



LES ANALYSES DU MIEL PAR LC-HRMS : CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE COUPLÉE À UNE SPECTROMÉTRIE DE MASSE À HAUTE RÉOLUTION

CE QUE DÉTECTE LA MÉTHODE



✓ Les ajouts de sirops de sucre en comparaison à une base de données de sirops et en détectant des marqueurs d'adultération.

Fourchette de prix : 200-250€ HT

Avantages

- Méthode récente et en constante amélioration
- Haute sensibilité pour certains marqueurs
- Capacité d'adaptation rapide aux nouveaux sirops d'adultération
- Combine approches ciblée et non ciblée

Limites

- Absence d'harmonisation entre laboratoires
- Variabilité des bases, instruments et protocoles
- Fiabilité dépend de la qualité des bases de données
- Sensibilité élevée pour des résidus de nourrissage
- Coût élevé

01

DÉFINITIONS

Marqueur : l'analyse de la composition du miel et des sirops permet d'identifier des marqueurs. Certains sont issus de la fabrication des sucres exogènes et sirops, leur présence dans le miel révèle une adultération. D'autres sont des constituants intrinsèques du miel authentique. Leur absence ou faible concentration indique une adultération.

Approche ciblée : pour identifier et quantifier un composé ciblé dont la masse moléculaire et le nom sont connus.

Approche non ciblée : l'échantillon est analysé dans son ensemble et comparé à une base de données.

Pour aller plus loin dans les définitions, lire la fiche d'introduction

LE PRINCIPE ANALYTIQUE

La LC-HRMS est une des méthodes les plus récentes, proposées par quelques laboratoires en analyse de routine à partir de 2017. Cette méthode continue à faire l'objet de développements et d'améliorations.

Deux techniques analytiques sont combinées :

- **La chromatographie liquide** qui permet de séparer les différents composés de l'échantillon analysé.
- **La spectrométrie de masse à haute résolution** qui détecte ces composés et les distingue selon leur masse moléculaire, avec une grande précision et une sensibilité élevée, même à très faible concentration. Sur le chromatogramme obtenu, chaque pic correspond à une molécule, caractérisée par sa masse. Pour identifier le nom du composé correspondant, il faut disposer de références de comparaison ou de bases de données. Certaines sont connues et facilement identifiables, mais plusieurs molécules peuvent avoir des masses moléculaires très proches, il n'est donc pas aisé de les identifier avec certitude.

La LC-HRMS peut être utilisée selon l'approche ciblée ou non ciblée. Cette méthode est aujourd'hui proposée en routine par les laboratoires surtout pour la détection de sucres exogènes, mais elle peut aussi être utilisée pour identifier des marqueurs de l'origine botanique ou de l'origine géographique¹, ou pour quantifier tout type de substance dont la masse moléculaire précise est connue.

LA LC-HRMS APPLIQUÉE AUX ANALYSES D'ADULTÉRATION

Les laboratoires utilisent en routine cette méthode appliquée à la détection d'adultérations en se constituant une base de données de sirops :

- Les échantillons de sirop sont d'abord analysés de manière non ciblée pour identifier tous leurs composants et obtenir un spectre correspondant à chaque type de sirop.
 - L'agrégation de ces spectres permet la formation d'une base de données contenant toutes les empreintes et composants de ces sirops.
 - Des analyses statistiques et une validation en comparaison avec des échantillons de miels authentiques permettent ensuite d'identifier les marqueurs d'adultération les plus pertinents². De nombreux sirops ont une composition proche et contiennent des marqueurs similaires. Si un sirop n'est pas présent dans la base de données, la méthode devrait quand même permettre sa détection grâce à ces marqueurs communs.
- Puis les échantillons de miel sont analysés en vérifiant l'absence de ces marqueurs.

Selon la méthode proposée par C. Kunert² la détection de sirop dans un miel se fonde sur plusieurs informations, dont la présence d'au moins trois marqueurs, et la comparaison à la base de données, ce qui permettrait de limiter le risque de résultats dits faux-positifs.

