

**École polytechnique de Louvain**

**Détection des fraudes en sucres  
dans les miels: appui au  
développement d'une méthode se  
basant sur la technique  
HPAEC-PAD**

Auteur: **Killian MICHEL**

Promoteurs: **Patricia LUIS ALCONERO, Carine MASSAUX**

Lecteurs: **Denis DOCHAIN, Patrick GERIN**

Année académique 2022–2023

Master [120] : ingénieur civil en chimie et science des matériaux

# Table des matières

<b>Abstract</b>	<b>3</b>
<b>Remerciements</b>	<b>4</b>
<b>Introduction</b>	<b>5</b>
<b>1 Recherche documentaire</b>	<b>8</b>
1.1 Composition du miel et les glucides . . . . .	8
1.1.1 Composition générale du miel . . . . .	8
1.1.2 Les sucres dans le miel . . . . .	9
1.2 Propriétés du miel . . . . .	15
1.2.1 Cristallisation . . . . .	15
1.2.2 Origine botanique . . . . .	17
1.2.3 Autres propriétés . . . . .	20
1.3 Fraudes en miels . . . . .	23
1.3.1 Législation existante . . . . .	23
1.3.2 Fraudes liées aux mauvaises pratiques existantes . . . . .	25
1.3.3 Fraudes volontaires . . . . .	25
1.3.4 Contrôle de l'Union Européenne - 2015 et 2021 . . . . .	29
1.4 Détection et analyse . . . . .	32
1.4.1 Chromatographie . . . . .	32
1.4.2 Autres méthodes . . . . .	35
1.4.3 Chromatographie à haute performance par échange d'anions à détection ampérométrique pulsée (HPAEC-PAD) . . . . .	38
<b>2 Méthodologie</b>	<b>47</b>
2.1 Matériel et Réactifs . . . . .	47
2.1.1 Matériel . . . . .	47
2.1.2 Réactifs . . . . .	47
2.2 Mode opératoire . . . . .	51
2.2.1 Préparation d'une solution de NaOAc 1M . . . . .	51
2.2.2 Préparation des solutions standards . . . . .	51
2.2.3 Préparation d'une solution témoin de sucres . . . . .	52
2.2.4 Préparation des éluants . . . . .	53
2.2.5 Préparation d'une solution de miel . . . . .	53
2.3 Analyse HPAEC-PAD . . . . .	53
2.3.1 Analyse de référence . . . . .	53
<b>3 Résultats et analyses</b>	<b>60</b>
3.1 Détermination du temps d'élution des sucres . . . . .	60

3.2	Détermination de la justesse des résultats obtenus par chromatographie HPAEC-PAD . . . . .	67
3.3	Détermination de la répétabilité de l'analyse de glucides par chromatographie HPAEC-PAD . . . . .	74
3.4	Détermination de l'influence des éluants . . . . .	77
3.5	Détermination de la détection d'adultération dans du miel . . . . .	81
3.6	Déterminations des limites de l'analyse des glucides par chromatographie HPAEC-PAD . . . . .	86
	<b>Conclusion</b>	<b>88</b>

# Abstract

Le miel est un aliment largement consommé au quotidien. Cependant, il peut arriver que celui-ci présente une altération de sa composition relevant de techniques frauduleuses pour le rendre plus rentable économiquement. De ce fait, il est nécessaire de développer des méthodologies permettant de détecter efficacement ces adultérations. Une méthodologie qui émerge dans ce domaine est la chromatographie à échange d'anions à détection ampérométrique. Cette technique de chromatographie permet de caractériser précisément les sucres dans le miel. Cette propriété en fait un candidat pour la détection de glucides exogènes dans ces aliments.

L'objectif de ce travail est donc de développer une méthode de détection d'adultérations dans les miels avec la technique HPAEC-PAD au moyen du système de chromatographie **Metrohm 930 Compact IC Flex** de la société Metrohm. Pour ce faire, il s'agit d'abord de déterminer si la méthodologie permet de caractériser correctement le profil en sucres des miels. Par la suite, il convient d'évaluer si cette nouvelle méthode est apte à évaluer la présence d'adultérant dans un miel.

Malgré une bonne correspondance entre les temps des pics et les sucres auxquels ils doivent être associés, ainsi qu'une répétabilité avérée des analyses effectuées par ce système, la technique HPAEC-PAD au moyen du système de chromatographie **Metrohm 930 Compact IC Flex** de la société Metrohm ne permet pas encore d'être utilisée pour la caractérisation du miel. En effet, les résultats obtenus ne sont pas encore assez précis pour accréditer son utilisation.

Cependant, les analyses de miels adultérés ont permis de démontrer que cette méthode est apte à reconnaître la présence de sucres d'origine étrangère. Cela permet de conclure que malgré le manque actuel de précision dans les résultats, cette méthodologie a le potentiel d'être utilisée à l'avenir pour la caractérisation du miel et pour le contrôle de l'authenticité de cet aliment.

# Remerciements

Avant tout, je tiens à remercier madame Patricia Luis Alconero, professeur à l'école polytechnique de l'UCLouvain, ainsi que madame Carine Massaux, responsable du laboratoire de l'ABL Cari, pour leurs conseils judicieux et pour avoir mis à ma disposition les ressources nécessaires ainsi que leur disponibilité afin de me guider dans la complétion de ce travail.

Mes remerciements vont également à l'ensemble des membres du Cari qui m'ont chaleureusement accueilli dans leurs bureaux pendant toute cette année. Je tiens, plus particulièrement, à remercier les membres du laboratoire d'analyse qui m'ont apporté leurs connaissances et leurs perspectives pour l'utilisation des divers outils expérimentaux ainsi que pour la préparation des multiples solutions.

Je souhaite exprimer ma reconnaissance envers Alexandru Tudor Boborodea pour sa collaboration, les échanges d'idées et ses commentaires constructifs qui ont grandement enrichi ce travail.

Enfin je tiens à témoigner toute ma gratitude à mes parents, à mon frère et à ma soeur, ainsi qu'à mes amis pour leurs soutiens et leurs encouragements tout au long de ce travail.

# Introduction

Le miel, un aliment largement consommé au quotidien, est une substance composée principalement de sucres, représentant environ 70 à 80 % de son poids. Cependant, celui-ci peut être sujet à des adultérations affectant de ce fait sa qualité et son authenticité. Pour exemple, la commission européenne a effectué un plan d'analyse des miels importés sur son territoire en 2021: sur 320 échantillons analysés, 147 ont été identifiés comme suspect.[1] De telles altérations permettent de tromper le consommateur et rendent plus rentable économiquement cet aliment. Pour lutter contre cette pratique, l'Union européenne a imposé des règles à ses pays membres visant à contrôler les miels qui circulent sur leur territoire.[2]

Dans un contexte actuel de préoccupations croissantes concernant l'intégrité des produits alimentaires, il est nécessaire de mettre en place des méthodes d'analyse et de détection sensibles et fiables pour les laboratoires de contrôle tel que celui de l'ASBL CARI. Il existe, de ce fait, plusieurs méthodologies visant à détecter les différentes méthodes de fraudes que peut subir le miel. L'une des méthodologies qui permet de déterminer si un miel a subi une pratique frauduleuse au niveau de ses sucres est la chromatographie. Il s'agit d'une technique séparative analytique qui permet de séparer et d'analyser les composants d'un mélange en fonction de leurs interactions avec une phase stationnaire. Il existe différentes variantes de cette technique qui sont reconnues pour permettre de réaliser cette détection de fraudes. Parmi celles-ci se trouve, par exemple, la chromatographie gazeuse qui détermine et quantifie certains sucres présents dans le miel en faisant passer, à travers sa colonne, une solution de ce miel en phase gazeuse.

Cependant, ces techniques présentent des désavantages tel qu'un manque de précision ou un temps d'analyse et de préparation des échantillons trop important. Une technique, qui est en train d'émerger dans ce domaine et qui permettrait d'éviter ces problèmes, est la chromatographie à échange d'anions à détection ampérométrique (HPAEC-PAD). Celle-ci permet de séparer et quantifier avec précision une variété de composants présents dans des échantillons sur base de leurs propriétés ioniques.

Toutefois, cette technique n'est pas encore reconnue comme une technique fiable de détections des fraudes en sucres dans les miels. En effet, malgré ses potentiels avantages, l'application de l'HPAEC-PAD pour la détection des adultérations soulève plusieurs questions. Comment développer une méthodologie robuste qui permet d'obtenir des résultats précis ? Comment déterminer si le système permet de détecter des adultérations dans un miel ? Est-il possible de réduire les temps d'analyse sans diminuer la précision des résultats ?

Ce travail vise à développer une méthodologie basée sur la chromatographie à échange d'anions avec détection ampérométrique à partir d'un chromatographe provenant de la société Metrohm afin de permettre la détection des fraudes en sucres dans les miels par le laboratoire d'analyse de l'ASBL CARI.

Pour ce faire, cette recherche s'appuie sur les questions préalablement soulevées et se donne les objectifs spécifiques qui suivent.

Tout d'abord, l'élaboration d'une méthodologie efficace et répétable de la HPAEC-PAD est visée, afin de permettre l'analyse et la caractérisation des miels ainsi que des solutions de sucres adultérants.

Ensuite, il s'agit de déterminer l'influence que les solvants exercent sur la vitesse d'analyse et sur la qualité des résultats obtenus.

Par la suite, l'objectif consiste à évaluer l'utilisation de la HPAEC-PAD pour la détection des adultérations dans le miel, en se basant sur les variations de composition chimique induites par ces pratiques.

Finalement, il s'agit de déterminer les limites inhérentes au système pour l'analyse de solutions de miels.

Ce travail permettra d'apporter une contribution à la lutte contre les pratiques d'adultération dans l'industrie du miel en fournissant une nouvelle méthode d'analyse pas trop chère, efficace et robuste pour détecter ces falsifications.

Ce travail est organisé selon plusieurs chapitres. Il commence, par une synthèse des informations présentes dans la littérature sur différents sujets: d'abord le miel et sa composition, ensuite les fraudes qu'il peut subir ainsi que les différentes techniques permettant leur détection, et enfin une description détaillée de l'HPAEC-PAD et son utilisation dans le domaine du miel.

Ensuite, le matériel et la méthodologie utilisés sont présentés afin de réaliser les diverses expérimentations sur l'HPAEC-PAD qui permettent de répondre aux objectifs de la recherche.

Le dernier chapitre détaille les résultats obtenus sur base des expériences effectuées et l'interprétation de ces résultats.

Enfin, ce travail se termine par un récapitulatif des conclusions des différentes analyses réalisées afin d'atteindre les objectifs énoncés précédemment, ainsi qu'une proposition de recommandations pour de futurs travaux.



# Chapitre 1

## Recherche documentaire

### 1.1 Composition du miel et les glucides

#### 1.1.1 Composition générale du miel

Le miel est défini selon la commission européenne comme : "*la substance sucrée naturelle produite par les abeilles de l'espèce *Apis mellifera* à partir du nectar de plantes ou des sécrétions provenant de parties vivantes des plantes ou des excréments laissés sur celles-ci par des insectes suceurs, qu'elles butinent, transforment en les combinant avec des matières spécifiques propres, déposent, déshydratent, entreposent et laissent mûrir dans les rayons de la ruche*".[2]

Le miel est donc un aliment naturel composé de divers éléments. Parmi ceux-ci, il y a des sucres, de l'eau, des enzymes, des minéraux, des vitamines, des protéines et des acides aminés. La concentration en sucres est plus importantes que les autres et doit être supérieure à 60 % massique du miel pour suivre les normes du Comité du Codex Alimentarius sur les sucres de 2001. Cependant, cette concentration est très souvent retrouvée aux alentours de 78-80 %. Le second élément dont la concentration dans le miel est la plus importante est l'eau à environ 15-20 % massique. Pour ce qui est des protéines et des enzymes, leur concentration est aux alentours de 1.2 % de la composition du miel. Les enzymes peuvent provenir autant des végétaux que des animaux par notamment la sécrétion salivaire des abeilles. Ces enzymes sont importantes et doivent être contrôlées comme elles permettent la conversion autonome de sucres et d'autres éléments dans le miel. On peut notamment retrouver le "glucose oxydase" qui convertit le glucose en  $\delta$ -gluconolactone, qui est hydrolysé en acide gluconique ou la  $\beta$ -amylase qui hydrolyse l'amidon présent dans le miel conduisant à la formation de maltose.

La définition du miel prodigue également une distinction entre 2 types de miels qui sont le miel de nectar et le miel de miellat. Le miel de nectar est un miel qui provient directement du butinage des fleurs par les abeilles. Le miel de miellat,

quant à lui, fait intervenir un intermédiaire. Des insectes, tels que les pucerons ou les cochenilles, se nourrissent des matières azotées dans la sève et rejettent ensuite les sucres qu'ils ne peuvent pas digérer. Ces rejets sont alors récoltés par les abeilles pour en faire du miel.

### 1.1.2 Les sucres dans le miel

Comme mentionné précédemment, les sucres aussi appelés glucides sont les éléments les plus présents dans le miel. Ces derniers sont notamment responsables du goût sucré de cet aliment. Les monosaccharides sont la forme la plus basique des glucides et sont présents aux alentours de 75 % de la concentration totale en sucres du miel.[3] Les molécules qui le compose sont sous la forme  $(CH_2O)_n$ . Il y a donc un carbone central lié à un atome d'hydrogène et à un groupement hydroxyle. Les monosaccharides peuvent être séparés en 2 catégories qui sont les aldoses possédant un groupement aldéhyde tel le glucose, et les ketoses possédant un groupement cétone comme il est visible à la table 1.1.[4]

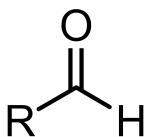
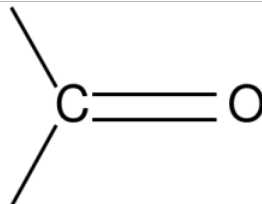
Aldéhyde	Cétose
	

Table 1.1: Groupements aldéhyde et cétose

Les monosaccharides peuvent cycliser. Cela se fait par héli-acétalisation et forme un nouveau centre chiral qui devient le nouveau centre anomérique permettant de distinguer les structures alpha et béta. Les monosaccharides peuvent être écrits sous cette forme cyclique grâce à la représentation de Fischer et ces formes cycliques des monosaccharides sont décrites comme pyranoses ou furanoses en référence aux structures hétérocycliques pyrane et furane comme à la figure 1.2.[5] Lorsqu'un aldéhyde ou un cétone rentre en contact avec un alcool en présence d'un acide, il y a formation d'un hémiacétal qui peut réagir encore une fois avec un second alcool pour former un acétal. Les formes cycliques des monosaccharides sont des hémiacétals. Cela signifie que le groupe hydroxyle attaché au carbone anomérique peut réagir avec un alcool pour former un disaccharide qui est appelé glucoside dans le cas où le monosaccharide est un glucose. Les oligo- et polysaccharides sont des glycosides où l'aglycone peut être un autre glucide.[5] En ce qui concerne les disaccharides, ceux-ci peuvent être réducteur s'ils possèdent

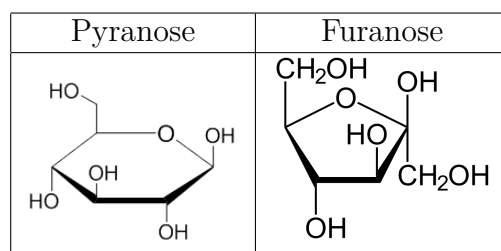


Table 1.2: Formes pyranose et furanose

un groupe carbonyle libre. Dans le cas où ils sont non-réducteurs, les monosaccharides sont liés par leurs centres anomériques respectifs de telle sorte que le groupe carbonyle ne soit plus disponible pour réagir. La table 1.3 montre un exemple de différents disaccharides présents dans le miel.[5]

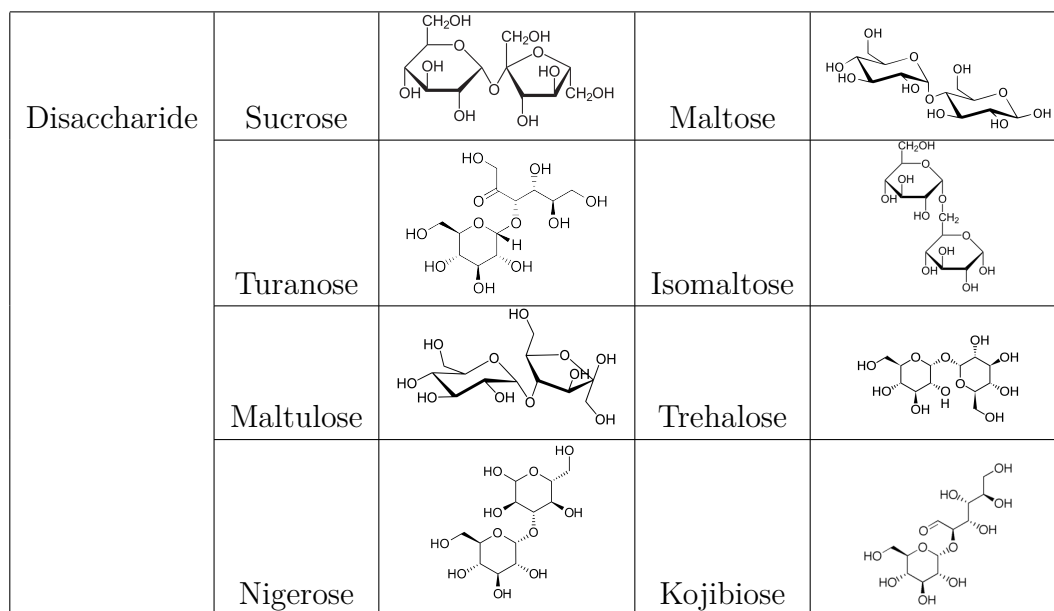


Table 1.3: Exemple de disaccharides présents dans le miel

Les polysaccharides sont aussi appelés "glycanes". En fonction des monomères de base utilisés, ils font parties d'une famille différente comme les glucanes, fructanes, galactanes, etc. qui réfèrent respectivement au glucose, fructose et au galactose. Les polysaccharides peuvent être composés soit d'un seul type de monomère et sont donc appelés "homopolysaccharides", soit de différents monomères et se font appelés alors "hétéropolysaccharides".[5]

## Les Monosaccharides

Les monosaccharides sont donc les unités principales des glucides dont deux particulièrement qui sont le glucose et le fructose.

Le glucose, aussi appelé dextrose, est un monosaccharide. Sa formule est  $C_6H_{12}O_6$  et il possède une masse molaire de 180 g/mol.[5, 6] Il s'agit d'un polyalcool qui contient un groupement aldéhyde ce qui en fait un aldose comme énoncé précédemment. La molécule possède 4 atomes chiraux qui sont les carbones 2, 3, 4 et 5 comme montré à la figure 1.1.[6] La forme naturelle du glucose est la forme D d'où l'appellation régulière de d-glucose. Comme chacun des atomes chiraux peut adopter une conformation ou l'autre, la distinction entre la forme L et D se fait sur base du carbone 5 afin d'éviter 16 dénominations différentes.[6]

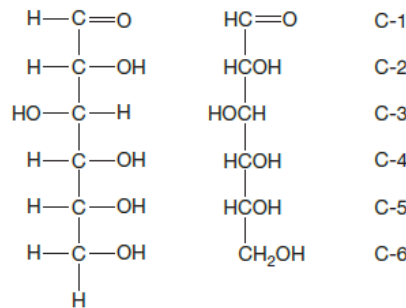


Figure 1.1: Forme linéaire du glucose[6]

Dans sa forme cyclique, le glucose perd son groupe aldéhyde mais forme un groupe ester à la place. L'hémi-acétalisation se fait par réaction entre le carbone 5 et celui de l'aldéhyde.[6] La forme ouverte étant thermodynamiquement instable, le dextrose va s'isomériser spontanément en sa forme cyclique.[6]

La répartition des différentes formes du glucose à température ambiante est de 36 % de glycopyranose alpha et 64 % de glycopyranose bêta. Ces formes sont représentées sur la figure 1.2. Il existe un infime pourcentage de glucose linéaire et moins de 0.5% des anomères alpha et beta de glucofuranose.[5]

Le fructose, moins communément appelé lévulose, est également un monosaccharide. Tout comme le glucose sa formule chimique est  $C_6H_{12}O_6$  ce qui fait que sa masse molaire est la même puisqu'ils s'agit d'isomères.[5] Le lévulose est un polyalcool contenant un groupement cétone faisant de lui un cétose comme écrit précédemment. Le fructose possède également 4 atomes chiraux, à savoir les atomes 3, 4, 5 et 6, montrés à la figure 1.3. Tout comme le glucose, la forme naturelle du fructose est la forme D qui est de ce fait appelée d-fructose.[5][7]

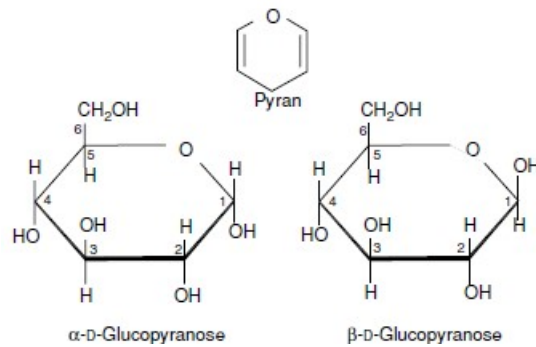


Figure 1.2: Glycopyranoses alpha et beta[5]

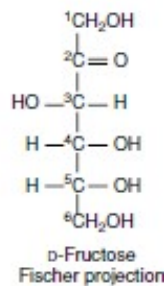


Figure 1.3: Forme linéaire du fructose[5]

Le processus de transformation de la forme linéaire à la forme cyclique est le même que celui énoncé dans la partie sur le glucose et se produit également spontanément en raison de la non-stabilité thermodynamique de la forme linéaire. Les différentes formes du fructose à températures ambiantes sont le fructofuranose alpha et bêta, le fructopyranose bêta, et la forme linéaire avec un pourcentage respectif de 4, 20, 76, et une infime partie. Ces différentes formes cycliques sont montrées dans la table 1.4.[5]

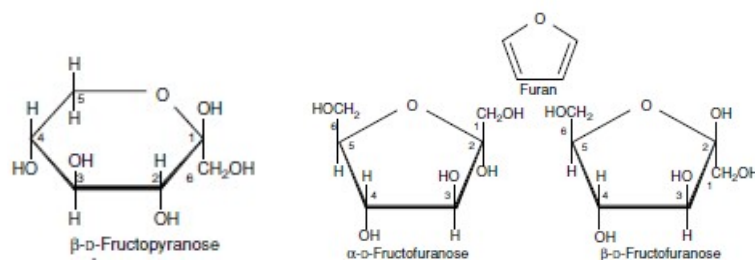


Table 1.4: Fructopyranose beta ainsi que Fructofuranoses alpha et beta[5]

