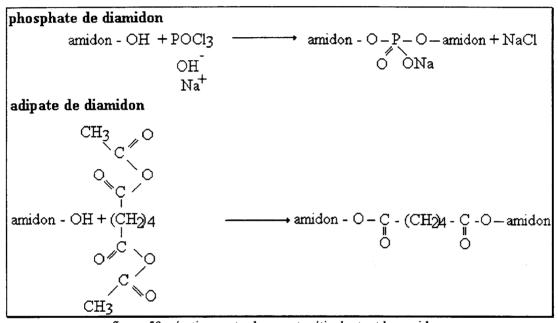


figure 50: réactions entre les agents réticulants et les amidons

#### 3.1.2.b. la stabilisation

L'objectif de la stabilisation est d'augmenter la viscosité pour améliorer la résistance des amidons à la synérèse. En bloquant les groupes hydroxyles responsables de la rétrogradation, il devient possible d'éviter ce phénomène. Les substitutions sont réalisées par l'intermédiaire de liaisons ester ou éther (figure 51). Les amidons présentent moins de 2,5% de groupements acétyl.

# acétate d'amidon amidon hydroxypropylé amidon - OH + CH3- CH - CH2 — amidon - O - CH2 - CHOH - CH3 figure 51: réactions de substitution des amidons

#### la prégélatinisation 3.1.2.c.

Contrairement aux traitements chimiques précédents, la prégélatinisation est simplement une transformation physique du grain d'amidon (BULEON & al., 1990). Après chauffage (gélatinisation) et séchage à la vapeur de l'amidon en solution, ce dernier devient soluble dans l'eau froide. Les amidons prégélatinisés entrent dans la composition de produits alimentaires en poudre (soupes, sauces, garnitures pour pâtisseries...).

Ce traitement peut être effectué sur les amidons natifs comme sur les amidons modifiés chimiquement.

# 3.1.3. aspect législatif

La réglementation européenne (Parlement Européen et Conseil de l'Union Européenne, 1995) ne considère pas les amidons traités par voie physique comme des additifs. En alimentation, aucune quantité maximale d'additif n'est spécifiée. La dose ne doit pas dépasser la quantité nécessaire pour obtenir l'effet désiré et à la condition de ne pas induire le consommateur en erreur.

Indépendamment des traitements physiques, certains amidons peuvent avoir subi une double modification chimique: réticulation et stabilisation. C'est le cas des phosphates et adipates de diamidon acétylés.

Pour faciliter leur dénomination, les amidons sont codés en fonction de leur(s) modification(s) (tableau 13).

tableau 13: dénomination des amidons modifiés chimiquement

nom	n° CE	dénomination
phosphate d'amidon	E1410	I
phosphate de diamidon acétylé	E1414	J
amidon acétylé	E1420	E
adipate de diamidon acétylé	E1422	Н
amidon hydroxypropylé	E1440	K
phosphate de diamidon hydroxypropylé	E1442	R

# 3.1.4. méthodes classiques d'identification des amidons modifiés (COLONNA, 1996)

# 3.1.4.a. origine végétale

Une observation morphologique par microscopie photonique des granules après coloration à l'iode est le moyen le plus classique de déterminer la variété de l'amidon. En effet, la forme, la taille et la couleur des grains varient selon l'origine biologique des amidons.

#### 3.1.4.b. modification physique

L'amidon prégélatinisé présente l'avantage d'être soluble à froid. Aussi, pour savoir si un amidon est prégélatinisé, il suffit de préparer une solution aqueuse et d'observer si l'amidon gonfle au contact de l'eau froide.

# 3.1.4.c. modifications chimiques

Les taux de modifications pratiqués sont très faibles et le degré de substitution est inférieur à 0.02%. Les amidons <u>réticulés</u> sont difficiles à mettre en évidence. Une méthode rhéologique de la viscosité d'un empois d'amidon en fonction du temps (ou du cisaillement) à haute température permet d'identifier ce caractère. La caractérisation de la <u>fonction adipyl</u> est fondée sur une hydrolyse des groupements ester et caractérisation par chromatographie en phase gazeuse (MITCHELL, 1982). La <u>fonction phosphate</u> peut être observée par IRTF, car la

réponse spectrale indique une bande à 1240-1200 cm<sup>-1</sup> caractéristique de ces groupements. La RMN du phosphore est également une méthode donnant accès à cette mise en évidence (MUHRBECK & al., 1996).

Les amidons <u>stabilisés</u> conduisent à des empois dont la rétrogradation est réduite. Le comportement d'un amidon au cours d'une étude de la synérèse par succession de cycles congélation-décongélation détermine s'il est substitué. La <u>fonction acétyl</u> peut être mise en évidence par titration avec une base ou par dosage enzymatique (méthode ISO TC/93, 1995). L'infrarouge peut également être mis en oeuvre avec une bande caractéristique de la liaison ester carbonyl à 1725 cm<sup>-1</sup>. La <u>fonction hydroxypropyl</u> présente une bande d'absorption dans l'infrarouge à 2980 cm<sup>-1</sup> (FORREST & al., 1992) est caractéristique de la vibration C-H du méthyle relié au groupement O-H. Toutefois, cette fonction reste difficile à identifier car la méthode classique est basée sur une hydrolyse de la éther, très difficile à réaliser.

#### 3.1.4.d. conclusion

Les méthodes analytiques classiques sont élaborées pour chacune des modifications précitées ce qui conduit à réaliser plusieurs de ces analyses pour caractériser un amidon. Seulement, les amidons utilisés en industrie alimentaire présentent parfois plusieurs modifications et la combinaison de ces modifications (physiques, chimiques) augmente la difficulté d'identification.

La reconnaissance d'un amidon par calcul des coefficients de corrélation de son spectre infrarouge avec les spectres de référence de la base de données n'est pas fiable mais l'information contenue dans les spectres des amidons traités avec des méthodes chimiométriques plus puissantes devrait permettre une identification rapide et efficace de la plupart des amidons utilisés en alimentaire.

# 3.2. LES METHODES STATISTIQUES

# 3.2.1. l'analyse en composantes principales (PCA)

Le principe de l'analyse en composante principale, première étape de PCR, est présenté dans le chapitre précédent. C'est une méthode de classification non supervisée qui ne nécessite pas de connaître la nature des échantillons. La classification est réalisée sur la totalité des échantillons dans le but de vérifier s'il existe une relation entre les différentes variétés d'amidons et leurs spectres infrarouges.

# 3.2.2. la classification par PLS

La régression par les moindres carrés partiels (PLS) corrèle les données spectrales à des valeurs de référence. Pour cette application particulière, les valeurs de référence ne correspondent pas à des concentrations mais à un codage caractérisant la qualité de l'amidon. La méthode PLS est rendue possible grâce à une codification préalable. La mise au point du modèle se déroule en deux étapes successives: la calibration et la validation.

#### 3.3. LES METHODES NEURONALES

#### 3.3.1. historique des réseaux de neurones

Le cerveau humain reçoit des informations transmises de neurone en neurone par l'intermédiaire des synapses capables de véhiculer des messages électriques. L'information se propage le long des cellules nerveuses jusqu'aux synapses où l'intensité du signal est modifiée avant d'être transmise au neurone suivant. Dans les réseaux de neurones artificiels (Artificial Neural Network) inspirés de la structure du cerveau (GASTEIGER & al., 1993), un ensemble d'unités de base est connecté en réseau, les données sont propagées le long de liaisons puis distribuées, transformées et éventuellement rassemblées par l'architecture pour produire un résultat.

Ces systèmes connectifs sont apparus dans les années 50 mais les applications en chimie analytique ne se sont développées que depuis une dizaine d'années. L'approche neuronale permet per exemple d'établir une corrélation entre les données spectroscopiques infrarouges

(SONG & al., 1995, RICARD & al., 1993) ou RMN (MUNK & al., 1996, DOUCET & al., 1993) et la structure du composé correspondant.

#### 3.3.1.a. architecture d'un neurone

Chaque neurone possède un grand nombre de connexions et peut recevoir simultanément plusieurs signaux  $(S_i)$  compris entre 0 et 1. Les connexions sont paramétrées par des variables numériques ajustables appelées *poids*  $(W_{ji})$  et caractérisant la liaison du neurone i au neurone j. La cellule artificielle a pour fonction d'additionner les signaux véhiculés par les liaisons pour produire un effet collectif appelé *net* (figure 52).

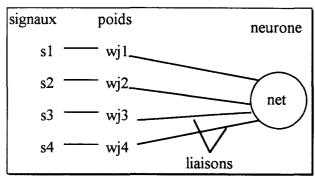


figure 52: architecture d'un neurone artificiel

Chaque neurone reçoit une série d'entrées pondérées  $(W_{ji}S_i)$  des neurones précédents qu'il additionne:

$$net = W_{j1}S_1 + W_{j2}S_2 + W_{j3}S_3 + ... + W_{jn}S_n$$
 (éq.15)

Ce signal collectif est soit utilisé comme signal de sortie, soit dirigé vers d'autres neurones. Pour obtenir un modèle plus facilement exploitable, la valeur du net est ensuite modifiée par une fonction de transfert. Il s'agit en général d'une fonction sigmoïde permettant de normaliser le signal de sortie (out) entre les valeurs 0 et 1.

$$out = \frac{1}{1 + e^{-(\alpha net + \beta)}}$$
fonction sigmoïde

(éq.16)

 $\alpha$  et  $\beta$  sont des paramètres de la fonction sigmoïde.

La fonction sigmoïde est une fonction non linéaire permettant ainsi aux méthodes neuronales d'être adaptées à l'étude des données issues de la spectroscopie infrarouge pour lesquelles la diffusion de la lumière et l'instrumentation peuvent être des causes de non linéarité.

# 3.3.1.b. généralisation au réseau de neurones

Un ensemble de neurones effectuant le même type d'opération constitue un réseau. Le résultat final n'est pas la somme de ces opérations simples mais provient de l'interconnexion des neurones individuels (GASTEIGER & al., 1993) et des modifications que l'environnement apporte à leurs paramètres propres. La principale source de flexibilité des réseaux de neurones réside dans l'architecture. Tous les types de réseaux sont composés de plusieurs niveaux parallèles de neurones, appelés *couches*. Chaque neurone d'une couche reçoit indépendamment et au même instant la même entrée à traiter (figure 53) et effectue alors ses propres transformations mathématiques avant de transmettre une réponse simultanée dans la couche suivante. La première couche du réseau est destinée à recevoir les signaux d'entrée correspondant aux données à analyser. Le résultat du traitement se lit sur la *couche de sortie*. La présence de couches intermédiaires éventuelles, dites *couches cachées*, ainsi que les interconnexions entre neurones forment une grande variété d'architectures. Le nombre de couches, de neurones par couche, et leurs connexions déterminent l'architecture du système.

Globalement, un réseau de neurones transforme un vecteur d'entrée à n dimensions en un certain nombre de paramètres de sortie. Les valeurs numériques associées aux paramètres d'entrée et de sortie sont des nombres réels ou binaires. En fonction du processus d'apprentissage et de l'architecture du réseau, les applications de ces méthodes sont les associations, les classifications ou les modélisations. Au cours de l'apprentissage supervisé, la façon dont le système assigne un objet à une classe est forcée par l'utilisateur. Dans le cas contraire, les groupes se forment naturellement en utilisant comme information uniquement les données d'entrée.

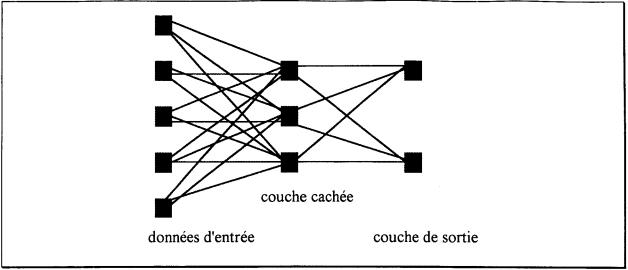


figure 53: exemple d'un réseau à 5 neurones en entrée, 3 en couche cachée et 2 en couche de sortie

# 3.3.2. apprentissage non supervisé: le réseau de KOHONEN

Les réseaux de Kohonen appartiennent à la classe des réseaux auto-organisés (KOHONEN, 1982). Leur objectif est de compresser les données d'entrée et de les projeter dans un espace de plus petite dimension tout en préservant la topologie des informations.

# 3.3.2.a. architecture

Un réseau de Kohonen est composé d'un niveau d'entrée collectant les données initiales et d'une couche de sortie active (figure 54). Le niveau de sortie est généralement formé d'une ossature d'unités à deux dimensions appelée carte de Kohonen.

Chaque unité de la carte reçoit le même signal du niveau d'entrée et se voit attribuer un vecteur poids dont les dimensions sont celles du vecteur d'entrée. Chaque neurone de sortie a un nombre fixe de voisins avec lequel il est connecté et l'intérêt est porté essentiellement aux connexions entre neurones voisins. Le but de l'apprentissage est pour des données d'entrées similaires d'activer des neurones dans des positions similaires.

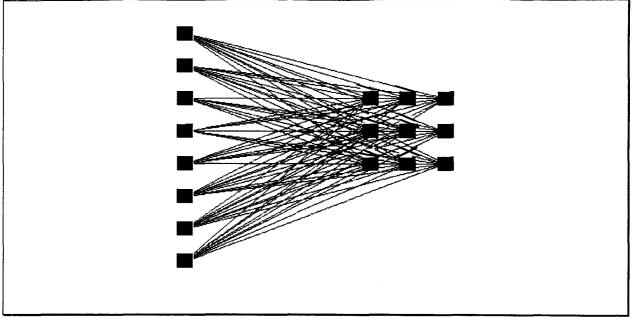


figure 54: réseau avec architecture de type Kohonen

# 3.3.2.b. algorithme d'apprentissage

L'algorithme d'apprentissage de Kohonen est caractérisé par un entraînement compétitif (KOHONEN, 1989) où, au cours d'un cycle, tous les neurones du niveau actif sont activés. Suivant les versions d'algorithmes, le neurone gagnant out(c) est sélectionné selon l'un des deux critères suivants:

- celui qui fournit le plus grand signal de sortie

- celui correspondant au vecteur poids  $W_j$  ( $W_{j1}$ ,  $W_{j2}$ ,... $W_{jm}$ ) le plus similaire au signal d'entrée  $S(S_1, S_2,...S_m)$   $out(S) = \min_{m} \left(\sum_{j=1}^{m} (S_i - W_m)^2\right)$  i=1 m(6a.18)

où j correspond à un neurone particulier, n au nombre total de neurones (soit dans la couche d'entrée, soit dans la couche de sortie), et m est le nombre de poids par neurone.

Après obtention du neurone qui satisfait au mieux l'un des deux critères, les poids des neurones sont corrigés à l'aide d'une fonction de proximité (figure 55) dont l'effet doit diminuer au fur et à mesure que la distance topologique au neurone voisin augmente.

La fonction de proximité s'écrit a(.) = a(dc-dj), où dj-dc représente la distance entre le neurone gagnant c et le neurone j.

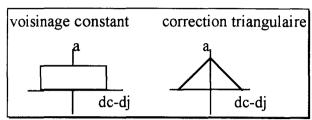


figure 55: fonctions de proximités typiques des corrections de poids

La correction des poids des neurones du voisinage concerné s'effectue comme suit:

$$W_{ji}^{nouveau} = W_{ji}^{avcien} + n(t).a(dc - dj).(S_i - ji_j^{avcien})$$
 (éq.19)

n(t) est une fonction monotone qui décroît en fonction du nombre d'itérations, le signe du dernier terme approche ou éloigne le nouveau vecteur poids de celui correspondant au signal.

Après ces corrections, les poids des neurones sont normalisés à 1:

$$\sqrt{\sum_{i=1}^{m} W_{ji}^2 = 1}$$
 (éq.20)

En résumé, pour un cycle d'apprentissage de Kohonen, un objet de signal S et de dimension m est présenté au réseau, la réponse produite par chacun des neurones est calculée permettant de connaître le neurone vainqueur. Les poids du neurone vainqueur et des neurones voisins sont ensuite modifiés. L'objet suivant est alors présenté au réseau et le processus recommence.

Sur la carte de Kohonen, les signaux similaires sont placés à des positions neuronales identiques. Les informations ne sont pas quantitatives. Ces réseaux sont utilisés en première approche pour explorer la structure des données et sont d'une grande utilité quand les propriétés caractéristiques des échantillons sont peu connues. Les échantillons sont représentés dans un plan où ceux présentant des ressemblances sont activés au voisinage l'un de l'autre.

Cette méthode neuronale peut devenir un outil de classification plus performant que l'analyse en composantes principales à condition d'adapter la taille de la carte de sortie. Néanmoins, les frontières entre les classes restent à l'appréciation de l'utilisateur et sont fonction de sa connaissance des données.

# 3.3.3. apprentissage supervisé: les réseaux multicouches

Ces réseaux de neurones sont utilisés pour la modélisation. Ils doivent élaborer une relation entre un ensemble de données d'entrées et des valeurs de sorties associées connues. Ce couple « données d'entrée-valeurs de sortie » permet d'entraîner le réseau de manière supervisée. Ensuite, l'étape de *test* effectue la procédure de validation pour ultérieurement prédire avec la meilleure précision possible les sorties pour des vecteurs d'entrée inconnus du réseau.

Dans un réseau multicouches, l'information se transmet du niveau d'entrée vers la couche de sortie en parcourant successivement tous les niveaux intermédiaires des couches cachées. Le nombre de niveaux cachés est choisi par l'utilisateur pour approcher au mieux le comportement voulu. Néanmoins, il a été démontré que toute relation peut être modélisée par un réseau ne comportant qu'une seule couche cachée si le nombre de neurones la constituant est suffisamment élevé. C'est pourquoi, la plupart des applications sont réalisées avec une couche cachée unique (ZUPAN & al., 1993).

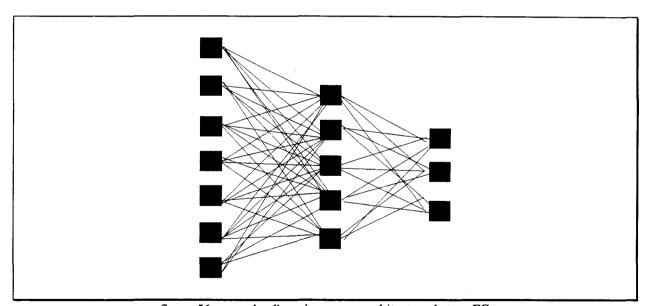


figure 56: exemple d'un réseau avec architecture de type FC

Un réseau de neurone artificiel peut contenir uniquement des connexions entre les couches adjacentes. Il est dans alors appelé de type FC (full connexion) (figure 56). S'il existe

en plus des connexions directes entre la couche d'entrée et celle de sortie, le réseau est nommé de type FC-SC (full connexion-short connexion) (figure 57).

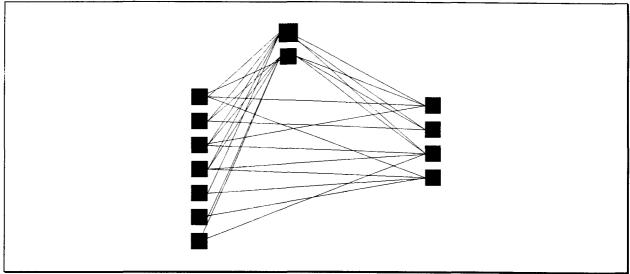


figure 57: exemple d'un réseau avec architecture de type FC-SC

Les réseaux de neurones peuvent se répartir en plusieurs catégories selon qu'ils interdisent ou permettent des liens récurrents entre leurs neurones.

#### 3.3.3.a. les réseaux à couches

Le fonctionnement du réseau est déterminé par les valeurs de ses poids évoluant au cours de l'apprentissage. L'algorithme le plus connu pour l'apprentissage (ou entraînement) est l'algorithme de *rétropropagation de l'erreur*.

Dans cet algorithme, un vecteur d'entrée X est présenté au réseau, le vecteur de sortie Out est immédiatement comparé avec la valeur cible Y (figure 58). Y représente la réponse correcte associée au vecteur X. L'erreur calculée β et l'ajustement des poids α s'effectuent du niveau de sortie vers le niveau d'entrée c'est-à-dire dans la direction opposée à celle de la propagation de l'information (GASTEIGER, 1993). Les poids sont corrigés dans le but de reproduire une valeur cible pour le plus grand nombre d'entrées possible. En phase d'apprentissage, le processus de rétropropagation de l'erreur est réitéré jusqu'à obtenir un minimum. En effet, l'erreur est plus faible lors de la présentation suivante du vecteur d'entrée au réseau.

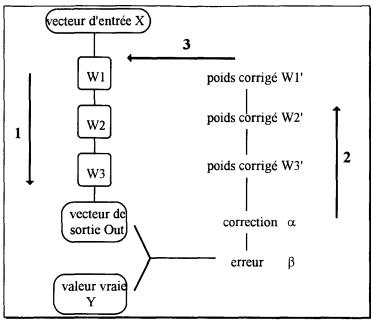


figure 58: processus d'apprentissage de l'algorithme de rétropropagation de l'erreur

La correction du poids correspondant au neurone j de la couche l relié au neurone i de la couche précédente est donnée par:

$$\Delta W_{ji}^{(l)} = W_{ji}^{(l) nouveau} - W_{ji}^{(l) ancien} = \eta \delta_{j}^{(l)} \cdot Out_{i}^{(l-1)} + \mu \Delta W_{ji}^{(lprecedent)}$$
 (éq.21)

 $\delta_j^l$  représente l'erreur calculée sur le neurone j de la l-ième couche. Elle est fonction des valeurs des poids du niveau précédent. Les paramètres  $\eta$  et  $\mu$  sont appelés taux d'apprentissage et constante d'inertie respectivement.

