



## ANALYSE DES RATIO ISOTOPIQUES : EA-IRMS ET LC-IRMS

### CE QUE DÉTECTE LA MÉTHODE



#### EA-IRMS

✓ Les ajouts de sucres en C4

Fourchette de prix : 100-120€HT (avec la LC-IRMS)\*

#### Avantages

- Méthode de mesure et interprétation harmonisées
- Connue et proposée par la majorité des laboratoires

#### Limites

- Insuffisante pour détecter efficacement la fraude
- Ne détecte que les sucres en C4
- Peu sensible

\* Les analyses EA et LC-IRMS sont généralement proposées ensemble par les laboratoires

#### LC-IRMS

✓ Les ajouts de sucres en C3 et en C4

Fourchette de prix : 100-120€HT (avec la EA-IRMS)\*

#### Avantages

- Peu coûteuse
- Méthode de mesure normalisée
- Connue et proposée par la majorité des laboratoires
- Amélioration de la EA-IRMS : plus sensible pour les sucres en C4 et détection des sucres en C3

#### Limites

- Très sensible pour les sucres en C4, parfois trop (jusqu'à 1%)
- Des différences de calcul et d'interprétation des critères de conformité

## 01

## DÉFINITIONS

**Les « plantes en C3 » et « plantes en C4 »** : selon leur processus de photosynthèse, on distingue les sucres issus des plantes « en C3 », comme le blé, le riz ou la betterave sucrière, et ceux provenant des plantes « en C4 » dont le maïs ou la canne à sucre.

**Le ratio isotopique du carbone** : le carbone (C) existe sous la forme de 15 isotopes connus, dont le nombre de neutrons varie. Parmi eux, deux formes sont présentes dans la nature sous un état stable : le carbone 12 ( $^{12}\text{C}$ ) et le carbone 13 ( $^{13}\text{C}$ ), le premier étant plus léger et naturellement plus abondant. Le  $\Delta \delta^{13}\text{C}$  est la variation du rapport  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  entre une référence établie et la valeur mesurée dans l'échantillon analysé. Ce delta est exprimé en ‰.

**Les mécanismes de la photosynthèse influencent le ratio isotopique des plantes et permet d'identifier l'origine botanique des sucres** : la photosynthèse fixe préférentiellement le  $^{12}\text{C}$ , qui est plus léger. Mais en cas de contrainte hydrique les plantes en C4 peuvent s'adapter et ralentir les échanges de  $\text{CO}_2$  entre la feuille et l'air, ce qui limite la discrimination isotopique.

Les plantes en C3 sont donc plus riches en  $^{12}\text{C}$ , et le ratio  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  est très faible par rapport à celui des plantes en C4. L'analyse des ratio isotopiques permet donc de distinguer facilement les sucres en C3 de ceux en C4. Au sein des plantes en C3, chacun a un  $\delta^{13}\text{C}$  qui lui est propre, mais les différences sont moins marquées, donc plus difficiles à analyser avec précision.

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

### LE PRINCIPE ET LES CRITÈRES

La majorité des plantes mellifères sont des plantes en C3, tandis que les sirops initialement utilisés pour l'adultération étaient issus de plantes en C4 (sirop de maïs, sirop de canne à sucre).

La méthode EA-IRMS appliquée au miel repose sur la mesure du ratio isotopique des protéines du miel ( $\delta^{13}\text{C}_p$  ou P) et du miel ( $\delta^{13}\text{C}_H$  ou H). P sert de référence de comparaison, et s'il y a un ajout de sucres exogènes avec un ratio isotopique très différent de celui du miel, il y aura une déviation de la valeur de H.

Le pourcentage de sucres en C4 est estimé par la formule suivante :

$$\% \text{ de sucres en C4} = \frac{\delta^{13}\text{C}_p - \delta^{13}\text{C}_H}{\delta^{13}\text{C}_p - (-9.7)} \times 100$$

Dans cette équation,  $\delta^{13}\text{C}_p$  représente le rapport isotopique mesuré des protéines, et  $\delta^{13}\text{C}_H$  celui mesuré dans le miel, tous deux exprimés en ‰. La valeur de -9,7 ‰ correspond au rapport isotopique moyen du sirop de maïs.