Dû au fait que ces deux monosaccharides possèdent un groupe carbonyle libre, il

s'agit de sucres réducteurs. Ces sucres en contact avec des acides primaires durant une longue période peuvent réagir et former une base de Schiff comme montré aux figures 1.4 et 1.5.[8, 9] Cette base va procéder à un réarrangement qui va être différent selon le fait d'avoir une molécule de fructose ou de glucose à l'origine. Si le sucre de base est le fructose, le réarrangement sera celui de Heyns, alors que pour le glucose ce sera celui de Amadori.[8, 9, 10] Les produits résultants sont les réactions initiales d'une suite de réactions appelée réaction de Maillard. Cette réaction est celle responsable du brunissement du miel avec le temps et n'est pas enzymatique.[8, 9]

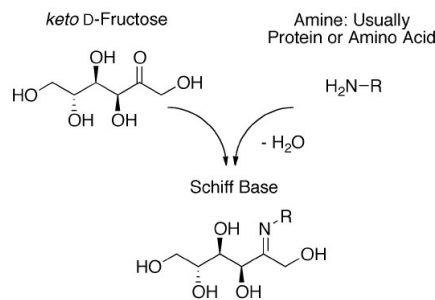


Figure 1.4: Base de Schiff formée à partir du fructose [8]

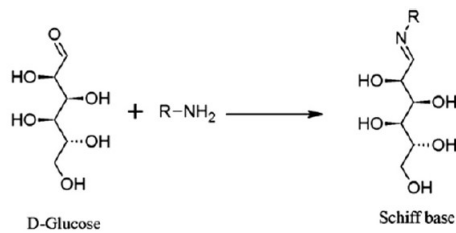


Figure 1.5: Base de Schiff formée à partir du glucose [9]

Un des intermédiaires de cette réaction est le 5-Hydroxyméthylfurfural (5-HMF). Cet élément est un produit direct de la dégradation des glucides dû à une température élevée ou à un stockage prolongé. Il permet donc de déterminer le temps de conservation d'un miel. Comme il s'agit d'un élément toxique et cancérigène quand il est ingéré en grande quantité, il existe des législations pour limiter la vente de miels à haute concentration en 5-HMF.[9, 11]

### Les disaccharides

Les disaccharides sont, comme énoncé auparavant, le résultat d'une combinaison entre deux monosaccharides. Ils sont présents à hauteur de 10 à 15% dans le

miel.[12, 13] Les principaux trouvés dans le miel sont le sucrose, le tréhalose, le maltose, le maltulose, l'isomaltose, le turanose et kojibiose.[13, 14]

Le sucrose est la combinaison entre une molécule de glucose et une molécule de fructose par leur extrémité réductrice respective empêchant toute liaison future avec un autre saccharide.[14]

La principale caractéristique de ce sucre est le goût sucré qu'il possède. Il est l'élément de base sur lequel les autres sont comparés en ce qui concerne ce goût sucré ce qui lui confère de ce fait un pouvoir sucrant relatif au sucrose de 1.[14]

Le sucrose se décompose en glucose et fructose soit avec le temps soit avec l'enzyme invertase ce qui fait qu'il est un acteur à la formation du 5-HMF.[14]

Le tréhalose est tout comme le sucrose, une molécule de stockage dans beaucoup d'organismes non-photosynthétiques comme les champignons, la levure, certaines bactéries ainsi que dans les fluides corporels d'insectes. Cela permet notamment de déterminer l'origine florale d'un composé si celui-ci possède une grande quantité de tréhalose.[14]

Ce disaccharide est plus stable que le sucrose et ne se décomposera pas avec le temps ou la température contrairement à ce dernier.[14]

### **Les oligosaccharides**

Les oligosaccharides sont présents dans le miel en une fraction bien moins importante que les deux monosaccharides présentés ci-dessus. Pourtant, ceux-ci possèdent une grande importance dans les miels. En effet, ceux-ci permettent notamment de déterminer l'origine botanique ainsi que géographique des miels, ce qui peut aider à déterminer une fraude si les origines indiquées ne correspondent pas aux différentes teneurs obtenues. Leur présence est majoritairement due à l'action de l'enzyme invertase sur le sucrose dans le miel qui va permettre de former des molécules de glucose et de fructose et ces molécules vont ensuite se recombinaisonner pour former des oligosaccharides. De ce fait, la présence en quantité de cette enzyme ou du sucrose va changer la concentration en oligosaccharides. Le fait qu'ils soient présents en faibles concentrations permet de mesurer de grandes différences relatives à l'analyse lorsque leurs concentrations varient légèrement.[12]

Il est par exemple démontré que la proportion de mélézitose et de raffinose (des trisaccharides) est plus importante dans un miel de miellat que dans un miel de nectar (tableau 1.5). Cela résulte de la formation de ces sucres dans le corps de l'insecte piqueur avant d'être relâchés dans le miellat que l'abeille va récolter pour produire du miel.

	miel de miellat (%)	miel de nectar (%)
Mélézitose	0.86	0.2
Raffinose	0.84	0.03

Table 1.5: Comparaison de trisaccharides entre un miel de miellat et un miel de nectar [15]

## 1.2 Propriétés du miel

### 1.2.1 Cristallisation

Le miel est une substance capable de cristalliser puisqu'il peut être considéré comme une solution aqueuse très concentrée en sucres, et principalement en glucose et en fructose.[5, 16, 17, 18, 19] Cela peut être observé à la figure 1.6. La figure représente

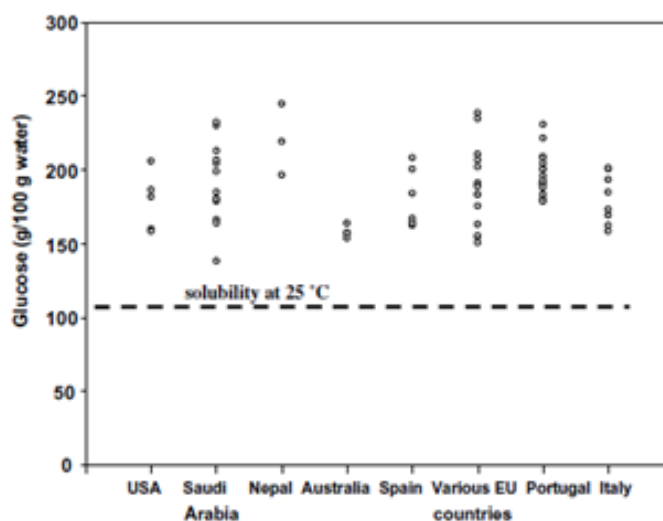


Figure 1.6: Quantité de glucose dans divers régions du monde[16]

la concentration en glucose de différents miels dans diverses régions du monde par des points et les compare à la concentration de saturation de ce glucide dans l'eau. La concentration de saturation est la concentration à laquelle un composé ne peut se dissoudre dans un solvant. Dans le cas présent, le glucide est le soluté et l'eau le solvant. On voit bien que pour des miels provenant de divers endroits dans le monde, la concentration en glucose est supérieure à sa concentration de saturation à 25°C qui vaut  $103.3 \text{ g}_{\text{glucose}}/100\text{g}_{\text{eau}}$ . En ce qui concerne le fructose, sa concentration de saturation à 25°C est de 222 à 225  $\text{g}_{\text{fructose}}/100\text{g}_{\text{eau}}$ , ce qui est supérieur à la concentration en fructose habituellement trouvée.[16] Malgré cette sursaturation, la cristallisation ne va pas forcément se faire puisqu'il s'agit d'un



état méta-stable. Il faut donc tenir compte de différents paramètres.

Le premier paramètre influençant la cristallisation du miel est évidemment le degré de sursaturation. Il peut être relié à l'activité à l'équilibre de l'eau  $a_w$  qui correspond à la disponibilité de l'eau pour réagir dans des réactions. L'activité est définie comme  $a_w = \frac{f_T}{F_T}$  ce qui correspond au rapport entre la tension de vapeur de l'eau à la surface du produit à la température T et celle à la surface de l'eau pure.  $a_w$  peut varier entre 1 pour de l'eau pure et 0 pour un produit totalement sec. Cette activité vaut 0.891 à 25°C pour une solution aqueuse avec du glucose à l'équilibre.[16] Quand un système est sursaturé, comme un miel par exemple, l'activité de l'eau diminue, créant un déséquilibre thermodynamique. L'excès en soluté va tendre à cristalliser afin de réaugmenter cette valeur jusqu'à la concentration d'équilibre.[16, 18]

Le second paramètre est la viscosité du système. Pour que la cristallisation se fasse, il faut que les molécules de glucose pouvant cristalliser puisse se mouvoir dans la solution. De ce fait, si la concentration en glucides devient trop importante, le miel ne pourra pas cristalliser. D'autres éléments peuvent également avoir un impact sur la viscosité du mélange tels que le taux d'humidité et la présence de colloïdes.[18] En troisième lieu, il s'agit de la présence d'éléments catalytiques. On peut notamment voir la présence de cristaux et/ ou de poussières en solution. Cela permet au glucose de réaliser de la cristallisation hétérogène qui est moins restreignant thermodynamiquement parlant et qui donc se déroulera plus rapidement qu'une cristallisation homogène. En plus de cela, on peut observer aussi la présence de chocs thermiques ou d'agitation afin de catalyser la transformation.[18]

Le dernier point ayant un impact sur la cristallisation est la composition de la solution. Le glucose est le seul sucre capable de cristalliser mais le fructose abaisse considérablement la vitesse de cristallisation du dextrose sans pour autant faire varier la saturation du glucose.[18, 19] Cela est observable dans le tableau 1.6 avec les données obtenues par [18].

Fraction de glucose	Fraction de fructose	Fraction d'eau	Rapport entre le glucose et l'eau	Temps de cristallisation
34	50	16	2.12	moins de 30 jours
32	52	16	2	à partir de 120 jours
28	56	16	1.75	toujours pas après un an

Table 1.6: Evolution du temps de cristallisation en fonction des concentrations en glucose et fructose [18]

L'influence du fructose reste inexplicée mis à part le fait que ce sucre est

hygroscopique. Une hypothèse avancée est que le fructose immobilise par solvation les molécules d'eau ralentissant ainsi le déplacement des molécules de glucose.[18]

### 1.2.2 Origine botanique

En ce qui concerne les miels, leur composition et principalement leurs concentrations en certains sucres va changer en fonction de leur origine. Tout d'abord, il existe une différence entre un miel de nectar et un miel de miellat.

Comme expliqué précédemment, le fait que ce miellat provienne de la sève et de la digestion par des insectes va faire en sorte que la composition des miels basés sur celui-ci sera différente que ce soit au niveau des sucres qui seront plus complexes (plus d'oligosaccharides), des minéraux, ou au niveau de la concentration en azote (0.2% en miel de nectar contre 1.8% en miel de miellat).

Outre la séparation entre ces deux types de miels, le type de fleurs desquelles un miel provient va aussi affecter ses propriétés physico-chimiques comme par exemple au niveau de la cristallisation puisqu'il va y avoir une variation des concentrations des sucres en fonction de la provenance.[20]

La figure 1.7 montre les concentrations en sucre de différents miels d'origines botaniques différentes provenant d'Italie.[20]

Il est facilement remarquable que le miel de Castanea qui est une plante qui appartient à la famille des châtaigniers possède une plus grande concentration en fructose que les autres types de miels alors que sa concentration en glucose est plus faible. Cela signifie que ce type de miel reste plus longtemps sous une forme liquide que les autres. De plus, les miels provenant de ce type de plante auront une concentration en mélézitose supérieure à la moyenne des miels où celle-ci est presque nulle.

En ce qui concerne les miels d'Arbutus, qui est un arbuste à fruits rouges méditerranéens, ces miels possèdent une concentration moyenne en fructose plus faible que les autres ce qui entraîne une cristallisation assez rapide de ceux-ci. Cependant, leur concentration en sucrose est supérieure, et ils possèdent également une concentration importante en maltose et en erlose.

Les miels de Citrus possèdent une concentration en glucose, en fructose et en eau assez moyenne. Ils se démarqueront cependant par une plus grande concentration moyenne en maltose et en erlose.

Les miels d'Erica et les miels d'Eucalyptus se rapprochent des miels d'Arbutus au niveau des concentrations en glucose et en fructose. La distinction entre ces miels se fait alors sur le rapport entre le glucose et l'eau qui est largement plus importante pour les miels d'Eucalyptus qui se cristallisent de ce fait plus rapidement, et sur les concentrations en sucrose et isomaltose qui sont beaucoup plus basses dans les

miels d'Erica.

Honey type	Fructose (%) (min/max)	Glucose (%) (min/max)	Fructose/Glucose ratio (min/max)	Glucose/Water ratio (min/max)	Fructose + Glucose (%) (minx/max)	Sucrose (%) (min/max)	Maltose (%) (min/max)	Isomaltose (%) (min/max)	Trisaccharides
<i>Arbutus</i> (n = 23)	37.2 ± 2.4 (31.8/41.5)	32.1 ± 1.1 (29.8/34.1)	1.16 ± 0.06 (1.02/1.27)	1.71 ± 0.18 (1.39/2.02)	69.3 ± 3.1 (63.1/74.3)	1.5 ± 0.9 (0.1/3.3)	1.2 ± 0.5 (0.2/2.3)	0.8 ± 0.3 (tr/1.3)	Eriose (+)
<i>Castanea</i> (n = 85)	41.9 ± 2.1 (37.1/47.4)	26.4 ± 1.4 (22.1/29.3)	1.59 ± 0.11 (1.34/1.95)	1.51 ± 0.13 (1.14/1.84)	68.2 ± 2.7 (62.0/75.7)	0.1 ± 0.1 (0/0.8)	0.8 ± 0.5 (0.2/3.0)	2.1 ± 0.8 (0.7/4.0)	Melezitose (+)
<i>Citrus</i> (n = 34)	38.8 ± 3.0 (33.5/45.1)	32.2 ± 1.3 (29.8/35.7)	1.20 ± 0.09 (1.02/1.43)	1.87 ± 0.13 (1.58/2.12)	71.0 ± 3.6 (63.7/77.9)	0.9 ± 1.1 (0/4.5)	1.3 ± 0.7 (0.2/3.3)	0.6 ± 0.3 (0.2/1.4)	Eriose (+)
<i>Erica</i> (n = 13)	38.0 ± 1.2 (36.0/40.0)	34.8 ± 1.3 (32.0/37.3)	1.10 ± 0.06 (0.99/1.25)	1.82 ± 0.11 (1.63/1.97)	72.8 ± 1.5 (71.1/76.3)	0.3 ± 0.3 (tr/1.0)	1.0 ± 0.3 (0.6/1.9)	0.3 ± 0.3 (tr/0.8)	–
<i>Eucalyptus</i> (n = 17)	38.6 ± 3.1 (33.4/43.7)	32.9 ± 1.0 (31.2/34.5)	1.17 ± 0.10 (1.01/1.40)	2.04 ± 0.14 (1.80/2.32)	71.5 ± 3.3 (66.3/77.0)	1.3 ± 0.8 (0.1/2.8)	0.9 ± 0.5 (0.2/2.2)	0.6 ± 0.3 (tr/1.1)	Eriose (+)

Figure 1.7: Concentration en sucres de miels italiens d'origine botanique différentes[20]

Comme les concentrations en glucides vont changer en fonction du type de plantes visitées par les abeilles pour la confection du miel, la présence ou non de ces plantes dans un milieu va avoir son importance. De ce fait, les miels vont avoir leur composition qui va varier en fonction de la localisation géographique d'où ils proviennent puisque les espèces végétales présentes dans une région évoluent en fonction de la position géographique et des conditions climatiques environnantes. Il y a bien sûr d'autres concentrations qui vont changer en fonction de l'origine botanique ou géographique. Parmi elles se trouvent par exemple la teneur en eau. Le tableau 1.7 montre la comparaison de la teneur en eau dans des miel d'eucalyptus espagnols et algériens. Il ressort que les miels algériens seront en moyenne plus humides que les espagnols malgré le fait que les deux proviennent de la même plante puisque les miels sont hygroscopiques et que l'air algérien est en moyenne plus humide que l'air espagnol. Cependant, la gamme est plus élargie pour ceux d'origine algérienne puisque l'humidité est moins homogène en Algérie par rapport à celle en Espagne.

	miel d'eucalyptus d'Espagne	miel d'eucalyptus d'Algérie
Nombre d'échantillons	12	14
Valeur moyenne et déviation standard	15.7 ± 0.23	16.5 ± 1.7
Gamme	14.1 - 16.7	14.0 - 19.8

Table 1.7: Comparaison des concentrations en eau dans du miel d'eucalyptus espagnol et algérien

Un autre composant qui va changer selon l'origine botanique est le pollen. Il est possible de détecter la provenance d'un miel unifloral en fonction du type de pollen analysé.[21, 22] Des conditions ont d'ailleurs été imposées dans certains pays pour déterminer à partir de quelle quantité de pollen dans un miel ce dernier est considéré comme provenant majoritairement d'un type de plante. La figure 1.8 montre ces conditions pour 5 pays européens.[22]

Pollen grains	Croatia (%)	Greece (%)	Germany (%)	Italy (%)	Serbia (%)
<i>Arbutus unedo</i>	10				
<i>Brassica napus</i>	60	–	80		
<i>Calluna vulgaris</i>	20	–	–		20
<i>Castanea sativa</i>	85	87	90		85
<i>Citrus</i> spp.	10 (5*)	3	20	10	
<i>Gossypium</i> (cotton- <i>Erica</i> spp.		3	45		
<i>Eucalyptus</i> spp.			85		
General monofloral	45	45	45		
<i>Medicago sativa</i>					> 30
<i>Lavandula</i> spp.	10 (5*)				
<i>Phacelia tanacetifolia</i>	60				
<i>Robinia pseudoacacia</i>	20		–		20
<i>Rosmarinus officinalis</i>					20
<i>Salvia officinalis</i>	15 (10*)				
<i>Satureja montana</i>	20				
<i>Taraxacum officinalis</i>					20
<i>Thymus</i> spp.	–	18		15	
<i>Tilia</i> spp.	25 (10*)		20		25
<i>Trifolium, melilotus</i>			70		
<i>Helianthus</i>	–	20	50		40

\*With characteristic organoleptic properties of honey for particular plant species (smell, taste, color).

Figure 1.8: Conditions minimales pour qu'un miel provienne majoritairement d'une plante dans 5 pays[22]

La melissopalynologie, ou plus communément appelée la méthode d'analyse des pollens est une des principales méthodes utilisées pour vérifier l'origine botanique du miel puisqu'elle est qualitative et quantitative. Elle se fait par analyse microscopique des pollens présents dans le miel.[13, 21, 23]

Il existe cependant quelques limitations à cette méthode. Tout d'abord, les quantités de pollen provenant d'une plante peuvent varier en fonction des saisons ou du sexe de la fleur. Il y a aussi le fait que les abeilles peuvent récolter du pollen d'une plante sans pour autant en récolter le nectar. Enfin, il se peut que le pollen soit rajouté frauduleusement par une personne. [13, 21]

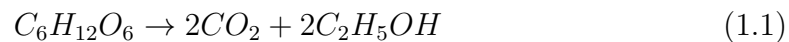
### 1.2.3 Autres propriétés

#### Fermentation

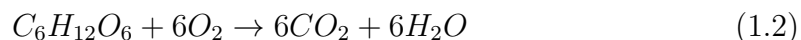
A part la cristallisation, les miels peuvent aussi subir une fermentation qui est produite par la levure en dégradant les sucres.[16] Fabian et Quinet ont déterminé en 1928 une valeur critique de la teneur en eau de 21 % à partir de laquelle le phénomène de fermentation se déroule. La variation de la teneur en eau vient en grande partie de l'hygroscopicité du fructose. Browne et Waters, en 1922 et 1923 respectivement, ont fait la conclusion, à la suite de plusieurs expériences durant lesquelles l'humidité ambiante variait, que le degré d'humidité des miels s'ajuste à celui du milieu dans lequel ils se trouvent.[24]

Fabian et Quinet ont donc théorisé que le miel absorbe suffisamment d'eau à sa surface afin de diminuer la concentration en sucres. Cette absorption se produit jusqu'à 21 % d'eau qui est un niveau compatible avec la vie de certaines levures qui pénètrent progressivement dans le miel.[24]

Les levures produisent de l'alcool et du dioxyde de carbone à partir de sucres en milieu anaérobie selon la formule



En milieu aérobie, la levure va pousser à se développer en faisant de la respiration selon l'équation suivante



Il a été déterminé que la levure se développera dans tout miel naturel non-chauffé et que la fermentation anaérobie se déroulera dès que les conditions seront réunies pour cela. En ce qui concerne la respiration aérobie, il sera nécessaire d'avoir une teneur en eau à la surface de 21.5% au minimum pour que cela se déroule. A partir de ce moment-là, de par l'effet Pasteur, les levures vont tendre à se reproduire plus efficacement puisque la respiration fournit plus d'énergie que la fermentation alcoolique. Il sera donc conseillé pour les apiculteurs d'éviter de se trouver dans une situation permettant la croissance aérobie des levures.[24]

Il a été démontré plus tard que la fermentation peut se faire à une humidité plus

faible que celle déterminée par Fabian et Quinet. En effet, comme le montre la figure 1.9, la fermentation dans le miel peut se faire à partir d'une concentration en eau supérieur à 17% si le nombre de micro-organismes présents dans le miel amorçant le processus de fermentation est supérieur à 1000 par gramme de matière. Plus le miel sera humide, moins il faudra de micro-organismes afin que cela se produise.[25]

Moisture content (%)	Liability
Below 17.1	None
17.1-18.0	None if yeast count < 1000/gm
18.1-19.0	None if yeast count < 10/gm
19.1-20.0	None if yeast count < 1/gm
Above 20.0	Always liable

Figure 1.9: Evolution de la quantité de micro-organismes présents naturellement dans le miel nécessaire afin de débiter la fermentation dans le miel en fonction de l'humidité de ce dernier [25]

La fermentation étant proportionnelle à la concentration en levures, il existe plusieurs méthodes pour éviter qu'elle ne se produise en éliminant les levures ou en les empêchant de se reproduire. Le stockage des miels à une température inférieure ou égale à 10°C, puisque les levures tolérantes en sucre ne vont pas se développer en dessous de 11°C. Une autre méthode est la pasteurisation en chauffant les miels à 63°C durant 30 minutes ce qui a pour effet de tuer en grande partie les levures réalisant la fermentation.[26, 27]

