

SPECTROMÉTRIE NIR : L'ANALYSE D'UN MIEL EN QUELQUES SECONDES



L'analyse des miels est plus que jamais à l'ordre du jour. Le prix du miel étant plus élevé que celui d'autres produits sucrants comme les sirops de sucres, l'adultération du miel avec ces produits est de plus en plus pratiquée. On constate que bon nombre de commerçants et conditionneurs demandent une analyse des miels avant de les commercialiser. Cependant, les analyses prennent du temps et peuvent être chères. Ne peut-on rêver d'un petit appareil qui réalise l'analyse des principaux éléments du miel (humidité, teneur en glucose, en fructose, en di- et trisaccharides, résidus indésirables...) en quelques secondes ? Les analyses réalisées par spectrométrie proche infrarouge ouvrent des portes très intéressantes dans ce domaine. Les premiers essais réalisés au labo du Professeur Marc MEURENS situé au sein de l'Unité de Biochimie de la Nutrition à la Faculté des Sciences agronomiques de l'UCL semblent assez prometteurs.



Prof. M. MEURENS

Depuis le début du siècle, on assiste à une évolution rapide des méthodes utilisées pour déterminer la composition et pour contrôler la qualité des aliments. Les premières, des méthodes chimiques, impliquaient l'emploi de réactifs le plus souvent dangereux ou toxiques. Dans les années cinquante, on a vu se multiplier les méthodes basées sur une séparation des éléments à analyser, suivie de leur détection (par ex. la chromatographie). Avant les années 70, il n'était donc pas possible d'analyser les aliments sans leur faire subir des réactions chimiques ou des traitements physiques. Aujourd'hui, avec la spectrométrie proche infrarouge (en anglais Near InfraRed ou NIR), on peut doser de manière rapide et non destructive, avec peu ou pas de préparation, les constituants des aliments. L'origine de cette technique remonte au début du 19^e siècle quand l'astronome William HERS-

CHEL observe pour la première fois les radiations infrarouges. Dès 1906, le scientifique COBLENZ étudie une centaine de constituants organiques et pose ainsi les bases de la spectroscopie infrarouge : il constate que le spectre infrarouge de chaque composé est comme une empreinte unique qui pourrait servir à son identification. Malgré ces découvertes et les énormes possibilités de la spectroscopie infrarouge (voir «Principe de base»), cette technique n'apparaît qu'à l'aube des années 40 dans certains laboratoires de recherche. Les premiers spectrophotomètres apparaissent sur le marché vers 1950 et se limitent à l'analyse qualitative. Plus tard, au cours des années 70, Karl NORRIS met au point l'analyse quantitative sur des produits solides et détermine en quelques secondes les teneurs en eau, en protéines et matières grasses de certains produits tels que les farines de céréales. De-

puis lors, il est courant de réaliser l'analyse qualitative et quantitative de produits tant solides que liquides ou pâteux. D'application limitée durant les premières étapes de leurs développements, les spectromètres NIR sont maintenant largement utilisés dans un grand nombre d'industries agro-alimentaires, chimiques et pharmaceutiques. Dans les industries agro-alimentaires, la spectroscopie proche infrarouge a été utilisée pour l'analyse de la composition chimique et des propriétés physiques de nombreux produits (grains, lait, jus de fruits, fourrages, viandes, aliments composés...) et pour la détection de leur adultération (MEURENS, 1995, BAETEN *et al.*, 1997). Dans la littérature, plusieurs auteurs (CHO, 1998 ; KOO, 1998 et QIU, 1999) ont étudié la composition et la qualité du miel par spectroscopie proche infrarouge. Ils rapportent que la technique NIR offre des possibilités pour le do-