Les miels authentiques présentent naturellement une différence entre  $\delta^{13}\text{C}_p$  et  $\delta^{13}\text{C}_H$  inférieure à 1 ‰<sup>1,2</sup>. Une différence plus importante suggère que les protéines et les sucres proviennent de sources botaniques différentes, et donc qu'il y a eu un ajout de sucres exogènes. Ainsi, lorsque la teneur calculée en sucres C4 dépasse 7 %, le miel est considéré comme adultéré<sup>3</sup>.

Ce seuil ne correspond pas à un seuil de tolérance à l'ajout de sucres, mais à une limite au-delà de laquelle la teneur en sucres en C4 n'est pas naturelle. Les sucres présents dans le miel sont en général issus de plantes en C3, mais de faibles traces de sucres C4 peuvent être naturellement présentes<sup>4</sup>. Le taux de sucres en C4 calculé ne correspond donc pas forcément à une quantité équivalente de sucres ajoutés frauduleusement.

En plus de ce critère, certains laboratoires interprètent (P-H) > + 2.0 ‰ comme un indice d'adultération avec des sucres en C3, en se basant sur leurs données et expertise. Dans ce cas, le miel est jugé « atypique ».

### SENSIBILITÉ DE LA MÉTHODE

L'analyse EA-IRMS est considérée comme peu sensible, car elle ne détecte l'ajout des sucres en C4 qu'au-delà de 7 % et ne permet pas de détecter l'ajout de sucres en C3.

Il s'agit de la seule méthode permettant la quantification des sucres en C4 dans le miel. Le calcul de quantification est une estimation, car chaque sirop a un ratio isotopique différent.

### HARMONISATION ET PUBLICATIONS DE RÉFÉRENCE

Cette méthode a été développée à partir de 1978, puis améliorée et validée pour une mise en application en 1998<sup>5</sup>. Aujourd'hui harmonisée internationalement et publiée à l'AOAC (*Association of official Analytical Collaboration*), elle fait toujours référence pour la détection des sucres en C4.

### AVANTAGES

L'analyse EA-IRMS du miel présente plusieurs avantages :

- Seule analyse pour laquelle la méthode de mesure et l'interprétation sont harmonisées internationalement.
- Analyse de routine, proposée par la majorité des laboratoires d'analyse.

### LIMITES

L'analyse EA-IRMS du miel comporte également certaines limites :

- Méthode insuffisante pour détecter efficacement la fraude car la majorité des sirops utilisés actuellement sont fabriqués à partir de sucres en C3.
- Méthode peu sensible.

### EXCEPTIONS CONNUES

Cette méthode n'est pas adaptée pour tous les types de miel et peut donner des résultats faux-positifs pour :

- Certains miels comme le miel de mānuka en Nouvelle-Zélande, le miel de mezquite (*prosopis glandulosa*) au Mexique (qui adopte une photosynthèse CAM dans les climats désertiques), le miel d'euphorbe au Maroc, le miel d'agrumes aux États-Unis<sup>6</sup>, ou encore le miel de miellat de pin en Turquie<sup>7</sup>.
- Les miels ayant naturellement un taux de protéine bas, lié à une densité pollinique faible, par exemple le miel de lavande ou d'acacia<sup>7</sup>.
- Les miels avec un teneur élevée en levures, qui peut influencer  $\delta^{13}\text{C}_p$ .

### LE PRINCIPE ET LES CRITÈRES

La LC-IRMS est une amélioration utilisant la chromatographie liquide, qui permet de séparer les fractions de sucres avant de mesurer le ratio isotopique de chacune. En plus du ratio isotopique des protéines et du miel calculés par EA-IRMS, on obtient les ratios du fructose, du glucose, des disaccharides, des trisaccharides et des oligosaccharides.

Si aucun sucre exogène n'a été ajouté, les valeurs  $\delta^{13}\text{C}$  des différentes fractions de sucres devraient être proches.