### Propriétés Antibactériennes

Malgré la présence de levures, les miels sont de très bon agents antibactériens. Cela vient de plusieurs facteurs différents. Tout d'abord, il y a l'acidité des sucres. La plupart des bactéries se propagent dans des milieux dont le pH est au moins de 6.5. Dans le cas des miels, leur pH varie entre 3.2 et 4.5 ce qui est beaucoup plus acide que les milieux favorables à leur développement. Cette propriété des miels vient de la présence de plusieurs acides mais principalement de l'acide gluconique qui provient du glucose grâce à l'enzyme glucose oxydase. Sa concentration se situe dans la gamme de 8.6 à 60 mM. Parmi les autres, il y a les acides lactiques, acétiques, fumariques, glyoxyliques et succiniques.[28, 29]

Ensuite, il y a le fait que les miels sont des solutions sursaturées en sucres comme écrit précédemment. Cela implique une pression osmotique sur les bactéries qui va pousser l'eau, à l'intérieur de celles-ci, à sortir dû à la différence d'activité entre les

deux milieux.[28]

Dans certains miels, un des composés antibactériels majeurs est le  $H_2O_2$ . Il est produit enzymatiquement par le GOX (glycolate) qui s'active lors de la dilution du miel. La concentration maximale en  $H_2O_2$  est atteinte dans la plupart des cas pour une dilution de 15 à 50% (poids/volume). L'effet antibactériel de cet élément vient de la production d'espèces réactives d'oxygène comme le radical superoxyde ( $O_2 \bullet -$ ) et le radical hydroxyle ( $HO-$ ). Ces espèces provoquent la coupure et la séparation des brins d'ADN ainsi que des dommages oxydatifs à la structure des protéines, lipides, des enzymes et des acides gras des membranes des cellules bactériennes. En plus de cela, des molécules d'oxygène sont produites par l'hydrolyse du  $H_2O_2$  par la catalase (enzyme catalysant la dismutation du  $H_2O_2$  en eau et dioxygène par  $H_2O_2 = O_2 + 2H_2O$ ). Ces dernières provoquent l'auto-oxydation de polyphénols, flavonoïdes ou de l'acide ascorbique qui vont exercer une activité pro-oxydante résultant en une dégradation de l'ADN ainsi que d'autres effets bactériostatiques.[28]

### Propriétés antioxydantes

Les miels possèdent des propriétés antioxydantes. Cela signifie qu'ils sont aptes à prévenir voire empêcher la dégradation des cellules due à des radicaux instables comme par exemple ceux énoncés précédemment. Cela vient de la présence de composants phénoliques présents comme les flavonoïdes et les acides phénoliques, d'enzymes tels que la catalase et la peroxydase, ainsi que la présence de vitamines comme la C. La génération des radicaux se fait par une réaction d'oxydation en chaîne. Les composants antioxydants terminent cette chaîne empêchant la formation des radicaux.[29, 30]

Différents types de miels vont présenter des concentrations différentes des différents composants antioxydants et vont donc être plus ou moins utiles à la santé. On peut notamment voir que les miels possédant une grande quantité d'antioxydants ont une couleur plus sombre. On peut atteindre une valeur de  $4.32 \times 10^{-3}$ meq. d'acide ascorbique dans un miel qui est supérieur au  $2.83 \times 10^{-3}$ meq. d'acide ascorbique dans des tomates par exemple. La figure 1.10 montre la différence entre différents types de miel et le lien avec la quantité de composés phénoliques.[30]

Honey Type	ORAC $\mu\text{mol TE/g}$	Total Phenolics GAE mg/kg
Buckwheat Illinois	16.95 $\pm$ 0.76	796 $\pm$ 3 2
Buckwheat	9.81 $\pm$ 0.34	nd
Buckwheat New York	9.75 $\pm$ 0.48	456 $\pm$ 55
Buckwheat	9.34 $\pm$ 0.57	nd
Buckwheat	9.17 $\pm$ 0.63	nd
Buckwheat	7.47 $\pm$ 0.27	nd
Soy (2000)	9.49 $\pm$ 0.29	nd
Soy (1996)	8.34 $\pm$ 0.51	269 $\pm$ 22
Hawaiian Christmas berry	8.87 $\pm$ 0.33	250 $\pm$ 56
Clover (January 2000)	6.53 $\pm$ 0.70	nd
Clover (July 2000)	6.05 $\pm$ 1.00	128 $\pm$ 11
Tupelo	6.48 $\pm$ 0.37	183 $\pm$ 9
Fireweed	3.09 $\pm$ 0.27	62 $\pm$ 6
Acacia	3.00 $\pm$ 0.16	46 $\pm$ 2

ORAC = Oxygen radical absorbance capacity,  
TE = Trolox equivalent, GAE = gallic acid equivalent, nd = not determined.

Figure 1.10: Activité antioxydante et teneur totale en phénol pour différents miels [30]

## 1.3 Fraudes en miels

Le miel est l'un des composés alimentaires les plus touchés par la fraude. En effet, le miel est un aliment "chère" dû à sa méthode de production qui nécessite l'entretien des ruches et sa récolte ainsi que sa commercialisation qui passe notamment par son emballage. De ce fait, les grands exportateurs de miels tels que la Chine vont diminuer artificiellement le prix en ajoutant des éléments dans la substance de base. Il y a alors une modification de la composition nutritionnelle du miel qui se déroule entraînant une diminution de sa qualité mais pouvant aussi entraîner des risques pour la santé humaine.

### 1.3.1 Législation existante

Pour contrôler la mise en vente des miels et des produits ayant subi une adultération, le conseil de l'Union Européenne a décidé d'imposer en 2001 des règles sur la substance appelée "miel" en commerce.[31, 32] C'est par la Directive 2001/110/CE du Conseil du 20 décembre 2001 que ces règles ont été imposées en commençant



par donner la définition du miel du point 1.1.

L'article 2 donne une explication de ce que compose le miel naturel et des différentes caractéristiques que cet aliment doit posséder pour pouvoir être commercialisé en tant que tel. Le paragraphe 3 explique notamment qu'il ne doit avoir fait l'objet d'aucune addition autre que du miel. Le paragraphe 6 donne les caractéristiques des miels afin de pouvoir être mis en vente. Les valeurs fournies pour les glucides et le miel sont présentées dans le tableau 1.8.

	<b>teneur en fructose et glucose (somme des 2)</b>
miel de fleurs	minimum 60g/100g
miel de miellat	minimum 45g/100g
	<b>teneur en sucrose</b>
en général	maximum 5g/100g
faux acacia ( <i>Robinia pseudoacacia</i> ), luzerne ( <i>Medicago sativa</i> ), banksie de Menzies ( <i>Banksia menziesii</i> ), hedysaron ( <i>Hedysarum</i> ), eucalyptus rouge ( <i>Eucalyptus camadulensis</i> ), <i>Eucryphia lucida</i> , <i>Eucryphia milliganii</i> , agrumes spp.	maximum 10g/100g
lavande ( <i>Lavandula</i> spp.), burrache ( <i>Borago officinalis</i> )	maximum 15g/100g
	<b>teneur en eau</b>
en général	maximum 20%
miel de bruyère ( <i>Calluna</i> ) et miel destiné à l'industrie en général	maximum 23%

Table 1.8: Teneurs en sucres et en eau limites déterminées par l'article 2 paragraphe 6

Par conséquent, un produit vendu sous l'appellation "miel" se doit d'être un produit provenant directement d'une ruche auquel on n'aura pas ajouté un quelconque élément et qui respecte un certain nombre de critères pour s'assurer de la santé des consommateurs.[33, 34]

En ce qui concerne les législations au niveau de la Belgique, cette directive a été retranscrite par l' "Arrêté royal relatif au miel" de 2004 [C - 2004/11146].

### **1.3.2 Fraudes liées aux mauvaises pratiques existantes**

En ce qui concerne les fraudes réalisées dans le domaine du miel, il en existe de 2 types qui sont celles dues à de mauvaises pratiques et celles dues à une volonté du vendeur de diminuer ses coûts de manière illégale.

Pour les fraudes liées aux mauvaises pratiques existantes, celles-ci viennent de mauvaises habitudes des producteurs sans réelles mauvaises intentions. Parmi celles-ci se retrouvent, par exemple, le nourrissage des abeilles avec des sirops de sucre ou des suppléments alimentaires notamment, ce qui va donc modifier les proportions des sucres par rapport à celles attendues au niveau de l'origine botanique.

En plus des fraudes liées au nourrissage des abeilles, il existe également des fraudes liées à l'eau présente dans les miels. Comme énoncé précédemment, la teneur en eau dans un miel a un impact sur ses propriétés physico-chimique. Il peut aussi arriver qu'il y ait une adultération en eau qui se produise de manière involontaire. Le produit résultant d'une adultération en eau aura notamment tendance à cristalliser plus difficilement puisque le degré de sursaturation du glucose sera diminué. Une augmentation de la fermentation de ce produit sera aussi visible.[31, 35]

### **1.3.3 Fraudes volontaires**

Outre les fraudes liées aux mauvaises pratiques existantes, il existe également celles qui sont faites de manière volontaire. L'adultération peut se faire soit en croisant plusieurs miels pas chers à produire avec un miel coûteux afin d'en diminuer le prix, soit en utilisant un adultérant de manière indirecte, ou soit en utilisant un adultérant de manière directe comme le montre la figure 1.11. [36]

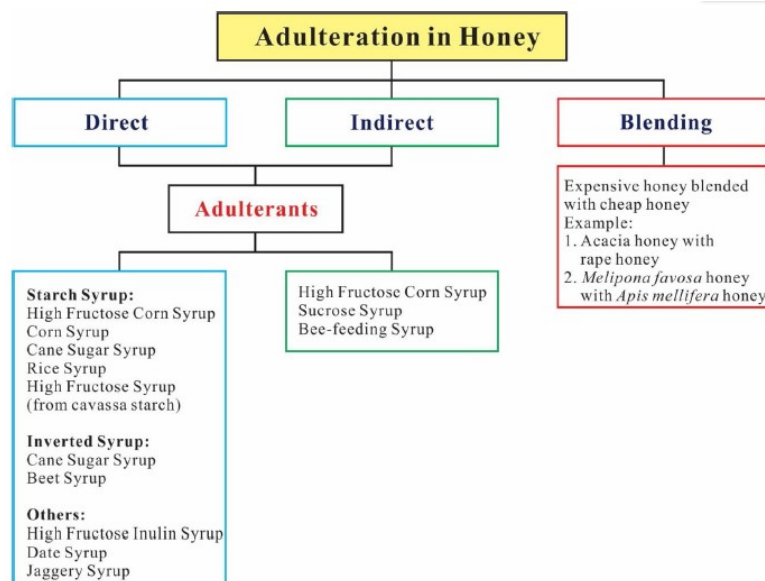


Figure 1.11: Différents types d'adultérations et des adultérants liés[36]

Une manière d'altérer le miel se fait par une modification du nourrissage des abeilles en période de miellée mais cette fois-ci de manière volontaire. Il s'agit donc d'une adultération indirecte qui se fait en ajoutant des sirops à haute teneur en sucres aux ressources de nutrition des insectes. En réalisant cela, les propriétés physico-chimiques des miels récoltés ne varient presque pas hormis une faible diminution de l'acidité et des indicateurs enzymatiques (ID et IS) comme on peut le voir à la figure 1.12. Le fait qu'il n'y a que peu de variations des mesures physico-chimiques en fait une adultération difficile à détecter.[31]

Tabl.1

	Témoin	Miel + Trim-0-Bee	Miel + Apisuc	Miel + Fondant
Humidité (%)	22,1	22,9	21,4	20,9
HMF (mg/kg)	< 3,5	< 1,2	< 1,2	< 1,2
Conductivité (mS/cm)	0,84	0,63	0,82	0,57
pH initial	4,4	4,5	4,7	4,4
Acidité	21,5	13,9	12,7	15,6
IS	49	27	39	31
ID (Schade)	43	18	25	26

Figure 1.12: Analyse de différents nourrissages d'abeilles[31]

Cependant, l'adultération la plus souvent observée est celle qui consiste à ajouter un adultérant directement dans le miel. Elle se fait notamment par ajout d'un

sirop dont la teneur en saccharides est élevée comme le sirop de maïs ou de sucre de canne.

Comme le montre la figure 1.11, il existe trois sortes de ces adhésifs qui sont les sirops d'amidon, les sirops inversés, et les autres types de sirops utilisés. Les sirops d'amidon sont obtenus par l'hydrolyse de l'amidon pour obtenir des sucres. Les sirops inversés sont quant à eux produits par hydrolyse acide de disaccharides, formant des monosaccharides tels que le glucose et le fructose. Enfin, il existe d'autres types de sirops comme les sirops de dattes où les sucres ont été extraits des dits fruits.

L'un des éléments encore fréquemment utilisé actuellement est le sirop de maïs à haute teneur en fructose (HFCS) puisqu'il n'est pas très cher et est facilement accessible.[32, 34] Il est notamment possible d'en obtenir par plusieurs sites de ventes en ligne chinois tel que DELIFOODS et Made-in-China comme le montre les images 1.13 et 1.14 respectivement.

F42 HFCS	F42 HFCS
< Brix: ≥71%	< Brix: ≥77%
< Dextrose + Fructose: ≥92%	< Dextrose + Fructose: ≥95%
< Fructose content: 42-44%	< Fructose content: 55-57%
< Color: ≤50 RBU	< Color: ≤50 RBU
< PH: 3.3-4.5	< PH: 3.3-4.5
< Transmissivity: ≥96%	< Transmissivity: ≥96%
< Ash: ≤0.05%	< Ash: ≤0.05%

Figure 1.13: <https://delimfg.com/syrup/high-fructose-corn-syrup>



**Haut de la qualité HFC Sirop de maïs à haute teneur en fructose Le fructose sirop édulcorant alimentaire des aliments et boissons No CAS : 57-48-7 F55 F42 CAS No 7776-48-9**

Prix FOB de Référence [Obtenir le Dernier Prix >](#)

**400,00-600,00 \$US** / Tonne | 10 Tonnes (Commande Min.)

N ° CAS:	57-48-7
Formule:	N/a
EINECS:	N/a
Type:	Flavoring Agents, Sweeteners
Valeur Nutritive:	Nutritionnel
Effet:	Stabilisation

Figure 1.14: [https://fr.made-in-china.com/co\\_zhangyuan8173/product\\_Top-Quality-Hfcs-High-Fructose-Corn-Syrup-Fructose-Syrup-Food-and-Beverage-Food-Suoionsoygy.html](https://fr.made-in-china.com/co_zhangyuan8173/product_Top-Quality-Hfcs-High-Fructose-Corn-Syrup-Fructose-Syrup-Food-and-Beverage-Food-Suoionsoygy.html)

Outre ces sites là, il est aussi possible d'acheter ces sirops sur des sites plus populaires tel Amazon, comme le prouve l'image 1.15.



**Poudre de fructose 100% sirop de maïs à haute teneur en fructose Poudre de sirop de soda à haute teneur en fructose Pot de 1 Kg**

Marque: Sosa  
 4.5/5 (27 Évaluations)

28<sup>70</sup> € (28,70€ / kg)

Tous les prix incluent la TVA.  
 Disponible à un meilleur prix auprès d'autres vendeurs qui ne proposent peut-être pas la livraison gratuite avec Prime.

Marque	Sosa
Unités	1000 gramme
Format	Poudre
Spécialité	Sans gluten, Convient aux végétariens.
Informations relatives aux allergènes	Contient : Sans Gluten
Poids du colis	1,09 Kilogrammes

Figure 1.15: [https://www.amazon.fr/Poudre-fructose-sirop-haute-teneur/dp/B0851LLS67/ref=sr\\_1\\_3?keywords=Sirop+de+ma%C3%AFs&qid=1679241070&sr=8-3](https://www.amazon.fr/Poudre-fructose-sirop-haute-teneur/dp/B0851LLS67/ref=sr_1_3?keywords=Sirop+de+ma%C3%AFs&qid=1679241070&sr=8-3)

De plus, l'HFCS possède une composition relativement proche de celle du miel naturel. De ce fait, une addition de ce dernier permet de ne pas forcément dépasser les concentrations en sucres reprises dans les spécifications du Codex.[34]

### 1.3.4 Contrôle de l'Union Européenne - 2015 et 2021

#### Plan d'analyse de 2015

En 2015, la commission européenne a organisé un plan d'analyse des miels dans l'Union européenne dû au fait qu'elle était régulièrement informée de la commercialisation sur le territoire européen de miels dont les critères de composition ne correspondaient pas à ceux imposés par les lois en vigueur. L'opération avait pour but de contrôler les miels des différents pays afin de détecter les fraudes liées à une mauvaise indication de l'origine géographique ou de l'origine botanique, ainsi que ceux présentant un apport en sucres exogènes. En plus des pays membres de l'Union Européenne, la Norvège et la Suisse ont également participé à ce plan d'action.[37]

La commission a alors donné des règles aux pays réalisant les analyses. Celles-ci portaient sur la façon de traiter les échantillons durant le transport et en laboratoire ainsi que sur la façon selon laquelle les tests étaient réalisés et les résultats étaient enregistrés dans une base de données.[37]

Les échantillons analysés étaient choisis à partir des sources d'où les fraudes pouvaient provenir le plus probablement. Il y avait donc des échantillons provenant des inspections aux frontières, des importateurs, des entreprises de conditionnement, des producteurs, des revendeurs, etc. Au total, 2264 échantillons ont été collectés.[37] A partir de ces 2264 échantillons collectés, 1069 ont été analysés par le centre commun de recherche (JRC). Parmi ces derniers, 138 sont ressortis non conformes avec les tests de tiers 1 et 2, qui sont sur le profil de pollen et l'analyse des sucres, ainsi qu'à l'analyse élémentaire - spectrométrie de masse à rapport isotopique (EA-IRMS). Parmi les 893 qui sont ressortis conformes, 127 ont été analysés comme suspects à la suite de l'utilisation de méthodes plus précises qui sont la méthode de Elflein et Ræzke ainsi que celle de Cabañero. Ces méthodes se basent sur la proportion en terme des isotopes  $C^{12}$  et  $C^{13}$  du carbone dans les miels. Parmi ces 127 échantillons suspects, il a été montré que 92 d'entre eux proviennent de revendeurs. La figure 1.16 montre les proportions de chacune des provenances suites à ces analyses.[37]

Category	Samples (n)	Suspicion of non-compliance	
		(n)	(%)
Border	4	0	0
Distributor	106	8	7.6
Importer	21	2	9.5
Packager	29	4	13.8
Processor	36	3	8.3
Producer	51	5	9.8
Retailer	563	92	16.3
Storage	22	3	13.6
Wholesaler	56	10	17.9
Unknown	5	0	0
<b>TOTAL</b>	<b>893</b>	<b>127</b>	<b>14.2</b>

Figure 1.16: Proportion des analyses réalisées sur les 893 échantillons[37]

Ces études ont permis de montrer qu'il existe encore une bonne proportion de miels non-conformes qui sont en circulation sur le sol européen et que se limiter aux premiers tests, à savoir ceux de tiers 1 et 2 ainsi que le EA-IRMS, qui sont pour l'instant réglementés par les lois européennes, n'est pas suffisant pour tous les détecter.[37]

### Plan d'analyse de 2021

En 2021, la commission européenne a décidé de relancer un plan d'analyse des miels qui sont importés à travers l'Union européenne. Cela est dû au fait que le prix moyen des miels importés cette année-là était de 2.32 €/kg alors que celui des sirops de sucres réalisés à partir de riz était de 0.40 - 0.60 €/kg. De ce fait une dilution d'un miel avec un sirop permettait de diminuer significativement le prix du miel et offrait ainsi un avantage déloyal aux fraudeurs. Le réseau européen de lutte contre la fraude a décidé de procéder à des contrôles des miels importés en prélevant des échantillons majoritairement au niveau des postes de frontière des pays dans le but de détecter spécifiquement les miels adultérés par l'ajout de sirop de sucres.

Dans ce plan d'analyse, 15 pays membres de l'Union européenne ainsi que deux autres pays ont participé. Il s'agit de la Belgique, la Bulgarie, la République Tchèque, l'Allemagne, le Danemark, la Grèce, l'Espagne, la France, la Hongrie, l'Irlande, l'Italie, la Lituanie, la Pologne, la Roumanie, la Suède, la Norvège et la Suisse. 320 lots de miel ont été échantillonnés au total. La majorité provient des postes de frontière comme écrit précédemment et le reste provient soit des locaux des conditionneurs ou des distributeurs, soit de sources inconnues.[1]

Le centre commun de recherche a décidé d'utiliser différentes méthodes d'analyse qui sont répertoriées dans le tableau 1.9 afin d'obtenir des résultats pour tous types de glucides présents dans le miel.[1]

Méthode	Marqueur de falsification
Analyseur élémentaire (EA)/ Chromatographie liquide - Spectrométrie de masse à rapport isotopique (IRMS)	Rapport isotopique $C^{13}/C^{12}$ du carbone stable des protéines et des composés sucrés
Chromatographie haute performance à échange d'anions - Détecteur par ampérométrie pulsée	Polysaccharides avec un degré de polymérisation (DP) égal ou supérieur à 10
Chromatographie liquide - Spectrométrie de masse à haute résolution (LC-HRMS)	Oligosaccharides avec un DP compris entre 6 et 10 2-Acétylfurane-3-glucopyranoside (AFGP) Anhydride de difructose (DFA)
Résonance magnétique nucléaire du proton (H-NMR) Spectroscopie	Mannose  Profilage du miel

Table 1.9: Méthodes de détection utilisées dans le plan d'analyse de 2021 avec leurs marqueurs de falsification [1]

Parmi les 320 échantillons reçus, 147 sont ressortis comme suspects de ne pas respecter les règles de la commission européenne sur la pureté du miel vendu en présentant au moins un marqueur de source externe de sucres comme le montre la figure 1.17.[1]

Parmi les différents marqueurs d'adultération, ce sont la présence d'oligo/polysaccharides et le mannose qui ont permis de détecter une fraude dans la plupart des cas avec la présence de 2 à 5 marqueurs dans 44% des échantillons suspects.[1]

Le plan d'analyse a également permis de mettre en avant que la méthode d'analyse des rapports isotopiques des carbones stables par EA-IRMS, qui était souvent utilisée par le passé pour détecter des sirops de sucre de canne ou d'amidon de maïs, n'était plus efficace pour la détection de miels susceptibles d'être adultérés. Cela s'explique par le fait que les deux types de sirops détectés par cette méthode ne sont plus utilisés actuellement pour adultérer les miels.[1]



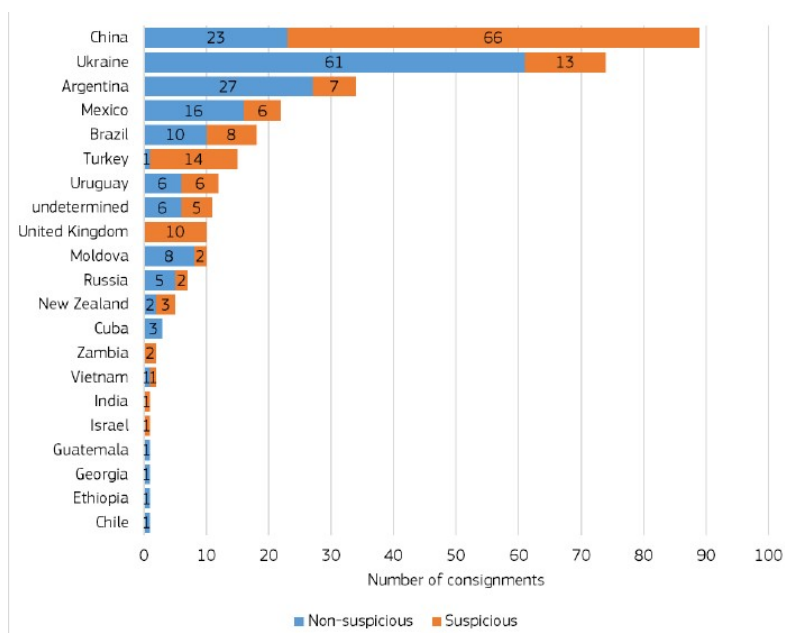


Figure 1.17: Résultats des analyses effectuées durant le plan de 2021[1]

Ces deux plans d’analyse européens ont permis de montrer que la fraude en miel au sein de l’Union européenne ne cesse de faire effet et qu’elle a fortement augmenté entre l’année 2015 et l’année 2021. De plus, ces contrôles ont montré que les adulations évoluent afin de s’adapter aux méthodes d’analyse comme l’a montré la méthode d’analyse élémentaire qui n’était plus aussi efficace qu’avant puisque ce ne sont plus les mêmes sirops qui sont utilisés. Par conséquent, cela montre qu’il faut constamment améliorer les analyses, les rendre plus efficaces et plus accessibles aux laboratoires de contrôle, afin de ne pas être laissé à la traîne par rapport aux producteurs de miel qui cherchent à réduire leurs coûts de production en adultérant leurs produits.[1, 37]

## 1.4 Détection et analyse

### 1.4.1 Chromatographie

L’analyse des sucres dans un miel se fait sur base de la méthode appelée chromatographie. Cette méthode permet d’analyser les différents composants d’un mélange par absorption sélective des constituants de ce mélange ou par partage en mélange de phases liquides ou gazeuses. Parmi celles-ci, il existe la chromatographie gazeuse et la chromatographie liquide à haute performance dont celle à échange d’anions à haute performance.