La relation est composée de deux termes. Le premier terme, fonction de η, correspond à une convergence rapide indépendante de la correction effectuée à l'itération précédente. Le second, fonction de μ, empêche les changements de direction dans l'espace où la minimisation est réalisée. Au cours de l'apprentissage, les deux termes décroissent. Afin d'obtenir un réseau mieux structuré, la fonction d'erreur a été modifiée pour s'adapter à la méthode de « resilient propagation » (DOLMATOVA & al., 1998). Dans ce cas, le signe de la dérivée partielle de l'erreur est utilisé pour déterminer la direction des modifications des poids et l'algorithme diminue systématiquement les poids inutiles.

En résumé, le processus d'apprentissage appliqué pour tous les couples entrée-sortie impose les étapes suivantes:

- présentation d'un objet à l'entrée du réseau
- propagation du signal, calcul de la valeur de sortie et comparaison avec la valeur cible.
- calcul de l'erreur et correction des poids.
- minimisation de l'erreur par réitération du processus jusqu'à ce que le réseau soit capable de prédire correctement les données de sortie.

#### 3.3.3.b. les réseaux récurrents

Les réseaux à couches voient l'activation de leurs neurones les traverser en vague unique et n'ont pas véritablement de comportement dans le temps. En revanche, les réseaux récurrents sont caractérisés par des comportements dynamiques plus ou moins complexes selon les contraintes d'architecture. Quand toutes les données ne peuvent pas être traitées en même temps, il est possible de les apporter par parties. Dans ce cas, une mémoire contextuelle est nécessaire pour retenir les calculs intermédiaires. A la différence des réseaux vus précédemment, les connexions des réseaux récurrents forment des boucles. Puisque l'activation des neurones peut circuler le long de ces boucles et ainsi affecter le réseau pendant une période arbitrairement plus longue, les comportements des réseaux récurrents sont complexes.

Parmi les réseaux récurrents, le réseau de Elman (ELMAN, 1990) propose une architecture adaptée au traitement des séquences structurées. La couche cachée est bouclée sur elle-même. L'effet de cette boucle est de recopier sans traitement la valeur de la couche cachée dans une couche dite de contexte (figure 59). Incorporer une récurrence donne à cette couche une vision des états passés et permet d'intégrer le temps dans la représentation. Seule la couche cachée est suffisamment libre pour développer la représentation qui résout au mieux le problème.

Dans ce type de réseau, le signal est traité en deux étapes. Au temps t-1, les signaux de la couche d'entrée et de contexte sont distribués aux neurones de la couche cachée. Celle-ci effectue alors ses calculs et envoie les signaux vers la couche de sortie pour le traitement au

temps t. En même temps, les données de la couche cachée sont copiées dans la couche de contexte. Les sorties de la couche de contexte se combinent avec les nouvelles entrées de la couche d'entrée du cycle suivant pour aller de nouveau dans la couche cachée au temps t+1. Ainsi, la couche d'entrée et la couche de contexte forment des combinaisons récurrentes dans la couche de sortie. Les poids sont ajustables sauf dans la connexion récurrente de la couche cachée à la couche de contexte (en général fixés à 1).

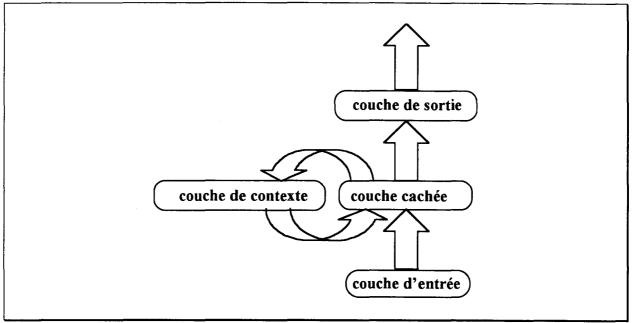


figure 59: topologie d'un réseau récurrent de type Elman

# 3.4. MATERIEL ET METHODES

#### 3.4.1. les amidons

# 3.4.1.a. échantillonnage

Les traitements rencontrés sur les amidons de maïs, de riz, de pomme de terre ou de manioc sont la prégélatinisation, les modifications H, R, I et J. Les amidons peuvent être cireux ou non. Ces combinaisons de modifications sur 101 échantillons d'amidons de lots et de fournisseurs différents se répartissent en 20 classes (tableau 14).

Les informations représentatives de chacune des caractéristiques doivent impérativement être reproductibles. L'échantillonnage par réflexion diffuse employé pour la

constitution de la base de données n'est pas envisageable. Les spectres sont collectés à l'aide d'un accessoire ATR horizontal, un spectre de référence correspondant à l'air est enregistré avant chaque échantillon.

Pour favoriser le contact entre le cristal et l'échantillon et améliorer le rapport signal/bruit, l'amidon est déposé sur le cristal puis imprégné par 0,5 ml d'acétone. Après évaporation de l'acétone, la poudre est plus compacte et adhère mieux au cristal. Le spectre est enregistré quand le solvant est totalement évaporé.

La répétabilité calculée sur 10 spectres est de 5 %. Afin de prendre en considération un éventuel caractère hétérogène des amidons, chaque échantillon est obtenu en moyennant 3 spectres.

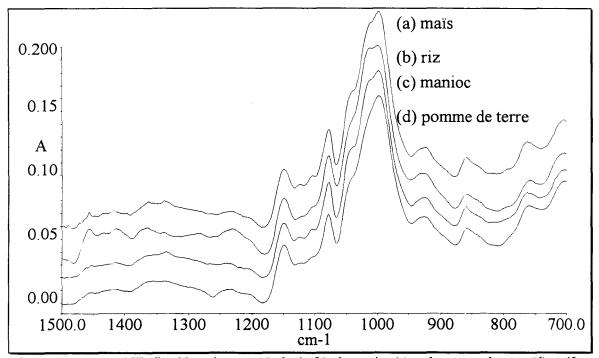


figure 60: spectres ATR d'amidons de maïs (a), de riz (b), de manioc (c) et de pomme de terre (d) natifs.

Les spectres sont enregistrés sur l'intervalle spectral 2000-700 cm<sup>-1</sup> après accumulation de 200 interférogrammes, la résolution est de 4 cm<sup>-1</sup>. Pour s'affranchir d'éventuels résidus de solvant, les intervalles (1729-1697 cm<sup>-1</sup>, 1372-1342 cm<sup>-1</sup> et 1225-1205 cm<sup>-1</sup>) dans lesquels l'acétone présente des bandes d'absorption sont supprimés.

Quelle que soit l'origine botanique de l'amidon, la présence majoritaire d'amylose et d'amylopectine conduit à des spectres très ressemblants (figure 60) ne permettant une identification facile de façon visuelle.

tableau 14: identification des 101 amidons (\* échantillons utilisés pour la validation)

nature de l'amidon	abbrév.	référence de l'échantillon
	МСР	44 - 47
maïs, cireux prégélatinisé	—·- ·	
riz, cireux prégélatinisé	RCP	16 - 76 - 22* - 58
maïs, cireux	MC	3 - 31 - 32 - 30 - 24* - 4 - 28*
riz, natif	RN	55 - 69* - 87 - 57* - 27* - 56 - 8
manioc, natif	MaN	60 - 65* - 82
pomme de terre, natif	PdtN	49 - 97 - 98
maïs, cireux prégélatinisé modifié R	MCPR	13 - 19 - 42 - 43*
maïs, cireux modifié H	МСН	37 - 33 - 34* - 10 - 11 - 74 - 17* - 12 -
	ļ	35 - 59* - 81 - 86 - 89 - 91 - 18 - 36* -
	•	77 - 79 - 90 - 61
manica madifiá D	MaR	62 - 63 - 80
manioc, modifié R		
maïs, cireux prégélatinisé modifié H	MCPH	64 - 38 - 20* - 39 - 40 - 41* - 14
maïs, cireux modifié R	MCR	5 - 6 - 45* - 83 - 25
maïs, natif	MN	46 - 21 - 1 - 2 - 84 - 92* - 99 - 100 - 101
manioc, modifié I	MaI	66* - 75 - 85 - 93
riz, cireux modifié J	RCJ	53 - 68 - 54 - 94
riz, cireux	RC	67* - 9 - 15
riz, cireux prégélatinisé modifié H	RCPH	70 - 95 - 96 -78*
maïs, modifié H	MH	71 - 73
maïs, cireux modifié I	MCI	72 - 48 - 88
pomme de terre, modifié R	PdtR	7 - 52 - 26*
pomme de terre, prégélatinisé	PdtP	50* - 51

#### 3.4.1.b. codification des échantillons

Un système de codification binaire a été élaboré à partir de la nature des amidons: la valeur "1" est associée à la (ou les) propriété(s) que possède l'amidon considéré et la valeur "0" est associée à toutes les autres propriétés (tableau 15). La classification portera donc sur la combinaison de 10 propriétés.

tableau 15: exemples de codification pour les amidons

échantillon	mais	riz_	pdt	manioc	cireux	pregel	mod H	mod R	mod I	mod J
maïs natif	1	0_	0	0	0	0	0	0	0	0
manioc modifié I	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
riz cireux modifié J	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1

# 3.4.2. les supports informatiques

Matériellement, les calculs pour PCA et PLS sont effectués à l'aide du logiciel QUANT+. La classification des amidons par réseaux neuronaux se fait sur une station de travail sous UNIX à l'aide d'un simulateur de réseaux de neurones appelé SNNS développé par l'Université de Stuttgart. Ce logiciel, régulièrement mis à jour, est un "free-software" disponible sur le réseau internet capable de traiter de grands jeux de données. La version 4.1 actuellement disponible possède une large variété de méthodes d'apprentissage, de fonctions d'activation et d'initialisation des poids.

# 3.5. RESULTATS ET DISCUSSIONS

# 3.5.1. les méthodes non supervisées

# 3.5.1.a. l'analyse en composantes principales

Une analyse en composantes principales uniquement sur des spectres d'amidons de maïs a montré qu'il est possible de caractériser les amidons prégélatinisés et de discriminer les amidons natifs des amidons modifiés (DUPUY & al., 1997). Lors de l'étude sur les 101 amidons, les meilleurs résultats en PCA sont obtenus à partir des spectres dont l'intervalle spectral

comprend la région 1500-800 cm<sup>-1</sup>. Pour s'affranchir des problèmes de ligne de base, une dérivée première à 5 points est appliquée sur chaque spectre. Cette dérivation s'accompagne d'un lissage.

Les 3 premières composantes principales extraites expriment 91% de la variance (66,73% pour PC1, 12,7% pour PC2 et 11,64% pour PC3). Les autres composantes contribuent à moins de 6% de la variance résiduelle et modélisent les variations non significatives.

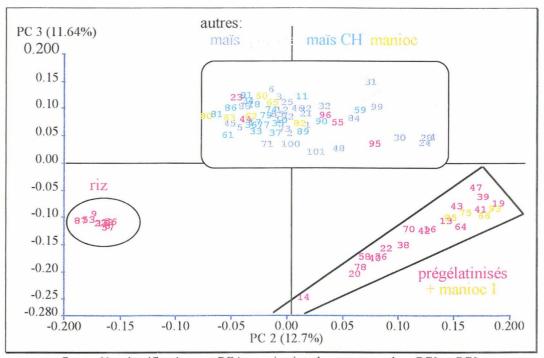


figure 61: classification par PCA - projection des spectres selon PC2 et PC3

La projection des spectres selon les deuxième et troisième composantes (PC2 et PC3) permet de différentier 3 groupes d'amidons (figure 61). Les numéros d'échantillons correspondant à des amidons de manioc modifiés I ainsi que la plupart des amidons prégélatinisés (quelles que soient les autres propriétés) sont projetés négativement selon PC3 et positivement selon PC2. Les amidons issus du riz (modifiés ou non) et non prégélatinisés sont regroupés dans la zone où les valeurs sont négatives pour PC2 et PC3. Au centre, figurent les

autres amidons. Dans ce troisième ensemble, les amidons de pomme de terre se distinguent des autres amidons et forment un sous-groupe.

La répartition de part et d'autre de l'origine des projections selon PC3 du indique une information spectrale différente pour le riz, le manioc modifié I et les amidons prégélatinisés d'une part, et pour les autres amidons d'autre part. La représentation graphique de la troisième composante principale en fonction des nombres d'onde (figure 62) indique un maximum pour PC3 vers 1000 cm<sup>-1</sup>. Or, à 995 cm<sup>-1</sup> se situent les vibrations de déformations C-O-H sensibles à la teneur en eau (CHAMPENOIS, 1994). Cela signifie que la différence entre ces amidons pourrait se faire d'après la teneur en eau différente. L'information extraite est cohérente car les amidons prégélatinisés, solubles dans l'eau, ont subi une précuisson. Le riz également projeté négativement (comme le manioc modifié I) n'est pas précuit mais sa sensibilité vis à vis de l'eau est probablement différente des autres amidons.

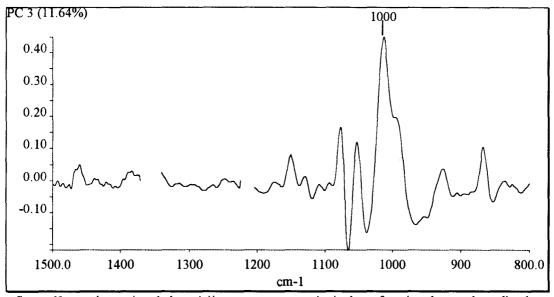


figure 62: représentation de la troisième composante principale en fonction des nombres d'ondes

Contrairement aux autres amidons, la projection négative des riz selon la deuxième composante principale signifie que l'information spectrale relative à l'amidon de riz est extraite par cette composante principale. La représentation graphique de PC2 en fonction des nombres d'ondes (figure 63) présente un maximum en intensité à 1050 cm<sup>-1</sup> où se trouve également la

bande d'absorption relative au degré de cristallinité des amidons (FORREST & al., 1992). La cristallinité est probablement différente entre le riz et les autres amidons.

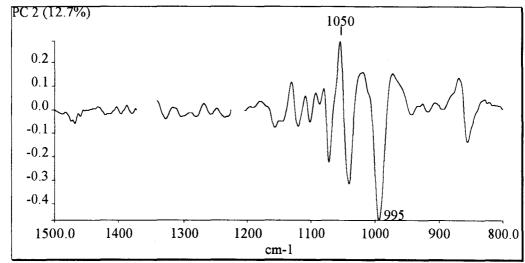


figure 63: représentation de la deuxième composante principale en fonction des nombres d'ondes

Par analyse PCA, la projection d'un spectre d'amidon inconnu selon les deuxième et troisième composantes principales de la classification (obtenue à partir des échantillons connus) ne permet d'identifier clairement que 2 classes d'amidons: les amidons prégélatinisés et les amidons de riz (à condition qu'ils ne soient pas prégélatinisés).

## 3.5.1.b. classification sur carte de Kohonen

La procédure d'apprentissage commence avec l'activation de l'ensemble des neurones du réseau. Elle s'arrête lorsque la fonction de proximité est inférieure à 1 ou lorsque le réseau est stable, c'est à dire quand les poids ne sont plus corrigés. Dans ce cas, seul le neurone vainqueur reste activé.

Pour l'établissement de cette carte de Kohonen, l'intervalle spectral considéré totalise 530 données, de 1800 cm<sup>-1</sup> à 700 cm<sup>-1</sup> en supprimant les régions d'absorption de l'acétone. Les spectres sont lissés et dérivés de la même façon que pour l'analyse en composantes principales. Après différents essais successifs, les meilleurs résultats sont obtenus avec une couche de sortie de taille 20 X 20.

La carte de Kohonen (figure 64) confirme les résultats obtenus par PCA. La structure des données étudiée par l'intermédiaire des réseaux auto-organisés de type Kohonen permet de distinguer six classes d'amidons.

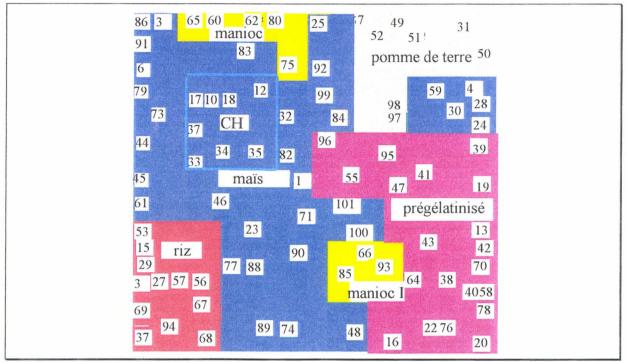


figure 64: carte de Kohonen pour une classification neuromimétique non supervisée

Les amidons prégélatinisés sont rassemblés sur la carte et ce, quelles que soient leur origine végétale ou leur modification chimique. Pour les amidons non-prégélatinisés, il est possible cette fois de préciser l'origine végétale. Les amidons de pomme de terre sont situés à l'opposé des amidons de riz. Les amidons de manioc se répartissent en deux zones : les amidons de manioc modifiés I (à proximité des amidons prégélatinisés) et les autres. Les échantillons de manioc modifiés I sont confirmés comme un groupe proche des amidons prégélatinisés, comme cela apparaissait déjà dans le résultat de PCA. Enfin, les amidons de maïs, les plus nombreux, sont plutôt centralisés. Parmi les maïs, les amidons natifs sont rassemblés, de même que ceux présentant une modification R mais la classification la plus évidente concerne les maïs cireux modifiés H où l'association "CH" est parfaitement localisée.

Cette carte de Kohonen permet de différentier les amidons selon leur origine végétale en plus du traitement de prégélatinisation. Cette dernière propriété est prioritaire sur les traitements chimiques et la nature des amidons.

Contrairement aux algorithmes tels que PCA, il n'est pas possible de connaître les régions spectrales détenant l'information caractéristique de chaque propriété.

#### 3.5.1.c. conclusion

Les résultats obtenus par projection de manière non supervisée indiquent qu'il existe sur les spectres infrarouges des informations caractéristiques de l'origine végétale et des modifications de structure relatives au traitement de prégélatinisation. La classification par réseaux de neurones de type Kohonen aboutit à une différentiation plus fine des amidons puisque au moins six classes d'amidons sont distinctes.

Cette première approche paraît suffisante pour un contrôle-qualité rapide ou pour vérifier une réponse à un échantillon connu. Néanmoins, elle est insuffisante pour décrire complètement un échantillon inconnu et encourage la mise en oeuvre de modèles capables de modéliser l'appartenance d'un amidon à un groupe grâce à des traitements de données supervisés.

## 3.5.2. les méthodes supervisées

Contrairement à l'analyse en composantes principales et aux réseaux auto-organisés de Kohonen, l'utilisation de PLS et des réseaux à rétropropagation de l'erreur nécessite de relier les données expérimentales à des valeurs de référence afin de définir l'origine, les propriétés ou les modifications recherchées. La codification binaire est justifiée pour l'origine végétale dans la mesure où les échantillons ne sont pas mixtes. En revanche, ce paramétrage est moins évident pour les propriétés ou modifications qui peuvent affecter les échantillons à des taux variables. Mais les fiches techniques à disposition n'indiquent en aucun cas le degré de modification.

Pour l'étude par les méthodes statistiques et neuronales, 80 échantillons sont utilisés pour la calibration et 21 pour la validation (dans le tableau 14, les amidons utilisés en validation sont marqués du symbole \*).

Les erreurs prédites doivent prendre en compte le caractère arbitraire du paramétrage binaire puisqu'un échantillon en prédiction peut être plus ou moins modifié que la moyenne des échantillons utilisés pour l'étalonnage. Ces erreurs sont examinées selon le critère de l'erreur standard de prédiction SEP.

# 3.5.2.a. paramètres de calibration par PLS

Les calculs sont effectués selon les mêmes spécifications que pour PCA, c'est à dire sur l'intervalle 1500-800 cm<sup>-1</sup>, où une dérivée première à 5 points est appliquée sur chaque spectre ainsi qu'un lissage.

Le choix du nombre de facteurs utilisé pour expliquer chacune des propriétés, fonction de l'erreur standard de prédiction pour la calibration (SEPc), n'est pas le même (tableau 16). Le nombre important d'échantillons en calibration (80) et la combinaison éventuelle des propriétés indiquent une difficulté à extraire l'information significative de la propriété considérée et sont responsables du nombre de facteurs élevés.

tableau 16: nombre de facteurs et SEPc pour chacune des propriétés

	maïs	riz	pdt	manioc	cireux	prégel	mod. H	mod. R	mod. I	mod. J
facteur	13	10	5	10	10	10	14	10	6	9
SEPc	0.19	0.10	0.09	0.13	0.21	0.09	0.14	0.12	0.08	0.13

# 3.5.2.b. paramètres d'apprentissage par les réseaux de neurones

L'architecture du réseau est décrite de la façon suivante: 530x50x10 avec 530 neurones en entrée regroupant les données spectrales sur le domaine 1800-700 cm<sup>-1</sup> (dérivées premières lissées), 50 neurones en couche cachée et 10 neurones en couche de sortie représentant les différentes origines (pour les 4 premiers) et les traitements (pour les 6 autres). La modélisation

est effectuée selon l'algorithme de rétropropagation de l'erreur. Seul le nombre de neurones en couche cachée est ajusté. Avec un nombre inférieur à 50, le degré de précision des valeurs cibles est insuffisant. Et quand le nombre de neurones dans cette couche cachée est trop important (supérieur à 100), la durée de l'apprentissage est très long et sans gain significatif de la précision.

Au cours de l'apprentissage, pour éviter un "sur-entraînement" susceptible de créer des liens par erreur, une validation est effectuée toutes les 10 itérations sur les échantillons en test. L'apprentissage s'achève quand les erreurs en test deviennent stables.