En se basant sur l'étude de 451 miels authentiques et en testant des miels adultérés, Efllein et Raezke<sup>8</sup> ont déterminé des valeurs maximales de  $\delta^{13}\text{C}$  et ont fixé les paramètres suivants :

- La différence de ratio isotopique entre le fructose et le glucose (appelée F-G ou  $\Delta\delta^{13}\text{C}_{F-G}$ ) doit se situer entre -1 ‰ et +1 ‰.
- L'écart maximal observé entre les ratios des différentes fractions (appelé « différence max » ou « delta max » ou  $\Delta\delta^{13}\text{C}_{\text{max}}$ ) doit être entre -2,1 ‰ et +2,1 ‰.

- La détection d'oligosaccharides indique une adultération.  
Si un de ces critères n'est pas respecté, le miel est considéré adultéré.  
Le dernier n'est pas appliqué uniformément par les laboratoires, car de faibles quantités d'oligosaccharides peuvent se trouver naturellement dans le miel (voir fiche sur l'analyse des oligosaccharides).

### SENSIBILITÉ

La LC-IRMS permet une détection améliorée, plus sensible, des sucres en C4, ainsi qu'une détection grossière des sucres en C3.

En effet, il a été observé que l'ajout de sucres en C3 n'a pas d'impact significatif sur le ratio isotopique des protéines et du miel (qui est aussi majoritairement issu de plantes en C3) mesurés par EA-IRMS.

En revanche, la mesure des ratios de chaque sucre par LC-IRMS permet d'identifier des variations, elle est donc plus sensible.

On estime le seuil de sensibilité de cette méthode à :

- À partir d'1 % d'ajout de plantes en C4,
- À partir de 10 % d'ajout de sucres en C3, voir beaucoup plus élevé si les sirops mélangent des sucres en C3 et C4 pour être au plus près du profil en sucres naturels du miel.<sup>9</sup>

Ces taux sont des estimations et varient selon le type de sirop utilisé, chaque sirop ayant un ratio isotopique propre.

### HARMONISATION ET PUBLICATIONS DE RÉFÉRENCE

La méthode de mesure des ratio isotopiques des différentes fractions de sucre est harmonisée et fait l'objet d'une norme CEN européenne<sup>10</sup>, publiée fin 2024.

Cette norme couvre la méthode de mesure des ratios isotopique des différents sucres, mais ne couvre pas le calcul des critères de conformité ni l'interprétation des résultats.

D'abord proposée par Cabañero et al.<sup>9</sup>, la méthode a été améliorée par Elflein et Ræzke<sup>8</sup> en 2008 dans une publication qui fait aujourd'hui référence, bien que des variations d'interprétation existent entre laboratoires.

### AVANTAGES

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

- Analyse de routine, proposée par la majorité des laboratoires d'analyse.

- Sensibilité améliorée par rapport à l'analyse EA-IRMS pour les sucres en C4 et détection des sucres en C3.

- Normalisée au niveau européen.

### LIMITES

L'analyse LC-IRMS du miel comporte également certaines limites :

- Méthode qui peut être trop sensible pour les résidus de nourrissements en C4 (1%).
- Des différences dans les fractions utilisées pour le calcul du delta max entre les laboratoires : certains incluent dans le calcul les valeurs P et H de la EA-IRMS, d'autres estiment qu'étant obtenues par une mesure différente, elles ne peuvent être comparées aux valeurs obtenues par LC-IRMS.
- Des différences dans l'application du critère « absence d'oligosaccharides » : certains laboratoires estiment que ce critère n'a pas été suffisamment étudié et n'est pas valide.
- Des différences existent dans l'interprétation des résultats du critère différence maximale entre laboratoires :

- La majorité des laboratoires appliquent les limites proposées par Elflein et Ræzke avec une valeur maximale de delta max à  $\pm 2.1 \text{ ‰}$ .

- Parmi eux, certains indiquent dans la conclusion lorsque le résultat est non-conforme mais se situe dans la zone d'incertitude de la méthode.

- D'autres laboratoires appliquent systématiquement un seuil de non-conformité de  $\pm 2.5 \text{ ‰}$ , estimant que la limite de  $\pm 2.1 \text{ ‰}$  est trop stricte et entraîne un trop grand nombre de faux-positifs.