## Chromatographie gazeuse

La chromatographie gazeuse se fait entre une phase mobile gazeuse et une phase stationnaire liquide ou solide. La séparation se fait sur base de l'affinité entre un composé analysé et la phase stationnaire de telle sorte que plus celle-ci sera grande et plus longtemps le composé restera dans la colonne avant d'être détecté. Comme il s'agit d'une phase mobile gazeuse, la source et le contrôle du flux de gaz porteur ont une importance capitale dans l'analyse ainsi que la colonne. La volatilité des éléments analysés a de ce fait une influence dans l'opération, ce qui entrainera le fait qu'il faille utiliser un four thermostatiquement contrôlé comme la température fera grandement changer cette volatilité.[38, 39, 40]

Les différents éléments importants lors de la chromatographie gazeuse sont donc le gaz porteur, le type de tube et la phase stationnaire. En ce qui concerne le gaz porteur, il peut s'agir soit d'hydrogène, d'hélium ou d'azote. Le choix se fait par essais et erreurs. L'hydrogène est celui qui fournit les meilleurs résultats en le moins de temps. L'hélium fournit des résultats aussi précis mais l'analyse prend plus de temps ce qui peut permettre d'obtenir une meilleure résolution. Pour ce qui est de l'azote, l'analyse prend beaucoup plus de temps mais peut être bonne en fonction des cas et du type de colonne.[39, 40]

En ce qui concerne la colonne, elle peut être en verre ou en métal, et son garnissage est réalisé à partir d'un matériau inerte tel le verre ou la céramique. Ce qui est important pour la colonne est qu'elle favorise les interactions entre les deux phases tout en évitant de bloquer le passage du gaz. Pour ce faire, le garnissage, la longueur et le diamètre de la colonne sont des paramètres importants. Pour mesurer l'efficacité d'une colonne, les plateaux (nombres) ou plateaux par mètre (n/m) sont utilisés. Ces plateaux augmentent quand le diamètre interne de la colonne diminue mais un diamètre trop petit peut entraîner une surcharge de la colonne et une dégradation importante. Si le nombre de composants à analyser est trop important, un petit diamètre est nécessaire et de ce fait la colonne devra être équipée d'équipements spécialisés pour contrôler la pression qui est plus importante.[39]

Pour ce qui est de la phase stationnaire, elle est choisie en fonction des composants à analyser afin de permettre des interactions entre les 2. Il existe 3 types de phases stationnaires qui sont les apolaires, les mi-polaires et les polaires. Ces phases sont classées en siloxanes pour les phases apolaires et mi-polaires, et en polyéthylène glycol pour les phases polaires.[38, 39, 40]

La figure 1.18 montre de manière schématique comment fonctionne la chromatographie gazeuse. Le gaz porteur est envoyé vers la colonne avec l'échantillon qui, à l'entrée, lui est injecté dedans. Le gaz va passer un certain temps dans la colonne permettant de séparer les différents éléments qui restent plus ou moins

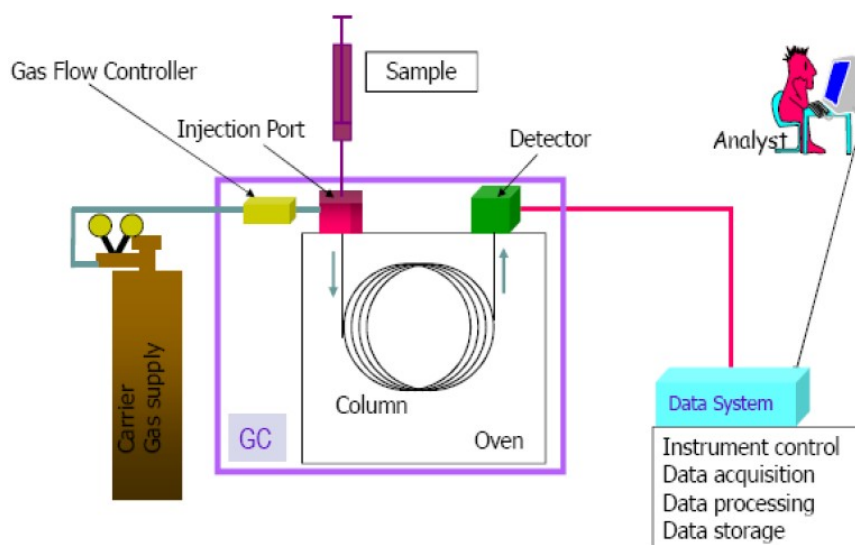


Figure 1.18: Représentation schématique de la chromatographie gazeuse[39]

longtemps à l'intérieur. Ces éléments vont ensuite passer dans un détecteur afin de déterminer lequel est sorti et en quelle quantité.

Un des désavantages de cette technique est dans la préparation des échantillons. Ces derniers demandent un temps de préparation important afin de pouvoir être analysés. De plus, l'opération nécessite une expertise technique de la part de la personne qui réalise l'analyse.[36]

### Chromatographie liquide à haute performance

La chromatographie liquide se fait entre deux phases, dont la phase mobile est liquide, et l'autre phase peut être liquide ou solide. L'image 1.19 montre les éléments principaux nécessaires à une chromatographie liquide à haute performance.[41]

Le dégazeur a pour fonction de permettre un échange gazeux sous vide grâce à la pompe à vide en retirant les gaz des solvants. En raison de la présence de vacuoles gazeuses (des agrégats de vésicules gazeuses) provenant de solvants qui peuvent engendrer de mauvaises conditions de séparation conduisant à de mauvais signaux à la sortie, cette dégazification est nécessaire.[41]

Les pompes à basse pression (LPG) permettent de fournir les flux de solvants en quantités adéquates évitant d'avoir des apports imprécis durant le processus. Ces pompes garantissent donc la reproductibilité du processus dans le cas où les concentrations en solvant doivent changer. Elles ne sont donc pas nécessaires dans un processus isocratique.[41]

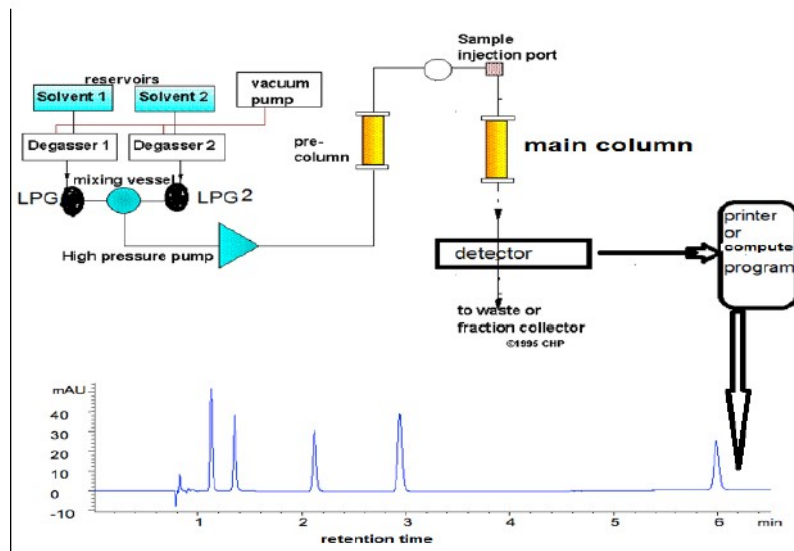


Figure 1.19: Eléments essentiels d'une HPLC[41]

La pré-colonne permet d'éviter que des contaminants et des impuretés ne se retrouvent dans la colonne principale. De plus, elle élimine les composants qui pourraient se lier de manière irréversible à la phase stationnaire dans la colonne. Le but de cette pré-colonne est donc d'éviter la dégradation de la colonne principale et de permettre une utilisation plus longue de cette dernière.[41]

La colonne est composée d'un garnissage en acier inoxydable et d'une phase stationnaire. Cette dernière peut varier en fonction des colonnes et la technique de séparation change également passant de l'exclusion de taille à l'échange d'anions, ainsi que la séparation par adsorption qui est la plus utilisée.[41, 42]

## 1.4.2 Autres méthodes

### Analyse élémentaire avec spectrométrie de masse à rapport isotopique

L'analyse élémentaire est une méthode utilisée fréquemment dans l'analyse de fraude dans les miels. Cette méthode repose sur la mesure des isotopes  $C_{12}$  et  $C_{13}$  du carbone présents dans le miel et dans son pollen. Il y a d'abord une comparaison entre un échantillon et un matériau standard selon les équations 1.3 et 1.4.[43, 44, 45] La référence standard utilisée pour le carbone est le Vienna Pee Dee Belemnite qui est récoltée sur la coquille de bélemnite ( une espèce de crustacés ayant vécu au Crétacé). La valeur  $R_{13}$  pour ce matériau est de 0.0112372.[43, 44, 46]

$$R = {}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C} \quad (1.3)$$

$$\delta^{13}\text{C}(\text{‰}) = [(R_{\text{sample}}/R_{\text{standard}} - 1) \times 10^3] \quad (1.4)$$

Il existe deux types de cycle de photosynthèse qui fournissent différents rapports entre les isotopes du carbone. Le cycle de Calvin et Benson va fournir un rapport nommé  $C_3$  alors que le cycle de Hatch-Slack va fournir un rapport nommé  $C_4$ . Il a été montré que les plantes ayant le cycle  $C_4$  absorbaient plus de  ${}^{13}\text{C}$  du  $\text{CO}_2$  durant la photosynthèse que les plantes ayant le cycle  $C_3$ . Ces plantes  $C_4$  ont donc un  $\delta^{13}\text{C}(\text{‰})$  autour de  $-11.5\text{‰}$  alors que celui des plantes  $C_3$  est autour de  $-25.5\text{‰}$ . [44, 45]

Comme le nectar collecté par les abeilles provient de plantes à fleurs dicotylédones, qui sont donc de la famille des plantes  $C_3$ , un miel possédant un  $\delta^{13}\text{C}$  moins négatif que  $-23.5\text{‰}$  est considéré comme suspect puisque le rapport s'éloigne de celui des plantes dont il provient. [44]

Il est de plus attendu que la différence de rapports en isotopes de carbone stable entre un miel et le pollen qu'il possède soit inférieur à  $1\text{‰}$ . De ce fait, cette méthode permet également de détecter une adultération si la différence des rapports excède la limite énoncée et cela correspond à une valeur de  $7\%$  selon la formule 1.5 où  $\delta^{13}\text{C}(\text{‰})_{\text{édulcorant}}$  est égal à  $-9.7\text{‰}$  qui est la valeur moyenne des sirops à haute teneur en fructose. [44, 45]

$$\% \text{ Adultération} = 100 \times \frac{(\delta^{13}\text{C}(\text{‰})_{\text{protéine}} - \delta^{13}\text{C}(\text{‰})_{\text{miel}})}{(\delta^{13}\text{C}(\text{‰})_{\text{protéine}} - \delta^{13}\text{C}(\text{‰})_{\text{édulcorant}})} \quad (1.5)$$

Le problème de cette méthode est qu'elle ne peut déterminer une adultération en sucre uniquement dans le cas où un sucre de la catégorie  $C_4$  est utilisé dans l'adultération. Dans le cas où le sucre serait de la catégorie  $C_3$ , cette technique ne le percevrait pas. [47]

## Résonnance magnétique nucléaire

Une des plus récentes méthodes d'analyse du miel est la méthode par résonnance magnétique nucléaire. Le principe de base de cette méthode est l'estimation du rayonnement de radiofréquence absorbé par les noyaux des atomes présents dans un champ atomique puissant. Le milieu autour des atomes peut modifier l'absorption des noyaux atomiques ce qui provoque les variations du champ magnétique périphérique. Grâce à cela, la structure moléculaire de l'échantillon peut être obtenue. La méthode peut s'appliquer sur base de différents éléments comme l'hydrogène (H) ou le carbone (C). [47, 48, 49, 50, 51]

Cette méthode est notamment utilisée parce qu'elle est rapide, non-invasive et reproductible. [47, 48, 49, 50, 52]

En ce qui concerne le miel, de nombreuses recherches ont permis de déterminer les différents marqueurs spécifiques à certains miels. Ces marqueurs sont basés sur les aliphatiques, les aromatiques et les glucides dans ces miels. Les résultats sont présentés sur un axe des abscisses en ppm selon la formule 1.6 où  $\nu_L$  est la fréquence de résonance,  $\nu_{ref}$  la fréquence de résonance de la référence utilisée lors de l'analyse, et  $\nu_0$  la fréquence du spectromètre. En ce qui concerne l'axe des ordonnées, il représente l'intensité du signal détecté en unités arbitraires.

$$\delta = \frac{\nu_L - \nu_{ref}}{\nu_0} \quad (1.6)$$

La figure 1.20 montre une représentation des spectres obtenus pour 8 miels monofloraux. La référence utilisée durant l'analyse a été le D4 propionate de sodium-3 triméthylsilyle (TSP). Les spectres ont été séparés en 3 parties qui sont la région aliphatique de 0 à 3 ppm, la région des glucides de 3 à 6 ppm et la région aromatique de 6 à 10 ppm. Comme les pics des glucides sont beaucoup plus importants que ceux des autres régions, les pics de ces régions ont dû être augmentés respectivement de 225 et 150 fois.[48]

Il est facilement observable que chaque miel possède ses propres caractéristiques qui sont liées à leur origine botanique. L'acide formique, par exemple, n'est pas présent dans le miel d'acacia ou de tournesol contrairement à celui de jujubier. La variation en phénylalanine entre les miels est encore plus évidente. Alors que 5 des miels ne présentent pas cet acide aminé, le miel de vitex en présente en grande quantité.[48]

Cette méthode est utilisée pour l'analyse de l'origine des miels, ainsi que pour détecter des adulterations dans ces derniers, car l'analyse ne se porte pas uniquement sur les glucides, mais également sur les acides aminés et les composés aliphatiques.[47, 48, 49, 50, 51, 52]

Il reste cependant que les pics, notamment au niveau des acides aminés et des aliphatiques, ont dû être augmentés pour pouvoir les observer ce qui signifie qu'une légère augmentation d'un des éléments due à une cause naturelle engendrait une grande augmentation de son pic.

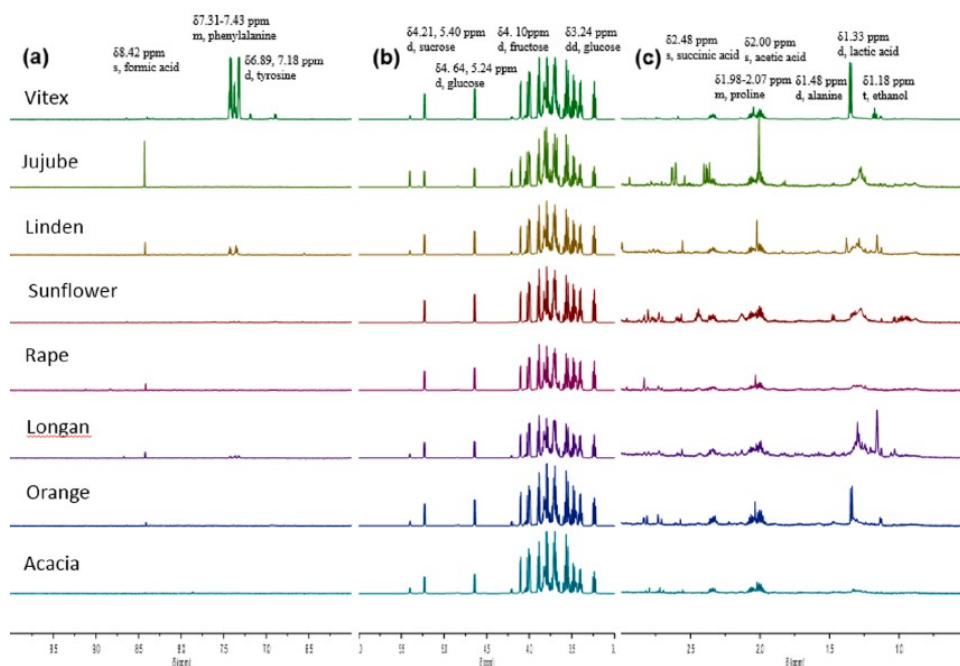


Figure 1.20: Représentation du spectre obtenu par résonance magnétique nucléaire pour divers miels monofloraux[48]

### 1.4.3 Chromatographie à haute performance par échange d'anions à détection ampérométrique pulsée (HPAEC-PAD)

#### Chromatographe à haute performance par échange d'anions (HPAEC)

La chromatographie à haute performance à échange d'anions est une sous-catégorie de chromatographie liquide à haute performance. Elle peut se réaliser pour détecter et doser différents composants tels que le HMF ou les glucides présents dans le miel. Pour ce qui est du miel, bien qu'ils s'agissent d'acides faibles, les glucides peuvent être analysés puisque leur pKa est aux alentours de 12-14 et donc en présence de bases fortes, ces derniers se lient à la résine ce qui fait que leurs groupes hydroxyles sont partiellement ou entièrement transformés en oxanions. De ce fait, ils peuvent être élués en tant qu'anions lorsque les solvants utilisés sont à haut pH comme des solutions d'hydroxyde de sodium. En raison de l'utilisation de bases fortes, cette méthode est également appelée chromatographie à haut pH à échange d'anions.[53, 54, 55]

Les résines utilisées dans les colonnes à échange d'anions sont symbolisées par les formules ROH ou RCl. La partie R est la plupart du temps un polymère ou un

copolymère qui, selon son utilisation, possède un degré de polymérisation plus ou moins élevé. Les résines anioniques obtenues par polymérisation peuvent être de deux types qui sont soit fortement anioniques avec souvent un groupement d'azote quaternaire chlorulé comme celui représenté à la figure 1.21, soit faiblement anioniques avec un groupement du type de ceux montrés à la figure 1.22.[56]

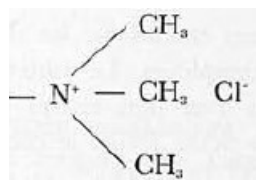


Figure 1.21: Groupement d'azote quaternaire chlorulé[56]

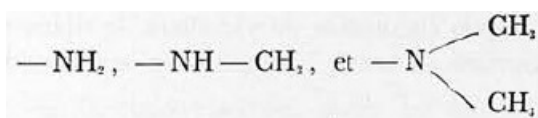


Figure 1.22: Groupements présents dans les résines faiblement anioniques[56]

Le temps de rétention des différents sucres en milieu alcalin est inversement proportionnel avec leur pKa comme le montre la figure 1.23.[53, 54, 57]

mono- sacchar- ide	pK <sub>a</sub> <sup>7</sup>	retention time (min)		
		experiment 1	experiment 2	experiment 3
galactose	12.39	14.10 ± 0.10	14.35 ± 0.05	17.93 ± 0.10
glucose	12.28	17.00 ± 0.15	17.33 ± 0.06	21.73 ± 0.15
xylose	12.15	20.70 ± 0.18	21.03 ± 0.08	26.36 ± 0.18
mannose	12.08	23.04 ± 0.25	23.25 ± 0.12	29.48 ± 0.25
fructose	12.03	26.90 ± 0.24	27.01 ± 0.08	34.51 ± 0.24

Figure 1.23: Evolution du temps de rétention de sucres en fonction des pKa[57]

Puisque les valeurs de pKa ont un grand impact sur le temps de rétention, alors les paramètres les plus importants influençant la séparation lors de la réalisation de la chromatographie avec une colonne composée d'un polymère résistant à un pH élevé sont l'anomérisme, l'isomérisme de position, le nombre de groupes hydroxyles et le degré de polymérisation. Par exemple, comme les groupes hydroxyles anomériques possèdent une valeur de pKa plus petite que les autres groupes hydroxyles, les sucres réduits possèdent une plus petite durée de rétention. Lorsque deux éléments ne diffèrent que par leur configuration, comme le glucose et le mannose,



une diminution du pH de la solution alcaline dans une post-colonne permet leur séparation avant la détection.[53, 54]

Outre l'impact du pKa sur le temps de rétention des polymères de sucres, un autre facteur qui implique le fait que ces derniers soient élués plus tard est l'augmentation du nombre de charges effectives des molécules entraînant une plus grande affinité avec la colonne.[54]

De plus, pour des oligosaccharides dont les monomères utilisés comme structure de base sont les mêmes, leur temps d'éluion est d'autant plus long que le degré de polymérisation est grand.[58, 59]

Un autre effet qui peut influencer les temps d'éluion en HPAEC-PAD est l'accessibilité des oxyanions des glucides par la phase stationnaire. Cela induit qu'un glucide dont les groupes fonctionnels chargés sont moins accessibles est élué plus rapidement, car il possède moins d'interactions avec la phase stationnaire.[54]

En ce qui concerne l'éluant utilisé, un système du type NaOH/NaOAc est le plus couramment utilisé pour la chromatographie à échange d'anions avec une détection pulsée. L'utilisation d'un éluant composé uniquement d'une dilution de NaOH permet d'obtenir des résultats satisfaisants en ce qui concerne la séparation des monosaccharides, par exemple, puisqu'il s'agit d'éléments faiblement liés. En ce qui concerne l'éluion des oligo/polysaccharides, la force d'éluion de la base  $OH^-$  peut ne pas être suffisante. L'utilisation d'un agent d'éluion supplémentaire légèrement plus fort, comme un acétate, permet de bien contrôler les conditions d'éluion afin de séparer à la fois les composés faiblement et fortement liés en une seule passe dans le chromatographe.[54]

Lors de la chromatographie, les anions hydroxydes jouent un double rôle. En plus de permettre d'ioniser les sucres, ces anions hydroxydes jouent le rôle de "pousseur", c'est-à-dire qu'ils entrent en compétitions avec les analytes liés à la résine les poussant à être élués.[55]

Le terme HPAEC est lié historiquement à l'analyse de sucres par les colonnes garnies de la série CarboPac avec des résines péliculaires à échange d'anions fournies par la société Dionex. Dans cette série, la première à avoir été reconnue est la CarboPac PA-1.[54]

Il existe maintenant de multiples colonnes pour différentes analyses et fournies par diverses entreprises comme Metrohm avec la Metrosep Carb 2 - 150/4.0 par exemple.

