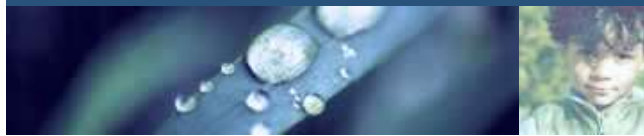


*Assemblée générale du SPMF, Janvier 2016*



# Résonnance Magnétique Nucléaire (RMN) Appliquée aux miels : De nouvelles perspectives analytiques

**Cécile Chabirand**  
**Eurofins Analytics France, Nantes**

**Contact: [asmnantesauthenticity@eurofins.com](mailto:asmnantesauthenticity@eurofins.com)**

# Pionniers dans l'authenticité des aliments



## Centre de compétence en authenticité: 28 ans d'expérience en analyses d'authenticité



Nantes, France



# Notre vision des besoins du marché du miel

---

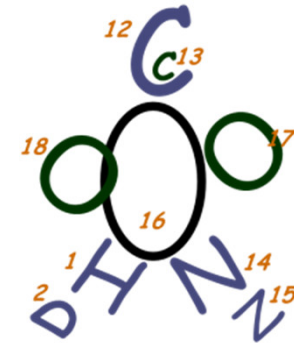
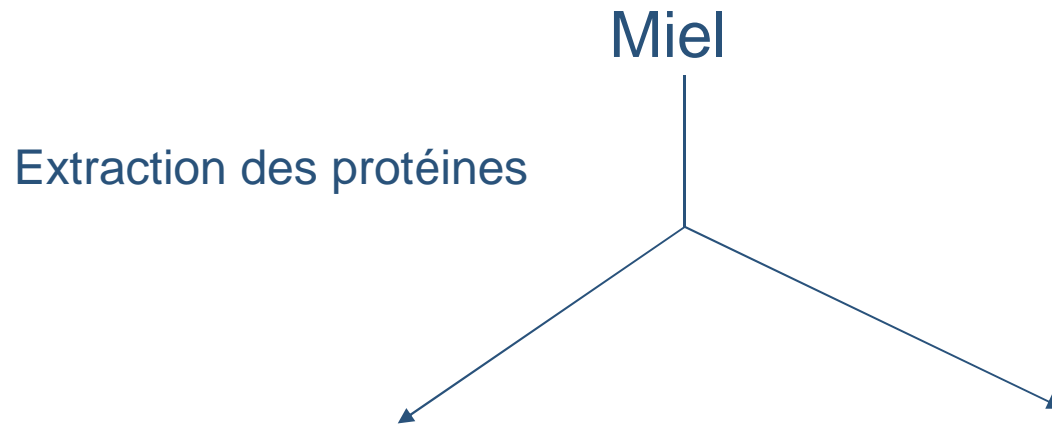


- Besoin d'un grand nombre de paramètres
- Analyses parfois libératoires
- Budget toujours limité



- La sensibilité des analyses ciblées est limitée
- Une bonne partie des adultérations sont encore non détectables (e.g. sucres C3)

# Carbone 13: Méthode AOAC 998.12



Protéines = référence interne

Miel = principalement sucres

Différence de déviation isotopique du  $^{13}\text{C}$

Détection et quantification du sucre issu de **plantes C4** (canne, maïs)

➔ Inconvénient: ne détecte pas le sucre C3 (sirops issus de blé, riz, betterave, etc.)



# Couplage LC-IRMS: est-ce vraiment utile?



Mesure les déviations isotopiques ( $\delta^{13}\text{C}$ ) individuelles des sucres majeurs (glucose, fructose, saccharose)



→ **Intérêt:** s'affranchir de la variabilité isotopique liée à l'environnement

## Mais:

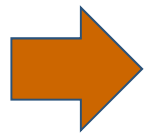
- La méthode AOAC inclut déjà une référence interne (pas d'avantage significatif pour la détection du sucre C4)
- N'améliore pas la détection de sucre C3:
  - Recouvrement des valeurs isotopiques entre miels et sucres C3
  - Les valeurs C13 des sucres individuels sont aisément ajustables pour rester dans les limites « naturelles »