Différentes possibilités de modélisations sont pratiquées. En première approximation, les résultats de prédiction pour les 21 échantillons en test sont sensiblement les mêmes pour le réseau FC (avec uniquement des connexions entre les couches adjacentes) et pour le réseau FC-SC (des connexions directes entre la couche d'entrée et la couche de sortie sont autorisées en plus des connexions adjacentes). Toutefois, dans certains cas, la prédiction avec le réseau FC-SC est meilleure indiquant la présence de composantes linéaires caractérisées par des connexions directes entre les entrées et les sorties. La visualisation des liens de plus haut poids du réseau FC-SC (figure 65) représente environ 10 % de connexions directes.

BU

Le réseau FC-SC est d'ailleurs plus intéressant du point de vue spectroscopique puisqu'il permet de relier les données spectrales aux propriétés des amidons par l'intermédiaire des liens directs. Les amidons cireux constitués essentiellement d'amylopectine, et donc de chaînes ramifiées, produisent des liens directs avec le domaine spectral proche de 1000-1100 cm<sup>-1</sup> caractéristique des vibrations C-C. Mais aussi, les modifications R et I contenant des groupes phosphates présentent des liens avec la région proche de 1200 cm<sup>-1</sup>. De même, la connexion à 994 cm<sup>-1</sup> avec la propriété "prégel" est en bon accord avec la présence d'eau dans les amidons ayant subi ce traitement.

Toutefois, il faut rester prudent lors de l'interprétation de liaisons directes dont la présence est parfois due uniquement à une correction de liens entre les couches adjacentes, ce qui justifie leur nombre important.

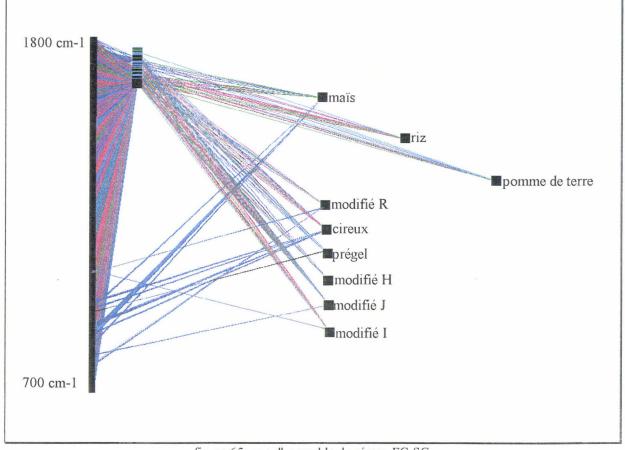


figure 65: vue d'ensemble du réseau FC-SC

# 3.5.2.c. comparaison des deux méthodes

L'examen détaillé des résultats établit une faisabilité des méthodes chimiométriques pour prédire les caractéristiques d'un amidon.

Compte tenu du caractère arbitraire du paramétrage, à la différence des méthodes neuronales, certaines valeurs prédites par les méthodes statistiques sont en dehors de l'intervalle [0 - 1]. Pour la comparaison des résultats par le calcul des erreurs standards de prédiction (SEP), ces valeurs sont arrondies à 0 quand elles sont prédites négativement et arrondies à 1 lorsqu'elles sont supérieures à l'unité.

Les SEP sont calculées pour chaque propriété à partir des résultats des réseaux de neurones et de PLS. Elles sont le plus souvent inférieures à 0,3 (tableau 17) et du même ordre de grandeur pour les deux.

tableau 17: comparaison avec les données théoriques (Th.) des résultats obtenus en validation par PLS et en test par les réseaux de neurones (RN)

	mais		riz		pomme de terre		manioc			cireux					
éch.	Th.	PLS	RN	Th.	PLS	RN	Th.	PLS	RN	Th.	PLS	RN	Th.	PLS	RN
22	0	-0.10	0.41	11	1	0.64	0	-0.07	0	0	-0.11	0.01	1	1.22	0.89
24_	1	0.86	0.91	0	0.4	0.01	0	-0.11	0.04	0	-0.1	0.05	1	1.1	0.85
28	1	0.74	0.9	0	0.03	0.01	0	-0.09	0.05	0	0.01	0.08	1	1.04	0.78
27	0	0.29	0.04	1	0.94	0.97	0	0.13	0	0	-0.3	0.03	0	0.37	0.62
65	0	0.05	0.35	0	-0.07	0.09	0	-0.15	0.11	1	0.90	0.57	0	0.14	0.13
43	1	1.37	0.42	0	-0.45	0.08	0	0.12	0.06	0	0.36	0.03	1	1.10	0.28
34	1	1.01	0.96	0	0.06	0.01	0	0.05	0.01	0	0.01	0.01	1	1.07	0.97
17	1	0.92	0.96	0	0.10	0.02	0	0.01	0.01	0	-0.04	0.01	1	0.90	0.98
59	1	1.86	1	0	-0.29	0	0	0	0.03	0	-0.25	0	1	1.26	0.99
36	11	1.03	0.97	0	0.05	0.01	0	0.02	0.01	0	-0.05	0.01	1	1.09	0.98
20	1	-0.31	0.81	0	0.70	0.46	0	-0.05	0	0	0.24	0	1	1.17	0.99
41	1	0.85	1	0	-0.81	0	0	-0.02	0.07	0	-0.29	0.13	1	0.76	0.97
45	1	1.01	0.68	0	-0.02	0.03	0	0.17	0.22	0	0.01	0.19	1	1.07	0.79
92	1	0.75	0.59	0	-0.04	0.05	0	0.04	0.05	0	0.23	0.18	0	0.27	0.47
6 <b>6</b>	0	0.39	0.47	0	-0.29	0.01	0	0	0.08	1	0.89	0.78	0	0.09	0.10
67	0	0	0.08	1	1.11	0.99	0	-0.13	0	0	0.11	0.17	1	0.72	0.38
78	0	0.30	0.17	1	0.86	0.87	0	-0.19	0	0	0.02	0.02	1	0.85	0.94
26	0	0.45	0.75	0	-0.34	0	1	0.71	0.88	0	0.02	0.3	0	0	0.18
50	0	-0.22	0.44	0	0.04	0.01	1	0.84	0.57	0	0.2	0.39	0	-0.28	0.13
69	0	-0.05	0	1	0.90	1	0	0.07	0	0	0.04	0.28	0	-0.04	0.06
57	0_	0.21	0.03	1	0.95	0.99	0	0.05	0	0	-0.27	0.03	0	0.17	0.63

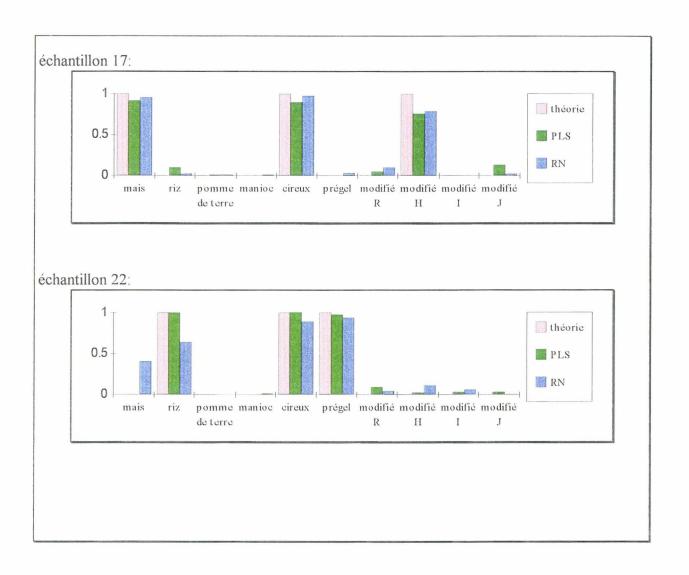
			T T T T T T T T T T T T T T T T T T T		
SEP	0.31 0.30	0.19 0.13	0.10 0.12	0.19 0.18	0.18 0.30

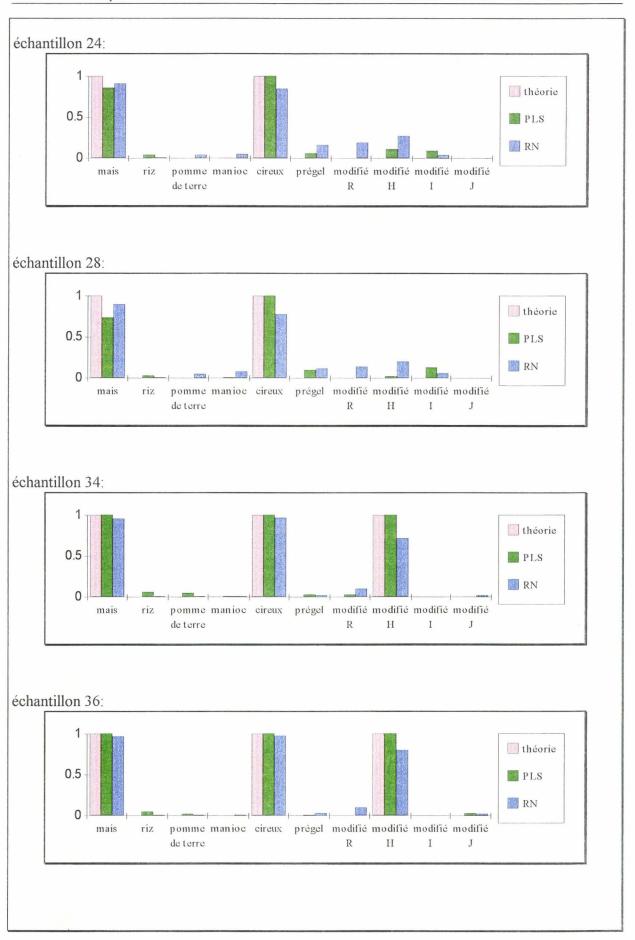
	prégélatinisé		modifié R		modifié H			modifié I			modifié J				
éch.	Th.	PLS	RN	Th.	PLS	RN	Th.	PLS	RN	Th.	PLS	RN	Th.	PLS	RN
22	1	0.98	0.94	0	0.09	0.04	0	0.02	0.11	0	0.03	0.06	0	0.03	0
24	0	0.06	0.16	0	-0.02	0.19	0	0.11	0.27	0	0.09	0.04	0	-0.12	0
28	0	0.10	0.12	0	-0.04	0.14	0	0.02	0.2	0	0.13	0.06	0	-0.08	0
27	0	-0.03	0.07	0	0	0.02	0	-0.16	0.01	0	0.02	0	0	0.23	0.12
65	0	-0.04	0.0	0	-0.2	0.17	0	0.11	0.01	0	0.1	0.02	0	-0.14	0.01
43	1	1.35	0.97	1	1.42	0.93	0	-0.38	0.01	0	0	0.11	0	-0.67	0.01
34	0	0.03	0.02	0	0.03	0.1	1	1.03	0.72	0	0	0	0	-0.03	0.02
17	0	-0.13	0.03	0	0.05	0.10	1	0.76	0.79	0	-0.03	0	0	0.13	0.02
59	0	0.06	0.05	0	-0.54	0.07	1	1.03	0.96	0	-0.02	0.01	0	0.01	0
36	0	0.01	0.03	0	-0.06	0.1	1	1.07	0.80	0	0	0	0	0.03	0.02
20	1	1.35	0.99	0	-0.05	0.01	1	0.54	0.76	0	0.04	0.01	0	0.2	0
41	1	0.85	0.79	0	-0.26	0	1	1.04	0.55	0	0.01	0.08	0	-0.64	0
45	0	0.11	0 -	1	0.79	0.55	0	0.05	0.08	0	0.03	0	0	-0.1	0.04
92	0	0.01	0.02	0	0.58	0.1	0	-0.28	0.04	0	-0.05	0.02	0	0.28	0.01
66	0	0.03	0.24	0	0.41	0.16	0	0.28	0	1	0.86	0.82	0	-0.02	0
67	0	0.05	0.01	0	0.01	0.05	0	-0.13	0	0	-0.07	0	0	0.4	0.38
78	1	-0.12	0.01	0	0.24	0.04	0	0.56	0.07	0	0.04	0	1	0.69	0.48
26	0	0.5	0.13	1	1.02	0.79	0	-0.5	0.02	0_	0	0.08	0	0	0
50	1	0.79	0.06	0	0.1	0.48	0	-0.02	0.01	0	0.07	0.07	0	-0.11	0
69	0	0.04	0.01	0	-0.09	0.03	0	-0.13	0	0	-0.05	0	0	0.07	0.14
57	0	-0.05	0.03	0	-0.25	0.01	0	-0.17	0.01	0	-0.09	0	0	0.13	0.20

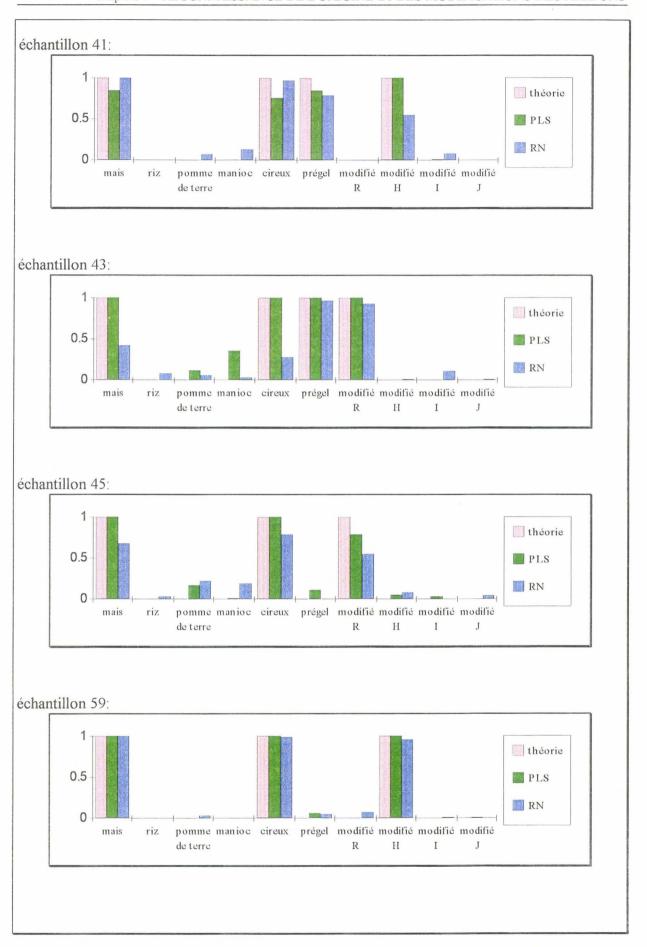
SEP	0.29 0.32	0.20 0.18	0.18   0.17	0.06   0.06	0.15 0.16

La tentative de modélisation des réseaux neuronaux spécifiques pour chaque propriété a conduit à des résultats décevants. Cela illustre la capacité des réseaux de neurones à généraliser les informations et confirme sa différence par rapport à PLS qui au contraire donne de meilleurs résultats avec des calibrations séparées et plus précisément quand les données ne sont pas indépendantes. Les méthodes neuronales sont modélisées pour les réseaux de types FC et FC-SC. Les valeurs prédites sont peu différentes. Les résultats présentés sont ceux obtenus pour un réseau présentant à la fois des liaisons adjacentes et des liens directs, c'est à dire de type FC-SC.

Pour plus de la moitié des échantillons testés, la reconnaissance de l'amidon est facilement obtenue par les deux méthodes (figure 66).







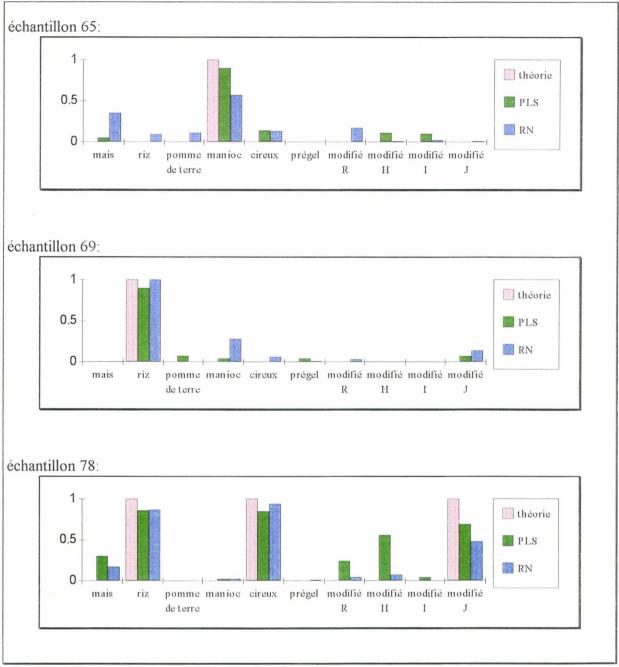


figure 66: représentation graphique des résultats des classifications supervisées (PLS) et réseaux de neurones (RN)

Dans certains cas, les prédictions sont justes mais de moins bonne qualité. Les amidons de riz natifs (échantillons 27 et 57) et de maïs (échantillon 92) sont reconnus avec un caractère cireux mais de manière plus accentuée pour les réseaux neuronaux (figure 67). En effet, en considérant que la propriété est correctement prédite uniquement si sa valeur est supérieure à 0,5 alors la méthode PLS reconnaît les amidons de riz natifs. La reconnaissance, même faible du caractère cireux, peut s'expliquer tout d'abord par une structure peu différente entre un

amidon natif et un amidon cireux dont seule la proportion relative entre l'amylose et l'amylopectine diffère. Mais aussi, l'apprentissage ne possède pas suffisamment d'amidons natifs par rapport aux amidons cireux pour permettre une reconnaissance aisée. Il semblerait que le réseau généralise le caractère cireux à l'ensemble des échantillons avec un taux plus ou moins élevé.

Outre le caractère cireux proposé par PLS sur l'échantillon 92, une modification R est prédite par erreur. Aucune explication ne permet actuellement d'expliquer ce résultat.

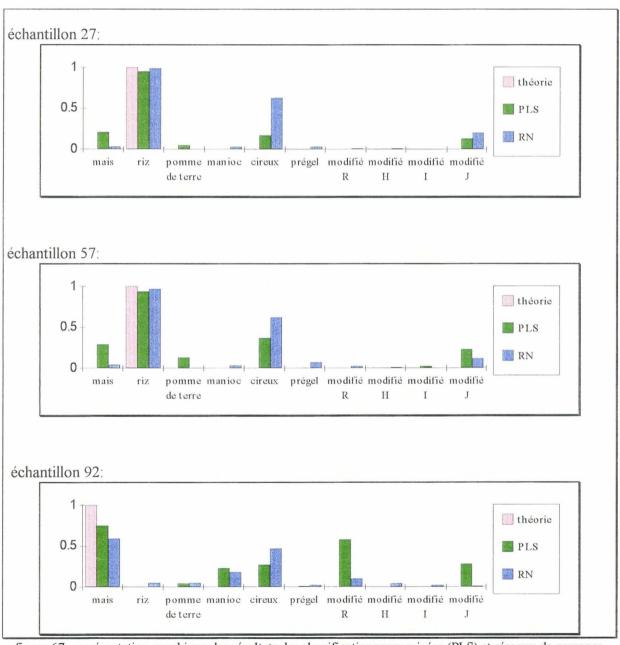


figure 67: représentation graphique des résultats des classifications supervisées (PLS) et réseaux de neurones (RN)

Mais aussi, quand le nombre d'échantillons présentant certaines caractéristiques est faible en apprentissage, le diagnostic des méthodes neuronales est erroné (figure 68). Le cas se présente pour l'échantillon 50 correspondant à un amidon de pomme de terre prégélatinisé pour lequel la reconnaissance n'est pas établie (mélange de maïs, riz et manioc modifiés R) alors que PLS identifie correctement cet échantillon. L'acquisition d'un nombre plus nombreux d'échantillons de pomme de terre devrait résoudre ce problème.

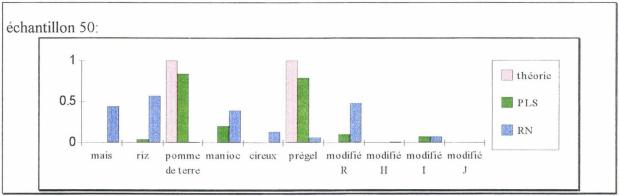


figure 68: représentation graphique des résultats des classifications supervisées (PLS) et réseaux de neurones (RN)

Plus rarement, l'erreur en prédiction est confirmée par les deux méthodes. En apprentissage (pour les réseaux neuronaux) ou en calibration (pour la méthode statistique), la modification J n'est présente que dans les amidons de riz. Lors de l'étape prédictive, elle semble directement corrélée avec l'origine végétale : les amidons de riz sont présentés avec cette modification (figure 69). En ajoutant au jeu d'entraînement des amidons modifiés J non issus du riz, les prédiction devraient être meilleures.

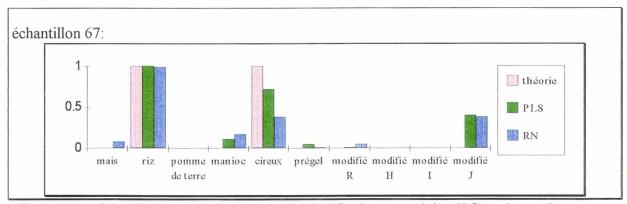


figure 69: représentation graphique des résultats des classifications supervisées (PLS) et réseaux de neurones (RN)

Pour l'échantillon 20 (figure 70), l'origine végétale de l'échantillon testé est reconnue comme du riz et non du maïs. Ces résultats semblent aller dans le sens d'un défaut de l'échantillon par rapport au cahier des charges. En ce qui concerne les échantillons 26 et 66, une origine végétale est doublement reconnue bien que ces échantillons ne soient pas mixtes (maïs-pomme de terre et maïs-manioc respectivement). Relativement aux autres variétés, le nombre d'amidons de maïs est trop important dans l'apprentissage. La valeur est toutefois supérieure pour l'origine exacte.