Mais les approches varient selon les laboratoires, chacun ayant développé sa propre méthodologie :

- Certains laboratoires privilégient une combinaison de deux méthodes : d'abord la LC-HRMS pour identifier les marqueurs, puis la LC-MS/MS pour analyser les miels et cibler ces marqueurs, car la LC-MS/MS serait plus sensible pour la détection de composés identifiés. D'autres n'utilisent que la LC-HRMS pour chaque étape.
- Certains utilisent à la fois une base de données de sirops et

une base de données de miels authentiques. D'autres n'utilisent pas de base de données de miels authentiques, mais valident les marqueurs sur quelques échantillons de miel.

L'analyse LC-HRMS a été proposée à l'origine pour améliorer la détection des adultérations avec des sirops perfectionnés conçus pour imiter le miel et être indétectables. Cette méthode est intéressante pour détecter des fraudes sur des miels en provenance de pays à risque, conseillée par les laboratoires en complément de la RMN et de la EA/LC-IRMS.

SENSIBILITÉ DE LA MÉTHODE

Cette méthode d'analyse peut être très sensible lorsque le sirop utilisé est présent dans la base de données, ce qui permet de détecter des sucres en très faibles concentration.

La méthode et l'instrument de mesure diffèrent selon les laboratoires, la sensibilité est donc variable. Selon la méthode proposée par C. Kunert², la limite de détection est fixée à 5% de sirop dans l'échantillon. Toutefois, si le sirop exact utilisé n'est pas dans la base de données, la limite peut être plus élevée.

Un expert interrogé affirme que la LC-HRMS permettrait de détecter des sirops à partir de 1%.

La sensibilité de la méthode dépend également des marqueurs : selon un laboratoire, la LC-HRMS peut par exemple détecter le marqueur SM-B à une proportion proche du ppb (10^{-9} ou $\mu\text{g}/\text{kg}$), tandis que pour d'autres comme le mannose, l'ordre de grandeur est plus proche du ppm (10^{-6} ou mg/kg).³

HARMONISATION

Cette méthode n'est pas harmonisée, chaque laboratoire a développé sa propre méthode interne. Les bases de données sont également privées et propres à chaque laboratoire.

Deux laboratoires privés ont mené des essais comparatifs et ont obtenu des résultats comparables en 2020 avec des méthodes différentes⁴.

La LC-HRMS a été utilisée par le JRC, *Joint Research Center*, dans l'étude *From the Hives*⁵ pour analyser les oligosaccharides avec un $6 \leq DP < 10$, le 2-Acétylefurane-3-glucopyranoside (AFGP) et le difructose anhydride (DFA). Cette méthode fait partie du projet *HarmHoney* et devrait être prochainement harmonisée pour la détection de marqueurs d'adultérations.

AVANTAGES

L'analyse LC-HRMS du miel présente plusieurs avantages :

- Méthode récente, prometteuse, de plus en plus utilisée, et en évolution (améliorations en cours de cette méthode par les laboratoires).
- Approche intéressante : au lieu de se fonder sur une base de données de miels en analysant leur composition et les composés qui doivent être présents dans un miel authentique, ce qui peut être difficile étant donnée la grande variabilité des miels, cette méthode s'intéresse à ce qui compose et caractérise les sirops.
- Sensibilité élevée, plus sensible que la RMN pour certains marqueurs.⁶
- Analyse non ciblée possible : cette méthode permet d'analyser plusieurs centaines de marqueurs et différents types d'adultération

en une seule analyse.

- Permet de détecter des fraudes même sophistiquées indétectables avec les autres méthodes d'analyse.
- Capacité d'adaptation rapide de la méthode aux nouvelles techniques d'adultération et nouveaux sirops : dès qu'un nouveau produit d'adultération apparaît sur le marché, les laboratoires peuvent le tester et l'intégrer à leur base de données pour le détecter.
- Cette méthode avec l'approche ciblée fait partie des méthodes qui devraient être harmonisées par le JRC dans le projet *HarmHoney*.