## D'autres tests existent mais ils traitent des cas spécifiques et augmentent les coûts

---



- Activité d'enzymes exogènes (beta-fructofuranosidase, amylases)  
Objectif = détection de produits d'hydrolyse du saccharose / de l'amidon  
Limitation: ces enzymes peuvent être inactivées dans le miel
- Méthodes LC-MS, ICP-MS ou LC-ELSD ciblant des marqueurs spécifiques du sirop de riz, du sucre de betterave, de sirops issus d'amidon
- Méthode LC-MS de détection du Caramel



Besoin d'une méthode unique, applicable au contrôle d'authenticité de tout type de miel

# Comment optimiser les contrôles?



**Les analyses  
d'authenticité / sécurité  
alimentaire aujourd'hui**



**Les analyses  
d'authenticité / sécurité  
alimentaire de demain**



Projet R&D 2012-2017 conduit  
par EUROFINS



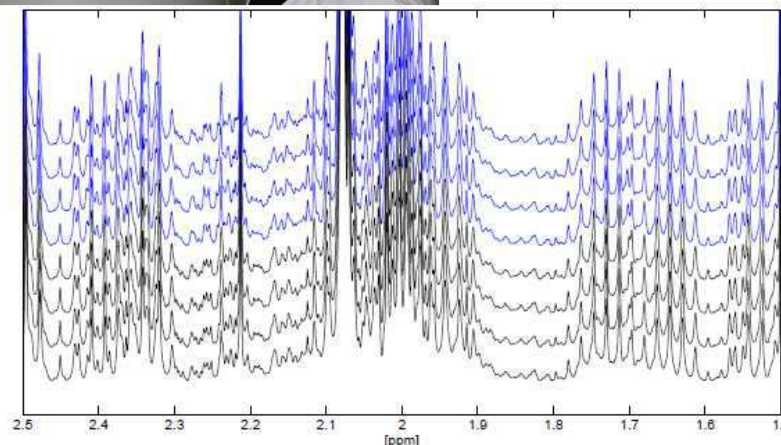
# RMN Haute résolution

Domaine d'observation:  
Composés organiques,  
ppm à %



## Forces principales:

- Large domaine de linéarité
- Délai court
- Reproductibilité importante
- Discrimination fine



*publication*

— Lab 1  
— Lab 2

Fast and global authenticity screening of honey  
using  $^1\text{H-NMR}$  profiling,

**Food Chemistry 2014**

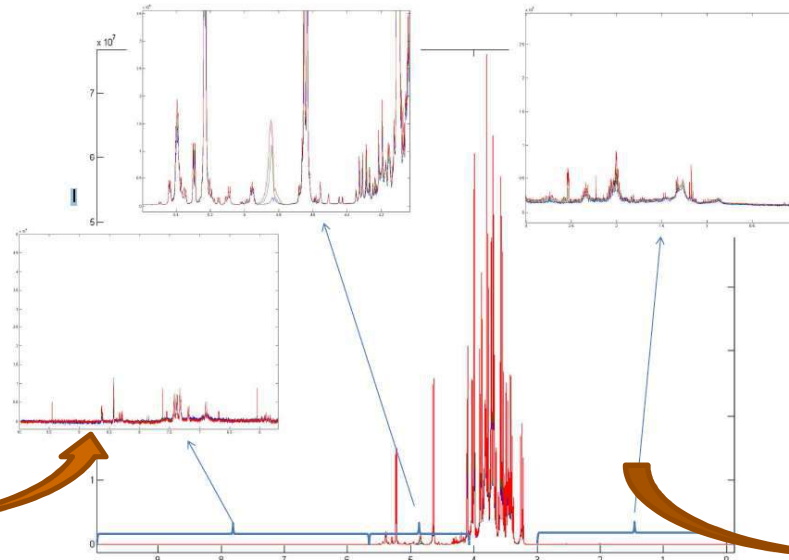
*DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.11.099*