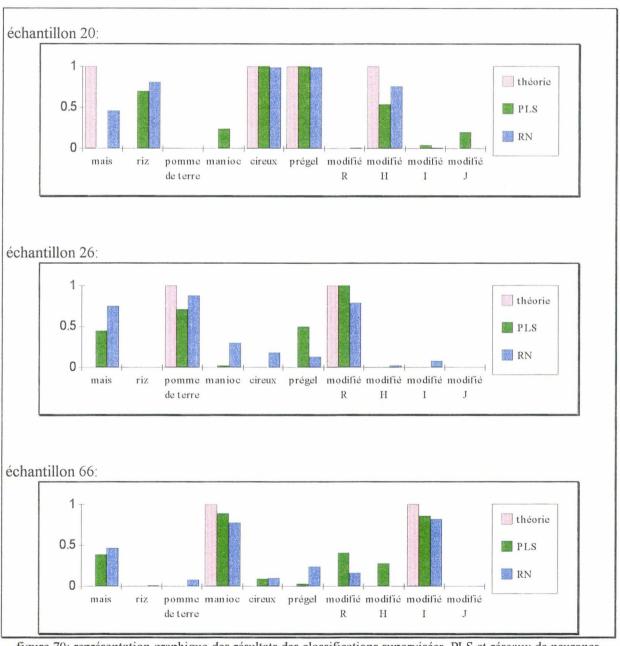
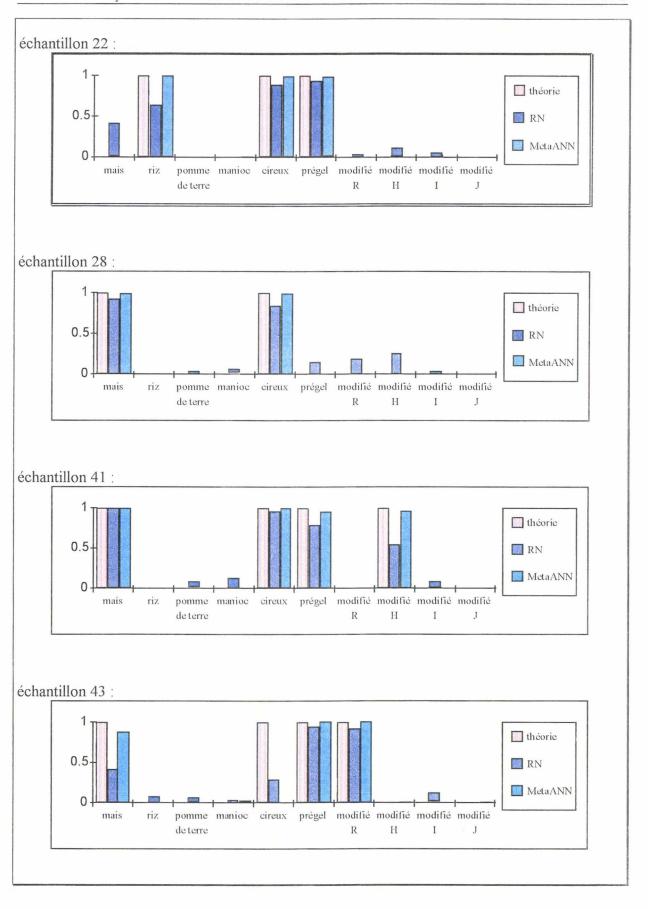


figure 70: représentation graphique des résultats des classifications supervisées PLS et réseaux de neurones (RN)

L'algorithme de régression PLS fournit en prédiction des valeurs inférieures à 0 ou supérieures à 1 (et arrondies à 0 ou 1). Pour les échantillons concernés, cela pourrait s'expliquer par des informations spectrales caractéristiques de la propriété considérée. Par exemple, si la valeur est négative, l'information spectrale est moins importante que celle des spectres utilisés pour l'étape de calibration. Ces résultats amènent à s'interroger sur l'aspect quantitatif des propriétés recherchées. Pour une modification donnée, un résultat négatif ou supérieur à 1 pourrait correspondre à un degré de modification plus faible ou au contraire plus important que la moyenne des échantillons en calibration, alors qu'un résultat très intermédiaire entre 0 et 1 pourrait s'interpréter comme une modification incomplète. Cette information pourrait être très utile pour l'utilisateur de ces amidons.

Dans le but d'améliorer davantage les prédictions, un réseau récurrent de Elman est modélisé. Pour cela, un second niveau de réseau neuromimétique est employé. Les résultats des deux réseaux (FC et FC-SC, réseaux de premier niveau) sont considérés comme entrées du nouveau réseau. L'architecture du réseau appelé MetaANN est composée de 2x10 neurones dans la couche d'entrée, 20 neurones dans la couche cachée connectés par des liens récurrents avec le même nombre de neurones de la couche de contexte et 10 neurones en sortie. Ce dernier réseau procède à des corrections d'erreur des prédictions pour augmenter la qualité de reconnaissance de l'information. Globalement, le réseau MetaANN augmente les fortes valeurs des paramètres de sortie et élimine les valeurs résiduelles des prédictions et s'avère être un outil très pratique pour sortir de la "zone d'incertitude" (appartenant à l'intervalle 0,2 - 0,7) les valeurs de prédiction (figure 71). Les résultats ne sont pas de meilleure qualité qu'avec un réseau à couches avec des liens directs (de type FC-SC). Par exemple, le caractère cireux de l'échantillon 43 n'est plus prédit, de même que la modification J de l'échantillon 78. Au contraire, l'échantillon 57 (riz natif) est reconnu comme un amidon de riz cireux. Le réseau MetaANN, à la manière d'un expert humain analyse les résultats extraits du premier niveau. Par rapport à une interprétation humaine, le raisonnement est plus transparent et ne nécessite pas de connaissances implicites sur les données.



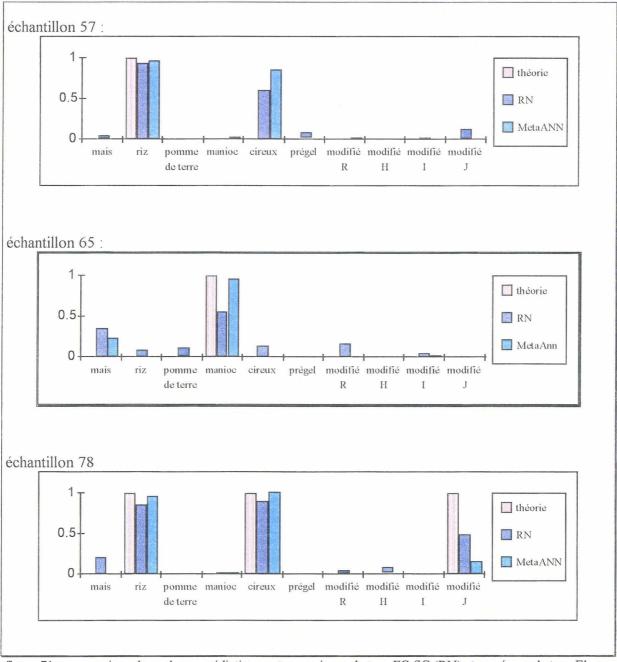


figure 71: comparaison de quelques prédictions entre un réseau de type FC-SC (RN) et un réseau de type Elman (MetaANN)

### 3.5.2.d. conclusion

L'interprétation des liens directs de plus haut poids confirme la présence d'informations linéaires dans les données spectrales en ce qui concerne la prégélatinisation, les liaisons phosphates ainsi que les groupements esters.

Les valeurs de SEP sont globalement du même ordre de grandeur pour la méthode neuronale et la méthode statistique.

## 3.6. CONCLUSION

Selon leur origine et leur constitution, les amidons confèrent aux aliments des textures et propriétés différentes. La vérification avant fabrication de la conformité par rapport au cahier des charges des nouveaux lots de matières premières est indispensable. Elle permet tout d'abord d'éviter des comportements inattendus se traduisant par des pertes du produit après fabrication mais cette vérification est également un moyen d'assurer au consommateur que les propriétés organoleptiques restent les mêmes quel que soit le lot de fabrication. Les méthodes physiques et chimiques classiques sont efficaces pour mettre en évidence la nature d'une modification mais elles sont peu fiables quand les modifications sont faibles et multiples, d'où l'utilisation de méthodes automatiques pour traiter les données analytiques. Le traitement chimiométrique des spectres d'absorption dans l'infrarouge d'une centaine d'amidons d'origine et de propriétés diverses a été menée à l'aide de méthodes non supervisées puis supervisées, en vue d'une reconnaissance de l'origine botanique (maïs (cireux), riz (cireux), pomme de terre ou manioc) et des modifications des amidons (prégélatinisé, H, R, I et J).

Les méthodes non supervisées produisent des projections où des groupes peuvent être reconnus. L'origine végétale ainsi que la propriété "prégélatinisé" sont ainsi identifiées. Pourtant, la précision atteinte est insuffisante pour authentifier complètement un échantillon. Néanmoins, ces résultats établissent les caractères significatifs qui vont servir à l'apprentissage des méthodes supervisées. Ainsi, la reconnaissance des modifications d'amidons d'origines diverses est efficace par traitement statistique ou neuronal des spectres infrarouges même si certaines prédictions sont erronées, ce qui signifie que la calibration (pour PLS) et l'apprentissage (pour les réseaux neuronaux) doivent être approfondis. La capacité pour les réseaux de neurones à généraliser les informations laisse supposer des améliorations significatives de la précision. En effet, certaines familles d'échantillons sont encore faiblement représentées et la mémorisation de leurs propriétés lors de la correction des poids des liens du réseau s'améliorera avec l'acquisition de données supplémentaires. Ce travail a fait l'objet de 3 publications (DUPUY & al., 1997, DOLMATOVA & al., VANDEERSTRAETEN & al.).

Les méthodes actuellement développées ne permettent pas l'identification de tous les amidons. Pour envisager la caractérisation des amidons de blé ou d'orge... et d'autres modifications il est indipensable d'entraîner le réseau ou le jeu de calibration avec ces échantillons. La mise en évidence d'amidons provenant du génie génétique peut être également envisagée de cette manière.

La reconnaissance est valable sur l'amidon en tant qu'ingrédient. La caractérisation des amidons présents dans des produits alimentaires complexes pourrait être envisagée après extraction préalable de l'amidon à l'aide de protocoles analytiques par purifications successives des matrices lipidiques et protéiques (CHATEL, 1997).

Le choix de la meilleure architecture ainsi que l'augmentation du nombre d'échantillons en apprentissage devraient fournir une réponse instantanée sur la nature des amidons et ainsi permettre à l'utilisateur de s'assurer de la qualité de ses matières premières.

Enfin, l'application des réseaux de neurones à l'interprétation des données issues de la spectroscopie infrarouge est peu répandue encore dans le domaine industriel et cette faisabilité de reconnaissance des amidons constitue une première approche encourageante. Toutes les possibilités offertes par les réseaux de neurones telles que le nombre de couches, le nombre de neurones par couche, les connexions autorisées... ne sont pas encore exploitées.

# CHAPITRE 4 APPORTS DE L'IRTF POUR L'ETUDE DE PRODUITS FINS

Les études précédentes ont montré que la spectroscopie IRTF permet de développer des méthodes rapides et automatisées de reconnaissance et d'appréciation de la qualité des ingrédients et des matériaux d'emballage. L'interprétation spectrale et l'attribution des bandes d'absorption permet d'étendre cette technique d'analyse à des études spécifiques. La spectroscopie IRTF peut être employée comme technique d'investigation pour mieux connaitre et comprendre les phénomènes qui interviennent pendant la fabrication de produits et au cours de leur conservation. Pour illustration deux applications sont développées.

Un produit alimentaire est composé de plusieurs ingrédients. Ces derniers sont mélangés, chauffés, broyés... selon le procédé de fabrication puis sont emballés pour conservation. Certains emballages d'origine plastique protègent efficacement les aliments de l'oxydation et des contraintes extérieures. Cependant, les matériaux ne sont pas inertes vis à vis des aliments. Certaines substances provenant de l'emballage diffusent vers le produit par des effets physico-chimiques. Par exemple, de par leur hydrophobie, les lipides favorisent le transfert d'espèces chimiques (additifs) de l'emballage vers l'aliment. La qualité d'un produit dépend de la protection que lui offre son emballage. Les apparitions d'odeurs, dues aux additifs volatils présents initialement dans les emballages et ayant migré dans les produits alimentaires, sont des problèmes à éviter sous peine de rejet par les consommateurs. Ces phénomènes sont réciproques, c'est à dire que les emballages peuvent être perméables aux constituants alimentaires. La diversité de formulations des polymères pose le problème du contact alimentaire et oblige à faire des études d'interactions spécifiques afin de mieux appréhender la compatibilité d'un aliment avec son emballage.

Le couplage du microscope à l'IRTF est applicable à l'analyse de microéchantillons et correspond bien à l'étude des polymères dont les spectres sont très caractéristiques. Afin d'approfondir les connaissances sur les interactions contenant-contenu, cette technique qui offre le moyen de mettre en évidence des imperfections et la présence de contaminants, est utilisée pour étudier un matériau d'emballage en contact direct avec une sauce blanche (à base de crème fraîche).

Au cours de la fabrication de produits finis, les contraintes subies par les ingrédients (cisaillement, température, interactions...) modifient leurs propriétés physico-chimiques et

nutritionnelles. Les matières grasses, par exemple, subissent au cours du temps et des différents procédés de fabrication des altérations de type autoxydatif. Les analyses chimiques et sensorielles, seuls moyens de vérifier la composition et la qualité des lipides, s'avèrent donc indispensables.

Le rancissement et l'oxydation des matières grasses ne sont pas quantifiables. La lipochimie (étude de la chimie des lipides) est une démarche essentielle permettant de préciser la nature des constituants présents ainsi que leurs quantités relatives. Les résultats rendent compte de l'état de fraîcheur du produit et de la présence de composés indésirables. La spectroscopie IRTF, technique rapide d'analyse fonctionnelle et de dosage, est bien adaptée à l'étude des corps gras (DUPUY & al., 1996, SAFAR & al., 1994, VAN DE VOORT(b), 1994, ISMAIL, 1993).

Les traitements technologiques de l'industrie des corps gras (raffinage, désodorisation, hydrogénation) ou des industries alimentaires (friture) soumettent les matières grasses à des températures élevées (voisines de 180°C à 250°C) et s'accompagnent d'une isomérisation cistrans des acides gras constitutionnels des lipides, majoritairement cis à l'état naturel. Or, de récentes enquêtes épidémiologiques ont démontré le rôle négatif des acides gras trans (AGt) dans le développement de maladies cardiovasculaires (MOSSOBA & al., 1993).

Une méthode rapide de quantification des AGt dans les matières premières et dans les produits finis à haute teneur lipidique est développée par traitement statistique (PLS) des données de la spectroscopie infrarouge. Elle est ensuite appliquée à l'étude comparative de matières grasses et produits finis exposés à différentes contraintes physico-chimiques afin de garantir au consommateur un équilibre nutritionnel.

## 4.1. LA MATIERE GRASSE

# 4.1.1. composition

Les matières grasses d'origines animales et végétales se trouvent dans la quasi totalité des aliments. Elles constituent une source importante d'énergie, contribuent au goût et à la texture de la nourriture. Elles constituent également un excellent support d'arôme, un véhicule pour les vitamines liposolubles (VAN DE VOORT (a) & al., 1994) et sont majoritairement composées

d'esters de glycérol (formant les triglycérides), d'acides gras (AG) et acides gras libres (AGL), de phospholipides et de stérols (EGE, 1984). Les principales différences entre les triglycérides résident dans la longueur des chaînes, la position des substitutions des acides organiques sur le squelette glycérol, le degré d'insaturation et la position des insaturations (SADEGHI-JORABCHI & al., 1991). Les acides gras peuvent être saturés, comme l'acide laurique C12:0 (12 atomes de carbone, aucune insaturation), monoinsaturés comme l'acide oléique C18:1 (18 atomes de cabone, 1 insaturation) ou encore polyinsaturés comme l'acide linoléique C18:2 (18 atomes de carbone, 2 insaturations).

Les huiles végétales (comme le tournesol) ont une concentration élevée en AG monoou poly-insaturés (KARLESKIND, 1992) (tableau 18).

	huile de	huile	huile de	huile	huile de foie	beurre
	tournesol	d'olive	maïs	d'arachide	de morue	
C16:0	5 -7 %	8 - 14 %	8 - 13 %	8 - 13 %	10 - 19 %	23 - 32 %
C18:0	4 - 6 %	3 - 6 %	1 - 4 %	3 - 4 %	2 - 4 %	13 %
C18:1	15 - 25 %	61 - 80 %	24 - 32 %	48 - 66 %	9 - 25 %	29 %
C18:2	62 -70 %	3 - 14 %	55 - 62 %	14 - 28 %	1 - 2 %	2 %

tableau 18: composition en acides gras majoritaires des matières grasses - valeurs usuelles

Le beurre et la graisse animale contiennent beaucoup d'AG saturés responsables de leur cristallisation. Les AG insaturés sont beaucoup moins stables que les saturés d'un point de vue technologique (ADRIAN & al., 1995).

Les acides gras essentiels (AGE) ne sont pas synthétisés par l'organisme mais apportés par la nourriture. Ils correspondent à l'acide linoléique 18:2 n-6 (ou  $\omega$ 6), aux acides  $\alpha$ -linoléique 18:3 n-3 (ou  $\omega$ 3) et  $\gamma$ -linoléique 18:3 n-6 (ou  $\omega$ 6) dont la formule est schématisée par le nombre de carbones sur la chaîne, le nombre de doubles liaisons et la position de la première par rapport au méthyle terminal.

# 4.1.2. phénomènes de dégradation

Sous l'influence de la lumière, de l'eau, de l'oxygène et de la température, les corps gras donnent naissance à des hydroperoxydes. Ces composés, très réactifs, se dégradent en composés aromatiques (aldéhydes ou cétones) généralement présents en faible quantité avec un seuil organoleptique très faible. Les aldéhydes sont en partie responsables de l'apparition d'odeurs rances (VAN DE VOORT (a) & al., 1994). Par exemple, les seuils de perception de l'hexanal et du pentène-1 one -3 (odeur caractéristique de poisson) sont de 0,06 et 0,003 ppm respectivement (MIN & al., 1989). La dégradation des corps gras développe non seulement une odeur mais elle se visualise également par une évolution de la coloration au cours du temps. La lumière (par la présence de rayons ultraviolets), la présence de cuivre ou de fer (catalyseurs métalliques) et la température activent l'oxydation.

L'analyse par ATR/IRTF d'huile de soja non oxydée et oxydée (à 100°C pendant 5h sous pression d'O<sub>2</sub> de 5 bars) met en évidence ces phénomènes de dégradation (figure 72). La formation d'hydroperoxydes est représentée par une bande large mais peu intense vers 3350 cm<sup>-1</sup>, l'apparition des aldéhydes et des cétones est caractérisée par un élargissement et une baisse de l'intensité de la bande vers 1740 cm<sup>-1</sup> attribuable aux vibrations C=O. L'oxydation des huiles s'accompagne d'une isomérie cis-trans d'où une augmentation de l'intensité de la bande de vibration caractéristique des doubles liaisons trans (à 967 cm<sup>-1</sup>) et une diminution de celle caractéristique des doubles liaisons cis (à 3030 cm<sup>-1</sup>).

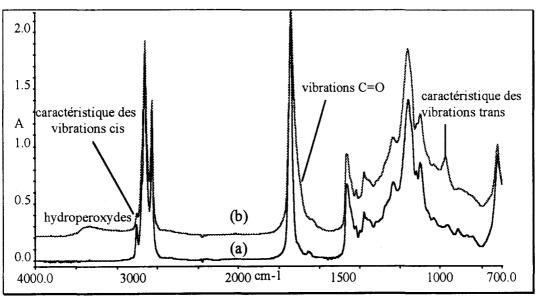


figure 72: spectres par ATR d'huile de soja avant (a) et après (b) oxydation

Les traitements thermiques pendant lesquels la matière grasse est exposée à l'humidité, à l'air et à des températures élevées, s'accompagnent inéluctablement d'attaques thermo-oxydatives. Toute matière grasse, qu'elle soit sous forme pure (graisses, huiles...) ou incorporée dans un mélange de sucres et de protéines, subit ce genre d'altérations.

L'intensité des modifications dépend de la mise en oeuvre de la matière grasse, de la durée et de la température du traitement. La dégradation est également fonction de la composition initiale de l'huile, de la présence naturelle (vitamine E) ou artificielle d'antioxydants et du degré d'insaturation.

#### 4.2. ETUDE DES INTERACTIONS CONTENANT - CONTENU

#### 4.2.1 introduction

Le conditionnement a pour objectif de préserver les propriétés qualitatives, nutritionnelles et organoleptiques d'un aliment, assurer la sécurité du consommateur et la promotion du produit. Les caractéristiques physiques liées à l'emballage et qui ont une incidence sur la conservation des aliments sont sa transparence (contre l'oxydation photochimique), sa perméabilité aux gaz (en particulier à l'oxygène) et son degré de protection vis à vis des micro-organismes et des odeurs. Il est rare qu'un matériau unique parvienne à répondre efficacement à toutes ces exigences. C'est la réunion de plusieurs matériaux sous formes de films multicouches de différentes épaisseurs (de quelques µm à 1000 µm) qui permet en général de réunir les caractéristiques désirées. Le contact direct entre l'emballage et l'aliment peut provoquer des interactions entre le contenant et le contenu ce qui aurait pour conséquence une diminution de la qualité nutritionnelle de l'aliment. Le développement de matériaux plastiques et leurs utilisations de plus en plus répandues pour l'emballage contraignent les industries agro-alimentaires à choisir scrupuleusement leurs emballages en termes de nature du polymère, épaisseur et inertie vis à vis du contenant.