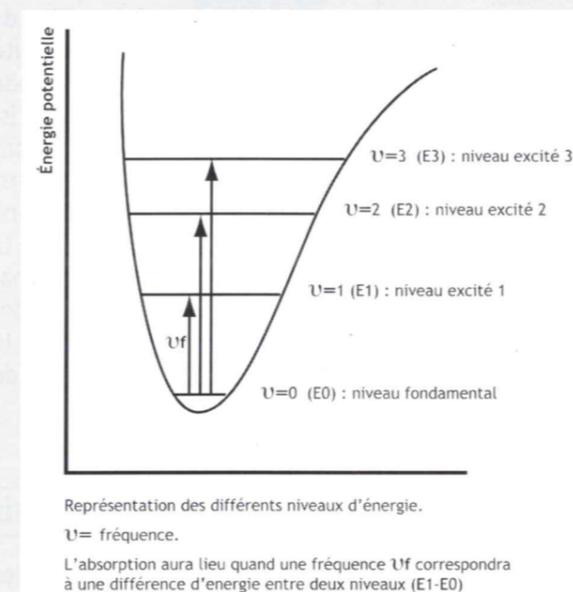
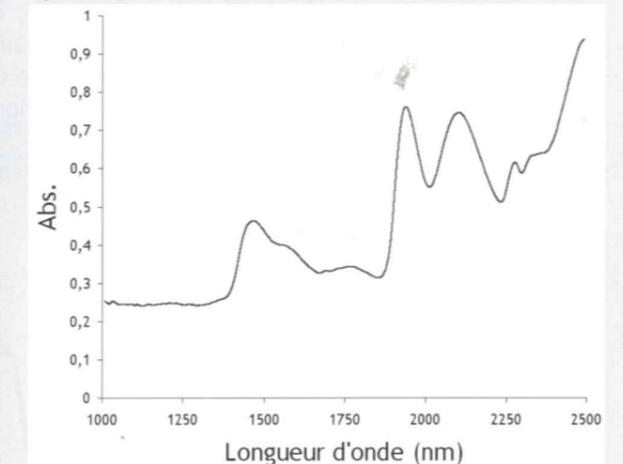
ANALYSE CHIMIQUE DU MIEL PAR SPECTROMÉTRIE PROCHE INFRAROUGE

PRINCIPE DE BASE

Toutes les molécules (eau, protéines, graisses, sucres) exposées à un rayonnement lumineux (visible mais également infrarouge et ultraviolet) absorbent son énergie sous la forme de photons. Un photon est un petit paquet élémentaire d'énergie. Chaque photon est caractérisé par une longueur d'onde ou fréquence déterminée. Les spectres du visible et du proche infrarouge correspondent aux ondes lumineuses dont la longueur est comprise entre 400 et 700 nanomètres pour le visible et entre 700 et 2500 nanomètres pour le proche infrarouge. Pour la lumière visible, l'énergie des photons non absorbés (c'est-à-dire transmis ou réfléchis) correspond à la couleur que nous voyons. L'absorption de photons par une molécule a pour effet d'exciter les mouvements de ses atomes et de les faire passer vers des niveaux supérieurs d'énergie de vibration. Il faut pour cela que la longueur d'onde du photon (quantité d'énergie apportée) corresponde exactement à l'énergie nécessaire pour faire passer les atomes à un niveau supérieur de vibration. Plus grand sera le nombre de molécules dont les atomes peuvent ainsi vibrer à des niveaux d'énergie plus élevés (à des fréquences plus grandes), plus forte sera l'absorption des photons dont la fréquence et l'énergie correspondent à ces changements de vibration. Si l'on expose un échantillon à un faisceau lumineux, l'énergie absorbée par l'échantillon dépendra donc de la fréquence ou de la longueur d'onde des photons du faisceau et du type de molécules présentes dans l'échantillon.

l'abscisse indique les longueurs d'onde des photons. Chaque substance pure est caractérisée par un spectre particulier qui constitue en quelque sorte sa signature. Le mélange de plusieurs substances produit un spectre global qui est la somme des spectres de tous les constituants du mélange. Ainsi, le spectre global d'un aliment comme le miel présente qualitativement et quantitativement la contribution des différents constituants (voir figure 1).

Figure 1 : Spectre NIR représentatif d'un miel toutes fleurs.