- Dans le cadre de l'enquête *From the hives*, le JRC, *Joint Research Center*, a utilisé les seuils de décision montrés dans le tableau ci-dessous, en tenant compte de l'incertitude pour juger un échantillon suspect d'adultération.

Ces incertitudes ne tiennent pas compte de la variabilité inter-laboratoires. C'est pourquoi le JRC a récemment proposé une méthode de calcul de l'incertitude liée à la répétabilité et la reproductibilité, en se basant sur les résultats d'une étude inter-laboratoires<sup>11</sup>.

Une harmonisation des critères d'évaluation de la pureté des miels est donc nécessaire pour cette méthode, ça devrait être un des objets du projet *HarmHoney* mené par le JRC.

## SEUILS DE DÉCISION APPLIQUÉS PAR LE JRC DANS L'ÉTUDE *FROM THE HIVES* POUR JUGER UN ÉCHANTILLON SUSPECT D'ADULTÉRATION SUR LA BASE DES MESURES EA/LC-IRMS<sup>12</sup>

Paramètre	Valeur de référence	Seuil de décision tenant compte de l'incertitude de mesure
$\Delta\delta^{13}\text{C}$ (fructose - glucose)	$\pm 1 \text{ ‰}$	$\pm 1.33 \text{ ‰}$
$\Delta\delta^{13}\text{C}$ (fructose - disaccharides)	$\pm 2.1 \text{ ‰}$	$\pm 2.52 \text{ ‰}$
$\Delta\delta^{13}\text{C}$ (fructose - trisaccharides)	$\pm 2.1 \text{ ‰}$	$\pm 2.61 \text{ ‰}$
$\Delta\delta^{13}\text{C}$ (fructose - protéines)	$\pm 2.1 \text{ ‰}$	$\pm 2.49 \text{ ‰}$
$\Delta\delta^{13}\text{C}$ (glucose - disaccharides)	$\pm 2.1 \text{ ‰}$	$\pm 2.53 \text{ ‰}$
$\Delta\delta^{13}\text{C}$ (glucose - trisaccharides)	$\pm 2.1 \text{ ‰}$	$\pm 2.62 \text{ ‰}$
$\Delta\delta^{13}\text{C}$ (glucose - protéines)	$\pm 2.1 \text{ ‰}$	$\pm 2.50 \text{ ‰}$
$\Delta\delta^{13}\text{C}$ (disaccharides - trisaccharides)	$\pm 2.1 \text{ ‰}$	$\pm 2.68 \text{ ‰}$
$\Delta\delta^{13}\text{C}$ (disaccharides - protéines)	$\pm 2.1 \text{ ‰}$	$\pm 2.58 \text{ ‰}$
$\Delta\delta^{13}\text{C}$ (trisaccharides - protéines)	$\pm 2.1 \text{ ‰}$	$\pm 2.66 \text{ ‰}$

## EXCEPTIONS CONNUES

Cette méthode a des exceptions et ne fonctionne pas pour certains types de miels :

- Miels naturellement riches en saccharose : on observe une déviation naturelle du  $\delta^{13}\text{C}$  des disaccharides par rapport au  $\delta^{13}\text{C}$  total du miel dans le miel de lavande. Cette déviation pourrait être liée à la division du saccharose par l'enzyme invertase apportée par l'abeille<sup>13</sup>.

Par conséquent, la majorité des laboratoires excluent maintenant le ratio isotopique des disaccharides du calcul du critère delta max. Récemment, des anomalies ont été constatées dans l'analyse de miels de lavande produits en Provence par LC-IRMS et ce malgré l'adaptation des disaccharides.<sup>14</sup>

- En 2021, des insectes producteurs de miellat ont infesté les plantations de sorgho (plante en C4) en Argentine et en Uruguay. Le miellat a été butiné par les abeilles, et le miel provenant de ces pays échouait systématiquement l'analyse LC-IRMS, du fait de sa grande sensibilité aux sucres en C4 introduits par le miellat.

- Une étude de 2020<sup>15</sup> sur des miels authentiques produits en Chine affirme que le critère delta max à 2.1 ‰ est inadapté et cause de nombreux résultats faux-positifs, notamment pour les miels d'acacia.