Pour appréhender davantage la compatibilité organoleptique d'un aliment avec son emballage, une sauce blanche est conditionnée dans des coupelles incubées dans deux conditions de conservation distinctes. En focalisant le rayonnement infrarouge à différentes

épaisseurs de l'emballage, le couplage microscopie/IRTF permettra de mettre en évidence une éventuelle contamination du polymère par les constituants de la sauce.

#### 4.2.2. matériel et méthodes

# 4.2.2.a. le couplage microscopie - IRTF

Le microscope couplé à l'analyseur infrarouge focalise le faisceau infrarouge issu de la source sur une petite surface du matériau à analyser (généralement de l'ordre de 250 µm). Il remplace donc le compartiment échantillon du spectromètre IRTF. A la sortie de l'interféromètre, le faisceau est dévié vers l'optique du microscope. L'utilisation d'un détecteur plus sensible est indispensable pour une meilleure détectivité (MESSERSCHMIDT, 1988). Il s'agit d'un détecteur MCT (mercure cadmium tellure) refroidi à l'azote liquide.

La surface à analyser doit pouvoir être visualisée afin d'en délimiter les contours. Cette condition opératoire est possible grâce à un faisceau de lumière visible parallèle au faisceau infrarouge. L'échantillon est d'abord observé en microscopie en lumière visible pour sélectionner la surface à analyser puis le spectre infrarouge correspondant est enregistré. Un basculement des miroirs permet d'effectuer des analyses soit par transmission, soit par réflexion.

Le microscope *i-Series* ainsi que le logiciel Image sont commercialisés par la société PERKIN ELMER (figure 73). Les grandissements du binoculaire et de l'objectif sont de x15 et x6 respectivement. Les analyses par couplage microscopie/IRTF sont spécifiques et concernent les échantillons de petite taille (fibres, particules...) qui ne peuvent être analysés en IRTF classique. Cette technique est employée dans les domaines pharmaceutiques, des polymères (BUFFETEAU & al., 1996, RUAU & al., 1997, KRISHNAN, 1986) et en sciences légales (ROUX & al. 1993) pour identifier la nature d'un corps étranger, évaluer la pureté d'une poudre mais surtout caractériser les couches internes des emballages multicouches. En effet, l'analyse classique (par ATR) des films de plus de 2 couches nécessite une séparation des couches de manière mécanique ou chimique, ce qui n'est pas toujours possible. Le mode réflexion permet de réaliser des analyses ponctuelles des irrégularités de surface.

Souvent, cette technique d'analyse nécessite une préparation d'échantillon. La dimension et l'épaisseur sont étudiées pour que l'énergie atteignant le détecteur soit suffisante. Une épaisseur trop importante peut provoquer un rapport signal/bruit trop faible ou une saturation des bandes les plus intenses. Le microtome (Leica RM2145) permet de préparer des coupes transversales fines. L'épaisseur des coupes peut varier de 20 à 50 μm selon l'opacité matériau étudié au rayonnement infrarouge (GARDETTE, 1993). La diffraction de la lumière constitue également une limitation de la microscopie/IRTF. Celle-ci se traduit par une mauvaise résolution spatiale car l'énergie arrivant au détecteur contient les informations d'une surface plus grande que désirée. En infrarouge, la limite de résolution est d'environ 10 μm.

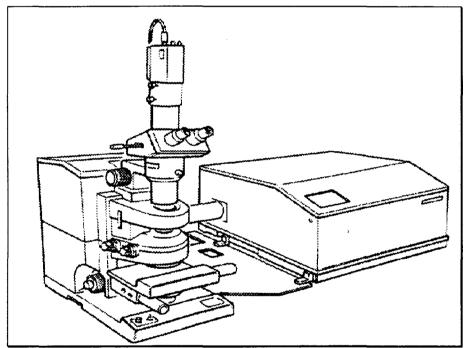


figure 73: couplage microscope-IRTF

# 4.2.2.b. le protocole expérimental

L'étude est réalisée sur des coupelles blanches et opaques en plastique de 600 µm d'épaisseur environ ayant contenu (ou non) une sauce blanche basique composée de crème fraîche (à 30% de matière grasse), de sel, d'amidon et d'eau. Pour la mise en contact du support, deux récipients sont remplis avec la sauce puis operculés de façon aseptique et incubés soit 10 jours à 40°C et 0% d'humidité relative (simulant un vieillissement accéléré), soit

2 mois à 23°C et 50% d'humidité relative. Parallèlement, deux coupelles vides sont operculées et conservées dans les mêmes conditions (figure 74). A la fin des périodes d'incubation, elles sont vidées et essuyées.

Les échantillons sont prélevés dans le fond de la coupelle puis découpés par microtomie suivant un plan perpendiculaire à la surface de contact de manière à obtenir de fines lamelles de 30 µm (suffisamment minces pour être analysées en mode transmission). L'épaisseur de la coupelle est suffisante pour permettre une découpe directe au microtome sans préparation (inclusion dans une résine).

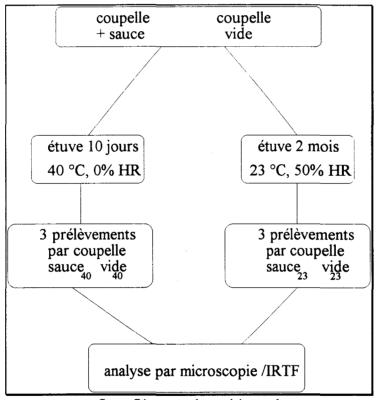


figure 74: protocole expérimental

Sur chaque coupelle, 3 prélèvements sont effectués pour vérifier l'homogénéité des résultats. Après découpe, les échantillons sont positionnés sous l'objectif du microscope pour délimiter la surface à analyser.

## 4.2.3. résultats et discussions

## 4.2.3.a. caractérisation de la coupelle

L'observation au microscope optique d'une coupe fine et régulière de 30 μm d'épaisseur met en évidence 7 couches d'épaisseurs variées (figure 75) dont deux d'adhésifs (3 et 5). L'emballage semble symétrique. Les couches externes (1 et 7) d'environ 30-35 μm d'épaisseur sont transparentes. Les couches les plus épaisses (2 et 6) mesurent entre 200 et 250 μm. Elles sont de couleur blanche mais apparaissent noires car l'observation est faite par transmission. Enfin, au centre de l'emballage multicouche, les trois films transparents (3, 4 et 5) ont des épaisseurs moyennes de 15, 35 et 15 μm respectivement.

Chaque couche, dont l'épaisseur est supérieure à la limite de résolution de l'analyse par microscopie/ IRTF (10 µm) peut être analysée par IRTF puis caractérisée à l'aide de la base de données de spectres de référence des polymères afin de s'assurer de la qualité de l'emballage. Des surfaces rectangulaires (épaisseur de la couche x 250 µm de largeur) sont enregistrées par transmission. Le nombre d'accumulations (50) permet d'obtenir des spectres de qualité suffisante pour procéder à l'identification automatique des matériaux.

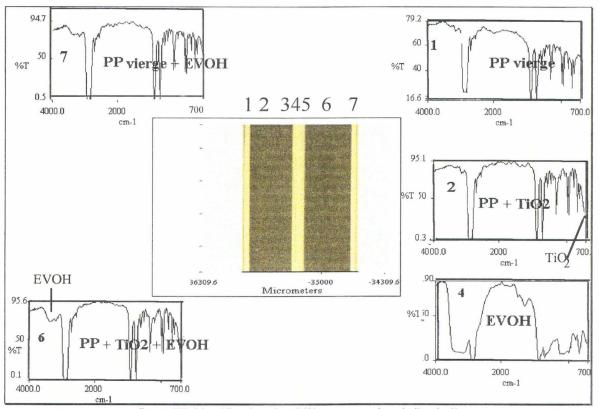


figure 75: identification des différentes couches de l'emballage

La composition n'est pas exactement symétrique. En effet, sur les couches 4, 6 et 7, les spectres présentent une bande large plus ou moins intense entre 3000 et 3500 cm<sup>-1</sup> caractéristique des vibrations OH. La recherche de la nature des matériaux en bibliothèque spectrale montre que la couche 1 est constituée de polypropylène (PP) vierge. La couche 2 est composée de PP teinté à l'oxyde de titane. Le TiO<sub>2</sub> est caractérisé par une bande intense à 700 cm<sup>-1</sup>. Au centre, le matériau de la couche 4 est de l'éthyl vinyl alcool (EVOH). Ensuite, vers l'extérieur, la couche 6 correspond à un mélange de PP teinté au TiO<sub>2</sub> et d'EVOH. Enfin, la couche 7 est composée majoritairement de PP vierge et d'un peu d'EVOH.

Le PP et l'EVOH constituent des polymères barrières à l'humidité et à l'oxygène respectivement. L'oxyde de titane, blanc, empêche le passage de la lumière et assure une meilleure conservation du contenant (CHOMON, 1992).

L'analyse par IRTF différencie la face interne de la face externe par la présence supplémentaire d'EVOH sur la face externe. Cette information, ne pouvant être obtenue par observation visuelle, est utile. En effet, la cavité de la coupelle est créée par thermoformage à partir d'une bobine, c'est à dire que cette dernière est ramollie à la chaleur pour lui donner une forme. A réception de la bobine et avant thermoformage en usine, une analyse par microscopie/IRTF d'une coupe permet de s'assurer du bon positionnement des faces.

La qualité des spectres permet de poursuivre l'étude et d'envisager une comparaison entre un emballage vide et un emballage ayant contenu un produit fini.

## 4.2.3.b. analyse des échantillons

Les spectres sont enregistrés comme précédemment par transmission dans l'intervalle spectral 4000 - 700 cm<sup>-1</sup> sur des coupes de 30 µm. L'analyse par IRTF des coupelles vides (vide<sub>23</sub> et vide<sub>40</sub>) ne met pas en évidence de différences significatives avec une coupelle témoin vide non conditionnée. Les spectres obtenus sont superposables.

L'étude comparative des 25 premiers microns (de la face interne) d'une coupelle vide (vide<sub>23</sub>) et d'une coupelle ayant été en contact avec la sauce (sauce<sub>23</sub>) met en évidence une bande fine à 1747 cm<sup>-1</sup> dans le cas où la coupelle a contenu de la sauce (figure 76).

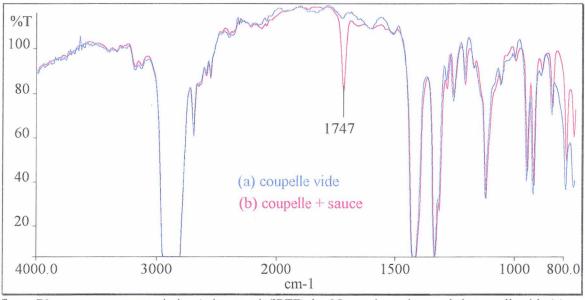


figure 76: spectres par transmission (microscopie/IRTF) des 25 premiers microns de la coupelle vide (a), en contact avec la sauce (b)

La réalisation de profils dans l'épaisseur du matériau tous les 20 µm permet de visualiser la perméation de composants de la sauce dans le matériau d'emballage (figure 77).

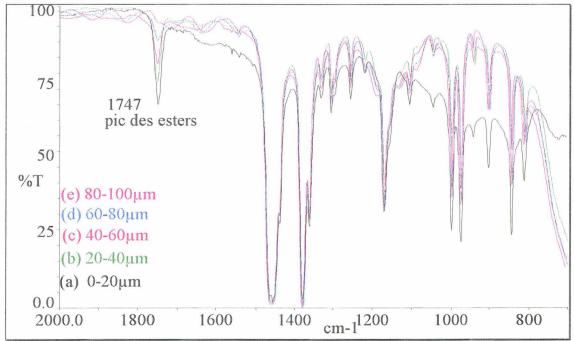


figure 77: spectres par microscopie /IRTF de l'emballage à différentes profondeurs: 0-20 μm (a), 20-40 μm (b), 40-60 μm (c), 60-80 μm (d) et 80-100μm (conditionnement 2 mois, 23°C, 50%HR)

Par comparaison avec les spectres des matières premières seules (amidon, crème fraîche), il n'a pas été possible de déterminer avec exactitude l'origine de cette bande située à

1747 cm<sup>-1</sup>. Caractéristique des esters d'acides gras, cette bande pourrait provenir de la matière grasse de la crème fraîche (figure 78). Certaines molécules des acides gras pourraient être adsorbées par le PP.

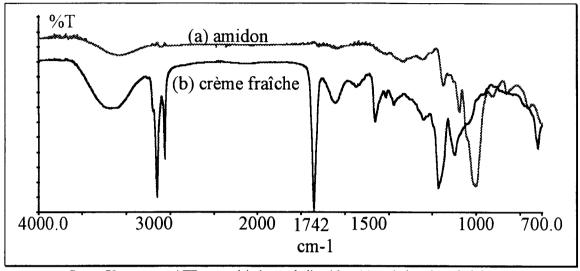


figure 78: spectres ATR caractéristiques de l'amidon (a) et de la crème fraîche (b)

Les spectres de l'emballage en contact avec la sauce sont traités mathématiquement à l'aide d'un logiciel (SIMPLISMA, MATLAB) permettant d'extraire les contributions des produits purs à partir de spectres de mélanges. Au cours du traitement, les spectres des produits purs extraits sont successivement affichés jusqu'à ce qu'il ne reste que du bruit. L'analyse est réalisée afin de connaître la nature du composé pur possédant une bande d'absorption à 1747 cm<sup>-1</sup>.

La première composante extraite (figure 79) correspond au spectre du PP. La deuxième représente à nouveau le PP avec une bande supplémentaire peu intense à 1747 cm<sup>-1</sup>.

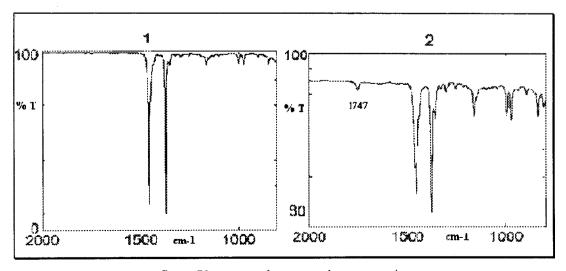


figure 79: spectres des composés purs extraits

Le traitement n'a pas extrait de spectre caractéristique de la matière grasse ni de ses différents constituants (acides gras, triglycérides...) comme composés purs et ne permet pas de connaître les molécules susceptibles d'être adsorbées par le matériau. Cependant, la matière grasse joue un rôle non négligeable dans les interactions entre la sauce blanche et la coupelle car en son absence, aucune bande n'est observée à 1747 cm<sup>-1</sup>.

L'influence des conditions de conservation peut être évaluée par la pente de migration (figure 80). Celle-ci est mesurée en calculant le rapport des intensités entre les bandes situées à 1747 cm<sup>-1</sup> (variable) et à 1000 cm<sup>-1</sup> (constant et caractéristique du PP).

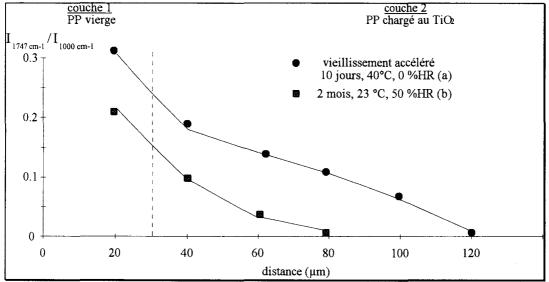


figure 80: évaluation de la profondeur de pénétration dans le PP après 10j, 40°C, 0%HR (a) et 2mois, 23°C, 50%HR (b)

Les valeurs sont plus élevées pour les coupelles incubées 10 jours que pour celles incubées 2 mois indiquant une intéraction plus importante dans le premier cas. En s'éloignant de la surface de contact, la concentration du produit migrant à l'intérieur du PP diminue progressivement. Après 2 mois, à température ambiante et en atmosphère humide, la bande d'absorption est observable jusqu'à 80 μm (couche 2). La profondeur de pénétration atteint 120μm d'épaisseur (couche 2) après 10 jours à 40 °C et en atmosphère sèche. Une coupelle supplémentaire, remplie de matière grasse, stérilisée 20 min à 110°C et analysée par microscopie/IRTF a montré que le phénomène est accentué (observable jusqu'à 190 μm en moyenne) et que la stérilisation favorise davantage l'interaction entre la matière grasse et le polypropylène.

## 4.2.4. conclusion

Le couplage par microscopie/IRTF met en évidence des interactions entre le polypropylène et la sauce blanche (et plus précisément la matière grasse) même si le PP possède une bonne tenue aux graisses. L'épaisseur de la coupelle est suffisante pour que la migration n'atteigne pas la couche d'EVOH car une interaction avec les acides gras pourrait dégrader ses propriétés physico-chimiques. La sorption d'acides gras dans le polymère, accentuée au cours du temps (puisque les conditions de conservation 40°C, 0%HR simulent un vieillissement accéléré), peut avoir pour conséquence une perte de la viscosité des aliments contenus dans ces barquettes ou encore une perte des qualités organoleptiques et nutritionnelles. Certains arômes et vitamines liposolubles ajoutés dans les aliments pourraient être entrainés par la matière grasse vers l'emballage. La spectroscopie IRTF n'étant pas assez sensible pour caractériser les interactions arômes-emballages ou antioxydants-emballages, la poursuite de l'étude sera effectuée par des techniques chimiques plus sensibles (telles que la CPG).

## 4.3. SUIVI DES AGt DANS LES MATIERES GRASSES ET LES PLATS CUISINES

# 4.3.1 les acides gras trans (AGt)

## 4.3.1.a. origine

L'oxydation, l'hydrogénation ou les effets thermiques (cyclisation) agissent sur les doubles liaisons. Ces dernières peuvent être configurées selon deux types: celles en configuration cis (2 atomes d'hydrogène sont situés du même coté de la double liaison), et celles en configuration trans (2 atomes d'hydrogène sont situés de part et d'autre de la double liaison). Le passage d'une forme isomérique à l'autre s'effectue sous l'influence photochimique ou thermique (figure 81).

H
$$C = C$$
 $h\nu,\Delta$ 
 $H$ 
 $C = C$ 
 $H$ 
isomère cis
isomère trans

figure 81: isomérisation cis-trans

Chez l'homme, les AG énorques se présentent sous forme d'isomères cis dans la plupart des cas. Les acides oléiques 18:1 sont les plus abondants et les plus répandus des acides monoéniques. Présents en proportions plus faibles, les AG insaturés en configuration trans peuvent être issus des voies métaboliques au cours de la dégradation des AG, mais ils n'ont qu'une existence fugace car ils sont immédiatement transformés en dérivés saturés.

Les apports en AGt dans l'alimentation ont 3 origines possibles (ENTRESSANGLES, 1995). Ils peuvent être formés en même temps que les acides gras cis (AGc) lors de l'hydrogénation catalytique partielle des AG insaturés des huiles végétales ou de poissons par procédés industriels. La technique d'hydrogénation catalytique partielle a pour objectif de modifier les propriétés physiques en favorisant l'augmentation du point de fusion et l'accroissement de la stabilité à l'oxydation par la formation d'AG saturés. Le catalyseur est habituellement du nickel. Le traitement à chaud (200°C) et sous pression d'hydrogène (2 à 10 atm) provoque la transformation de certaines doubles liaisons en simples liaisons en fixant de l'hydrogène sur une liaison insaturée. La diminution du nombre de doubles liaisons limite la formation d'hydroperoxyde. L'hydrogénation catalytique offre un caractère sélectif car elle tend à hydrogéner les AG les plus insaturés mais conduit à une augmentation des insaturations trans. La nature des AGt dépend des conditions d'hydrogénation (température, pression). L'hydrogénation est partielle car le traitement (utilisé pour la fabrication de la margarine par exemple) est interrompu quand les propriétés physico-chimiques sont atteintes. Généralement, les AG résultants sont saturés ou monoinsaturés, rarement polyinsaturés.

Chez les animaux ruminants, les AGt sont formés lors de l'isomérisation enzymatique et la biohydrogénation partielle des AG polyinsaturés. La réaction est catalysée de façon enzymatique par les bactéries du rumen. Ces AGt ainsi formés se retrouvent ensuite dans le lait, le beurre, les fromages et la viande.

Ces deux premiers modes d'hydrogénation (chimique ou biochimique) amènent une isomérie géométrique. L'isomérisation cis-trans implique une rotation au niveau de la double liaison faisant perdre provisoirement au carbone intéressé sa configuration sp². L'isomère trans étant plus linéaire et thermodynamiquement plus stable, sa formation est alors favorisée. Dans ces conditions, la réaction n'est pas réversible.

Enfin, la formation des AGt peut être associée au chauffage des huiles végétales à température élevée, par exemple lors de l'étape de désodorisation du raffinage de ces huiles (sous vide poussé, en présence de vapeur d'eau, à des températures entre 220 et 260°C, de quelques minutes à quelques heures) pour éliminer des substances odorantes indésirables dans les aliments ou au stade de l'utilisation ménagère (lors de fritures, à des températures proches de 160°C - 200°C). Alors que les AG insaturés résultants de l'hydrogénation catalytique sont surtout des monoènes, ceux issus des traitements thermiques sont à la fois des monoènes et des diènes et leur formation dépend des conditions opératoires.

#### 4.3.1.b. aspect nutritionnel

Les AGt sont principalement apportés à l'homme par les AG octadécénoïques (C18:1). Les AGt polyinsaturés sont faiblement représentés à l'état naturel (WOLFF & al. 1991). Biologiquement, le devenir des isomères trans dans l'organisme humain n'est pas encore totalement élucidé, mais ces isomères seraient responsables de certaines conséquences cliniques. La présence d'AGt affecte l'agrégation plaquettaire avec d'importantes répercussions sur l'incidence des maladies cardio-vasculaires. Ils peuvent participer à une diminution du cholestérol associé au HDL (high density lipoprotein) mais contribuer à l'augmentation du LDL (low density lipoprotein) (MANNION 1996, MENDY 1995, DRISS, 1994) et des risques d'athérosclérose. Toutefois, ces observations sont exclusivement attribuables aux AGt provenant des matières grasses végétales partiellement hydrogénées, aucune relation n'a encore été établie entre la consommation d'AGt provenant de matières grasses animales et les risques coronariens (STENDER & al., 1995).