### **Détection ampérométrique pulsée (PAD)**

La détection pour l'analyse des glucides a été réalisée sous différentes formes. L'une de ces formes est la détection par indice de réfraction (RI) qui est une méthode

souvent réalisée en HPLC. Cependant, celle-ci est très sensible aux changements de composition de la phase mobile ce qui empêche l'utilisation de gradients de concentration.[53]

Une autre forme est la détection par diffusion de la lumière par évaporation (ELSD). Avec cette méthode, les gradients de solvants sont autorisés, les fluctuations de température ne modifient pas les résultats, et les résultats sont dépendants des masses des analytes vaporisés. Cependant, tous les composants de l'éluant de l'HPLC doivent être vaporisés tandis que les glucides pouvant être détectés doivent être non-vaporisés. Cela signifie qu'il est possible d'utiliser n'importe quel gradient d'éluants permettant d'éviter une dégradation thermique des sucres mais la composition de la phase mobile n'est, alors, plus indépendante du système de détection.[53]

Cette indépendance est retrouvée en utilisant la détection ampérométrique pulsée (PAD), également appelée détection électrochimique pulsée (PED). De plus, elle permet de réaliser l'analyse des différents sucres du miel en une seule fois comme l'utilisation de différents gradients d'éluant est autorisée avec cette technique de détection. [53]

Lors de la détection, le courant généré par chaque analyte est mesuré. Il est ensuite intégré dans le temps afin de fournir une charge faradique nette pour chaque composant. Cette charge peut être transformée en concentration grâce à des solutions standards dont la concentration de chaque élément est connue et dont les différentes charges ont été précédemment mesurées.[23]

La détection ampérométrique est réalisée à l'aide d'une anode solide en or, en platine ou en carbone vitreux (carbone non-graphitable qui possède des propriétés communes avec celle du graphite, à la fois vitreuses et céramiques ). Elle est communément pratiquée avec un potentiel constant appliqué et est désignée sous le nom d'ampérométrie DC. L'électrode utilisée avec cette méthode doit être inerte et doit pouvoir accepter ou donner des électrons avec l'analyte souhaité. Le carbone vitreux fonctionne bien en détection DC puisqu'il respecte les conditions et qu'il est résistant à l'encrassement.

Malheureusement, dans le cas des glucides, les électrodes ampérométriques en carbone vitreux ne présentent pas de réponse aux composés aliphatiques comme l'absence de résonance- $\pi$  résulte en un faible taux d'oxydation de ces analytes à l'électrode. De ce fait, il faut utiliser une électrode en or ou en platine pour les sucres. La présence de surfaces catalytiques aux électrodes permet la stabilisation des radicaux libres intermédiaires formés malgré le fait que les composés aliphatiques polaires ne possèdent pas de mécanisme inhérent de stabilisation électronique.[53] Cependant, les produits d'oxydation intermédiaires des analytes peuvent être adsorbés sur la surface des électrodes provoquant de l'encrassement par accumulation ce

qui dégrade au fur et à mesure la détection.[23, 53]

Cela peut être résolu en utilisant un potentiel pulsé. La figure 1.24 montre les différents potentiels appliqués sur l'électrode afin de ne pas dégrader la détection à cause de l'accumulation.[23, 53, 60]

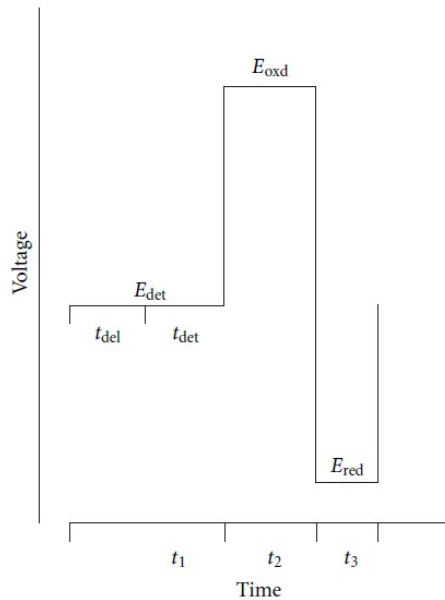


Figure 1.24: Etape d'oxydation lors de la détection pour un PAD[53]

Durant un temps  $t_1$ , la détection se fait à un potentiel positif en oxydant les sucres comme le montre l'exemple du glucose sur la figure 1.25. Après cela, durant le temps  $t_2$ , un potentiel plus élevé est appliqué afin d'oxyder toutes les impuretés absorbées et éliminer le sucre déjà oxydé. Finalement, durant un temps  $t_3$ , un potentiel négatif est appliqué afin de réduire à sa forme initiale la couche de métal oxydée à la surface de l'électrode pour permettre de continuer l'analyse.[53, 60]

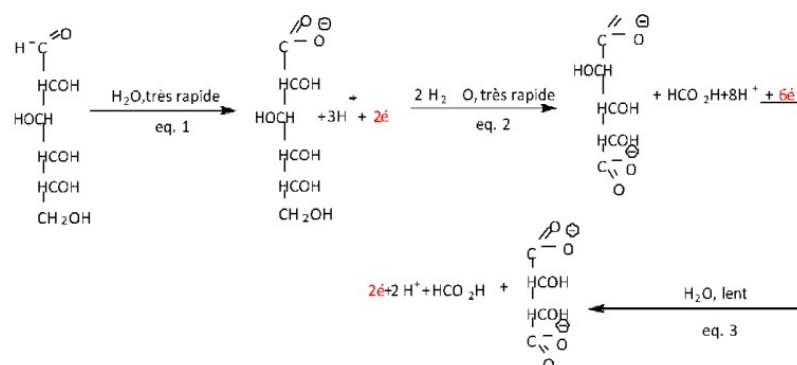


Figure 1.25: Oxydation du glucose dû au potentiel appliqué durant la première phase de l'ampérométrie pulsée[60]

Comme il existe différentes colonnes disponibles pour l'analyse de sucres avec un chromatographe à haute performance à échange d'anions ainsi que diverses modes opératoires dus à la variation de la température, de l'éluant utilisé ou même du débit, les résultats obtenus changent pour chaque étude réalisée. La figure 1.26 présente les temps d'élution obtenus pour différents sucres dans le cadre de 5 recherches décrites dans 5 publications différentes.

Le tableau 1.10 fournit les informations sur les différentes méthodes utilisées afin d'obtenir les résultats de la figure 1.26.

Les temps obtenus permettent de montrer la grande diversité des résultats obtenables par chromatographie à haute performance à échange d'anions en fonction des diverses méthodologies applicables.

Tout d'abord, les temps d'élution issus de la recherche [63] sont bien plus courts que ceux pour les autres recherches. Cela peut s'expliquer notamment par la taille de la colonne et la taille des particules utilisées. En effet, lors de la chromatographie par échange d'anions, la taille des particules a un grand impact puisque de plus petites particules rendent plus efficace la séparation des éléments. De ce fait, une plus petite taille de colonne peut être utilisée rendant l'élution plus rapide.[65]

De plus, il est observable que l'erlose a un temps d'élution qui change grandement selon la méthodologie utilisée. Cela peut s'expliquer notamment par l'éluant utilisé. En effet, la recherche [62] utilise un mode isocratique avec une solution de NaOH 250 mM avec de l'eau selon les proportions respectives 52%/48%. La recherche [23], quant à elle, utilise un mode gradient avec une solution de NaOH 200 mM et d'eau ultra-purifiée qui change donc avec le temps. De ce fait, après que les plus petits glucides aient été élués, la concentration en NaOH dans l'éluant devient plus importante facilitant l'élution des oligosaccharides. Un autre point qui peut expliquer cette différence de temps d'élution de l'erlose ainsi que d'autres oligosac-

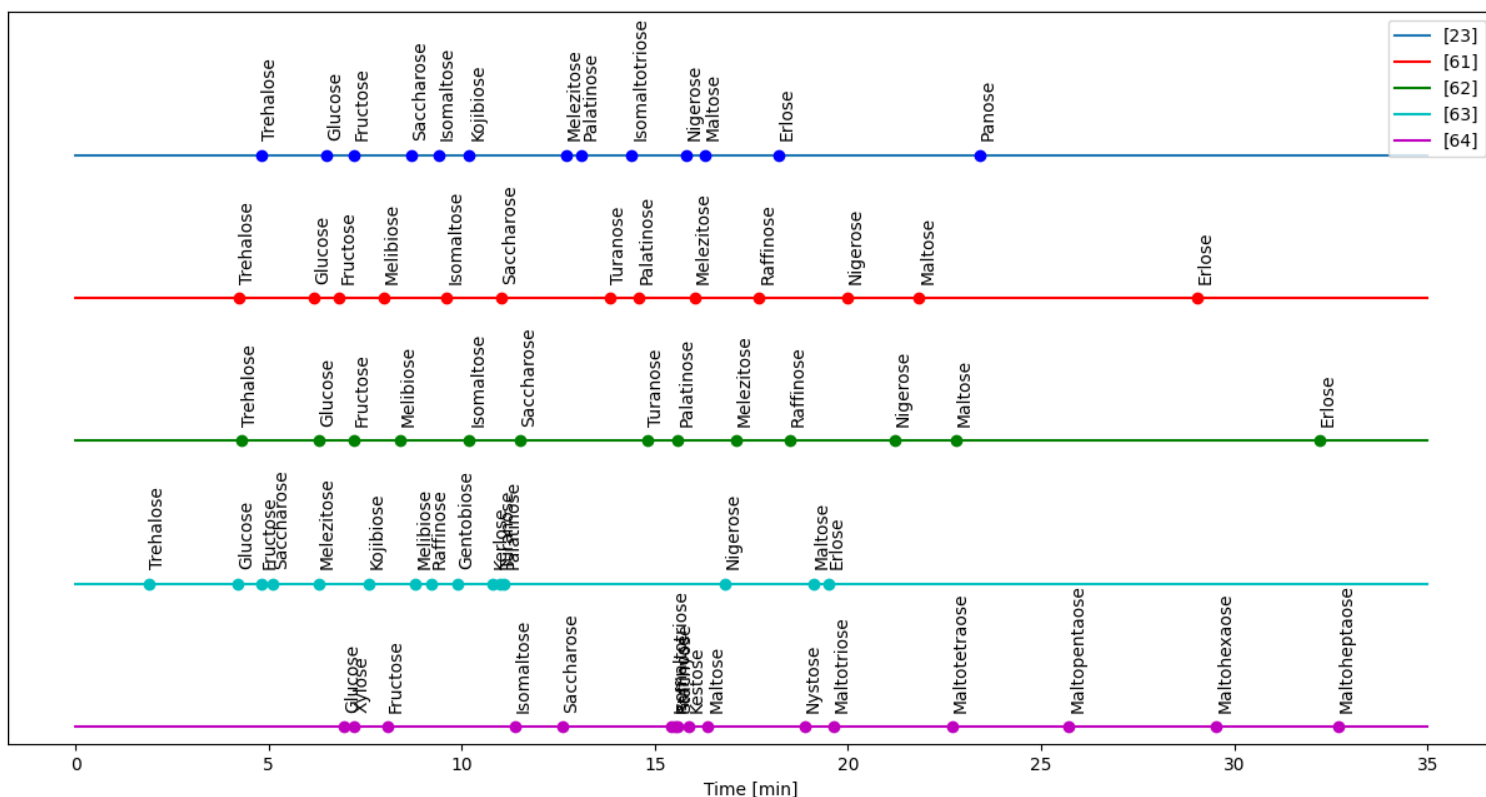


Figure 1.26: Temps délutions obtenus par chromatographie à haute performance à échange d'anions pour les recherches [23, 61, 62, 63, 64] respectivement

charides est le débit utilisé. En effet, utiliser un débit plus important va pousser les composés analysés, ce qui va faire en sorte qu'ils sont éludés plus rapidement.

Les différentes recherches possèdent également certaines similitudes qui sont notamment expliquées dans la première partie du point 1.4.3. Tout d'abord, l'élution du glucose précède dans chacune des recherches celle du fructose ce qui s'explique par le fait que le pKa du glucose est supérieur à celui du fructose comme montré précédemment à la figure 1.23.

Par ailleurs, le tréhalose est éludé dans la plupart des cas avant le glucose et le fructose malgré le fait que celui-ci est un disaccharide alors que les deux autres sont des monosaccharides. Cela peut s'expliquer par le fait que les interactions du tréhalose avec la phase stationnaire sont moins fortes que celles du glucose et du

fructose.

Ensuite, la recherche [64] illustre l'évolution du temps d'élution en fonction du degré de polymérisation de glucides possédant les mêmes monomères de base. En effet, le maltose, le maltotriose, le maltotetraose, le maltopentaose, le maltohexose et le maltoheptaose sont tous des oligosaccharides composés respectivement de 2 à 7 molécules de glucose et la figure 1.26 montre que l'élution de ces derniers prend de plus en plus de temps que leur degré de polymérisation est élevé.

Un des problèmes qui ressort cependant de cette comparaison est la proximité de certains pics. La recherche [63] montre par exemple qu'avec ces conditions opératoires, les pics du kerlose, du turanose et du palatinose s'enchaînent entre 10.8 et 11.1 minutes. La recherche [64] quant à elle montre un rapprochement des pics de l'isomaltotriose, du raffinose et du stachyose aux environs de 15.5 minutes. Ces rapprochements peuvent entraîner une superposition d'une partie des différents pics. Cela peut conduire dans des cas plus rare à l'assimilation d'un pic par un de ceux qui lui sont voisins.

[23]	Système	DIONEX ICS3000
	Colonne	CarboPac PA10 (4 × 250 mm)
	Pré-colonne	CarboPac PA10 (4 × 50 mm)
	Taille des particules	10 $\mu\text{m}$
	Eluant	Mode gradient d'eau milli-Q (A) et de NaOH 200 mM (B) (25% B 0-5 min, 25-100% B 5-15 min, 100% B 15-23 min, 100-25% B 23-25 min, 25% B 25-28 min)
	Débit	1 mL/min
	Volume d'injection	20 $\mu\text{L}$
[61]	Système	N.A.
	Colonne	N.A.
	Pré-colonne	N.A.
	Taille des particules	N.A.
	Eluant	N.A.
	Débit	N.A.
	Volume d'injection	N.A.
[62]	Système	DIONEX 500
	Colonne	CarboPac garnie avec de la silice
	Pré-colonne	N.A.
	Taille des particules	N.A.
	Eluant	Mode isocratique avec un mélange d'une solution de 250 mM de NaOH et d'eau selon les proportions % eau /% NaOH = 48:52
	Débit	0.6 mL/min
	Volume d'injection	N.A.
[63]	Système	DIONEX ICS 5000+
	Colonne	CarboPac PA210-Fast-4 $\mu\text{m}$ (150 × 4 mm)
	Pré-colonne	CarboPac PA210 (50 × 4 mm)
	Taille des particules	4 $\mu\text{m}$
	Eluant	Mode gradient de KOH 30 mM (A) et de KOH 100 mM (B) (A 0-25 min, B 25-30 min, A 30-45 min)
	Débit	0.8 mL/min
	Volume d'injection	10 $\mu\text{L}$
[64]	Système	Dionex ICS 3000
	Colonne	CarboPac PA100 (4 × 250 mm)
	Pré-colonne	CarboPac PA100 (4 × 50 mm)
	Taille des particules	4 $\mu\text{m}$
	Eluant	Mode gradient de CH <sub>3</sub> COONa (A) dans du NaOH 150 mM (B)
	Débit	0.8 mL/min
	Volume d'injection	25 $\mu\text{L}$

Table 1.10: Caractéristiques des différents systèmes et méthodes utilisés à la figure 1.26

# Chapitre 2

## Méthodologie

### 2.1 Matériel et Réactifs

#### 2.1.1 Matériel

- Bêchers (20 mL, 40 mL, 100 mL)
- Ballons jaugés (20mL, 50 mL, 100 mL, 500 mL, 1L)
- Agitateur magnétique **RO15** de **IKA**
- Balance analytique **ABJ 220-4NM** de **KERN**
- Vials + bouchons
- Micro-pipettes
- Chromatographe haute performance à échange d'anions **Metrohm 930 Compact IC Flex** de **Metrohm**
- Seringues
- Filtres à seringue jetables avec membrane de 0.45  $\mu\text{m}$  **MV-45/25** de **CHROMAFIL**

#### 2.1.2 Réactifs

- Miel
- Eau ultra-purifiée (18,2 M $\Omega$ )
- Acétate de sodium (NaOAc)



- Solution liquide d'hydroxide de sodium (NaOH) à 50% (19 M)

- Sucres témoins (pureté minimale si disponible):

monosaccharides: glucose (-), fructose (-)

disaccharides: saccharose (-), tréhalose (99%), turanose (98%), maltose (99%),  $\beta$ -gentiobiose (-)

trisaccharides: melezitose (-), raffinose (99%), erlose (-), maltotriose (98%), isomaltotriose (98%), panose (98%)

### Solution témoin de sucres du laboratoire du Cari

Sucre	% matière fraîche
Trehalose	0.51
Glucose	30.00
Fructose	40.01
$\beta$ -Gentiobiose	0.25
Turanose	1.25
Saccharose	3.00
Isomaltotriose	0.27
Raffinose	0.50
Melezitose	1.50
Maltose	2.50
Maltotriose	0.51
Panose	0.50

### Miels analysés

<b>Miel 29943</b>	Origine florale: inconnue Analysé par: Essais interlaboratoires BIPEA	
<b>Sucre</b>	<b>% matière fraîche</b>	<b>Déviati on standard</b>
Trehalose	0.8	0.7
Glucose	26.7	1.0
Fructose	32.0	1.0
$\beta$ -Gentiobiose	-	-
Turanose	2.0	0.5
Saccharose	0.3	0.5
Isomaltotriose	-	-
Raffinose	0.6	0.6
Melezitose	0.2	0.1
Maltose	2.7	1.0
Maltotriose	1.6	0.7
Panose	-	-

<b>Miel 30197</b>	Origine florale: jujubier Analysé par: chromatographie gazeuse	
<b>Sucre</b>	<b>% matière fraîche</b>	<b>Déviati on standard</b>
Trehalose	0.00	0.10
Glucose	20.30	2.14
Fructose	26.40	3.32
$\beta$ -Gentiobiose	0.00	0.00
Turanose	0.89	0.64
Saccharose	13.98	0.10
Isomaltotriose	0.00	0.59
Raffinose	0.21	0.12
Melezitose	0.11	0.40
Maltose	2.73	1.32
Maltotriose	0.12	0.32
Panose	0.06	0.59

<b>Miel 30300</b>	Origine florale: inconnue Analysé par: chromatographie gazeuse	
<b>Sucre</b>	<b>% matière fraîche</b>	<b>Déviati on standard</b>
Trehalose	0.00	0.10
Glucose	31.50	2.14
Fructose	37.20	3.32
$\beta$ -Gentiobiose	0.00	0.00
Turanose	1.20	0.64
Saccharose	4.51	0.10
Isomaltotriose	0.00	0.59
Raffinose	0.08	0.12
Melezitose	0.24	0.40
Maltose	4.10	1.32
Maltotriose	0.51	0.32
Panose	0.31	0.59

#### Solution de sucres utilisée comme adu ltérant

<b>Adu ltérant</b>	Analysé par: chromatographie gazeuse	
<b>Sucre</b>	<b>% matière fraîche</b>	<b>Déviati on standard</b>
Trehalose	0.0	0.1
Glucose	25.1	2.14
Fructose	16.6	3.32
$\beta$ -Gentiobiose	0.0	0.0
Turanose	6.63	0.64
Saccharose	0.0	0.1
Isomaltotriose	0.0	0.59
Raffinose	0.0	0.12
Melezitose	0.0	0.4
Maltose	18.34	1.32
Maltotriose	5.29	0.32
Panose	0.52	0.59

## 2.2 Mode opératoire

### 2.2.1 Préparation d'une solution de NaOAc 1M

Peser 8.203 g de NaOAc pur

Ajouter 80 mL d'eau ultra-purifiée

Transvaser quantitativement dans un ballon jaugé de 100 mL

Mélanger sous agitation mécanique (10 à 15 minutes)

Conserver au frais (4°C)

### 2.2.2 Préparation des solutions standards

Préparer des solutions de chaque sucre avec une concentration de 1 g de sucre par litre d'eau ultra-purifiée

Verser les solutions dans un ballon jaugé de 100 mL selon les proportions données dans le tableau 2.1.