Selon cette publication le rapport  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  du miel pourrait être influencé par de nombreux facteurs, tels que la zone climatique, les conditions météorologiques locales, la période de récolte, en plus de l'origine botanique.

## SOURCES BIBLIOGRAPHIQUES

<sup>1</sup> White, J.W., 1992. Internal standard stable carbon isotope ratio method for determination of C-4 plant sugars in honey: collaborative study, and evaluation of improved protein preparation procedure. J. AOAC Int. 75 (3), 543–548.

<sup>2</sup> White, J.W., Winters, K., 1989. Honey protein as internal standard for stable carbon isotope ratio detection of adulteration of honey. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 72 (6), 907–911.

<sup>3</sup> AOAC Official Method 998.12: C-4 Plant Sugars in Honey

<sup>4</sup> Zábrodská B., Vorlová L. (2015) « Adulteration of honey and available methods for detection—a review. » Acta Vet. Brno 83 (10), 85–102.

<sup>5</sup> White J.W., Winters K., Martin P., Rossmann A. (1998) « Stable carbon isotope ratio analysis of honey: validation of internal standard procedure for worldwide application. » J. Assoc. Off. Anal. Chem. 81, 610–619.

<sup>6</sup> White J. W., Robinson F. A. (1983). «  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  Ratios of Citrus Honeys and Nectars and Their Regulatory Implications. » Journal of AOAC International 66(1): 1-4.

<sup>7</sup> Akyıldız İ. E., Erdem Ö., Raday S., Daştan T., Acar S., Uzunöner D, Düz G., Damarlı E. (2022) « Elucidating the false positive tendency at AOAC 998.12 C-4 sugar test for pine honey samples: Modified sample preparation method for accurate  $\delta^{13}\text{C}$  measurement of honey proteome. » Journal of Food Composition and Analysis 114.

<sup>8</sup> Elflein L., Raezke K.-P. (2008) « Improved detection of honey adulteration by measuring differences between  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  stable carbon isotope ratios of protein and sugar compounds with a combination of elemental analyzer - isotope ratio mass spectrometry

and liquid chromatography - isotope ratio mass spectrometry ( $\delta^{13}\text{C}$ -EA/LC-IRMS) » Apidologie 3: 574-587

<sup>9</sup> Cabañero A.I., Recio J.L., Ruperez M. (2006) « Liquid chromatography coupled to isotope ratio mass spectrometry: a new perspective on honey adulteration detection. » Journal of Agriculture and Food Chemistry 54, 9719– 9727.

<sup>10</sup> NF EN 17958 – Authenticité des aliments - Détermination de la valeur du delta13C des mono- (fructose et glucose), di-, et trisaccharides présents dans le miel par chromatographie en phase liquide spectrométrie de masse de rapports isotopiques (CL-SMRI).

<sup>11</sup> Ulberth F., Aries E., De Rudder O., Kaklamanos G., Maquet A. (2024). « Purity assessment of honey based on compound specific stable carbon isotope ratios obtained by LC-IRMS. » Journal of AOAC International 107(5) : 884-887.

<sup>12</sup> Ždiniaková T., Lörchner C., De Rudder O. Dimitrova T., Kaklamanos G., Breidbach A., Respaldiza A., Vaz Silva I.M., Paiano V., Ulberth F., Maquet, A. (2023) « EU Coordinated action to deter certain fraudulent practices in the honey sector - Results of analytical testing of imported honey. » Publications Office of the European Union, Luxembourg.

<sup>13</sup> Wiezorek T., Beckh G., (2017). « Misinterpretation of LC-IRMS Honey Analysis »

<sup>14</sup> Descotes-Genon H. (2025). « Analyse de l'authenticité du miel de lavande – Des anomalies mises à jour. »

<sup>15</sup> X, J., Liu X. A.-O., Wu B., Cao Y. (2020) « A comprehensive analysis of  $^{13}\text{C}$  isotope ratios data of authentic honey types produced in China using the EA-IRMS and LC-IRMS. » Journal of Food Science and Technology 57(4): 1216-1232.



Interprofession des produits de la ruche

[www.interapi.fr](http://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.