Les résultats de la mesure d'absorption lumineuse se présentent sous la forme d'un graphe appelé «spectre» dont l'ordonnée indique l'énergie lumineuse absorbée et

Cependant, si l'on peut reconnaître dans un spectre les bandes d'absorption des constituants majeurs (eau, sucres), il n'est pas possible d'établir une relation directe entre le spectre obtenu et la composition chimique du produit. Cela vient des nombreuses interférences spectrales entre les différents constituants et des effets de diffusion de la lumière dans la matrice des échantillons. C'est pourquoi la spectrométrie proche infrarouge ou NIR ne permet pas une lecture directe des résultats. Il faut dès lors calibrer les spectromètres NIR pour chacun des constituants que l'on veut doser (par ex. pour le miel : l'eau et les différents sucres). Le calibrage se fait sur base des résultats d'une analyse dite de référence (par exemple la détermination des sucres par chromatographie) réalisée sur un grand nombre (de plusieurs dizaines à plusieurs centaines) d'échantillons représentatifs. Il faut donc établir des équations de conversion des données spectrales en données analytiques (indices chimiques, physiques ou même biologiques). Une fois établies et validées, ces équations sont utilisées en analyse de routine. On comprend ainsi pourquoi le développement de la spectrométrie NIR a profité du développement de la micro-informatique. Sans cela, elle serait restée une méthode relativement académique sans grand intérêt pratique.

sage de l'eau et des sucres majeurs (fructose et glucose). La technique continue à se développer et à évoluer. Les progrès réalisés dans le domaine de l'instrumentation permettent de développer des spectromètres sans cesse plus légers et plus compacts (voir "Appareillage"). Dans le cadre de ce travail, l'acquisition des spectres proche infrarouge a été réalisée avec un spectromètre de la marque BOMEM (Canada, Québec), qui permet d'acquérir un spectre proche infrarouge allant de 1000 à 2500 nm.

Le spectre d'un miel

Avant l'analyse par spectrométrie infrarouge, un échantillon de miel est immergé en pot scellé dans un bain d'eau à 60°C jusqu'à ce que tous les cristaux de sucres soient complètement fondus. L'échantillon est ensuite refroidi dans un second bain-marie à 20°C pour le ramener à la température ambiante. Par après, il est présenté dans le faisceau de lumière infrarouge. Le détecteur mesure la lumière non absorbée dans ce

cas par réflexion diffuse. On obtient ainsi un spectre représentatif de l'échantillon de miel analysé (voir fig. 1). On peut remarquer la présence des bandes d'absorption de l'eau à 1450 nm et 1950 nm. Aux environs de 2100 nm, on trouve la bande caractéristique des sucres. Pour confirmer l'allure générale des spectres des miels, nous avons pris les spectres NIR des sucres purs (fructose, glucose et saccharose) préparés de la même manière que l'échantillon de miel. Le profil spectral des longueurs d'onde comprises entre 2200 et 2400 nm est différent pour chacun de ces 3 sucres. Les deux figures (fig. 2 et 3) présentent respectivement le spectre caractéristique de chaque sucre. On constate que les variations spectrales varient très fortement en fonction de la longueur d'onde.

Avant d'aller plus loin dans l'étude, nous avons analysé à dix reprises le même échantillon de miel pour vérifier la répétabilité de l'analyse. Une trop grande variabilité dans les résultats risque de donner des informations trop peu précises. Dans ce cas, le coefficient de variation obtenu est compris entre 5 et 6 % de la valeur de l'absorbance pour chaque longueur d'onde. A ce stade, ce résultat est jugé acceptable pour se lancer dans un essai de calibrage.

Des miels au banc d'essais

L'eau et les sucres sont parmi les constituants les plus importants d'un miel. Comme ces constituants vont directement influencer l'évolution d'un miel (conservation, cristallisation, stabi-

Figure 2 : Spectres NIR représentatifs de solutions de sucres purs (glucose, fructose et saccharose) à 10 % de concentration en poids.