Dissoudre sous agitation mécanique à 600 tours par minute durant 10 à 15 minutes avec de l'eau ultra-purifiée portée au trait

#### Standard 50

Injecter dans un vial au moyen d'une pipette graduée

#### Standard 35

Verser 14 mL dans un ballon jaugé de 20 mL

Ajouter de l'eau ultra-purifiée jusqu'au trait

Mélanger sous agitation mécanique (10 à 15 minutes)

Injecter dans un vial au moyen d'une pipette graduée

#### Standard 20

Verser 8 mL dans un ballon jaugé de 20 mL

Ajouter de l'eau ultra-purifiée jusqu'au trait

Mélanger sous agitation mécanique (10 à 15 minutes)

Injecter dans un vial au moyen d'une pipette graduée

#### Standard 10

Verser 4 mL dans un ballon jaugé de 20 mL

Ajouter de l'eau ultra-purifiée jusqu'au trait

Mélanger sous agitation mécanique (10 à 15 minutes)

Injecter dans un vial au moyen d'une pipette graduée

### Standard 5

Verser 2 mL dans un ballon jaugé de 20 mL

Ajouter de l'eau ultra-purifiée jusqu'au trait

Mélanger sous agitation mécanique (10 à 15 minutes)

Injecter dans un vial au moyen d'une pipette graduée

Sucre	Volume des solutions d'1 g de sucre par litre d'eau à mettre dans le ballon jaugée de 100 mL [mL]
Glucose	40
Fructose	40
Saccharose	1.5
Melezitose	0.5
Maltose	0.5
Turanose	0.2
Trehalose	0.2
$\beta$ -Gentiobiose	0.2
Raffinose	0.2
Maltotriose	0.2
Panose	0.2
Isomaltotriose	0.2
Erlose	0.2

Table 2.1: Préparation de la solution de sucres

### 2.2.3 Préparation d'une solution témoin de sucres

Préparer des solutions de chaque sucre avec une concentration de 1 g de sucre par litre d'eau ultra-purifiée

Verser les solutions dans un ballon jaugé de 100 mL selon les proportions données dans le tableau 2.1

Dissoudre sous agitation mécanique à 600 tours par minute durant 10 à 15 minutes avec de l'eau ultra-purifiée portée au trait

Verser 10 mL dans un ballon jaugé de 20 mL

Ajouter de l'eau ultra-purifiée jusqu'au trait

Mélanger sous agitation mécanique à 600 tours par minute durant 10 à 15 minutes

Injecter dans un vial au moyen d'une pipette graduée

## 2.2.4 Préparation des éluants

### Solution 200 mM de NaOH

Prendre un ballon jaugé de 1L

Verser 1 mL de la solution de NaOAc 1 M

Verser 10.5 mL de la solution liquide de NaOH 19 M

Dissoudre sous agitation mécanique à 600 tours par minute durant 10 à 15 minutes avec de l'eau ultra-purifiée portée au trait

### Solution 500 mM de NaOH

Prendre un ballon jaugé de 1L

Verser 1 mL de la solution de NaOAc 1 M

Verser 26.3 mL de la solution liquide de NaOH 19 M

Dissoudre sous agitation mécanique à 600 tours par minute durant 10 à 15 minutes avec de l'eau ultra-purifiée portée au trait

## 2.2.5 Préparation d'une solution de miel

Peser 5 g de miel dans un bécher 50 mL

Diluer sous agitation mécanique à 600 tours par minute durant 10 à 15 minutes avec de l'eau ultra-purifiée

Transvaser quantitativement dans le ballon jaugé de 500 mL et porter au trait avec de l'eau ultra-purifiée

Poursuivre le mélange sous agitation mécanique à 600 tours par minute durant 10 à 15 minutes

Prélever 10 mL avec une pipette jaugée et verser dans un ballon jaugé de 100 mL

Porter au trait avec de l'eau ultra-purifiée

Poursuivre le mélange sous agitation mécanique à 600 tours par minute durant 10 à 15 minutes

Prélever au moyen d'une seringue

Filtrer au moyen d'un filtre à seringue et placer en vial

## 2.3 Analyse HPAEC-PAD

### 2.3.1 Analyse de référence

Les analyses ont été effectuées par chromatographie à haute performance par échange d'anions (HPAEC) avec une détection ampérométrique pulsée (PAD) tous deux provenant de la société Metrohm. Ces analyses ont été faites avec un système

**Metrohm 930 Compact IC Flex.** Les analyses de sucres ont été faites en utilisant une colonne **Metrosep Carb 2 - 150/4.0** (150 × 4.0 mm) en PEEK (Polyéther éther kétone) avec des particules de 5  $\mu\text{m}$  de polystyrène-divinylbenzène copolymère avec des groupes d'ammonium quaternaire. Le débit d'élution a été de 0.6 mL/min avec un volume d'injection de 50  $\mu\text{L}$ . Le débit est conservé constant grâce à l'utilisation d'une pompe **Macro pump head PEEK** de la société Metrohm. Cette dernière est en PEEK et empêche les variations de débit en manipulant la pression entre 1 bar et 200 bars. Pour éviter la présence d'air dans le système provenant d'un éluant, un dégazeur est installé en amont de la pompe permettant, de ce fait, d'éviter une dégradation de cette dernière ainsi qu'une variation de la ligne de base des résultats. Afin de réaliser les analyses de manière isothermale, la colonne principale est positionnée à l'intérieur d'un four qui maintient la température constante à 30°C.

La colonne est précédée d'une pré-colonne **Metrosep A Trap 1 - 100/4.0** (100 × 4.0 mm) en PEEK avec des particules de 570  $\mu\text{m}$  de polystyrène-divinylbenzène copolymère avec des groupes d'ammonium quaternaire. Cette dernière a pour objectif d'ôter les minuscules impuretés qui ont pu passer le filtre et de purifier les flux d'éluants des contaminations anioniques qui peuvent subsister dans l'eau ultra-purifiée par exemple. Cela permet ainsi d'augmenter le temps de vie de la colonne principale en évitant les possibles dégradations dues aux impuretés et aux contaminations.

Les divers éléments présentés du système **Metrohm 930 Compact IC Flex** sont montrés sur la figure 2.1.

Les vials sont positionnés dans un des deux supports de 48 places du **889 IC Sample Center** de la société Metrohm. Ce centre d'échantillonnage conserve les échantillons à une température de 5°C et permet d'automatiser la prise d'échantillon par une aiguille de 6 mm. Le centre comporte un réservoir d'eau ultra-pure qui permet de rincer l'aiguille avant chaque analyse. Ces divers éléments sont présentés sur la figure 2.2.

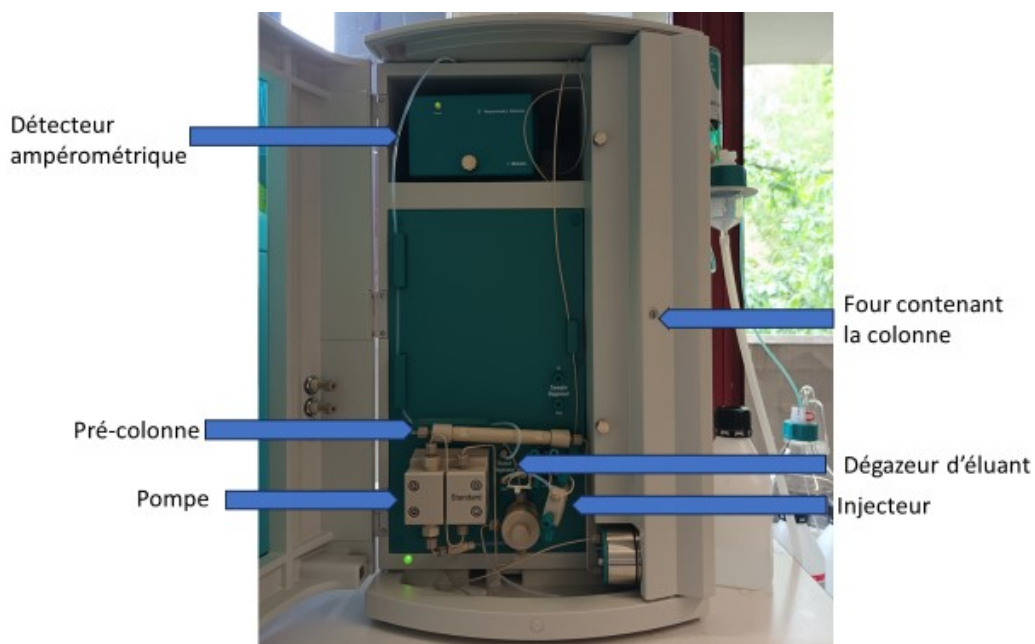


Figure 2.1: Photographie du système Metrohm 930 Compact IC Flex

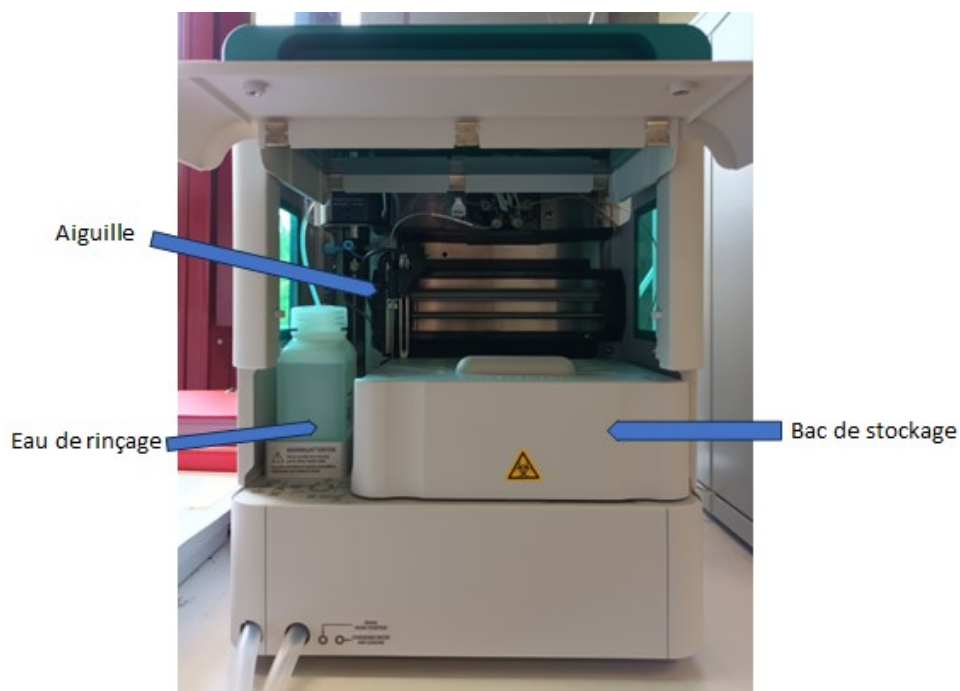


Figure 2.2: Photographie du centre d'échantillonnage 889 IC Sample Center



Les analyses ont été effectuées en mode gradient de NaOH 200 mM (A) et de NaOH 500 mM (B) selon l'image 2.3 (100 % A et 0 % B 0-20 min, 100-0 % A et 0-100 % B 20-20.1 min, 0 % A et 100 % B 20.1-35.5 min, 0-100 % A et 100-0 % B 35.5-35.6 min, 100 % A et 0 % B 35.6-45 min). Ce mode gradient permet d'augmenter progressivement la concentration en ions hydroxydes pour permettre de faciliter l'élution des oligosaccharides comme expliqué au point 1.4.3.

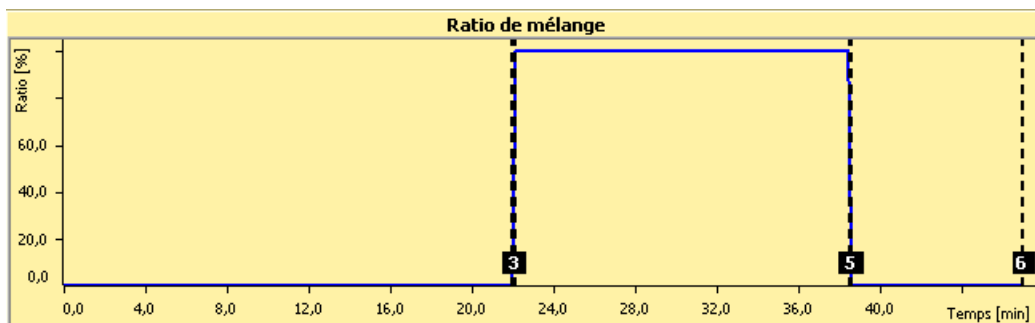


Figure 2.3: Représentation de l'évolution du gradient de concentration entre l'éluant A et l'éluant B

L'ajout d'acétate de sodium dans les éluants permet de réaliser la chromatographie des monosaccharides et des oligosaccharides en une passe puisque la force d'élution des ions hydroxydes n'est pas forcément suffisante pour éluder les plus gros glucides alors que celle de l'acétate de sodium est plus puissante et le permet.

Le mode gradient est obtenu grâce à l'utilisation d'un doseur automatique **800 Dosino** de la société Metrohm. Cet instrument est équipé de 5 ports dont 4 sont connectés. Les ports connectés le sont à :

1. l'éluant de 500 mM de NaOH
2. l'injecteur qui envoie l'éluant à la colonne entre l'éluant de 500 mM de NaOH qui provient du 800 Dosino et l'éluant de 200 mM de NaOH pour réaliser le mode gradient
3. un réservoir d'eau ultra-purifiée pour nettoyer le système
4. une sortie pour évacuer les déchets

Le cinquième port est laissé ouvert afin de pouvoir faire le vide lors d'un changement d'éluant. Les fluides sont aspirés et éjectés au moyen d'un piston de burette. Cet instrument est connecté au chromatographe afin de permettre de manipuler le mode gradient directement depuis le logiciel.

Ce **800 Dosino** est présenté à la figure 2.4.

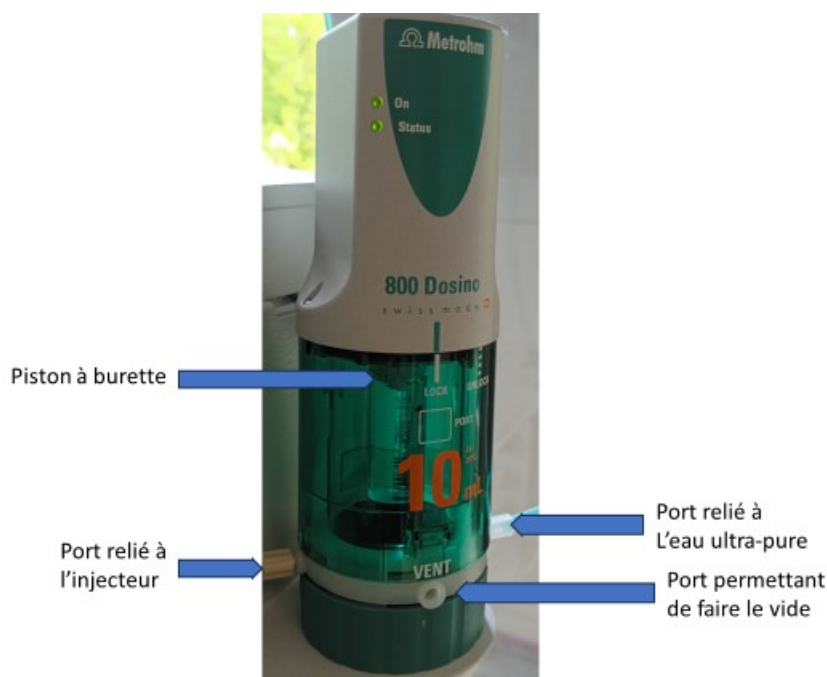


Figure 2.4: Photographie du **800 Dosino**

La détection ampérométrique pulsée se fait avec un potentiel triple, une électrode d'analyse en or et une électrode de référence. Le temps de détection du sucre est de 200 ms (représenté en rouge sur la figure 2.5) et correspond à la seconde moitié du potentiel appliqué à 0.1 V. La première partie du potentiel de 0.1 V dure également 200 ms et permet de stabiliser l'analyse tandis que la montée à 0.55 V durant 50 ms suivie de la descente à -0.1 V durant 200 ms permettent de nettoyer l'électrode des matières oxydées.

La concentration des sucres est déterminée sur base d'une analyse préalable de solutions standards en sucres passées en concentrations croissantes. Durant l'analyse des solutions, le courant généré est mesuré. Ce courant est ensuite intégré pour chaque sucre afin d'obtenir une charge faradique nette pour chaque composant. En établissant une extrapolation linéaire entre les charges obtenues et la concentration des sucres analysés des différentes solutions, une corrélation propre à chaque sucre est établie.

Chaque série de mesures est précédée par deux injections sur la colonne. En ce qui concerne la première, il s'agit d'une détermination d'eau ultra-purifiée afin de nettoyer le système. La seconde consiste en une solution standard de sucres ce qui

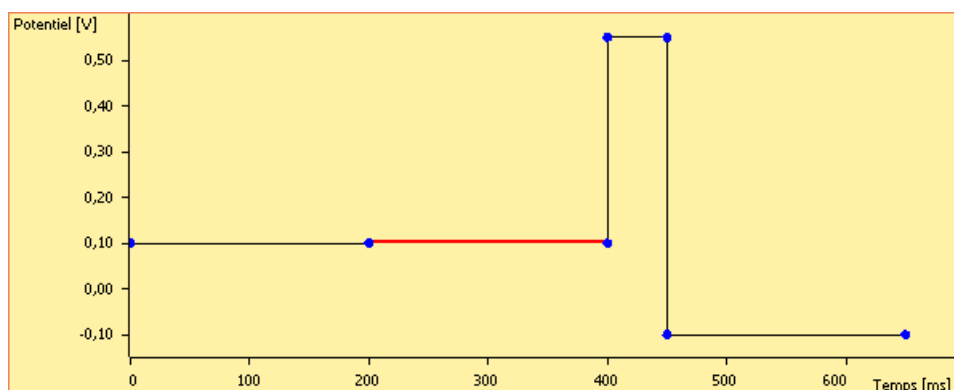


Figure 2.5: Représentation du potentiel appliqué au niveau du détecteur

permet de vérifier si une dérive des résultats n'est pas observée et si ceux-ci sont répétables d'une série à l'autre.

Le rôle de la solution témoin est de ce fait de vérifier que la corrélation obtenue à partir des solutions standards est valable.

L'ensemble de tous les éléments utilisés afin de performer la chromatographie à échange d'anions à détection ampérométrique pulsée est contrôlé par le programme **MagIC Net 4.1** de la société Metrohm. C'est au moyen de ce dernier que chaque détermination est retraitée après une première analyse des résultats. Le programme est composé de plusieurs fenêtres qui sont "Poste de travail", "Base données", "Méthode", "Configuration" et "Pilotage manuel".

- Le "Poste de travail" permet de programmer les analyses en choisissant si une détermination simple ou des déterminations en série doivent être lancées. Lors de la préparation d'une détermination, différents paramètres doivent être sélectionnés. Il y a tout d'abord le choix de la méthode implémentée dans le programme, le nom d'identification de la détermination, la position de l'échantillon dans un des supports du centre d'échantillonnage, le volume qui doit être prélevé, et finalement la dilution que l'échantillon a subi. D'autres paramètres peuvent être ajoutés mais ceux-ci ne sont pas obligatoires. Parmi ces derniers se trouvent le nom du "batch" dans lequel la détermination est enregistrée ainsi que des possibles informations supplémentaires sur l'échantillon.
- La fenêtre "Base données" permet d'observer les résultats des déterminations lancées. Elle permet notamment de comparer les courbes ou les concentrations de plusieurs analyses effectuées. En plus de cela, si le résultat d'un sucre a

mal été interprété par le programme lors d'une analyse, cette fenêtre permet de retraiter la détermination afin de repositionner le temps du sucre ou de rajouter un pic à son niveau si le programme n'a pas considéré qu'il en existait un. Chaque détermination est accompagnée des informations sur la méthodologie utilisée, sur les instruments utilisés, et sur les données de l'échantillon fournies dans la fenêtre "Poste de travail".

- La fenêtre "Méthode" permet d'accéder aux configurations des différentes méthodes. Cette fenêtre permet ainsi de modifier les conditions opératoires du chromatographe. Ces modifications comprennent la durée de l'analyse, les temps des éluants dans le mode gradient, la température du four, les limites des pressions autorisées par la pompe, ainsi que la température de conservation des échantillons. Cette fenêtre permet également d'observer les temps des différents sucres, de les changer en cas de besoin, et également d'en rajouter à la base de donnée.
- La fenêtre "Configuration" permet d'obtenir les informations enregistrées par la société Metrohm sur le système **Metrohm 930 Compact IC Flex** et les composants qui lui sont associés.
- La fenêtre "Pilotage Manuel" permet d'effectuer toutes les manipulations nécessaires sur le système. Cela comprend l'ouverture de la boîte de conservation pour ajouter un échantillon à analyser, ainsi que la possibilité de contrôler le **800 Dosino** afin de vider les tuyaux pour permettre de changer les éluants ou de préparer la machine en faisant circuler de l'éluant de 500 mM de NaOH dans la machine une fois que tous les récipients de solution sont reconnectés au système.

# Chapitre 3

## Résultats et analyses

### 3.1 Détermination du temps d'élution des sucres

La première étape qui doit être réalisée dans l'analyse de glucides au moyen d'un chromatographe est la détermination de la position des sucres. Lors de l'achat de l'appareil en 2021, l'entreprise Metrohm avait fourni un premier calibrage réalisé à partir de leurs propres solutions standards de sucres. Cependant, afin de s'assurer de la validité de ces résultats, il a fallu vérifier la position des différents sucres. Pour ce faire, une solution témoin de sucres du laboratoire du Cari a été passée au chromatographe afin de comparer les temps pré-enregistrés aux différents pics. La figure 3.1 montre une analyse de cette solution témoin par la méthode HPAEC-PAD.

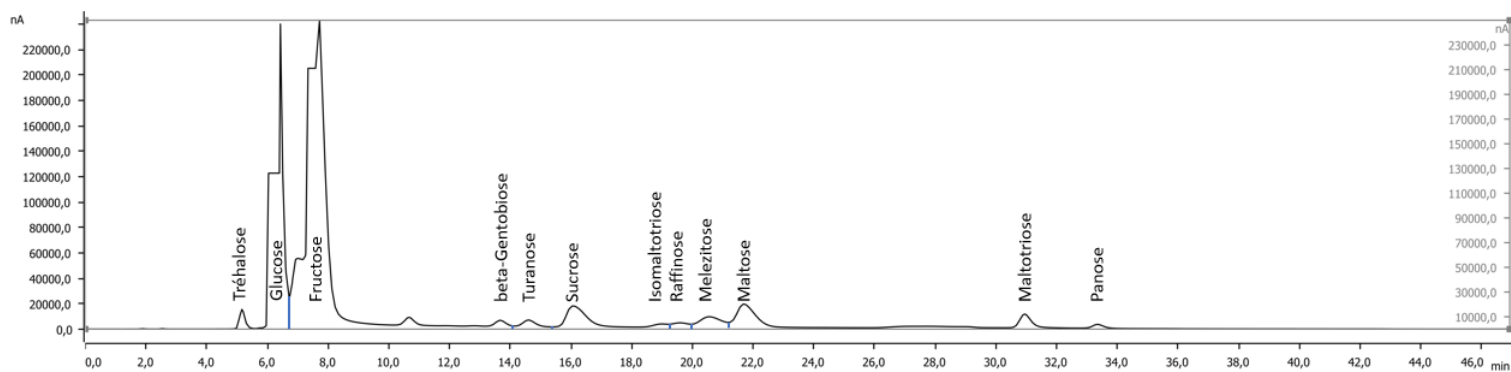


Figure 3.1: Résultat de l'analyse de la solution témoin de sucres du laboratoire du Cari

Au point 1.4.3, il a été observé que l'élution du glucose se fait avant celle du fructose puisque le pKa du glucose est supérieure à celui du fructose.[57] Il a

également été vu que l'élution du maltose est plus rapide que celle du maltotriose comme ce dernier a un degré de polymérisation plus élevé que le maltose sachant que tous deux sont uniquement composés de glucose comme base.[58, 59] Un autre point abordé est le fait que les monosaccharides sont, dans la plupart des cas, élués plus rapidement que les disaccharides comme ces derniers possèdent plus de charges effectives ce qui augmente leur affinité avec la colonne. De ce fait, il est fréquent que les disaccharides soient élués plus rapidement que les oligosaccharides.[54]

Sur la figure 3.1, il est possible de constater que les analyses effectuées au point 1.4.3 sont également valables.