Les AGE, apportés par la nourriture, sont convertis, grâce à des opérations enzymatiques, en AG à chaînes plus longues et plus saturées précurseurs de prostaglandines dont le rôle est essentiel vis-à-vis de la croissance et la maturation du cerveau (DRISS, 1994). La présence d'AGt peut inhiber ou ralentir les étapes de désaturation et d'élongation de ces AGE. Dans ces conditions, il apparaît nécessaire de limiter la consommation de matières grasses

riches en d'AGt, notamment chez les femmes enceintes et les nourrissons pour permettre un développement correct du cerveau.

Dans les aliments, les teneurs en AGt sont très variables. Les huiles végétales et de poisson contiennent naturellement peu d'AGt tandis que les graisses animales peuvent en contenir jusqu'à 11%. Les huiles fraîchement raffinées, désodorisées... ont souvent une teneur en AGt inférieure à 1% alors que certaines graisses alimentaires partiellement hydrogénées ont parfois une proportion d'AGt qui atteint 40% (KOCHHAR, 1989).

Les effets néfastes sur la santé ne concerneraient pas tous les AGt mais seulement les AGt isolés. Des tests sur des animaux montrent que les isomères d'AG conjugués (dans lesquels 2 doubles liaisons sont séparées par une liaison simple) inhiberaient le développement des cellules cancéreuses (HUNTER, 1992; VERGROESEN, 1989). Depuis quelques années, l'augmentation de la consommation en AGt s'explique par le remplacement industriel des graisses animales par des graisses végétales solidifiées. Aux Etats Unis et en France, l'apport alimentaire personnel quotidien en AGt est estimé à 8,1 g (HUNTER & al., 1991) et 2,8 g (WOLFF, 1994) respectivement. Les AGt constituent un apport essentiel mais une consommation supérieure à 5 g en AGt monoinsaturés (STENDER & al., 1995) peut s'avérer dangeureuse. Dans plusieurs pays européens, il est envisagé d'établir une réglementation avec la mention sur l'étiquetage des teneurs en AGt. Il est donc indispensable de disposer d'outils pour déterminer la teneur en insaturations trans isolées dans les matières grasses et dans les aliments.

#### 4.3.1.c. quantification des AGt par CPG

La méthode d'analyse la plus employée pour l'étude des corps gras est la chromatographie en phase gazeuse (CPG). Le principe est d'obtenir un chromatogramme représentatif des esters d'AG pour permettre une quantification de la plupart des AG dont les AGt. La méthode permet la différentiation des isomères trans et cis des AG C16:1 (9t), C18:1 (9t), (11t), (12t), (13t) et (15t), C18:2 (9t) et (12t), C18:3 (9t), (12t) et (15t) et C20:1 (11t).

La préparation de l'échantillon nécessite une extraction de la matière grasse selon la méthode Wolf Castera (5 extractions successives par hexane:isopropanol 3:2), suivie d'une

saponification des glycérides du corps gras (par soude/méthanol 0,5N) puis d'une méthylation des AG libérés (par BF<sub>3</sub> dans le méthanol). Chaque échantillon est dilué dans l'hexane et additionné de l'étalon interne C23:0.

L'appareil utilisé est un VARIAN 3300 muni d'un injecteur "split" (230°C, fuite ouverte de 33 ml/min) et d'un détecteur à ionisation de flamme. La solution hexanique (1μl) est injectée dans la colonne (CPSil 88 Chrompack, longueur 50m x 0,25mm, épaisseur 0,2μm) à une concentration d'environ 2 g/l en matière grasse.

La programmation de la colonne est la suivante: 50°C→150°C avec un gradient de 10°C/min, 150°C→220°C avec un gradient de 5°C/min, deux paliers à 190°C (20 min) et à 220°C (6 min). Le gaz vecteur est l'hélium et la pression de tête est de 30 ml/min. L'échantillon arrive ensuite dans le détecteur à ionisation de flamme, à 240°C. Les réglages des gaz sont de 3 bars et 30 ml/min pour l'hydrogène, 4 bars et 300 ml/min pour l'air comprimé.

Le traitement des données chromatographiques est effectué à l'aide du logiciel Chrom Card FISONS. Les AG sont identifiés à partir de leur temps de rétention et quantifiés par le standard interne (C23:0). La teneur en AGt (exprimée en mg / 100 mg) représente la masse de la molécule correspondante par rapport à la masse de la matière grasse. La difficulté de séparer les isomères cis et trans sur le chromatogramme (KOCHHAR & al., 1989) rend l'identification imprécise et conduit à des superpositions de bandes et des sous-estimations possibles des teneurs en AGt.

L'analyse est longue et coûteuse dans le cas où seule une estimation de la teneur en AGt est recherchée c'est pourquoi il s'avère intéressant de faire appel à la spectroscopie IRTF pour développer une méthode rapide de quantification globale des AGt.

#### 4.3.2. quantification des AGt par IRTF

#### 4.3.2.a. principe

Le principe dérive d'une méthode AOCS (American Oil Chemists' Society) mesurant par IR conventionnel les isomères trans isolés (AOAC Official Method, 1995).

Les insaturations isolées -C = C - (ou non-conjuguées) sont différenciées des insaturations conjuguées -C = C - C = C - (2 doubles liaisons séparées par une liaison simple). La teneur en insaturations trans est déterminée par une mesure de l'intensité de la bande d'absorption à 967 cm<sup>-1</sup> (caractéristique des vibrations de déformation des liaisons C-H adjacentes à la double liaison -C = C - 1). Les diènes conjugués (cis, trans) et (trans, trans) absorbent dans l'infrarouge à 983 cm<sup>-1</sup> et 988 cm<sup>-1</sup> respectivement. Et les triènes conjugués (cis, cis, trans), (cis, trans, trans) et (trans, trans, trans) absorbent quant à eux à 989 cm<sup>-1</sup>, 991 cm<sup>-1</sup> et 994 cm<sup>-1</sup> (KOCHHAR & al., 1989).

Dans cette méthode, les triglycérides et AG sont convertis en methyl esters avant analyse infrarouge par transmission. La méthylation est effectuée pour éliminer les AG libres très absorbants et responsables de phénomènes de saturation de bandes et pour minimiser les effets de superpositions de bandes des triglycérides et de la liaison trans. La teneur globale en AGt est calculée à partir d'une courbe de calibration des absorptions en fonction de la teneur en insaturations trans dans des solutions étalons (mélanges d'esters élaïdique et oléique en proportions variées). Cette méthode par IR nécessite l'utilisation d'un solvant toxique (CS<sub>2</sub>) et une préparation d'échantillons longue et coûteuse empêchant son utilisation en routine. Elle s'applique à l'analyse des matières grasses (sebedio & al., 1995).

La méthode développée par IRTF vise à quantifier les AGt avec une préparation d'échantillon plus courte et en utilisant un solvant de toxicité moindre. L'accessoire utilisé est le cristal ATR sur lequel l'échantillon est directement déposé. La relation entre la bande d'absorption et la teneur en AGt isolés est établie par chimiométrie (par régression PLS). Une fois la calibration établie, la teneur globale en insaturations *trans* isolées dans une matière grasse ou un produit à teneur lipidique élevée est déterminée en quelques minutes.

#### 4.3.2.b. acquisition de spectres

L'enregistrement du spectre d'une matière grasse sur l'intervalle 1800-700 cm<sup>-1</sup> avec une résolution de 4 cm<sup>-1</sup> est effectué après dilution de l'échantillon dans l'hexane (20 mg/ml)

La solution est énergiquement agitée sur Vortex pour une solubilisation totale. La phase aqueuse résiduelle est éliminée par décantation et ajout de sulfate de sodium.

L'échantillon (1 ml) est déposé sur le cristal ATR et l'acquisition (50 accumulations) a lieu après que l'hexane soit totalement évaporé. La possibilité d'accumuler et de moyenner plusieurs spectres en IRTF (par rapport à l'IR conventionnel) a l'avantage de minimiser le bruit et donc d'augmenter le rapport signal/bruit. Chaque analyse est répétée 3 fois et les spectres sont ensuite moyennés.

Le spectre de l'air est enregistré comme référence. Entre 2 analyses, le cristal est nettoyé à l'hexane et à l'alcool pour supprimer tout résidu de l'échantillon précédent.

A la différence de la méthode par CPG, l'estimation des AGt est basée sur une quantification des <u>doubles liaisons</u> en position trans et non sur les <u>molécules</u> possédant des doubles liaisons trans. Cela signifie par exemple que la bande d'absorption située à 967 cm<sup>-1</sup> pour un AG contenant 2 insaturations trans isolées (comme dans le C18:2) devrait être deux fois plus intense que celle de l'AG monoinsaturé correspondant. La comparaison entre les spectres de ces 2 AG (VAN DE VOORT & al., 1995) indique tout d'abord que le facteur d'intensité est d'environ 1,7 (au lieu de 2) et qu'un faible glissement de la position maximale de la bande d'absorption apparait entre le C18:1 (966,3 cm<sup>-1</sup>) et le C18:2 (967,8 cm<sup>-1</sup>). Pour les échantillons contenant des AG polyinsaturés (avec des insaturations en position trans), l'estimation de la teneur totale en AGt par méthode IRTF est ainsi légèrement surestimée par rapport à la teneur réelle.

#### 4.3.2.c. répétabilité spectrale

Le même échantillon de beurre a été analysé successivement 10 fois par la même personne, sur le même instrument selon le même protocole. Les spectres (figure 82) mettent en évidence à 967 cm<sup>-1</sup> la bande d'absorption caractéristique des vibrations trans isolées.

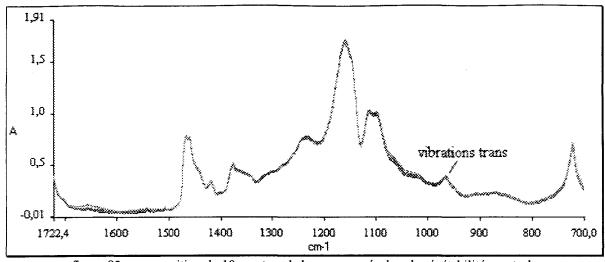


figure 82: superposition de 10 spectres de beurre pour évaluer la répétabilité spectrale

Les calculs sont effectués en mesurant les intensités à des nombres d'onde donnés. La répétabilité moyenne de la méthode d'échantillonnage calculée à 6 nombres d'onde est de 1,7%. Elle est homogène sur l'ensemble du domaine spectral étudié (figure 83 et permet d'envisager des études quantitatives avec cette technique et cette préparation d'échantillon.

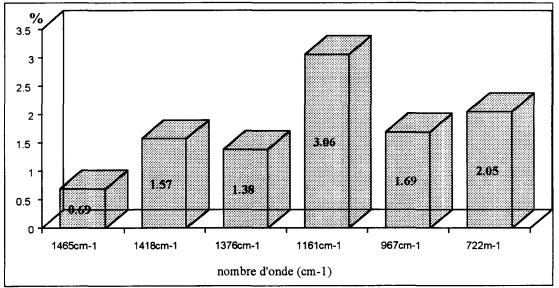


figure 83: calcul de la répétabilité de l'échantillonnage à différents nombres d'ondes

#### 4.3.2.d. échantillons standards

Les AGt étant principalement apportés à l'homme par l'acide C18:1, l'étalonnage est effectué sur des mélanges d'isomères cis et trans de l'acide oléique en proportions variables.

L'acide oléique (acide cis-9-octadécénoique ou C18:1 9c) et l'acide élaïdique (acide trans-9-octadécénoique ou C18:1 9t) sont dilués à 20mg/ml dans l'hexane. Le pourcentage d'AGt (correspondant au pourcentage d'acide élaïdique) est compris entre 0 et 35.

tableau 19: échantillons standards pour la quantification des AGt

échantillon	% trans
ag0a	0
ag2-5a	2.5
ag5a	5
ag7-5a	7.5
ag10a	10
ag15a	15
ag20a	20
ag25a	25
ag30a	30
ag35a	35

#### 4.3.2.e. calibration par PLS

Les méthodes chimiométriques comme PLS évitent d'effectuer des mesures de hauteur ou surface de pic pour établir une relation avec la teneur en AGt. Le calcul est effectué à l'aide d'un logiciel d'analyse quantitative QUANT+ sur des spectres dérivés et lissés (9 points), sur l'intervalle spectral 980 cm<sup>-1</sup> - 950 cm<sup>-1</sup>. Les meilleurs résultats sont obtenus après extraction des 2 premiers facteurs en utilisant la fonction "Full Cross Validation".

Les valeurs du coefficient de corrélation pour la droite de calibration (0,992) et du SEPc (0,93) permettent de poursuivre l'étude (figure 84).

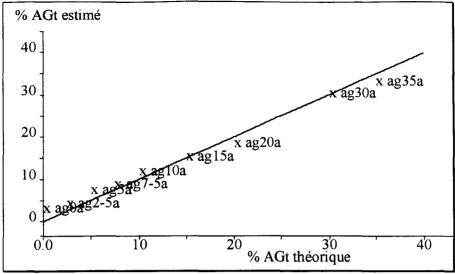


figure 84: coube de calibration des AGt obtenue par PLS pour 2 facteurs

#### 4.3.2.f. ajouts dosés

En première validation, la méthode des "ajouts dosés" est réalisée sur un échantillon de beurre dans lequel 2,5% (AD1), 5% (AD2), 10% (AD3) et 20% (AD4) d'acide élaïdique est ajouté. Chaque échantillon est analysé en triple. L'intensité de la bande d'absorption située à 967 cm<sup>-1</sup> augmente avec l'ajout d'AGt (figure 85).

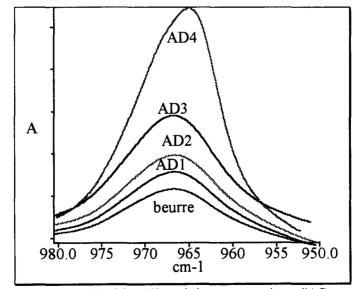


figure 85: spectres des échantillons de beurre avec ajouts d'AGt

Les estimations des teneurs en AGt déterminées par PLS sont reproductibles sur 3 prises d'essai (tableau 20).

essai 2 échantillon essai 1 essai 3 moyenne(%) AD1 7.5 7.7 7.2 7.5 9.8 AD2 9.7 9.8 9.8 AD3 15.0 14.7 14.8 14.9 24.9 24.8 AD4 24.7 24.8

tableau 20: teneurs en AGt calculés sur les ajouts dosés

Les teneurs en AGt moyennées sont représentées en fonction des ajouts d'acide élaïdique dans le beurre (figure 86). Le prolongement de la droite obtenue coupe l'axe des abscisses à 4,9. Cette valeur correspond à la teneur totale en AGt dans le beurre (4,9%).

La méthode PLS confirme d'ailleurs la proportion d'AGt dans le beurre (tableau 21).

échantillon essai 1 essai 2 essai 3 moyenne(%)
beurre 5 4.9 4.8 4.9

tableau 21: teneurs en AGt dans le beurre

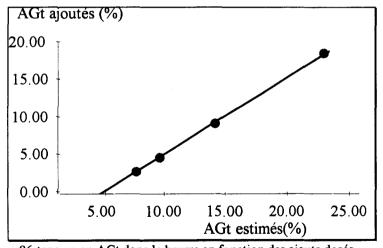


figure 86: teneurs en AGt dans le beurre en fonction des ajouts dosés

#### 4.3.2.g. validation

Quatre échantillons de matières grasses partiellement hydrogénées, provenant de différents fournisseurs et à teneur en AGt variables sont analysés simultanément par CPG et par IRTF. Le profil spectral (figure 87) met en évidence une bande d'absorption des insaturations trans d'intensités différentes selon les échantillons.

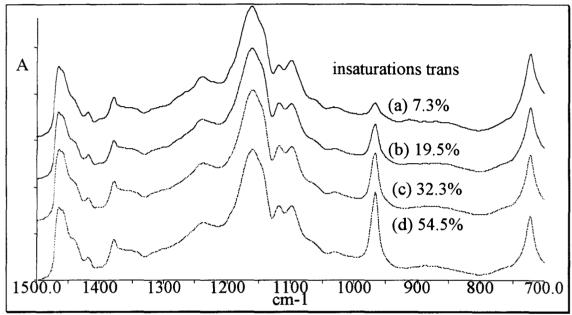


figure 87: spectres IRTF de 4 matières grasses à teneur en AGt croissantes 7,3 % (a),19,5% (b), 32,3% (c) et 54,5% (d)

La quantification en AGt est calculée pour la méthode de dosage par CPG par rapport au standard C23:0 et pour la méthode IRTF à l'aide de l'algorithme PLS (tableau 22).

Globalement, l'ordre de grandeur entre les résultats des 2 méthodes d'analyse est respecté, même pour l'échantillon (d) où l'estimation par PLS est obtenue par extrapolation.

tableau 22: estimation des teneurs en AGt par CPG et par IRTF

	résultats IRTF	résultats CPG
échantillon A	7.8 %	7.3 mg/100mg 6.51 mg/100mg de C18:1 trans 9 0.75 mg/100mg de C20:1 trans
échantillon B	24.9 %	19.5 mg/100mg 19.14 mg/100mg de C18:1 trans 11 0.26 mg/100mg de C18:2 trans
échantillon C	37.9 %	32.3 mg/100mg 28.51 mg/100mg de C18:1 trans 11 3.23 mg/100mg de C18:1 trans 12 0.47 mg/100mg de C18:2 trans
échantillon D	54.3 %	54.5 mg/100mg 39.78 mg/100mg de C18:1 trans 11 4.26 mg/100mg de C18:1 trans 12 10.07 mg/100mg de C18:1 trans 15 0.19 mg/100mg de C20:1 trans

Les 2 méthodes d'analyse (CPG et IRTF) sont complémentaires car elles n'apportent pas les mêmes informations (tableau 23).

tableau 23: comparaison entre les méthodes IRTF et CPG

méthode IRTF	méthode CPG
quantification du nombre de doubles	dosage des molécules avec des
liaisons trans	insaturations trans
estimation globale en AGt	identification des différents AGt
	(à condition qu'ils aient été étalonnés)
valeurs sur-estimées	valeurs sous-estimées

Dans les échantillons B et C, l'analyse CPG met en évidence la présence d'AGt polyinsaturés. A l'issue de l'hydrogénation catalytique partielle de ces matières grasses, il subsiste des monoènes ainsi que des diènes pouvant en partie expliquer l'écart des estimations en AGt entre les 2 méthodes pour ces échantillons.

#### 4.3.2.h. reproductibilité - limite de détection

Le même échantillon de beurre salé est analysé 10 fois par IRTF selon le même protocole, par le même opérateur sur 2 jours. Par PLS, la valeur moyenne de la teneur en AGt est de 4,84 avec un coefficient de variation (CV) égal à 2,75%. La méthode de quantification ainsi établie est reproductible.

Pour déterminer les seuils de quantification, des solutions composées d'un mélange d'acides oléique et élaïdique avec des teneurs faibles en AGt (0,1%, 0,2%, 0,5%, 1% et 2,5%) sont analysées par IRTF et quantifiées par la méthode de régression PLS. Sur 3 préparations du même échantillon, les estimations en AGt donnent des valeurs répétables quand le pourcentage en AGt est supérieur à 0,5% (tableau 24).

	essai 1	essai 2	essai 3
échantillon à 0.1%	-0.52%	-1.02%	0.23%
échantillon à 0.2%	0.1%	0.38%	-1.16%
échantillon à 0.5%	0.48%	0.52%	0.53%
échantillon à 1%	0.94%	0.92%	0.93%
échantillon à 2.5%	2.45%	2.49%	2.54%

tableau 24: estimations en AGt pour différentes analyses du même échantillon

Pour les échantillons contenant très peu d'AGt (moins de 0,5%), l'estimation est erronée et non répétable pour 3 essais consécutifs. De ce fait, le seuil de détection est évalué à 0,5% d'AGt dans la matière grasse.

#### 4.3.3. influence de la nature de la matière grasse

La matière grasse extraite sur des huiles végétales, beurres et margarines ainsi que sur des ingrédients riches en lipides est analysée par IRTF. Certains échantillons sont conjointement analysés par la méthode séparative (tableau 25).

tableau 25: estimation des teneurs en AGt sur des corps gras par CPG et par IRTF

échantillon	résultats IRTF	résultats CPG
beurre doux (81% MG)	4.27 %	3.95 mg/100mg 0.68 mg/100mg de C16:1 trans 0.35 mg/100mg de C18:1 trans9 2.19 mg/100mg de C18:1 trans11 0.20 mg/100mg de C18:1 trans 13 0.33 mg/100mg de C18:2 trans 0.20 mg/100mg de C18:3 trans
margarine (tournesol 70% MG)	0.57 %	0.46 mg/100mg 0.13 mg/100mg de C18:1trans11 0.33 mg/100mg de C18:3 trans
pâte à tartiner (40% MG)	2.56 %	2.25mg/100mg 0.25 mg/100mg de C18:1trans9 0.60 mg/100mg de C18:1trans11

Les huiles végétales riches en AG mono- et poly-insaturés contiennent très peu d'insaturations en position trans isolées. L'analyse par IRTF montre que leur proportion est généralement inférieure à 1% (tableau 26). Dans les aliments lipidiques plus complexes à base de matière grasse animale (fromages, crème fraîche...) la teneur en AGt est supérieure à celle du beurre.

tableau 26: estimation par IRTF des teneurs en AGt dans des corps gras - comparaison avec les valeurs bibliographiques

	o.oog.upqueo	
nature du corps gras	AGt	références biblio.
		(KOCHHAR & al., 1989)
huile de tournesol	0.70%	
huile de maïs	0.63%	valeurs très faibles
huile d'olive	0.75%	
huile d'arachide	0.84%	
crème fraîche	4.75%	
fromage fondu	7.1%	entre 5 et 11%
mozzarella	6.16%	

#### 4.3.4. influence de la température

Le choix d'une huile dans la préparation d'une recette dépend de plusieurs facteurs tels que les performances à la cuisson, l'arôme, le coût et aussi la stabilité à la conservation. Les modifications qui s'opèrent au sein de ces corps gras dépendent de leur nature, de la durée et du mode de chauffage (montée en température plus ou moins rapide) mais surtout de la température de chauffage. Il est important de maîtriser ces traitements pouvant conduire à des valeurs en AGt élevées.