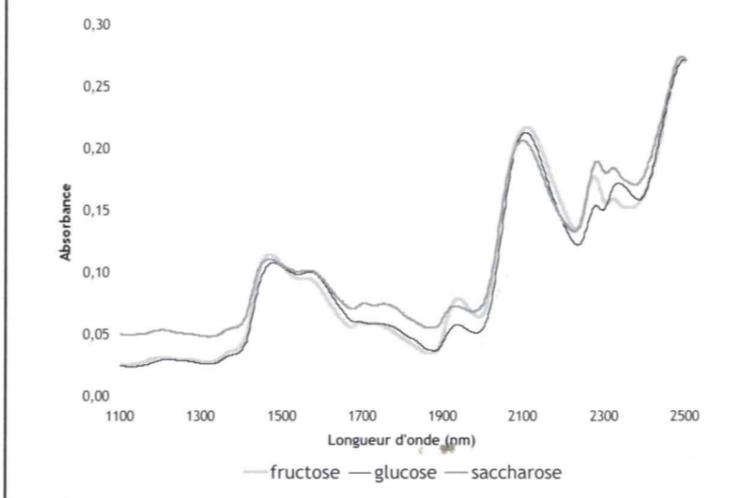
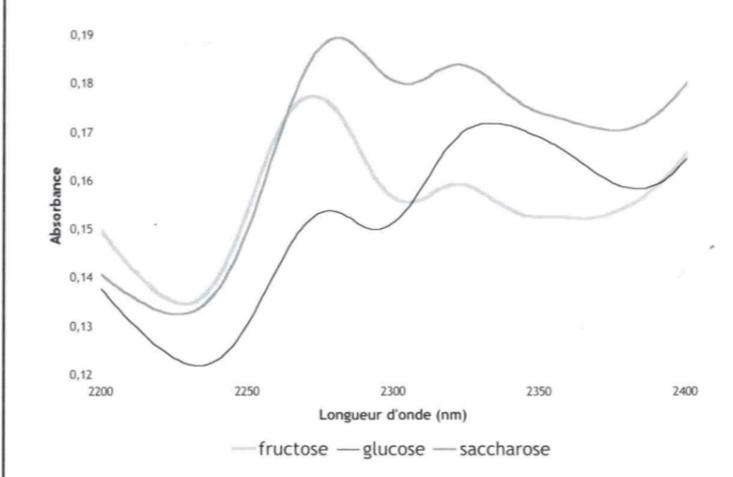


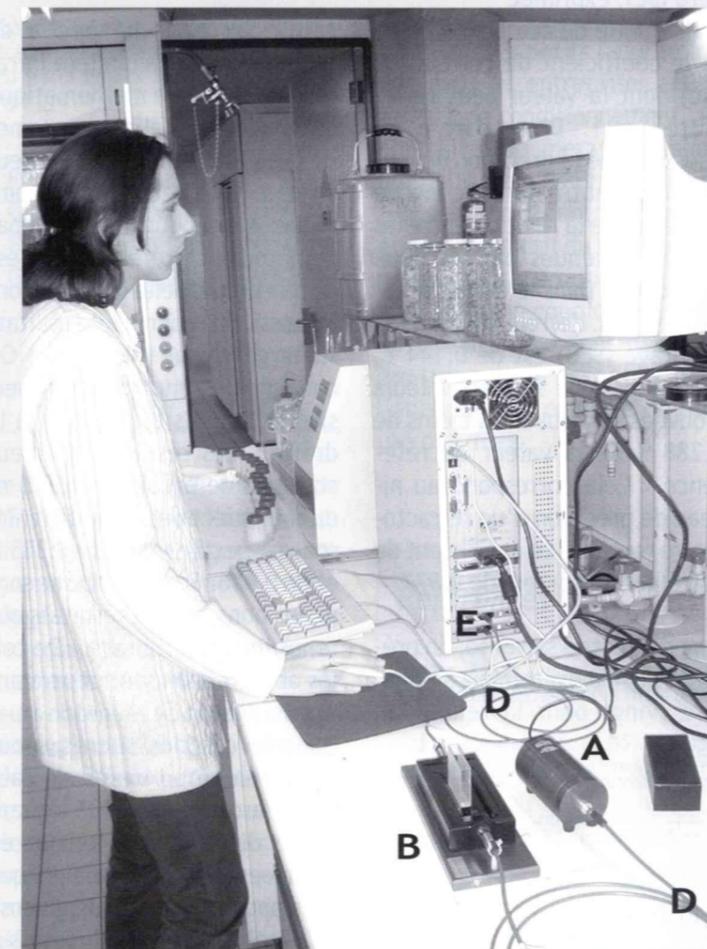
Figure 3 : Détail (2200 à 2400 nm) des spectres NIR représentatifs de solutions de sucres purs (glucose, fructose et saccharose) à 10 % de concentration en poids.