En ce qui concerne l'élution du tréhalose, le fait qu'elle soit plus rapide que celles des monosaccharides peut être due aux interactions du disaccharide avec la phase stationnaire qui sont moins importantes que celles des deux autres glucides.

Pour ce qui est du maltose, même s'il s'agit d'un disaccharide, il est élué après l'isomaltotriose, le raffinose et le mélezitose qui sont des trisaccharides. Cela s'explique par le fait que ce disaccharide possède dans la colonne deux groupes fonctionnels chargés qui sont facilement accessibles par la phase stationnaire alors que les trois autres glucides en possèdent respectivement un, deux, et trois qui ne sont pas facilement accessibles stériquement parlant.

Les temps des différents sucres analysés sont répertoriés dans la table 3.3.

Sucre	Temps [min]
Trehalose	5.160
Glucose	6.428
Fructose	7.718
$\beta$ -Gentiobiose	13.669
Turanose	14.602
Saccharose	16.184
Isomaltotriose	18.992
Raffinose	19.599
Melezitose	20.553
Maltose	21.735
Maltotriose	30.949
Panose	33.355

Table 3.1: Temps de référence pour l'analyse par HPAEC-PAD à partir de la solution témoin du laboratoire du Cari

Ces temps sont une référence. Cependant, comme il a été expliqué au point 1.4.3, des variations des temps d'élution des différents sucres peuvent survenir en

fonction des conditions opératoires.

Afin de garantir l'association correcte des différents sucres à leur pic correspondant et de vérifier la possibilité d'analyser d'autres sucres qui n'ont pas encore été enregistrés par la méthode HPAEC-PAD, des solutions contenant uniquement 1 ou 2 types de sucres ont été analysées.

Les solutions de sucres déjà enregistrés sont une solution de glucose et de maltose, une solution de fructose et de sucrose, et une solution de mélézitose.

Les solutions de sucres non-enregistrés sont une solution de palatinose et une solution de mélibiose.

Les figures 3.2, 3.3 et 3.4 montrent les résultats obtenus pour les solutions de sucres déjà enregistrés.

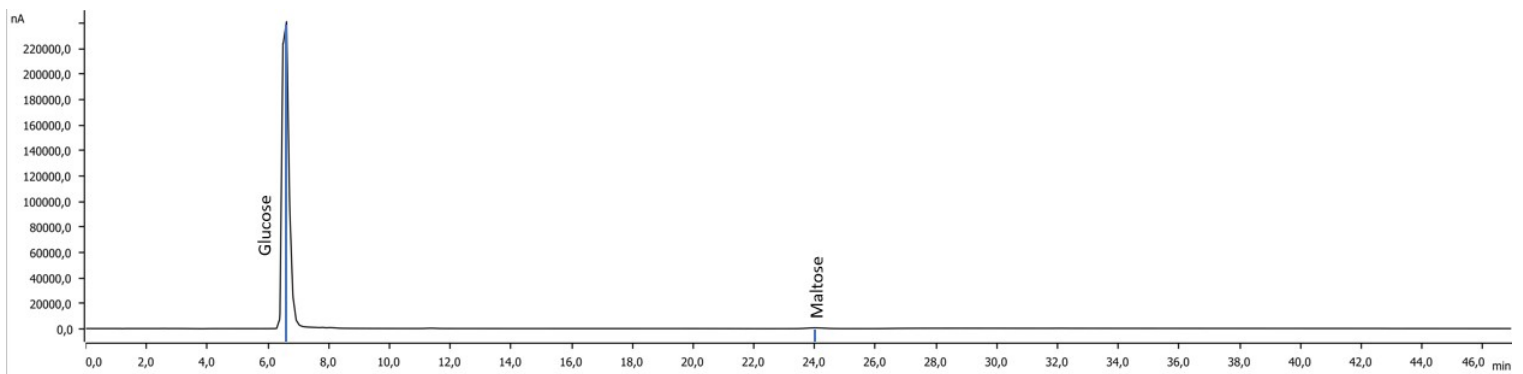


Figure 3.2: Analyse d'une solution de glucose et de maltose de concentrations respectives de 400 mg/L et de 5 mg/L (voir table 2.1 de la méthodologie)

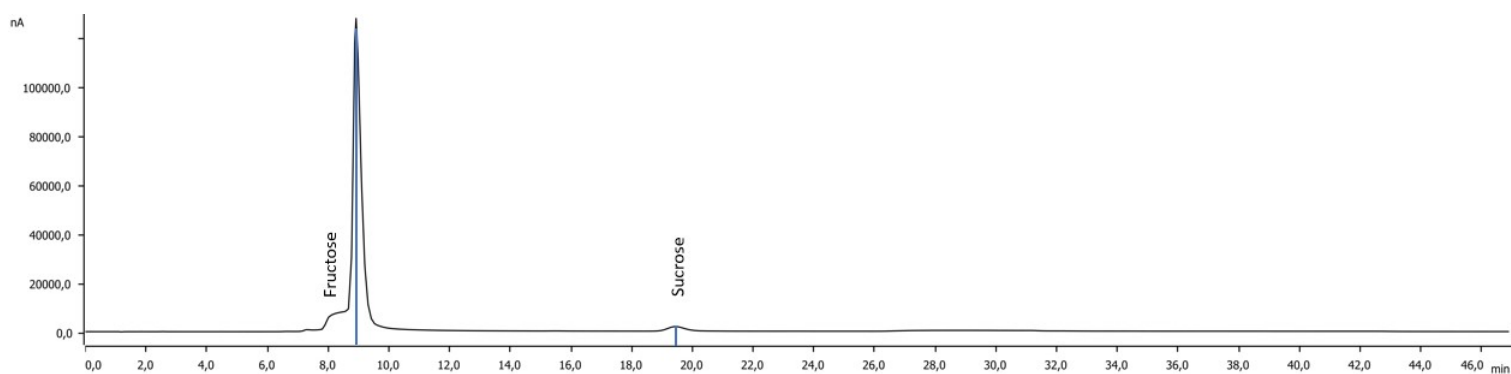


Figure 3.3: Analyse d'une solution de fructose et de sucrose de concentrations respectives de 400 mg/L et de 15 mg/L (voir table 2.1 de la méthodologie)

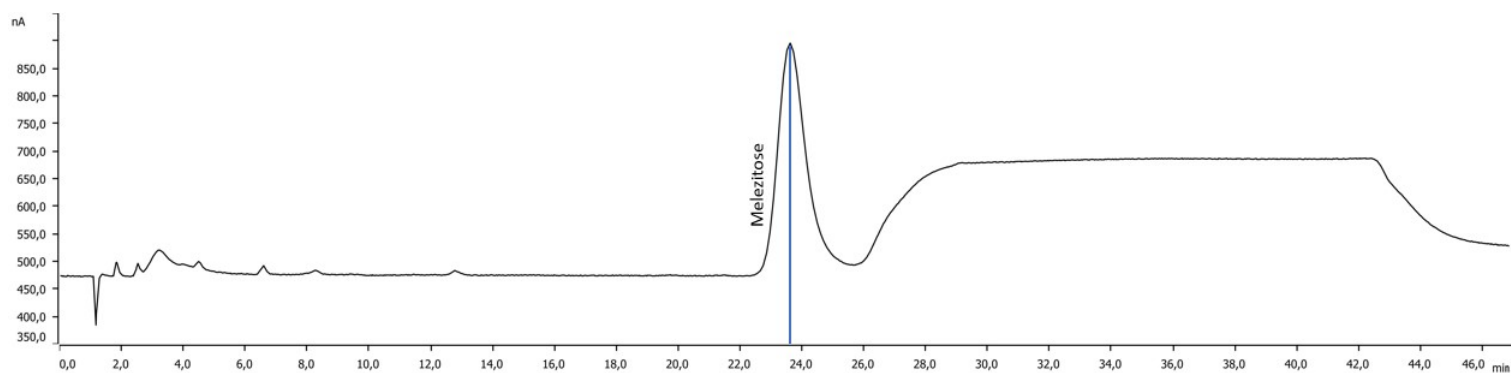


Figure 3.4: Analyse d'une solution de mélézitose (2 mg/L)

Un élément observable est le fait que les pics des sucres analysés seuls interviennent plus tard que leurs homologues dans la solution témoin. Ces temps sont répertoriés dans le tableau 3.2. Les rapports entre les temps obtenus dans les deux méthodes y sont également présentés et se situent aux alentours de 1.15. Cette évolution des temps peut être expliquée par un effet de masse dans la solution témoin qui pousserait les analytes à se faire éluder plus rapidement. De plus, les glucides ont plus de possibilités d'interactions avec les sites de la phase stationnaire puisque ces sites ne sont pas occupés par d'autres sucres.

Il reste cependant que les sucres sortent dans le même ordre que dans la solution témoin. En effet, le temps d'élution du glucose est légèrement plus faible que celui du fructose. Le sucrose est élué plus tardivement que ces monosaccharides mais plus rapidement que le mélézitose. Ce dernier est, lui-même, élué légèrement plus rapidement que le maltose.



Sucre	Temps d'éluion dans la solution témoin [min]	Temps d'éluion dans les solutions d'1 ou 2 sucres [min]	Rapport entre les temps obtenus [-]
Glucose	6.43	6.53	1.01
Fructose	7.72	8.90	1.15
Sucrose	16.18	19.41	1.19
Mélézitose	20.55	23.56	1.15
Maltose	21.74	24.00	1.1

Table 3.2: Comparaison des temps d'éluion entre l'analyse de la solution témoin et celles des solutions d'1 ou 2 sucres

Les figures 3.5 et 3.6 montrent les résultats obtenus pour les solutions de sucres non-enregistrés.

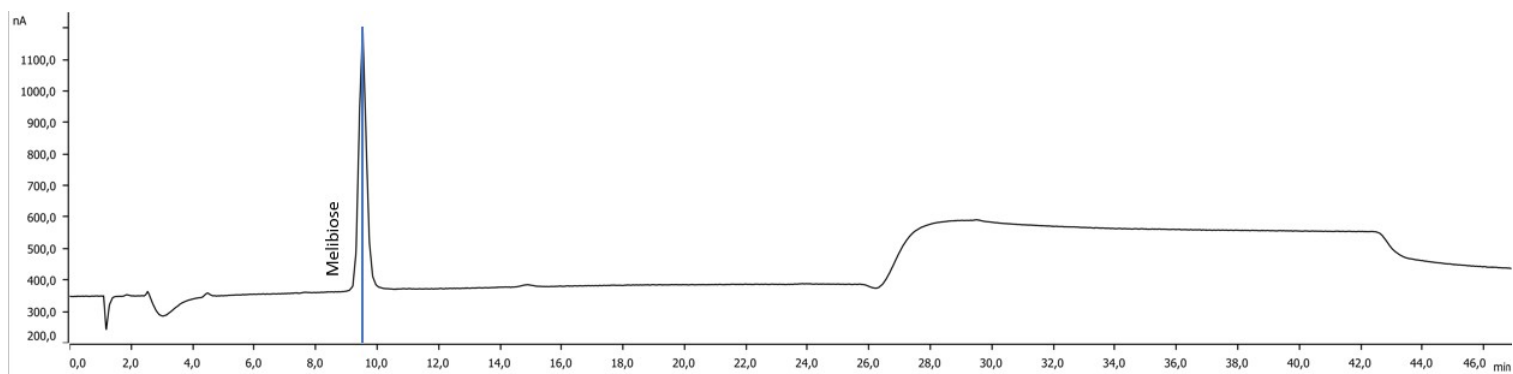


Figure 3.5: Analyse d'une solution de mélibiose

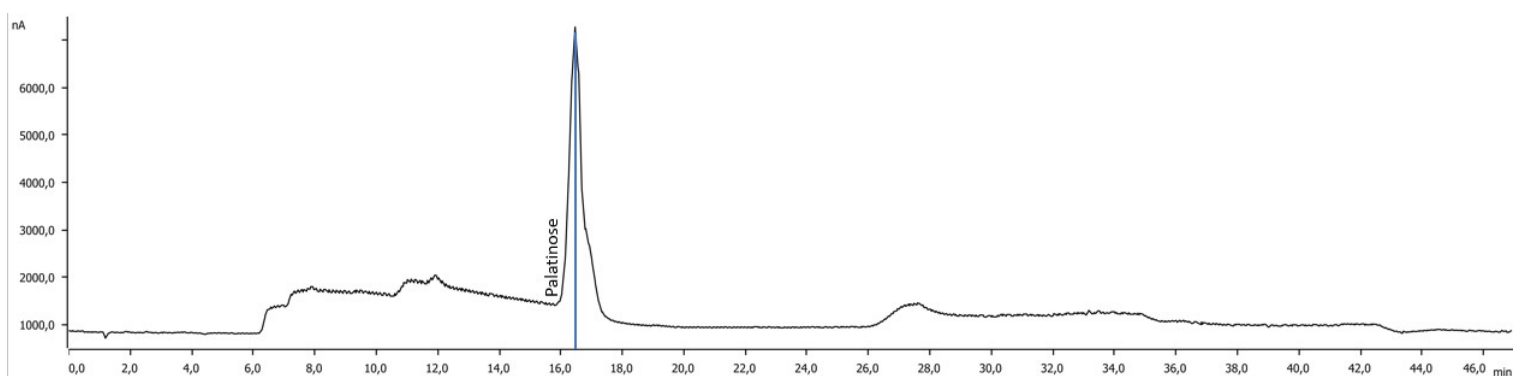


Figure 3.6: Analyse d'une solution de palatinose

En ce qui concerne le mélibiose, la figure 3.5 montre que son temps d'élution est plus ou moins le même que celui du fructose à la figure 3.3. Or, comme sa concentration dans les miels est bien moindre que celle du fructose, si le pic du mélibiose devait être analysé, il serait englobé dans celui du fructose. Pour le palatinose, le temps d'élution est légèrement inférieur à celui du sucrose. De ce fait, une analyse par la méthode HPAEC-PAD montrerait que le pic associé à ce temps correspond soit à du  $\beta$ -gentiobiose ou soit à du turanose. Cela implique donc que lors de l'analyse d'un échantillon de miel par la méthode HPAEC, la mesure obtenue pour le pic du fructose englobe également le mélibiose, même s'il est présent en très faible proportion dans le miel. De la même manière, en ce qui concerne les valeurs des pics du  $\beta$ -gentiobiose et du turanose, elles peuvent également inclure le palatinose. Par conséquent, il n'est pas possible de déterminer de manière précise les concentrations de ces trois sucres à partir de la technique HPAEC-PAD avec le système **Metrohm 930 Compact IC Flex**, étant donné qu'il n'y a pas de distinction claire entre leurs résultats.

Une dernière analyse a été effectuée afin de déterminer si l'erlose est analysable et afin de vérifier les temps obtenus précédemment. Pour ce faire, la solution témoin définie dans la méthodologie a été passée dans le chromatographe. La figure 3.7 montre les résultats obtenus pour cette solution.

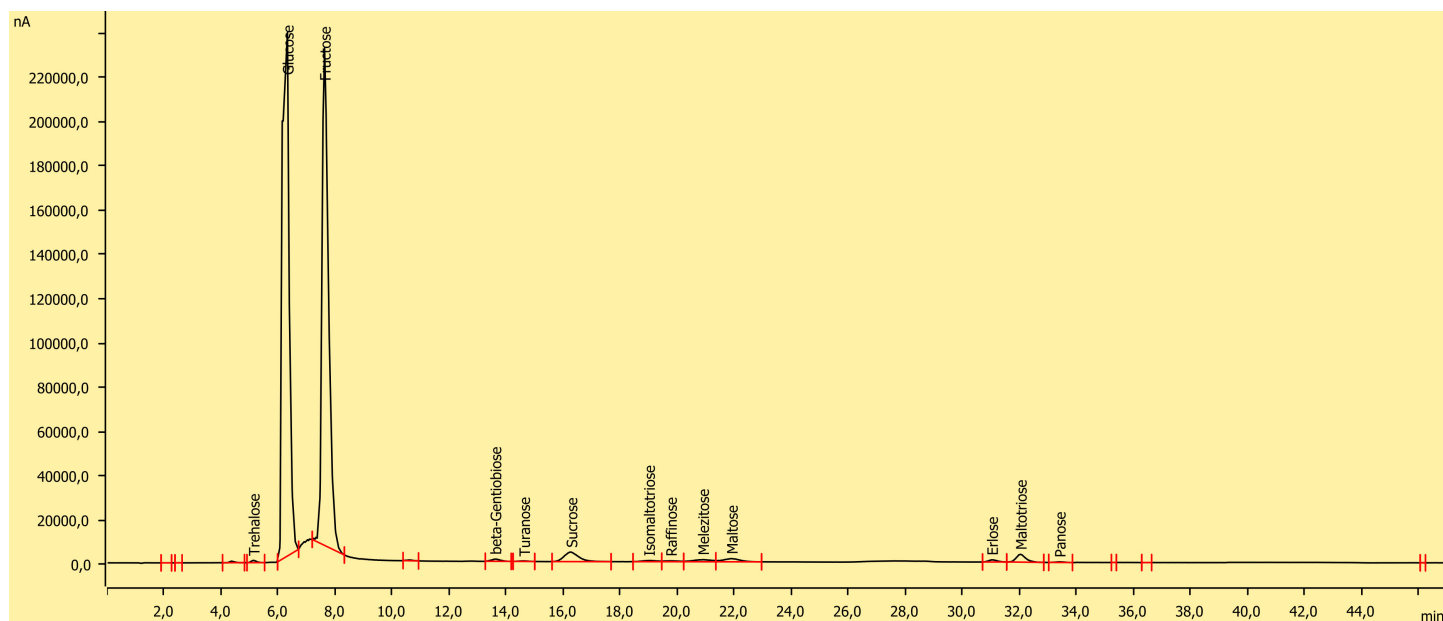


Figure 3.7: Analyse de la solution témoin de sucres selon les proportions données dans le chapitre méthodologie

Les temps obtenus sont répertoriés dans le tableau 3.3.

<b>Sucre</b>	<b>Temps [min]</b>
Trehalose	5.15
Glucose	6.26
Fructose	7.64
$\beta$ -Gentiobiose	13.62
Turanose	14.51
Saccharose	16.23
Isomaltotriose	19.00
Raffinose	19.77
Melezitose	20.90
Maltose	21.91
Erlose	31.03
Maltotriose	32.03
Panose	33.40

Table 3.3: Temps de référence pour l'analyse par HPAEC-PAD à partir de la solution témoin préparée selon la méthodologie

Tout d'abord, les résultats montrent que l'erlose est élué plus rapidement que le maltotriose avec une différence de temps suffisante pour séparer les deux pics. De ce fait, ce sucre est également analysable par ce chromatographe. De plus, les temps obtenus par cette solution témoin correspondent à ceux obtenus par la solution témoin disponible au laboratoire du Cari. De ce fait, il peut être légitime de considérer que ces temps sont corrects.

## 3.2 Détermination de la justesse des résultats obtenus par chromatographie HPAEC-PAD

Afin de garantir la conformité de l'analyse des glucides par chromatographie à échange d'anions avec détection ampérométrique par le système **Metrohm 930 Compact IC Flex**, il est nécessaire de déterminer si les résultats obtenus correspondent aux valeurs réelles présentes dans les solutions analysées.

Pour ce faire, la méthode pré-enregistrée par la société Metrohm à partir de leurs solutions standards réalisées au moyen de leurs propres sucres a été utilisée pour analyser la solution standard 50 et des solutions de miel afin de déterminer la validité de cette méthode.

Chaque analyse a été réalisée plusieurs fois et les valeurs obtenues ont ensuite été moyennées pour faire la comparaison avec les valeurs théoriques auxquelles elles sont associées.

Les figures 3.8, 3.9 et 3.10 présentent ces comparaisons pour chaque sucre dont la valeur théorique est connue. Ces résultats sont respectivement associées aux analyses de la solution standard 50, de la solution faite à partir du miel 29943, et de la solution faite à partir du miel 30300.

Pour chaque sucre l'erreur relative a été calculée à partir de l'équation 3.1.

$$Erreur\ relative = \frac{|valeur\ réelle - valeur\ théorique|}{valeur\ théorique} \quad (3.1)$$

STD50	Trehalose [mg/L]	Glucose [mg/L]	Fructose [mg/L]	beta-Gentiobiose [mg/L]	Turanose [mg/L]	Sucrose [mg/L]	Isomaltotriose [mg/L]	Raffinose [mg/L]	Melezitose [mg/L]	Maltose [mg/L]	Maltotriose [mg/L]	Panose [mg/L]
Valeurs théoriques	2	400	400	2	2	15	2	2	5	5	2	2
Moyennes des analyses	2,373	422,447	558,733	3,017	3,191	30,556	5,564	3,449	9,670	12,147	18,720	3,032
Erreur relative moyenne	0,187	0,056	0,397	0,508	0,596	1,037	1,782	0,725	0,934	1,429	8,360	0,516

Figure 3.8: Comparaison des valeurs obtenues pour la solution standard 50 au moyen de la méthode pré-enregistrée par la société Metrohm, avec leurs valeurs théoriques

29943	Trehalose [mg/L]	Glucose [mg/L]	Fructose [mg/L]	beta-Gentiobiose [mg/L]	Turanose [mg/L]	Sucrose [mg/L]	Isomaltotriose [mg/L]	Raffinose [mg/L]	Melezitose [mg/L]	Maltose [mg/L]	Maltotriose [mg/L]	Panose [mg/L]
Valeurs théoriques	8	267	320	-	20	3	-	6	2	27	16	-
Moyennes des analyses	1,180	385,224	446,467	0,696	24,251	3,035	0,000	12,919	6,572	23,139	11,315	22,351
Erreur relative moyenne	0,853	0,443	0,395	-	0,213	0,012	-	1,153	2,286	0,143	0,293	-

Figure 3.9: Comparaison des valeurs obtenues pour la solution réalisée à partir du miel 29943 au moyen de la méthode pré-enregistrée par la société Metrohm, avec leurs valeurs théoriques

30300	Trehalose [mg/L]	Glucose [mg/L]	Fructose [mg/L]	beta-Gentiobiose [mg/L]	Turanose [mg/L]	Sucrose [mg/L]	Isomaltotriose [mg/L]	Raffinose [mg/L]	Melezitose [mg/L]	Maltose [mg/L]	Maltotriose [mg/L]	Panose [mg/L]
Valeurs théoriques	0	315	372	0	12	45,1	0	0,8	2,4	41	5,1	3,1
Moyennes des analyses	0,377	392,116	402,573	0,285	20,248	53,581	0,000	4,325	4,056	27,121	1,597	6,143
Erreur relative moyenne	-	0,244813	0,082185	-	0,687333	0,188038	-	4,406250	0,689792	0,338512	0,686863	0,981452

Figure 3.10: Comparaison des valeurs obtenues pour la solution réalisée à partir du miel 30300 au moyen de la méthode pré-enregistrée par la société Metrohm, avec leurs valeurs théoriques

La figure 3.11 reprend de manière graphique l'ensemble des erreurs relatives afin de pouvoir comparer directement les résultats obtenus.