LIMITES

- L'analyse LC-HRMS du miel comporte également certaines limites :
 - Absence d'harmonisation et nombreuses différences entre laboratoires :
 - Différents instruments de mesure (TOF-MS ou Orbitrap-MS).
 - Utilisation uniquement de la LC-HRMS pour l'analyse des échantillons, ou combinaison LC-HRMS et LC-MS/MS.
 - Bases de données privées développées par chaque laboratoire. Le nombre et types de sirops dans les bases sont différents.
 - Certains laboratoires se basent sur deux bases de données pour valider les marqueurs : une de sirops et une de miels authentiques. D'autres, uniquement sur une base de données de sirops.
 - Le nombre, le type de marqueurs d'adultération et les limites fixées sont propres à chaque laboratoire.
- En lien avec les différences mentionnées ci-dessus, des incohérences de résultats entre laboratoires ont été observées, il y a

peu de tests inter-laboratoires à ce stade et pas d'harmonisation en vue sur l'approche non ciblée.

- La fiabilité de la méthode dépend fortement de la qualité de la base de données.
- Analyse coûteuse.
- Sensibilité élevée, très sensible même à de faibles résidus de nourrissage.
- Pas de quantification possible. Des estimations grossières sont parfois possibles si le sirop exact utilisé est connu et intégré à la base de données.

EXCEPTIONS CONNUES

Cette analyse étant relativement récente, il y a peu de recul sur les exceptions possibles. Les marqueurs de sirops utilisés par les laboratoires ne sont pas tous communiqués, il est donc difficile de savoir si certains peuvent être trouvés naturellement dans certains types de miels.

Selon M. Linkogel⁶, les exceptions suivantes existent :

- Des miels provenant du Mexique, de Cuba, d'Argentine et d'Uruguay sont positifs pour le marqueur SM-B (3-méthoxytramine), probablement présent naturellement dans certaines plantes.
- Lorsque le mannose est utilisé comme marqueur, certains miels de miellats pourraient être de faux-positifs car ils en contiennent naturellement. Ce marqueur devrait donc toujours être utilisé en combinaison avec le dihydroxyacétone (DHA), un autre marqueur. Le mannose et le DHA sont fréquemment présents conjointement dans de nombreux sirops de sucre.

SOURCES BIBLIOGRAPHIQUES

¹ Kasiotis K.M., Baira E., Iosifidou S., Manea-Karga E., Tsipi D., Gounari S., Theologidis I., Bampouni T., Danieli P.P., Lazzari F., et al. (2023) « Fingerprinting Chemical Markers in the Mediterranean Orange Blossom Honey: UHPLC-HRMS Metabolomics Study Integrating Melissopalynological Analysis, GC-MS and HPLC-PDA-ESI/MS. » *Molecules*, 28, 3967.

² Kunert, C. (2021). « Honey authenticity testing by LC-Orbitrap-HRMS » Eurofins Whitepaper.

³ QSI GmbH. (2023) « Newsletter – Overview of QSI + Bruker NMR Honey Profiling™, FAQs ».

⁴ QSI GmbH. (2020) « [Using molecular masses to detect honey adulteration](#) »

⁵ Ždiniaková T., Loerchner C., De Rudder O., Dimitrova T., Kaklamanos G., Breidbach A., Respalda Hidalgo M.A., Vaz Silva I.M., Paiano V., Ulberth F. and Maquet A. (2023) « EU Coordinated action to deter certain fraudulent practices in the honey sector » EUR 31461 EN, Publications Office of the European Union, Luxembourg, ISBN 978-92-68-01292-5, JRC130227.

⁶ Linkogel, M. (2024) « [Is my honey authentic? Perspective of QSI Bremen as private and independent expert laboratory on honey authenticity testing.](#) » Présentation aux journées du SPMF.



Interprofession des
produits de la ruche

www.interapi.fr

ENSEMBLE, FAIRE AVANCER LA FILIÈRE APICOLE

InterApi, l'interprofession des produits de la ruche, a été créée en 2018 et reconnue officiellement en 2019. Elle rassemble l'ensemble des acteurs de la filière apicole : apiculteurs, conditionneurs, distributeurs et fabricants de matériel.

Sa mission : fédérer, représenter et défendre leurs intérêts, notamment en améliorant la qualité et la traçabilité des produits de la ruche, afin de garantir des conditions d'exercice durables et une rémunération équitable pour chaque maillon de la filière.