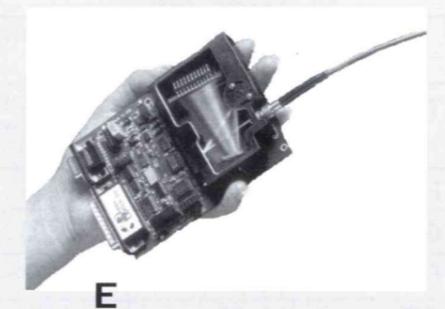
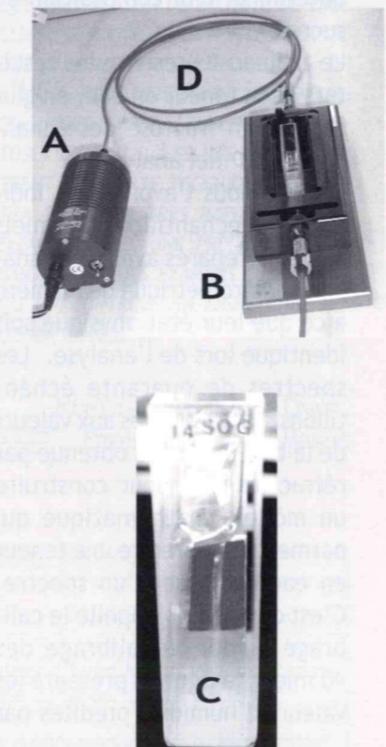
APPAREILLAGE

Les spectromètres NIR fonctionnent d'après le principe de l'absorption moléculaire de la lumière. Comme la lumière visible, la lumière proche infrarouge est émise par des lampes ordinaires à filament de tungstène. Une grande rapidité de balayage du spectre est indispensable. Plusieurs systèmes de sélection des photons existent : filtres à longueur d'onde unique ou variable, réseau de diffraction fixe ou oscillant, interféromètre de Michelson. La lumière est transmise par des fibres optiques depuis la source jusqu'à l'échantillon à analyser. Des détecteurs reçoivent alors la lumière non absorbée et génèrent un signal digitalisé. Il est

possible d'adapter les spectromètres NIR pour qu'ils mesurent la lumière non absorbée soit en traversant l'échantillon (transmission) soit en étant réfléchi par diffusion à la surface de celui-ci (réflexion diffuse). Les photons du proche infrarouge sont à peu près mille fois moins absorbés par la matière que ceux du moyen infrarouge. De ce fait, il est possible de traverser des échantillons épais de quelques millimètres à quelques centimètres en spectrométrie proche infrarouge, alors que l'épaisseur des échantillons ne peut dépasser quelques dizaines de micromètres en spectrométrie moyen infrarouge.



Le faisceau de la source lumineuse (cylindre rouge - A) est conduit vers le porte-échantillon (boîtier noir sur support bleu - B) au travers d'une fibre optique. Ce faisceau lumineux traverse l'échantillon de miel (C) et repart vers l'ordinateur par une autre fibre optique (D). À l'entrée de l'ordinateur se trouve le système de sélection des photons (E) qui est dans ce cas un réseau de diffraction. Le signal est analysé et le spectre d'absorbance apparaît à l'écran.



lité...), nous avons essayé de calibrer le spectromètre pour leur dosage dans le miel.

L'essai se base sur soixante miels sélectionnés d'après leur origine botanique. Chacun a fait l'objet d'une analyse chimique dite de référence et d'une analyse spectroscopique.

La teneur en eau a été mesurée sur les 60 miels en utilisant un réfractomètre digital ATAGO comme technique de référence. Trente-cinq de ces miels ont également été analysés par chromatographie en phase gazeuse pour déterminer leur composition en sucres.

Le tableau 1 présente les résultats de la teneur en eau, en glucose et en fructose des échantillons de miel analysés.

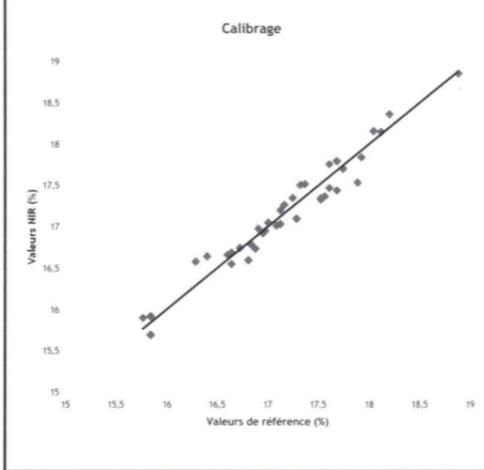
Comme nous l'avons déjà indiqué, les échantillons de miels étaient préparés avant leur analyse spectrométrique de manière à ce que leur état physique soit identique lors de l'analyse. Les spectres de quarante échantillons sont comparés aux valeurs de la teneur en eau obtenue par réfractométrie pour construire un modèle mathématique qui permettra de prédire une teneur en eau sur base d'un spectre. C'est ce que l'on appelle le calibrage. Pour le calibrage des 40 miels, la figure 4 présente les valeurs d'humidité prédites par