- Le spectre  $^1\text{H-NMR}$  est obtenu sur la matrice complète

**Spectre unique : empreinte**



- Détection de marqueurs et des effets sur le spectre des adultérations
- Quantification des paramètres clés de qualité
- Confirmation de l'origine botanique des miels monofloraux

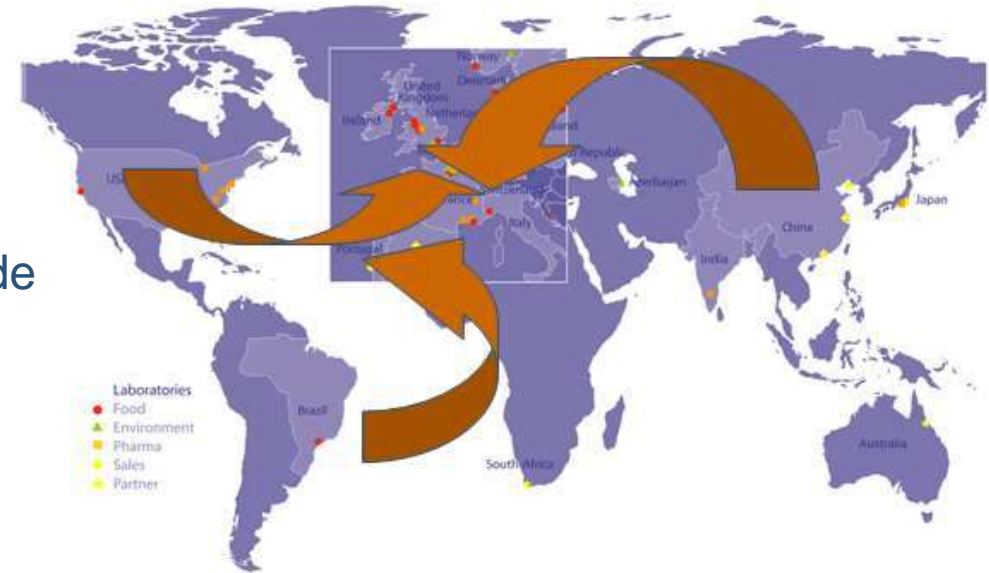
**Authenticité  
+  
Alternative aux  
méthodes  
conventionnelles**

# Construction d'une base de données authentique mondiale



Echantillons de référence: > 3500  
>100 familles botaniques

Collectés chez des producteurs locaux  
Dans plus de 50 pays à travers le monde  
Depuis plus de 10 ans (Europe)