Quatre huiles végétales commerciales (tournesol, arachide, maïs et olive) sont chauffées à 190°C pendant 2 heures. Cette valeur correspond à la température maximale d'utilisation conseillée des huiles pour friture, bien que l'huile d'olive ne soit pas une huile de friture (160°C étant la température d'utilisation conseillée). Au cours du chauffage, un échantillon d'huile est prélevé à 100°C. D'autres prélèvements sont effectués à 190°C à des intervalles de temps réguliers (t=0, 1h et 2h). La montée en température est de 20°C/min.

La variation de couleurs de ces huiles au cours du chauffage est mesurée par réflexion avec une sphère d'intégration sur Ultrascan. Les mesures sont réalisées en double afin de vérifier le bon positionnement de la cuve devant l'appareil. Les résultats (figure 88) sont donnés par un indice de clarté (noir=0, blanc=100) mais aussi des indices de jaunes et de verts (les analyses n'ont pas été totalement effectuées pour l'huile de tournesol).

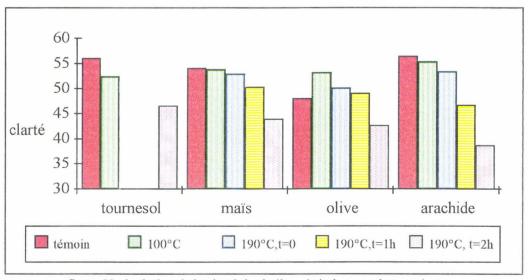


figure 88: évolution de la clarté des huiles végétales avec la température

Toutes les huiles sauf celle d'olive ont un même comportement au traitement appliqué. Au cours du temps, elles changent de couleur et l'indice de clarté diminue. Après une étape où elles deviennent plus vertes, les huiles jaunissent fortement en développant une couleur orangée surtout pour l'huile d'arachide et de façon moindre pour l'huile de maïs. L'huile d'olive est très colorée initialement. Sous l'action de la chaleur, dans un premier temps, elle s'éclaircit (l'indice de clarté augmente), verdit puis s'assombrit en devenant jaune orangé. La diminution de clarté des huiles s'accompagne d'un rancissement. L'évolution de la couleur des huiles végétales vis à vis de la température laisse supposer des modifications chimiques importantes.

Parallèlement, pour chaque prélèvement, les matières grasses sont diluées dans l'hexane puis analysées en triple par IRTF selon le protocole établi précédemment.

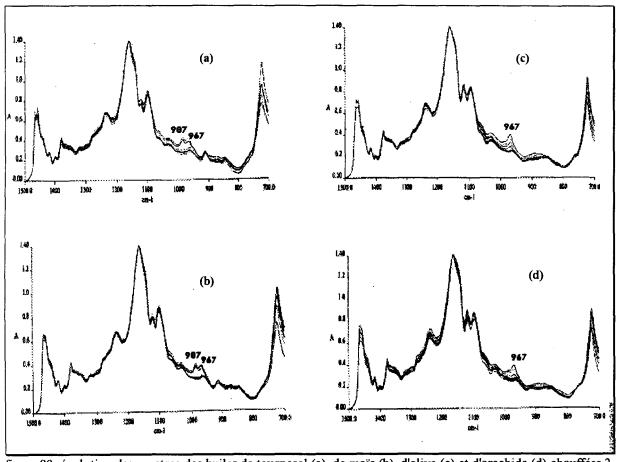


figure 89: évolution des spectres des huiles de tournesol (a), de maïs (b), d'olive (c) et d'arachide (d) chauffées 2 heures à 190°C

Les spectres de ces huiles enregistrés sur l'intervalle 1500-700 cm-1 (figure 89) indiquent que les huiles d'olive et d'arachide évoluent de la même manière. Cette analogie est mise en évidence par une augmentation de l'intensité de la bande d'absorption caractéristique des insaturations trans. Les huiles de tournesol et de maïs présentent au cours du chauffage un doublet à 967 cm-1 et 987 cm-1. Cette multiplicité de bandes pourrait correspondre à la formation de diènes conjugués trans-trans (à 988 cm-1) (kochhar & al., 1989) en même temps que les insaturations trans isolées. Les compositions en AG dans les huiles de maïs et de tournesol sont voisines avec notamment approximativement 20% d'acide oléique (C18:1) et 60% d'acide linoléique (C18:2) alors que ces proportions sont inversées dans les huiles d'olive et d'arachide. L'isomérisation cis-trans au cours du chauffage n'est pas sélective. La présence d'AG polyinsaturés conduit à la fois à la formation de doubles liaisons trans isolées et conjuguées.

La teneur en AGt est ensuite calculée à l'aide de la calibration par régression PLS (tableau 27). Les insaturations trans conjuguées ne sont pas quantifiées puisque la régression est établie sur le domaine spectral est 980 cm<sup>-1</sup> - 950 cm<sup>-1</sup> et que le maximum d'intensité de la bande d'absorption correspondante se situe à 987 cm<sup>-1</sup>.

tableau 27: influence de la température sur la formation des AGt dans les huiles végétales (en %)

	huile de tournesol	huile de maïs	huile d'arachide	huile d'olive
20°C (ambiante)	0.7	0.63	0.84	0.75
100°C	0.7	0.66	0.89	0.84
190°C t=0	0.9	0.78	0.76	0.69
190°C t=1h	1.39	1.07	1.77	2.05
190°C t=2h	1.72	1.61	2.56	2.51

Au départ et jusqu'à ce que la température atteigne 190°C, toutes les huiles ont une concentration en AGt inférieure à 1%. Ensuite, la valeur augmente progressivement même si elle diminue sensiblement à 190°C à t=0 dans les variétés arachide et olive (0,76% et 0,69 % respectivement). La diminution du nombre insaturations trans pourrait s'expliquer par une

dégradation du produit lors de l'oxydation (induite par la présence d'oxygène et une température élevée) même si la formation d'hydroperoxydes s'opère plus facilement sur les doubles liaisons en position cis.

Finalement, après 2 heures à 190°C, dans les variétés tournesol et maïs la valeur en AGt est augmentée d'un facteur 2,5. En ce qui concerne les huiles d'olive et d'arachide, les insaturations trans sont au moins 3 fois plus importantes qu'au départ. Ces résultats indiquent que le chauffage des huiles contenant une majorité d'acide linoléique conduit à la formation d'AGt conjugués et d'AGt isolés. La formation de ces derniers est moins favorisée que dans les huiles d'olive et d'arachide. Les variétés tournesol et maïs sont donc davantage conseillées pour la friture.

#### 4.3.5. influence des procédés de fabrication

Au cours de leur fabrication, les aliments surgelés sont soumis à différentes contraintes thermiques (cuissons de la pâte et de la garniture). Ces produits sont composés d'ingrédients à haute teneur lipidique (matières grasses végétales hydrogénées, matières grasses animales, crème fraîche, fromage, lardons...). La teneur en insaturations trans isolées est déterminée sur la matière grasse totale de quatre produits finis (tarte poireaux-crème fraîche, tarte aux 3 fromages, tarte oignons-jambon et quiche lorraine aux oeufs frais) après analyse par spectroscopie IRTF selon le protocole établi précédemment. Les résultats sont comparés aux valeurs théoriques calculées pour les produits équivalents avant cuisson de manière à évaluer l'influence de la cuisson sur les corps gras. Les teneurs en AGt, exprimées en pourcentage, sont relatives à la matière grasse et non au produit fini.

#### 4.3.5.a. estimation des teneurs en AGt

La valeur théorique en AGt est calculée grâce au logiciel GENESIS (sous windows) utilisé pour l'analyse nutritionnelle. Cette base de données nutritionnelle dispose de plus de 5000 ingrédients (lait, beurre, légumes, viandes...). Pour chacun des ces ingrédients, la composition, souvent non exhaustive en nutriments principaux (protides, lipides, glucides) et

micronutriments (vitamines, sels minéraux) est répertoriée. Le logiciel permet notamment de composer de nouvelles formules équilibrées. Pour certains ingrédients, les teneurs en AGt sont indiquées.

Pour accéder à la valeur théorique des insaturations trans dans un produit fini, il est nécessaire de connaître la totalité des constituants ainsi que leur proportion respective. Ensuite, le logiciel se charge de calculer la composition nutritionnelle du produit final (tableau 28). Les estimations sont effectuées à partir des ingrédients crus. L'absence des valeurs en AGt pour plusieurs ingrédients fournit une estimation théorique en AGt sous-estimée par rapport à la valeur réelle.

tableau 28: estimations théorique et expérimentale de la teneur en AGt

	valeur théorique en Agt	_
	(avant cuisson)	(après cuisson)
tarte Poireaux-Crème fraîche	13.1 %	21.8 %
tarte aux 3 Fromages	6.6 %	13.2 %
tarte Oignons-Jambon	8.4 %	13.4 %
Quiche Lorraine aux oeufs frais	7.0 %	14.4 %

Les échantillons sont broyés, décongelés et la matière grasse est extraite. Avant analyse par IRTF, la matière grasse extraite est diluée dans l'hexane selon le protocole établi précédemment. Les proportions d'AGt dans la matière grasse sont calculées par régression PLS. Par rapport aux estimations théoriques, les valeurs sont approximativement augmentées d'un facteur 2. Ce rapport entre les valeurs calculées et les valeurs théoriques est le même pour les 4 échantillons. Le facteur s'explique tout d'abord par la sur-estimation de la méthode de quantification par IRTF, par l'absence de quelques valeurs en AGt dans la base de données nutritionnelles GENESIS mais surtout par l'influence des traitements thermiques (en l'occurence les cuissons de la pâte et de la garniture). Ces résultats permettent de confirmer

aux industriels qu'après cuisson, les teneurs en AGt augmentent sensiblement dans la matière grasse (environ 1,5 fois plus élevées).

La proportion de lipides dans ces produits équivaut en moyenne à 15%. Cela signifie que la quantité d'AGt dans une part de tarte aux poireaux de 100 g par exemple, vaut 3,2 g. La consommation d'une part de ce produit suffit pour atteindre la consommation quotidienne moyenne en AGt (2,8g).

#### 4.3.6. conclusion

Du point de vue nutritionnel, la connaissance de la teneur en AGt dans les aliments est intéressante. Les résultats apportés par les méthodes chromatographique et spectroscopique ne sont pas comparables mais sont complémentaires. En CPG, l'investissement en temps et en produit est assez conséquent. Compte tenu du nombre élevé d'isomères possibles de polyinsaturés conduisant à une séparation des bandes plus délicate, les valeurs prédites sont légèrement sous-estimées. La méthode par IRTF nécessite une préparation de l'échantillon plus courte et permet une quantification rapide et globale (pas de discrimination entre les C16, C18, C20...) et les teneurs globales en AGt sont sur-estimées. Si la priorité va à la connaissance en AGt totale, l'analyse par FTIR sera préférée. Par contre, si le profil des AGt présents dans un produit est désirée, c'est une analyse par technique séparative qui sera favorisée.

#### 4.4. CONCLUSION

La connaissance de l'évolution des produits alimentaires au cours de leur fabrication ou de leur conservation revêt un intérêt considérable dans l'établissement d'une nouvelle formulation et dans la détermination de la date limite d'utilisation optimale. Le choix des ingrédients et matériaux d'emballage les plus adaptés assure au consommateur une conservation des qualités organoleptiques et nutritionnelles de l'aliment.

L'étude par couplage microscopie/IRTF met en évidence une interaction entre la matière grasse et une coupelle constituée de polypropylène. La profondeur de pénétration des corps gras s'accentue au cours du temps et pourrait entraîner éventuellement certains arômes

ou vitamines liposolubles. Le choix optimisé des matériaux d'emballage (nature, épaisseur...) grâce à la connaissance des interactions contenant-contenu constitue un enjeu technico-économique non négligeable.

Selon l'origine et donc la composition relative en AG, les corps gras ont des comportements différents lorsqu'ils sont soumis à des températures élevées. Une méthode de quantification globale des AGt isolés a été développée par IRTF. Elle est corrélée à la méthode CPG et utilisée pour l'évaluation de la présence d'AGt dans des matières premières et dans des produits finis à forte teneur en matière grasse. Cette étude a permis de noter la variabilité du pourcentage d'AGt dans les substrats analysés.

Afin d'évaluer l'influence technologique des procédés de friture, des huiles végétales commerciales ayant subi un chauffage à 190°C pendant 2 heures ont été analysées par IRTF et les AGt ont ensuite été quantifiés. L'observation du profil spectral indique que les huiles riches en acide linoléique (polyinsaturées) ont tendance à former des doubles liaisons trans conjuguées mais que ces huiles végétales possèdent une meilleure qualité nutritionnelle car elles favorisent moins la formation d'AGt que les autres huiles.

Cette étude devrait se poursuivre sur des huiles chauffées plus de 2 heures pour savoir si les teneurs en AGt continuent d'augmenter ou si elles atteignent une valeur limite. Mais aussi, la détermination des teneurs en AGt par IRTF au cours de simulations successives de fritures à 160°C (température conseillée d'utilisation) devrait permettre de contrôler la qualité des huiles et de vérifier si le nombre de friture maximum conseillé (sur l'emballage) prend en considération l'augmentation des insaturations trans. La rapidité des analyses fait de l'IRTF un outil optimal pour ces études cinétiques.

La communauté européenne envisage un étiquetage systématique des aliments à teneurs en AGt supérieure à 5 %. Dans cette perspective, les 2 méthodes (CPG et IRTF) pourront être très utiles. Par exemple, une première analyse plus rapide, par IRTF, pourra être envisagée. Les estimations étant légèrement supérieures à la réalité, une marge de sécurité avec la valeur limite est directement induite. Dans le cas où cette dernière est dépassée, une deuxième quantification en CPG informera sur la nature des insaturations.

## CONCLUSION GENERALE

Ce travail s'intègre dans le programme de recherche de sécurité alimentaire du Groupe DANONE et fait suite à l'implantation récente d'un spectromètre IRTF dans le laboratoire de biochimie du Centre de Recherche de la branche épicerie. Dans le cadre de la recherche analytique, l'objectif consistait à évaluer le potentiel de cette technique d'analyse pour caractériser les matières premières, ingrédients et matériaux d'emballage.

Les études appliquées sur des ingrédients d'origines diverses ont été développées à la demande des sociétés du Groupe et représentent un aperçu des performances de la technique appliquée au domaine agro-alimentaire. L'interprétation des spectres est facilitée par l'utilisation de méthodes chimiométriques pour traiter de façon automatique les données infrarouges. Les méthodes d'analyses quantitatives ou de classification sont spécifiques et nécessitent l'établissement d'une calibration, souvent longue, pour utiliser le modèle prédictif. Leur développement sera justifié par des analyses fréquentes.

La première partie de ce travail a consisté, par la biais d'une présentation de la spectroscopie IRTF et de ses techniques associées, à constituer une base de données de référence afin de disposer d'une méthode fiable et peu coûteuse de contrôle-qualité des échantillons à réception. Dans un premier temps, après établissement de protocoles simple, les spectres des matières premières (dérivés sucrés, vitamines pures, matières grasses...) et matériaux d'emballage (films, coupelles...) sont enregistrés en mode transmission ou réflexion. Ces spectres incrémentent une base de données spectrales. A réception, avant utilisation en fabrication, chaque nouveau lot est analysé puis son spectre est corrélé automatiquement avec celui de l'échantillon de référence. La durée approximative d'une analyse étant inférieure à la demi-heure, la méthode convient parfaitement aux analyses de routine.

La base de données de spectres de référence n'est pas limitée au contrôle-qualité des matières premières. En cours de développement de nouveaux produits, le mélange de plusieurs ingrédients ou le chauffage peuvent provoquer des phénomènes inattendus tels que la formation de « grumeaux ». Une analyse par IRTF permet d'indiquer si ces agrégats sont plutôt de nature lipidique, glucidique ou protidique. Parfois, certains corps étrangers sont identifiés avec succès à l'aide de la bibliothèque.

Après optimisation de l'échantillonnage visant à minimiser la séparation préalable à la détection des échantillons dans un mélange complexe, l'IRTF est apparue depuis quelques années comme une technique intéressante pour une expertise en ligne. Dans la deuxième partie, la quantification des vitamines B1, B2, B6 et PP dans un mélange met en évidence les performances de l'IRTF pour le dosage de composants en faibles proportions (les vitamines B1, B2 et B6 représentant moins de 1 % du produit). Le traitement des spectres ATR à l'aide de l'algorithme PLS conduit à des erreurs inférieures à 10 % par comparaison aux valeurs de référence. La méthode est spécifique mais peut être reproduite, sur le même principe, sur d'autres variétés de mélanges multivitamines. Il suffit pour cela d'établir une calibration encadrant les concentrations de vitamines à quantifier.

Dans une troisième partie, les réseaux neuromimétiques sont appliqués à la reconnaissance des amidons d'origines végétales (4 variétés) et de modifications diverses (6 propriétés). En effet, pour chaque modification, il existe une méthode d'analyse spécifique et quand les modifications sont multiples, la mise en évidence de chacune devient difficile. En vue d'une bonne répétabilité spectrale, indispensable à toute analyse chimiométrique, les spectres d'amidons sont enregistrés par ATR. Actuellement, les résultats sont encourageants et comparables à ceux des méthodes statistiques même si les méthodes non supervisées ne sont pas suffisantes pour caractériser l'ensemble des amidons. Toutes les capacités des méthodes neuronales supervisées sont encore loin d'être exploitées et laissent supposer l'obtention d'une meilleure précision après acquisition d'un nombre plus important de données.

Cette méthode pourrait être élargie à la caractérisation d'autres variétés d'amidons (blé, orge...) ainsi qu'à d'autres modifications pour ainsi disposer d'une méthode complète de reconnaissance des amidons.

Cette technique d'analyse n'est pas employée uniquement pour des analyses en contrôlequalité. Quand les échantillons sont de petite taille et difficiles à analyser par IRTF, le couplage avec la microscopie est utilisé. Ainsi, cette quatrième partie est illustrée par une identification des couches internes des matériaux d'emballage multicouches et une mise en évidence des modifications localisées du matériau. En effet, l'étude comparative d'une coupelle en plastique en contact avec une sauce met en évidence une interaction avec la matière grasse. Lors de la mise au point d'un nouveau produit, pour limiter les pertes des propriétés organoleptiques et nutritionnelles (liées aux arômes et aux vitamines liposolubles susceptibles d'être entraînés avec la matière grasse), ce phénomène devra être pris en considération en choisissant, par exemple, un matériau d'emballage approprié ou en augmentant la concentration initiale en vitamine ou en arôme.

Enfin, la spectroscopie est une technique d'analyse adaptée à l'étude des matières grasses dont les informations sont complémentaires à celles obtenues par chromatographie en phase gazeuse. Dans la quatrième partie, après calibration par régression PLS sur des spectres enregistrés par ATR, l'IRTF devient un outil simple et rapide de quantification globale de la teneur en insaturations trans dans les matières grasses. Les AGt, dont une consommation trop importante pourrait être néfaste sur la santé, sont quantifiés dans des huiles végétales chauffées à différentes températures et dans des produits finis (riches en matières grasses). Cette étude montre l'influence non négligeable des traitements thermiques sur leur évolution et peut aider, pour élaborer une nouvelle formulation, à choisir un corps gras en fonction du procédé de fabrication qu'il va subir.

Sur le même modèle, la mise au point d'une méthode de quantification des insaturations cis permettrait d'accéder à la teneur totale en insaturations (cis et trans). De même, le développement de méthodes de dosages du degré d'insaturation et de l'indice de peroxyde fournirait une connaissance générale de la matière grasse à partir d'un seul spectre.

En association avec des méthodes chimiométriques, moyennant le développement d'une méthode spécifique parfois longue, elle offre la possibilité de caractériser qualitativement et quantitativement une large gamme de produits. Ainsi, une autre méthode d'analyse quantitative a été développée suite à une étude récente (REJAEI & al., 1996) montrant la faisabilité de l'IRTF pour déterminer, par transmission, la teneur en caséines et protéines sériques dans des laits reconstitués. En modifiant la préparation de l'échantillon (enregistrement par transmission sur

extrait sec), une méthode de détermination de la concentration de ces deux constituants a été établie sur le lait écrémé. Les résultats sont satisfaisants, le dosage est reproductible et les erreurs sont de l'ordre de 3 à 5 % par rapport à la méthode traditionnelle de dosage des fractions de protéines (méthode Kjeldhal). L'échantillonnage est en cours d'optimisation pour améliorer la précision. A terme, cette méthode plus simple et plus rapide, surtout pour l'analyse de grandes séries d'échantillons, pourrait remplacer la méthode classique.

L'établissement de classifications statistiques ou neuronales peut être envisagé dans d'autres domaines. Sachant que certaines souches bactériennes sont pathogènes, il paraît intéressant de pouvoir les caractériser rapidement et de façon automatique. Une discrimination à l'aide de ces méthodes à partir de leur spectre infrarouge pourrait être judicieuse.