NIR en fonction des valeurs d'humidité observées par réfractométrie. On constate que les points ne sont pas nécessairement sur la droite, ce qui devrait être le cas si la relation établie par le modèle était parfaite. Deux paramètres nous permettent de juger de la performance du modèle : l'erreur standard (SE), exprimée

dans l'unité de ce que l'on dose et le coefficient de corrélation (Rc) dont la valeur peut varier entre 0 et 1. D'une part, le SE nous indique la précision du modèle et, d'autre part, Rc évalue la qualité de la relation entre les valeurs obtenues par les deux méthodes. Dans le cas de la teneur en eau, l'erreur standard de calibrage (SEC) est de 0.144 %, c'est à dire que 95 % des valeurs trouvées se trouvent à moins de 0,288 % de la valeur de référence. Cela correspond au niveau de précision d'un réfractomètre manuel. Le coefficient de corrélation (Rc) est de 0.977.

Lors de l'étape suivante, on présente de nouveaux miels à l'analyse (vingt pour la teneur en

Figure 4 : Valeurs d'humidité prédites par NIR en fonction des valeurs d'humidité observées par réfractométrie



eau). Sur base du spectre de l'absorption de la lumière infrarouge, le modèle mathématique obtenu lors du calibrage permet de prédire des valeurs de teneur en eau. Ces valeurs sont comparées aux valeurs obtenues par la méthode de référence. C'est ce que l'on appelle la validation. Ici aussi, on reporte les résultats sur un graphique (voir fig. 5). On constate une plus grande dispersion des points par rapport à la droite. Les résultats d'erreur standard de prédiction (SEP) et du coefficient de corrélation (Rc) sont respectivement de 0.323 % et de 0.916. Ces indicateurs sont moins bons que les résultats obtenus lors du calibrage. De telles observations sont cependant prévisibles.

Dans le cas des sucres, nous avons réalisé un travail de calibrage au départ de 35 échantillons de miel. Les teneurs en fructose et en glucose ainsi que le rapport fructose sur glucose (F/G) et le rapport glucose sur eau (G/E) ont été étudiés. Le tableau 2 résume les résultats obtenus pour le calibrage. Ces résultats sont cohérents avec les valeurs décrites dans la littérature.

Tableau 1 : Résultats des analyses de référence des miels étudiés
Cal. = Miels utilisés pour le calibrage. Val. = Miels utilisés pour la validation.

	Nombre	Moyenne	Minimum Maximum	Ecart type
Teneur en eau	40 (Cal.)	17.16	15.76 - 18.88	0.695
	20 (Val.)	16.99	15.32 - 18.02	0.767
Fructose	35	39.68	35.34 - 43.74	1.83
Glucose	35	29.08	21.08 - 39.15	4.17
F/G	35	1.39	0.97 - 1.89	0.23
G/E	35	1.71	1.17 - 2.34	0.26

Figure 5

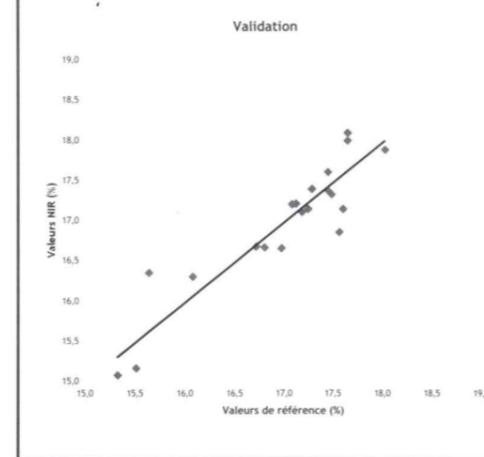


Tableau 2 : Erreurs standard et coefficients de corrélation obtenus pour une calibration des sucres simples et de l'eau réalisée au départ de 35 miels

	SEC	Rc
Fructose	0.641	0.937
Glucose	0.848	0.979
F/G	0.045	0.981
G/E	0.047	0.983

Piste pour le futur

Le but de ce travail était de voir dans quelle mesure l'analyse rapide des miels est possible par spectrométrie proche infrarouge.