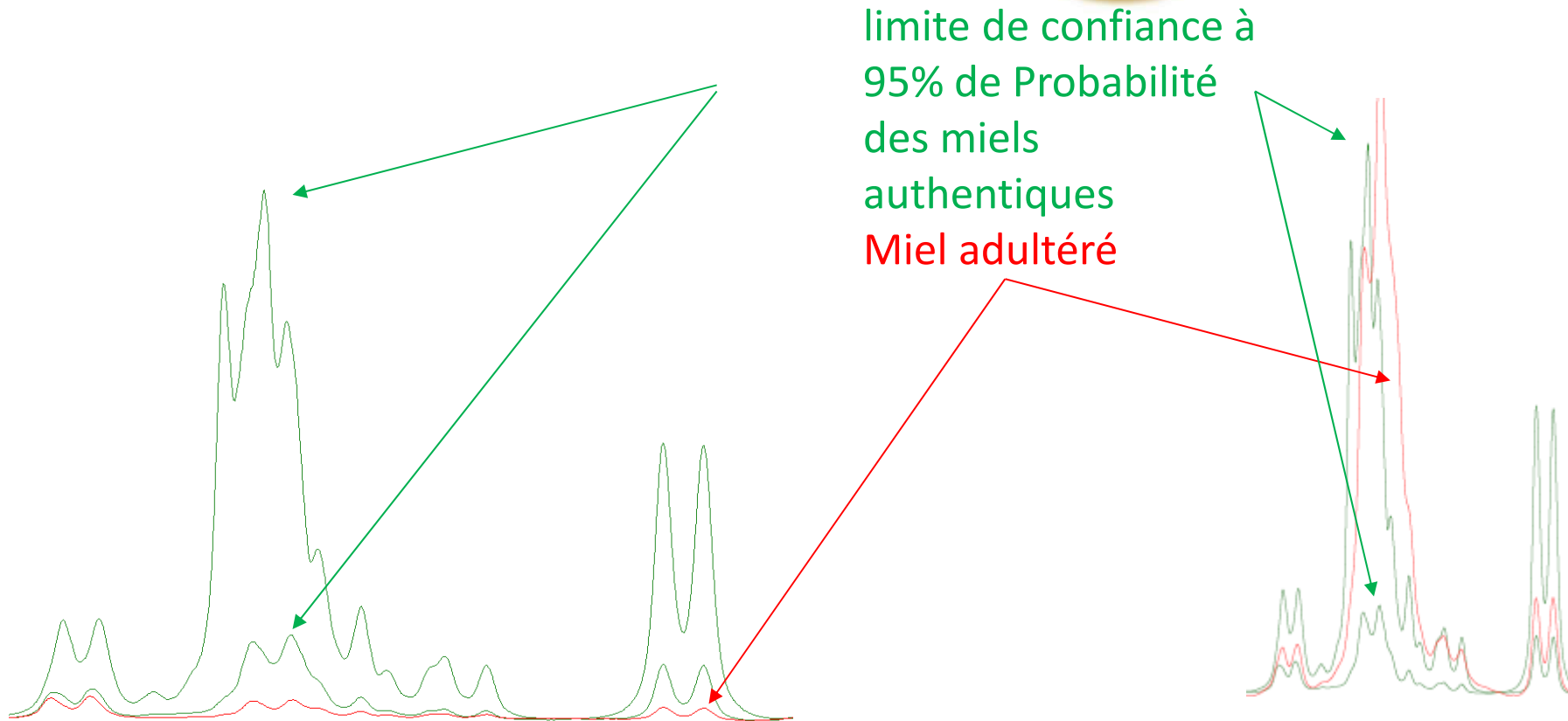


➔ Critères de détection : stables et robustes pour toutes les origines géographiques étudiées

➔ Modèles spécifiques : monofloraux, miels de miellat...

# Application du profiling RMN au miel

## 1) Detection d'ajout de sucres (C3 & C4)



limite de confiance à  
95% de Probabilité  
des miels  
authentiques  
**Miel adultéré**

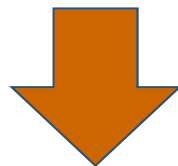
Détection indirecte:  
Effets de dilution

Détection directe:  
Marqueurs de sirop de sucres

# Comparaison de la méthode RMN avec les méthodes conventionnelles

Echantillons avec ajouts dosés (addition de sirop de sucres en C3):

Sample type	Spiked amount (added / total sugar)	Conclusion from NMR profiling (Eurofins)	Conclusion from LC-IRMS (lab X)	Conclusion from foreign enzyme (lab X)	Conclusion from oligosaccharides (lab X)
Acacia (Austria)	0%	No added sugar	No added sugar	No added sugar	Oligosaccharides traces, could be due to feeding
Fir (France)	0%	No added sugar	No added sugar	No added sugar	No added sugar
Sunflower (Austria)	10%	added sugar	No added sugar	No added sugar	No added sugar
All flowers (Gatinais, France)	20%	added sugar	No added sugar	No added sugar	No added sugar
Oak (Spain)	30%	added sugar	No added sugar	No added sugar	No added sugar