La spectroscopie IRTF, notamment après couplage avec la microscopie, est une technique d'investigation intéressante pour caractériser les matériaux d'emballage. Les modifications éventuelles qui apparaissent au cours de la stérilisation et dans le temps pourraient être suivie de cette manière.

Bien que souvent moins sensible que certaines techniques d'analyses déjà implantées dans le laboratoire, la spectroscopie IRTF nécessite peu d'échantillon et a l'avantage d'être non destructive. La préparation d'échantillon simple et la rapidité de l'analyse ne sont pas négligeables pour des études cinétiques où les informations extraites sont complémentaires aux autres techniques d'analyse.

L'ensemble de ces travaux montre que les applications de la spectroscopie IRTF en agro-alimentaire sont variées et que, moyennant un échantillonnage adapté, cette technique conduit à des résultats compétitifs tant sur le domaine qualitatif que quantitatif.

DEFENEL FOR DIDI IOON . See	
REFERENCES BIBLIOGRAPHIOUE	C

#### 1 - J. ADRIAN, J. POTUS, R. FRANGNE

La science alimentaire de A à Z

Tec & Doc. Lavoisier, 19

### 2 - A.S. BARROS, M. SAFAR, M.F. DEVAUX, P. ROBERT, D. BERTRAND, D.N. RUTLEDGE

Relation between mid infrared and near infrared detected by analysis of variance of an intervalle data matrix

Appl. Spectrosc., 1997, 51, 1384-1391

#### 3 - B. BECCARD

Analyse quantitative de données en spectrophotométrie infrarouge par la méthode des moindres carrés

Analusis, 1987, 15, 25-30

#### 4 - V. BELLON, J.L. VIGNEAU, F. SEVILLA

Infrared and near infrared technology for the food industry and agricultural uses : on lines applications.

Food Control, 1994, 5, 21-26

#### 5 - V. BELLON-MAUREL, C. VALLAT, D. GOFFINET

Quantitative analysis of individual sugars durind starch hydrolysis by FTIR/ATR spectrometry. Part I: multivariate calibration study- repeatability and reproducibility

Appl. Spectrosc., 1995, 49 556-562

#### 6- B. BOURSIER

Applications alimentaires des amidons

Ind. Agr. Alim., 1994, sept., 1-11

#### 7 - E.G. BRAME Jr, J.G.GRASSELLI

Infrared and Raman spectroscopy.

Ed. Marcel DECKER, N.Y. 1977, 1, 715p.

#### 8 - P.J BRIMMER, P.R. GRIFFITHS

Angular dependance of diffuse reflectance infrared spectra - part II: effect of polarization Appl. Spectrosc., 1987, 41, 791-797

#### 9 - T. BUFFETEAU, B. DESBAT, D. EYQUEM

Attenuated total reflection Fourier transform infrared microspectroscopy: theory and application to polymer samples

Vib. Spect., 1996, 11, 29-36

#### 10- A. BULEON, P. COLONNA, V. LELOUP

Les amidons et leurs dérivés dans les industries des céréales

Ind. Agr. Alim., 1990, 515-532

#### 11 - T. BURGER, J. KUHN, R. CAPS, J. FRICKE

Quantitative determination of scattering and absorption coefficients from diffuse reflectance and transmittance measurements: application to pharmaceutical powders **Appl. Spectrosc.**, 1987, 51, 309-317

#### 12 - T. BURGER, H.J. PLOSS, J. KUHN, S. EBEL

Diffuse reflectance and transmittance spectroscopy for the quantitative determination of scattering and absorption coefficients in quantitative powder analysis **Appl. Spectrosc.**, 1997, 51, 1323-1329

#### 13 - D.A. BURNS, E.W. CIURCZAK

Handbook of Near infrared analysis

Ed. Marcel DECKER, NY, 1992

# 14 - F. CADET, D. BERTRAND, P. ROBERT, J. MAILLOT, J. DIEUDONNE, C. ROUCH Quantitative determination of sugar cane sucrose by multidimensional statistical of their mid-infrared attenuated total reflectance spectra

Appl. Spectr., 1991, 45, 166-172

#### 15 - Y. CHAMPENOIS

Compréhension de la gélatinisation et de la gélification de l'amidon dans les produits céréaliers de cuisson humide

Thèse de doctorat, Faculté des Sciences et Techniques - Université de Nantes, 1994

#### 16 - S. CHATEL

Identification et dosage de biopolymères saccharidiques dans des matrices complexes Thèse de doctorat, Faculté de Droit, d'Economie des Sciences d'Aix-Marseille, 1997

#### 17 - P. CHOMON

L'emballage souple dans l'agro-alimentaire

Emballages Magazine, 1992, 383p.

#### 18 - P. COLONNA

Rapport final de l'étude des amidons modifiés physiquement et chimiquement document interne CREALIS, non diffusé, 1996, 35p.

#### 19 - article collectif

DACS technical Report: How artificial neural network are being used http://www.utica.kaman.com//techs/neural/neural12.html, 1998, 20p.

#### 20 - M. DEFERNEZ, E.K. KEMSLEY, R.H. WILSON

Use of infrared spectroscopy and chemometrics for the authentication of fruit purees J. Agric. Food Chem., 1995, 43, 109-113

#### 21 - F. DE LENE MIROUZE

Analyse quantitative en spectrométrie moyen infrarouge par transformée de Fourier: perspectives d'application dans le domaine agro-alimentaire

Thèse de doctorat, Université des Sciences et Techniques de Lille, 1992

#### 22 - G.J. DEMENNA

Culinary spectoscopy - FTIR analysis of cooking and cuisine **Spectroscopy**, 1989, 4, 10-15

- 23 M.F. DEVAUX, P. ROBERT, A. QANNARI, M. SAFAR, E. VIGNEAU Canonical correlation of mid and near infrared oil spectra Appl. Spectrosc., 1993, 47, 1024-1029
- 24 L. DOLMATOVA, C. RUCKEBUSH, N. DUPUY, J.P. HUVENNE, P. LEGRAND Identification of Modified Starches Using Infrared Spectroscopy and Artificial Neural Network Processing

Appl. Spectrosc., 1998, 52, à paraître

25 - J.P. DOUCET, A. PANAYE, E. FEUILLEAUBOIS, P. LADD Neural Networks and 13C NMR shift prediction J. Chem. Inf. Comput. Sci., 1993, 33, 320-324

26 - F. DRISS

"Position actuelle des acides gras trans"

Colloque GRNV - GRENUC, 18 octobre 1994, Marseille (FRANCE)

27 - B.R. DUMAS, R. GRAPPIN Milk protein analysis Le lait, 1989, 69, 357-416

28 - N. DUPUY, M. MEURENS, B. SOMBRET, J.P. HUVENNE, P. LEGRAND Determination of sugars and organic acids in fruit juices by FT mid-IR investigation of dry extract

Appl. Spectrosc., 1992, 46, 5, 860-63

- 29 N. DUPUY, J.P. HUVENNE, B. SOMBRET, P. LEGRAND Quantitative analysis by mid-infrared spectrometry in food and agro-industrial fields J. Mol. Struct., 1993, 294, 223-226
- 30 N. DUPUY, L. DUPONCHEL, B. AMRAM, J.P. HUVENNE, P. LEGRAND Quantitative analysis of latex in paper coatings by ATR-FTIR spectroscopy J. Chem., 1994, 8, 333-347
- 31 N. DUPUY, J.P. HUVENNE, L. DUPONCHEL, P. LEGRAND Classification of green coffees by FTIR analysis of dry extract Appl. Spectr., 1995, 49, 580-585
- 32 N. DUPUY, L. DUPONCHEL, B. SOMBRET, J.P. HUVENNE, P. LEGRAND Classification of edible fats and oils by principal component analysis of Fourier transform infrared spectra

Food Chem., 1996, 57, 245-251

#### 33 - S. EGE

Organic chemistry

Health International Edition, Toronto, 1984

#### 34 - J.L. ELMAN

Finding structure in time

Cognitive Science, 1990, 14, 179-211

#### 35 - B. ENTRESSANGLES

Isomères trans d'acides gras insaturés : aspects métaboliques et nutritionnels

Oléag. Corps gras & Lipides, 1995, 3, 2

#### 36 - J. FAHRENFORT

Attenuated total reflexion: a new principle for the production of useful infrared reflection spectra of organic compounds

Spectrochim. Acta, 1961, 17, 698-709

#### 37 - M. FEINBERG

La validation des méthodes d'analyse - une approche chimiométrique de l'assurance qualité au laboratoire

Sciences de l'ingénieur, Masson, 1996, 397p.

#### 38 - B. FORREST, L. COVE

Identification and quantification of hydroxypropylation of starch by FTIR Starch/Stärke, 1992, 44, 179-183

#### 39 - M.P. FULLER, P.R. GRIFFITHS

Diffuse reflectance measurements by infrared Fourier transform spectrometry Anal. Chem., 1978, 50, 1906-1910

#### 40 - M.P. FULLER, G.L. RITTER, C.S. DRAPER

Partial least squares quantitative analysis of infrared spectroscopic data.

Part I. Algorithm implementation.

Appl. Spectrosc. 1988, 42, 217-27

#### 41 - J.L. GARDETTE

Microspectrophotométrie IRTF: application à l'analyse du vieillissement des polymères Analusis Mag., 1993, 21, 17-21

#### 42 - J. GASTEIGER, J. ZUPAN

Neural network in chemistry

Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 1993, 32, 503-527

#### 43 - D.M. HAALAND

Multivariate least squares methods applied to the quantitative spectral analysis of multicomponent samples

Appl. Spectr., 1985, 39, 73-84

#### 44 - D.M. HAALAND, E.V. THOMAS

Partial least squares methods for spectral analysis. I relation to other quantitative calibration methods and the extraction of qualitative information.

Anal. Chem., 1988, 60, 1193-202

#### 45 - M. HANSSEN

E comme additifs - produits chimiques au menu Flammarion, 1987, 158p.

#### 46 - N.J. HARRICK

Total internal reflection and its application to surfaces studies

Ann. N.Y. Acad. Sci., 1963, 101, 928-959

#### 47 - D.M. HEMBREE, H.R. SMYRL

Anomalous dispersion effects in diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy: a study of optical geometries

Appl. Spectr., 1989, 43, 267-274

#### 48 - J.E. HUNTER, T.H. APPLEWHITE

Reassessment of trans fatty acids availability in the US diet

Am. J. Clin. Nutr, 1991, 54, 363-369

#### 49 - J.E. HUNTER

Safety and health effects of isomeric fatty acids

Fatty acids in food and their health implications, 1992, 857-868

#### 50 - T. ISAKSSON, T NAES

The effect of multiplicative scatter correction and linearity in NIR spectroscopy Appl. Spectr., 1988, 42, 1273-1284

#### 51 - A.A. ISMAIL, F.R. VAN DE VOORT, G. EMO, J. SEDMAN

Rapid quantitative determination of free fatty acids in fats and oils by Fourier transform infrared spectroscopy

J. Am. Oil Chem. Soc., 1993, 70, 335-341

#### 52 - R.J. JACOBSEN

Application of FTIR to surfaces studies

FTIR Spectroscopy applications to chemical systems, N.Y. Acad. Press, 1979, 2

#### 53 - A. KARLESKIND

Manuel des corps gras

Tec. & Doc., Lavoisier, 1992

#### 54 - S.P. KOCHHAR, J.B. ROSSELL

Application of infra-red absorption spectroscopy in food industry **Spectroscopy**, 1989, 4, 34-40

#### 55 - T. KOHONEN

Self-organization formation of topologically correct feature maps **Biological Cybernetics**, 1982, 59-69

#### 56 - T. KOHONEN

Self-organizination and associative memory

Springer-Verlag, Berlin FRG, third ed., 1989

#### 57 - K. KRISHNAN

Application of the FTIR microsampling technique to some polymers systems

SPIE - Optical techniques for industrial inspection, 1986, 252-257

#### 58 - K. KRISHNAN, S.L. HILL

FT-IR microsampling techniques

BioRad Digilab Division, 1990, 73, 165p.

#### 59 - J.U. KRISTOTT, S. REDDY, C.W. THANE, J.B. ROSSELL, M.R. FARMER

Trans fatty acids in frying and fried foods

The British Food Manufacturing Industries Research Association, 746, research reports 1997, 746, 53p.

#### 60 - P. KUBELKA, F. MUNK

Ein Beitrag zur Optik der Farbanstriche

**Z. Tech. Phys.,** 1931, 12, 593-601

#### 61 - Y.W. LAI, E.K. KEMSLEY, R.H. WILSON

Potential of Fourier transform infrared spectroscopy for the authentication of vegetable oils J. Agric. Food Chem., 1994, 42, 1154-1159

#### 62 - B.S. LANHER

Quantitative analysis of agricultural and foods products: a new instrumental and computerized approach

J. Am. Oil Anal. Int., 1992, 75, 18-25

#### 63 - P. LANTERI, R. LONGERAY

Chimiométrie: le mariage réussi entre les sciences analytiques et l'informatique Analusis, 1996, 24, 17-27

#### 64 - F. LE CORRE, P. DUBROSSET, M. PINEL

Les applications industrielles et potentielles des infrarouges en agro-alimentaire Effet du séchage infrarouge sur la stabilité des vitamines **ADRIA**, synthèse biblio., 13 fév, 1987, 73p.

#### 65 - J. LE GRUSSE, B. WATIER

Les vitamines - Données biochimiques, nutritionnelles et cliniques

Centre d'étude et d'information sur les vitamines, 1993, 303p.

#### 66 - A. LORBER, B.R. KOWALSKI

Alternatives to cross validation estimation of the number of factors in multivariate calibration **Appl. Spectr.,** 1990, 44, 1464-1470

#### 67 - B.J. Mc GRATTAN, D.W. SCHIERING, R.A. HOULT

Infrared spectral discrimination: the use of a filtering correlation function for materials characterization

Spectroscopy, 1989, 4, 39-42

#### 68 - MANDANIS

Identification des constituants des emballages Analusis, 1993, 21, 22-26

#### 69 - P. MANNION

Trans isomers, an end to fear?

The world of ingredients, 1996, 8-9

#### 70 - H. MARTENS

Factor analysis of chemical mixture

Anal. Chim. Acta, 1979, 112, 423-42

#### 71 - H. MARTENS, T. NAES

Multivariate calibration

Ed. John Wiley & Sons, 1989, 419p.

#### 72 - F. MENDY

L'essentiel du programme nutrition du 86e Congrès annuel de l'AOCS Oléag. Corps gras & Lipides, 1995, 4, 2

#### 73 - P MENEZ

La spectroscopie infrarouge

Analusis, 1987, 15, LXI -LXVI

#### 74 - R.G. MESSERSCHMIDT, M.A. HARTHCOCK

Infrared microspectroscopy. Theory and applications

Ed. Marcel DECKER, N.Y. 1988, 6, 282p.

#### 75 - Méthode AOAC 994.14

Teneur en acides gras trans isolés dans les matières grasses partiellement hydrogénées

AOAC Official Methods of analysis, oils and fat, 1996

- 76 Méthodes CREALIS de dosage des vitamines B6
- 77 Méthode ISO TC/93 WG3, 2nd, 1995
- 78 Méthodes officielles de dosage des vitamines B1 et B2 dans les produits diététiques et de régime
- **J. Off. Rép. Fr.,** 25 novembre 1987, 13714-13715

#### 79 - Méthode AOAC 994.13

Méthodes de dosage des vitamines PP dans les produits diététiques et de régime AOAC Official Methods of analysis, vitamins, 1990

#### 80 - M. MEURENS, G. ALFARO, G.S. BIRTH

Liquid analysis by dry extract near infrared on fiberglass

Appl. Spectrosc., 1990, 44, 979-986

#### 81 - D.B. MIN, T.H. SMOUSE

Flavor chemistry of lipids food

Am. Oil Chem. Soc., Illinois, 1989

#### 82 - G.A. MITCHELL, M.J. VANDERBIST, F.F. MEERT

Gas liquid chromatographic determination of adipate content of acetylated di-starch adipate J. Off. Anal. Chem., 1982, 65, 238-240

#### 83 - K. MORADI

Spectrométrie de réflexion diffuse en infrarouge moyen: apports à l'analyse des poudres et des interfaces

Thèse de doctorat, Université des Sciences et Techniques de Lille, 1993

#### 84 - M.M. MOSSOBA, R.E. McDONALD, A.R. PROSSER

GC/Matrix Isolation/FTIR spectroscopic determination of trans monounsaturated and saturated fatty acid methyl esters in partially hydrogenated menhaden oil

J. Agric. Food Chem., 1993, 41, 1998-2002

#### 85 - P. MUHRBECK, E. SVENSSON

Annealing properties of potato starches with different degrees of phosphorylation Carbohydr. Res., 1996, 31, 263-267

#### 86 - H.E. MUNK, M.S. MADISON, E.W. ROBB

The neural network as a tool for multispectral interpretation

J. Chem. Inf. Comput. Sci., 1996, 36, 231-238

#### 87 - Parlement Européen et Conseil de l'Union Européenne

Directives 95/2/CE relative aux additifs alimentaires autres que les colorants et les édulcorants J. Off. Comm. Eur., 1995, 3

#### 88 - A.R. RAJAEI, M. GUPTA, A.A. ISMAIL, F.R. VAN DE VOORT

Direct determination of casein/whey ratio in milk by FTIR spectroscopy extended abstract - résultats non publiés, 1996

#### 89 - D. RICARD, C. CACHET, D.CABROL BASS, T.P. FORREST

Neural Network approach to structural feature recognition from infrared spectra

J. Chem. Inf. Comput. Sci., 1993, 33, 202-210

#### 90 - C. ROUX, C. CHAMPOD, W.D. MAZZELA, C.J. LENNARD

Quelques applications de la microscectrométrie infrarouge à transformée de Fourier en sciences forensiques

Analusis Mag., 1993, 21, 27-30

#### 91 - O. RUAU, P. LANDAIS, J.L. GARDETTE

Quantitative analysis of powdered organic matter by transmission infrared microspectroscopy using a diamond-window compression cell **Fuel**, 1997, 76, 645-653

## 92 - H. SADEGHI-JORABCHI, R.H. WILSON, P. BELTON, J.D.E. WEEB, D.T. COXON Quantitative analysis of oils and fats by Fourier transform Raman spectroscopy Spectrochim. Acta, 1991, 47A, 1449-1458

# 93 - M. SAFAR, D. BERTRAND, P. ROBERT, M.F. DEVAUX, C. GENOT Characterisation of edible oils, butters and margarines by Fourier transform infrared spectroscopy with attenuated total reflectance J. Am. Oil Chem. Soc., 1994, 71, 371-377

#### 94 - T.A.B. SANDERS

Essential and trans-fatty acids in nutrition

Nutr. Res. Rev., 1988; 1, 57-78

#### 95 - A. SAVITZKY, M.J.E. GOLAY

Smoothing and differentiation of data by simplified least squares. Procedures.

Anal. Chem., 1964,, 96, 1624-1679

#### 96 - J.L. SEBEDIO, E.G. PERKINS

New trends in lipid and lipoprotein analyses

Am. Oil Chem. Soc. Press, 1995, 378p.

#### 97 - H. SONG, S.R. DELWICHE, Y.R. CHEN

Neural network classification of wheat using single kernel near-infrared transmittance spectra **Opt. Eng.**, 1995, 34, 2927-2934

#### 98 - T. SOUCCAR, J.P. CURTAY

Le nouveau guide des vitamines

Ed. Seuil, 1996, 445p.

#### 99 - PERKIN ELMER

Spectrum for Windows, manuel de référence, version 1.50, 1997

#### 100 - PERKIN ELMER

Spectrum Quant+, manuel de référence, version 4.00 P.E, 1997

# 101 - S. STENDER, J. DYERBERG, G. HOLMER, L. OVESEN, B. SANDSTRÔM The influence of trans-fatty acids on health: a report from Danish Nutrition Council Clin. Sci., 1995, 86, 375-392

#### 102 - F.R. VAN DE VOORT

Fourier transform infrared spectroscopy applied to food analysis Food Res. Int., 1992, 25, 397-403

103 - F.R. VAN DE VOORT(a), A.A. ISMAIL, J. SEDMAN, G. EMO Monitoring the oxidation of edible oils by fourier transform infrared spectroscopy J. Am. Oil Chem. Soc., 1994, 71, 243-253

104 - F.R. VAN DE VOORT(b), A.A. ISMAIL, J. SEDMAN, J. DUBOIS, T. NICODEMO The determination of peroxide value by FTIR Spectroscopy J. Am. Oil Chem. Soc., 1994, 71, 921-926

#### 105 - F.R. VAN DE VOORT, A.A. ISMAIL, J. SEDMAN

A rapid, automated method for the determination of cis and trans content of fats and oils by fourier transform infrared spectroscopy

J. Am. Oil Chem. Soc., 1995, 72, 873-880

#### 106 - A.J. VERGROESEN

The role of fats in human nutrition

Acad. Press, 1989, 1-44

#### 107 - R.H. WILSON, B.J. GOODFELLOW, P.S. BELTON

Fourier transform infrared spectroscopy for the study of biopolymers

Food Hydrocol., 1988, 2, 169-178

#### 108 - R.L. WOLFF, J.L. SEBEDIO

Geometrical isomers of linolenic acid in low-calorie spreads marketed in France J. Am. Oil Chem. Soc., 1991, 68, 719-725

#### 109 - R.L. WOLFF

Les isomères 18:1 trans dans l'alimentation des européens. Evaluations qualitative et quantitative

Oléag. Corps gras & Lipides, 1994, 3, 209-218

#### 110 - J. ZUPAN, J. GASTEIGER

Neural networks for chemists - an introduction

Ed. VCH, 1993, 305p.