Les essais de calibrage et de validation ont montré que les valeurs obtenues se situent pour la plupart à $\pm 0,3$ % de la valeur de référence pour la teneur en eau et à $\pm 1,7$ % pour les sucres simples. Cet essai étant limité, il faudra confirmer ces résultats encourageants par un échantillonnage de référence plus large. Aujourd'hui, nous pouvons conclure que la spectrométrie NIR est une technique qui permet de doser, de manière acceptable et donc exploitable, plusieurs des constituants du miel

influençant son conditionnement et sa stabilité. De plus, des petits spectrophotomètres (photocapteurs), exploitant la zone de longueurs d'onde inférieure à 1 micron, apparaissent sur le marché à des prix de plus en plus raisonnables. Ces photocapteurs se présentent comme des outils extrêmement pratiques et

performants pour une utilisation tant dans les petits laboratoires que dans les entreprises artisanales et de conditionnement. On pourrait ainsi mettre en place une politique d'assurance qualité reposant sur un contrôle complet et non destructif du miel tant au niveau de sa production qu'au niveau de son conditionnement. Ce travail ouvre donc des perspectives intéressantes pour l'analyse et le contrôle de qualité des miels.

RÉSUMÉ

DEPUIS DE NOMBREUSES ANNÉES, LA SPECTROMÉTRIE PROCHE INFRAROUGE A FAIT SON APPARITION DANS LE CONTRÔLE DE LA QUALITÉ DES ALIMENTS. VU QUE LES MÉTHODES UTILISÉES ACTUELLEMENT POUR CONTRÔLER LA QUALITÉ DU MIEL SONT LONGUES ET FASTIDIEUSES, NOUS PROFITONS DES AVANTAGES DE CETTE TECHNIQUE POUR L'APPLIQUER AUX MIELS. LE MIEL EST UNE SUBSTANCE NATURELLE COMPLEXE. SA COMPOSITION EST INFLUENCÉE PAR DE NOMBREUX FACTEURS ET CONSTITUE UN ÉLÉMENT IMPORTANT TANT POUR LA TECHNOLOGIE QUE POUR LA QUALITÉ DU PRODUIT. NOUS AVONS DONC UTILISÉ LA TECHNIQUE NIR AU SEIN DE L'UNITÉ DE BIOCHIMIE DE LA NUTRITION À LA FACULTÉ DES SCIENCES AGRONOMIQUES DE L'UCL, POUR DÉTERMINER LES TENEURS EN SUCRES SIMPLES (GLUCOSE ET FRUCTOSE) ET EAU. LES RÉSULTATS MONTRERONT QUE CETTE TECHNIQUE PERMETTRA DE DOSER TRÈS RAPIDEMENT CES ÉLÉMENTS AVEC UNE PRÉCISION SUFFISANTE POUR DES EXAMENS DE ROUTINE OU UN CONTRÔLE EN LIGNE CHEZ LES CONDITIONNEURS.

JEAN-YVES PIERARD, ISABELLE CORNET,
ETIENNE BRUNEAU, MARC MEURENS

Références

- Baeten V. and Aparicio R. (1997). Possibilities offered by infrared and Raman spectroscopic techniques in virgin olive oil authentication. *Glivae*, 69, 38-43.
- Cho H.-J. and Hong S.-H. (1998). Acacia honey quality measurement by Near infrared spectroscopy. *J. Near Infrared Spectrosc.*, 6, A329-A331.
- Cornet I. (1999). Analyse rapide des miels par spectrométrie proche infrarouge. Mémoire, Faculté des Sciences agronomiques, Unité de Biochimie de la Nutrition, UCL, LLN.
- Ha J., Koo M. and Ok H. (1998). Determination of the constituents of honey by Near infrared spectroscopy. *J. Near Infrared Spectrosc.*, 6, A367-A369.
- Meurens M., Foulon M. and Acha V. (1995). Rapid analysis of fruit juice by infrared spectrometry. *Cerevisia*, 3, 33-36.
- Qiu P.Y., Ding H.B., Tang Y.K. and Xu R.J. (1999). Determination of chemical composition of commercial honey by Near infrared spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 2760-2765.