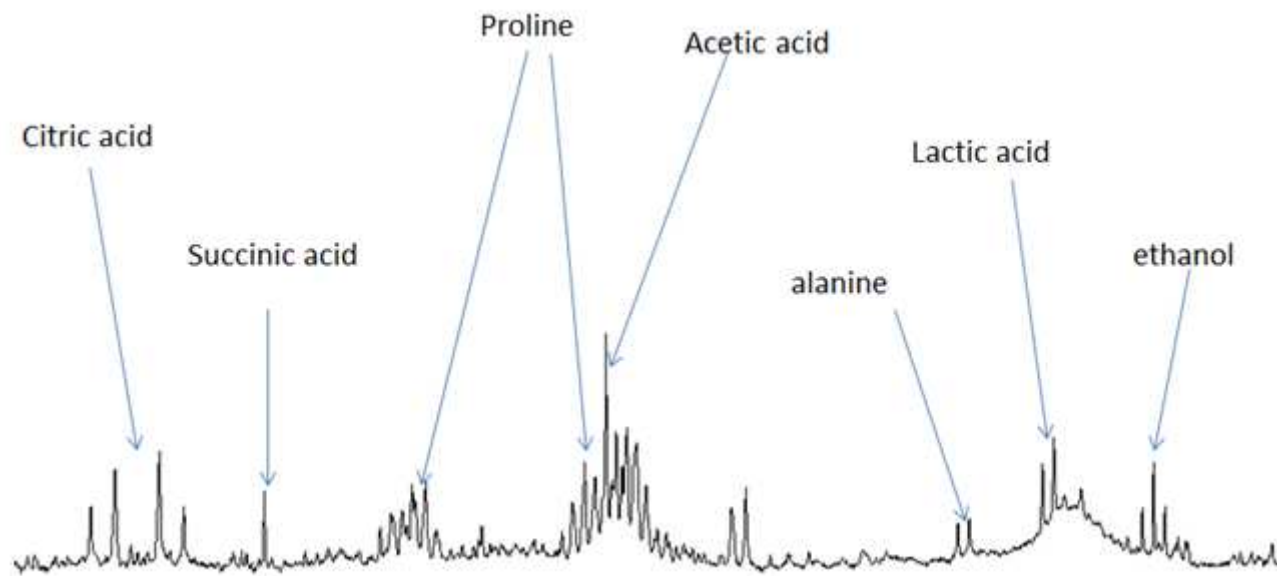
Le profiling RMN est plus sensible, surtout quand du sucre en C3 est ajouté

## Application du profiling RMN au miel

### 2) Critères de qualité



- Marqueurs de fermentation (haute teneur en acide acétique, lactique, succinique et/ou éthanol)
- Chauffe trop importante (5-HMF)
- Ajout de caramel pour la coloration



Robustesse du profiling :

- Stockage-Vieillessement
- Chauffage modéré
- Fermentation

Pas d'effet sur la  
détection  
d'adultération



# Paramètres quantifiés par RMN



ISO17025  
Accreditation\*



Test code	Parameter
AA0SG	Glucose
	Fructose
	Glucose+Fructose
	Sucrose
	5-HMF
	Fructose/Glucose
	Turanose
	Citric acid
	Ethanol
	Acetic acid
AA06C	Lactic acid
	Succinic acid
	Dihydroxyacetone (DHA)
	Methylglyoxal (MGO)
	Leptosperin

Comparaison aux limites réglementaires (EC directive, Codex Alim.)

Comparaison à la littérature & bases de données

\* Eurofins Analytics France is accredited by COFRAC under registration n° 1-0287, details on [www.cofrac.fr](http://www.cofrac.fr)

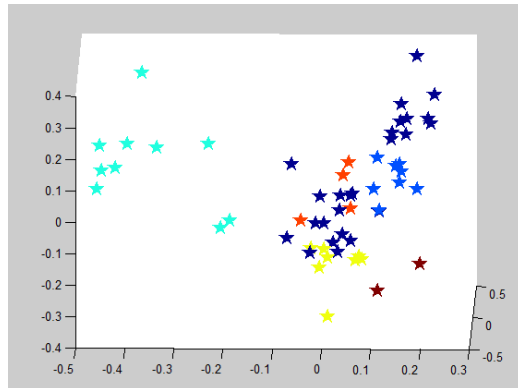


# Application du profiling RMN au miel

## 4) Confirmation de l'origine botanique



RMN

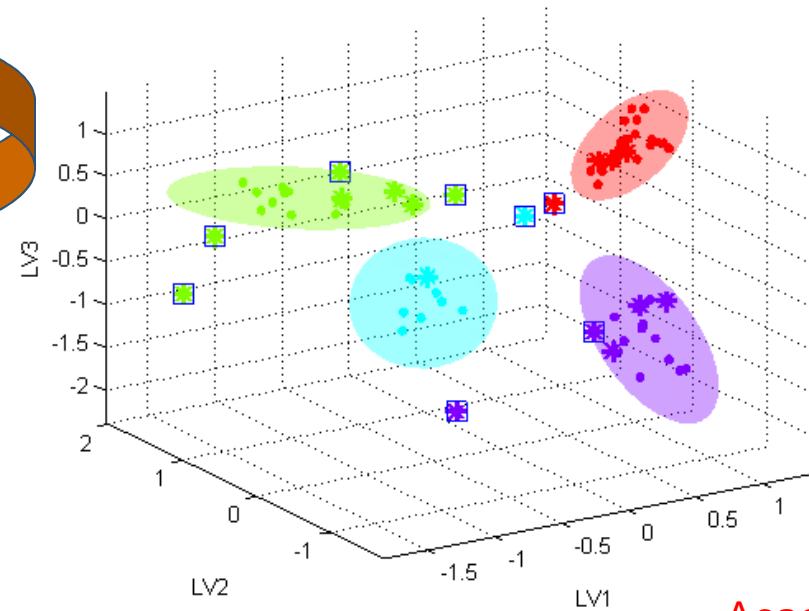
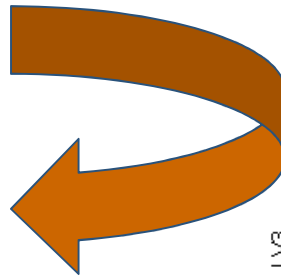


Lavender  
Flowers  
Acacia  
Mountain  
Orange  
Eucalyptus

En complément de UPLC-TOF

Fusion des données

sLDA results for LVs=3 max iterations=200 number of variables 25  
labels indicates final group based on distance to ellipsoid



Acacia  
Citrus  
Rapeseed  
Sunflower

*Spiteri, Dubin, Cotton et al.*  
*Data fusion between high resolution <sup>1</sup>H-NMR and mass spectrometry:  
a synergetic approach to honey botanical origin characterisation  
(in review)*

# Application du profiling RMN au miel

## 5) Confirmation de l'origine géographique

➔ Plusieurs approches

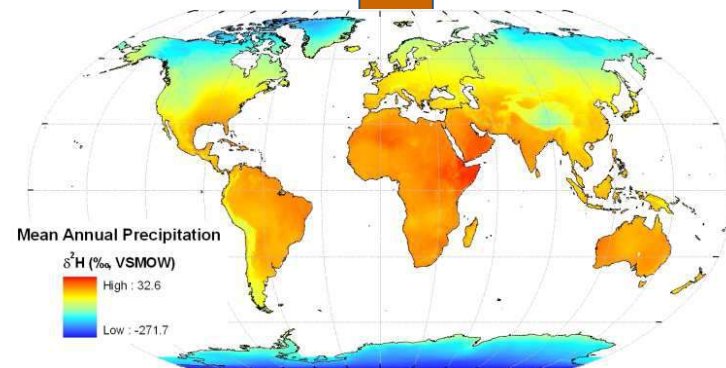
Facteurs  
environnementaux

Analyse pollinique

Empreinte RMN

Profil isotopique

Multi-isotope analysis:  
 $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^2\text{H}$  sur protéines  
**ISO17025 Accreditation\***



# Informations clés à retenir



## **$^1\text{H}$ NMR technique pour des tests en routine**

### **Avantages**

- Screening rapide
- Fiabilité importante
- Beaucoup d'informations en une seule analyse
- **Sensibilité accrue / sucre C3**

### **Limites**

- Selon la Matrice/adulterant – les limites de détections varient
- Ne permet pas de détecter la présence de minéraux, métaux lourds ou des contaminants à l'état de trace

### **Recommandations**

- Combiner les méthodes par NMR et IRMS pour un contrôle de l'authenticité optimal
- A associer avec un plan de surveillance pour les contaminants



**Merci de votre attention**