Ces tableaux ainsi que le graphique montrent que rares sont les valeurs dont l'erreur relative est inférieure à 5 % et il arrive même que cette erreur relative atteigne les 800%. De ce fait, il est légitime de considérer que cette méthode doit encore être améliorée étant donné que la précision des valeurs est nettement inférieure à ce qui peut être attendu d'une chromatographie à haute performance.

En ce qui concerne le raffinose, alors que les erreurs pour la solution standard 50 et pour la solution de miel 29943 sont du même ordre, celle de la solution de miel 30300 est bien plus importante. Cela peut être dû à la présence d'un autre sucre non-enregistré dans le programme qui est élué en même temps que le raffinose. Cela provoque ainsi une augmentation conséquente de son pic et donc une valeur bien plus importante que celle théorique.

Cette justification ne peut pas être applicable pour le maltotriose puisque tous les sucres analysés dans la solution standard 50 sont élués à des temps différents. Cela peut provenir d'une erreur de manipulation lors de la préparation de la solution puisque sa concentration y est faible et donc une légère erreur engendre une grande différence dans les résultats.

Le graphique montre cependant qu'en moyenne, les erreurs obtenues pour le glu-

cose et le fructose sont moindres en comparaison avec celles obtenues pour les disaccharides et les oligosaccharides. Cela s'explique notamment par le fait que les concentrations des deux monosaccharides sont bien plus importantes que celles des autres glucides dans les miels comme expliqué au point 1.1.2. Par conséquent, à moins d'une différence importante entre les valeurs mesurées et les valeurs théoriques, les erreurs relatives qui leurs sont associées ne seront pas très élevées par rapport à celles des autres sucres.

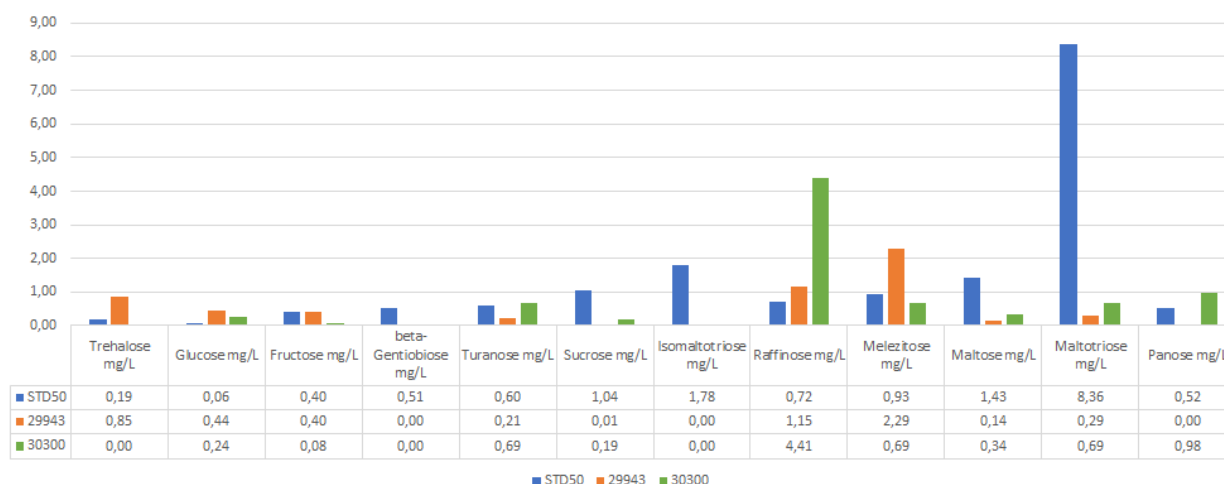


Figure 3.11: Représentation graphique des erreurs relatives calculées précédemment à partir des valeurs obtenues au moyen de la méthode pré-enregistrée par la société Metrohm

Puisque les résultats obtenus au moyen de la méthode pré-enregistrée ne se sont pas présentés comme assez concluants, une nouvelle méthode a été implémentée et testée. Pour ce faire, les solutions standards ont été préparées.

Des solutions de 1 g/L des 12 sucres ont donc été élaborées. A partir de celles-ci une solution standard 50 de 100 mL a été réalisée en suivant les concentrations données par le tableau 2.1. A partir de cette solution, les solutions standards 5, 10, 20 et 35 ont également été préparées en diluant proportionnellement celle de 50. Ces solutions standards ont ensuite été analysées afin de réaliser les régressions linéaires pour chaque sucre en fonction des pics obtenus comme indiqué au point 2.3.1.

Afin de pouvoir comparer avec la méthode précédente, la procédure appliquée a été identique et ce, sur les mêmes 3 solutions analysées.

Les figures 3.12, 3.13 et 3.14 présentent, les comparaisons obtenues avec cette nouvelle méthode et sont respectivement associées aux résultats de la solution

standard 50, de la solution faite à partir du miel 29943, et de la solution faite à partir du miel 30300.

<b>STD50</b>	Trehalose [mg/L]	Glucose [mg/L]	Fructose [mg/L]	beta-Gentiobiose [mg/L]	Turanose [mg/L]	Sucrose [mg/L]	Isomaltotriose [mg/L]	Raffinose [mg/L]	Melezitose [mg/L]	Maltose [mg/L]	Maltotriose [mg/L]	Panose [mg/L]
Valeurs théoriques	2	400	400	2	2	15	2	2	5	5	2	2
Moyennes des analyses	2,163	390,576	423,664	1,936	2,247	14,470	2,252	2,031	4,604	5,806	2,114	2,062
Erreur relative moyenne	<b>0,081</b>	<b>0,024</b>	<b>0,059</b>	<b>0,032</b>	<b>0,124</b>	<b>0,035</b>	<b>0,126</b>	<b>0,015</b>	<b>0,079</b>	<b>0,161</b>	<b>0,057</b>	<b>0,031</b>

Figure 3.12: Comparaison des valeurs obtenues pour la solution standard 50 au moyen de la nouvelle méthode implémentée dans le programme, avec leurs valeurs théoriques

<b>29943</b>	Trehalose [mg/L]	Glucose [mg/L]	Fructose [mg/L]	beta-Gentiobiose [mg/L]	Turanose [mg/L]	Sucrose [mg/L]	Isomaltotriose [mg/L]	Raffinose [mg/L]	Melezitose [mg/L]	Maltose [mg/L]	Maltotriose [mg/L]	Panose [mg/L]
Valeurs théoriques	8	267	320	-	20	3	-	6	2	27	16	-
Moyennes des analyses	0,704	347,407	369,965	5,222	11,264	5,324	4,604	5,804	3,753	10,450	1,546	4,191
Erreur relative moyenne	<b>0,912</b>	<b>0,301</b>	<b>0,156</b>	-	<b>0,437</b>	<b>0,775</b>	-	<b>0,033</b>	<b>0,876</b>	<b>0,613</b>	<b>0,903</b>	-

Figure 3.13: Comparaison des valeurs obtenues pour la solution réalisée à partir du miel 29943 au moyen de la nouvelle méthode implémentée dans le programme, avec leurs valeurs théoriques

<b>30300</b>	Trehalose [mg/L]	Glucose [mg/L]	Fructose [mg/L]	beta-Gentiobiose [mg/L]	Turanose [mg/L]	Sucrose [mg/L]	Isomaltotriose [mg/L]	Raffinose [mg/L]	Melezitose [mg/L]	Maltose [mg/L]	Maltotriose [mg/L]	Panose [mg/L]
Valeurs théoriques	0	315	372	0	12	45,1	0	0,8	2,4	41	5,1	3,1
Moyennes des analyses	0,579	384,901	430,753	0,624	18,521	31,415	0,000	2,835	3,635	15,101	1,420	2,094
Erreur relative moyenne	-	<b>0,222</b>	<b>0,158</b>	-	<b>0,543</b>	<b>0,303</b>	-	<b>2,543</b>	<b>0,515</b>	<b>0,632</b>	<b>0,722</b>	<b>0,325</b>

Figure 3.14: Comparaison des valeurs obtenues pour la solution réalisée à partir du miel 30300 au moyen de la nouvelle méthode implémentée dans le programme, avec leurs valeurs théoriques

La figure 3.15 reprend de manière graphique l'ensemble des erreurs relatives obtenues à partir de cette nouvelle méthode.

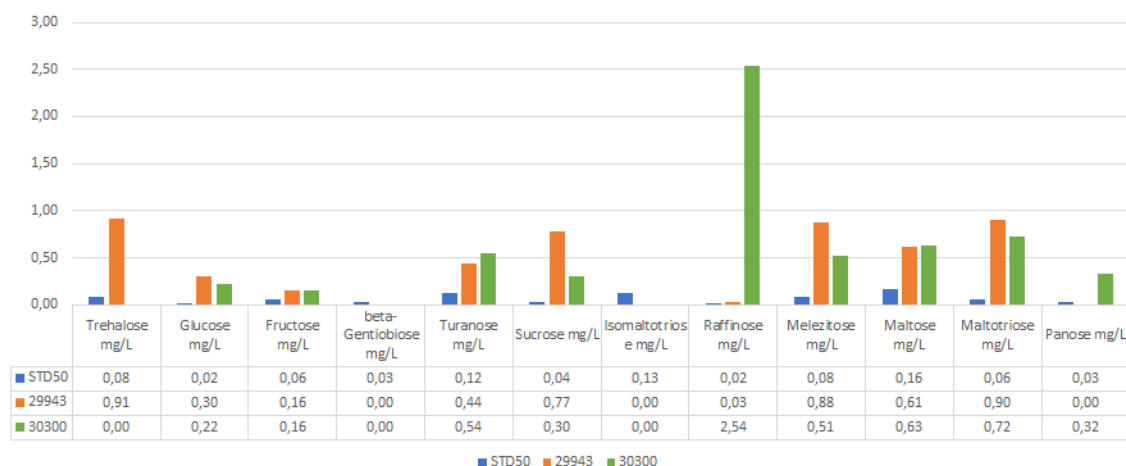


Figure 3.15: Représentation graphique des erreurs relatives calculées précédemment à partir des valeurs obtenues au moyen de la nouvelle méthode implémentée

Comme le montre la figure 3.12, les erreurs relatives liées à l'analyse des glucides de la solution standard 50 ne dépassent les 10 % que pour 3 sucres sur les 12 analysés. Cette amélioration des résultats s'explique par le fait qu'une solution standard 50 a également été utilisée pour implémenter cette nouvelle méthode. Par conséquent, les régressions linéaires sont basées sur les concentrations de cette solution.

En utilisant les figures 3.13 et 3.14 ainsi que le graphique de la figure 3.15, il devient évident que la précision de cette méthode n'est pas suffisante pour l'analyse des miels. En effet, il ressort que pour la majorité des sucres au moins une des analyses présente une erreur relative supérieure à 50 %. Les seuls sucres pour lesquels les erreurs ne dépassent pas les 50 % sont le glucose et le fructose ainsi que le panose. La comparaison entre les erreurs obtenues pour les oligosaccharides et celles des monosaccharides met encore en avant le fait que la présence en grande quantité des monosaccharides diminue fortement la concentration des oligosaccharides ce qui rend leur analyse précise compliquée.

Concernant le raffinose, l'erreur observée pour la solution du miel 30300 est, une fois de plus, beaucoup plus importante que pour les deux autres solutions. Cela appuie l'hypothèse évoquée précédemment selon laquelle un autre sucre présent en plus grande concentration dans ce miel est élué en même temps que le raffinose.



En comparant les résultats obtenus par les deux méthodes pour l'analyse de miel, il apparaît que, mis à part le sucrose, le maltose et le maltotriose, les valeurs calculées par la seconde méthode sont plus proches de celles attendues par la théorie. Cela peut donc signifier que la méthode est meilleure même si les valeurs ne correspondent pas encore à ce qui peut être espéré d'une chromatographie à haute performance à échange d'anions.

Cette difficulté à obtenir une méthode qui peut fournir de bons résultats peut être expliquée par plusieurs raisons visibles sur la figure 3.16. Celle-ci présente une image centrée au niveau des pics du glucose et du fructose, des courbes obtenues par le détecteur pour les différentes solutions standards analysées durant le développement d'une nouvelle méthode.

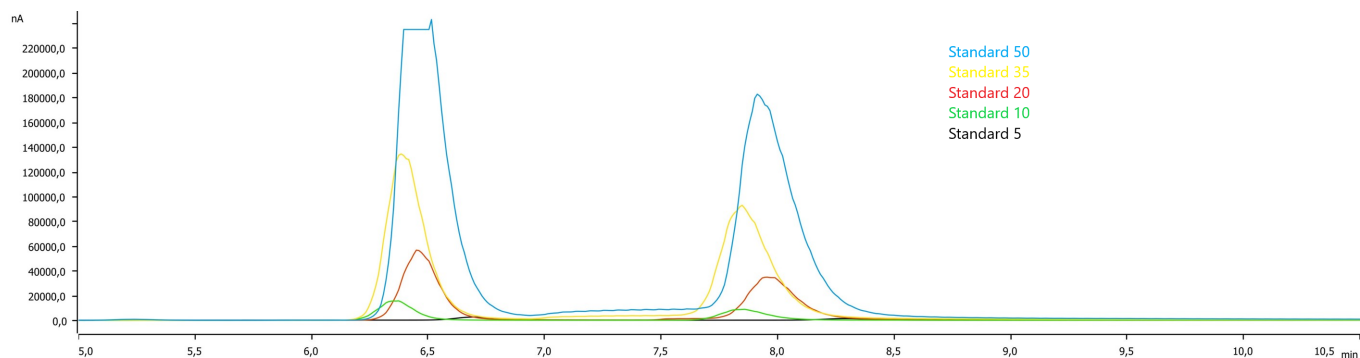


Figure 3.16: Zoom sur l'analyse des courbes obtenues par le passage des solutions standards pour la création d'une nouvelle méthode

Le premier problème observable est le fait que, selon la concentration, chacune des courbes possède des temps légèrement différents pour les pics associés au glucose et au fructose. Or, lors de la création d'une méthode, un seul temps peut être enregistré comme temps de référence pour un pic. De ce fait, si les pics ne présentent pas une superposition presque parfaite, l'analyse du pic pour certaines des solutions peut ne pas être prise en compte par le programme car considérée comme inexistante. Dans le cas de la figure 3.16, la solution standard 5 présente, par exemple, un pic du glucose qui apparaît après ceux des solutions standard 10 et 20, ce qui va engendrer le fait que ce dernier n'est pas pris en compte. Cette différence de temps est seulement d'une dizaine de secondes mais empêche déjà l'utilisation d'une valeur pour la régression. Une différence de temps, même petite, est d'autant plus contraignante pour les autres glucides que le glucose et le fructose puisque l'envergure de leurs pics est bien plus faible. Le fait que les pics n'apparaissent pas au même temps peut être dû à diverses raisons. Cela peut notamment être

expliqué par le fait qu'une diminution de la concentration en glucides va favoriser l'action des ions hydroxydes dans leur rôle d'agent éluant facilitant la sortie des analytes de la colonne ce qui va diminuer leurs temps d'élution. Cette variation de la concentration en glucides a également un impact sur le nombre de sites de la phase stationnaire disponibles. Une diminution du nombre de sites actifs réduit la compétition entre les analytes pour interagir avec ceux-ci, ce qui peut également contribuer à la fluctuation des temps d'élution.

Un autre problème observable est dû à la réponse générée lors de la détection. En effet, sur les pics du glucose et du fructose, la réponse produite par l'analyse de la solution standard 5 est très faible. Or, en comparaison aux autres pics, la taille des pics de ces deux monosaccharides est bien plus importante comme le montrait la figure 3.7. Cela entraîne que les pics des autres sucres peuvent ne même pas être observables en chromatographie en raison de leurs concentrations trop faibles dans ces solutions.

Pour ces deux raisons, les régressions linéaires des différents glucides peuvent manquer de points, réduisant ainsi leur précision et, par la même occasion, la qualité des résultats fournis par une méthode.

En conclusion, malgré la mise en place d'une nouvelle méthode, les résultats fournis par le programme MagIC Net 4.1 ne sont pas suffisamment précis pour considérer les différentes méthodes comme justes et utilisables pour l'analyse des glucides présents dans des miels.

Il a été jugé que la première calibration permettait des erreurs relatives moindres sur les sucres essentiels présents dans le miel et serait utilisée pour la suite des expériences. Cependant, les faiblesses rencontrées jusqu'ici seront retenues et prises en compte lors de l'analyse des résultats. Parmi celles-ci, on peut citer la variabilité des temps de rétention en fonction des concentrations ainsi que la possible présence de sucres non pris en compte lors de la calibration.

### 3.3 Détermination de la répétabilité de l'analyse de glucides par chromatographie HPAEC-PAD

Pour garantir la fiabilité d'une méthode d'analyse, il est nécessaire de s'assurer que le procédé est répétable. Cela implique qu'au cours de multiples exécutions de la même analyse, la réponse fournie par le système doit rester constante, ou du moins ne pas varier de manière excessive.

Pour ce faire, la solution standard 50 a été passée trois fois de suite lors de déterminations en série afin de déterminer si les réponses fournies lors de la détection ampérométrique permettent de valider ce critère de répétabilité.

Les résultats graphiques obtenus par ces déterminations sont montrés à la figure 3.17 et les valeurs obtenues par le programme sont reprises à la figure 3.18.

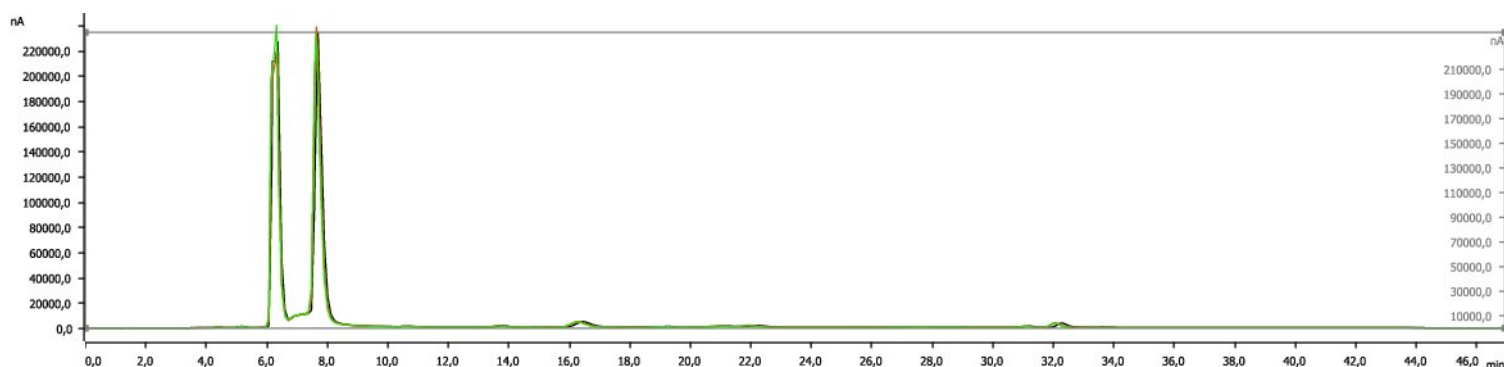


Figure 3.17: Analyse graphique de la répétabilité de la méthode à partir de plusieurs déterminations en série de la solution standard 50

	Trehalose [mg/L]	Glucose [mg/L]	Fructose [mg/L]	beta-Gentiobiose [mg/L]	Turanose [mg/L]	Sucrose [mg/L]	Isomaltotriose [mg/L]	Raffinose [mg/L]	Melezitose [mg/L]	Maltose [mg/L]	Maltotriose [mg/L]	Panose [mg/L]
Analyse 1	2,365	417,989	550,738	3,056	3,266	30,243	5,446	3,645	9,713	12,433	18,576	2,89
Analyse 2	2,412	414,189	562,909	2,994	3,248	30,753	5,326	3,414	9,628	11,844	18,385	2,969
Analyse 3	2,342	435,164	562,552	3,171	3,345	30,671	5,389	3,565	9,803	11,936	18,994	2,877
Ecart-type	0,036	11,176	6,926	0,090	0,052	0,274	0,060	0,117	0,088	0,317	0,311	0,050
Moyenne	2,373	422,447	558,733	3,074	3,286	30,556	5,387	3,541	9,715	12,071	18,652	2,912
Rapport Ecart-type/Moyenne	0,015	0,026	0,012	0,029	0,016	0,009	0,011	0,033	0,009	0,026	0,017	0,017

Figure 3.18: Valeurs obtenues par le programme à partir de l'analyse de plusieurs déterminations en série de la solution standard 50

Le graphique de la figure 3.17 montre que les tracés des 3 courbes des analyses de la solution standard se superposent presque parfaitement.

Il est donc légitime de supposer que les valeurs fournies par le programme seront donc semblables. Les valeurs numériques obtenues viennent renforcer cette idée. En effet, la figure 3.18 montre que les moyennes obtenues pour chaque glucide restent proches des valeurs fournies par le programme. En comparant les rapports entre les écarts-types et les moyennes pour chaque glucide, il ressort que ces rapports ne dépassent pas les 3.5%. Cela signifie que les valeurs obtenues présentent une dispersion faible et acceptable.

De plus, les glucides pour lesquels le rapport entre l'écart-type et la moyenne est le plus élevé sont le glucose, le  $\beta$ -gentiobiose, le raffinose et le maltose. Ces derniers, outre le glucose, sont des oligosaccharides présents en faible concentration dans la solution. Une légère différence due au détecteur ou au programme lors de l'analyse engendre par conséquent une plus grande variation de la concentration obtenue comme expliqué au point 1.1.2.

Afin de s'assurer de la validité de ces propos, la solution du miel 29943 a également été analysée trois fois de suite lors de déterminations en série.

Les résultats graphiques obtenus par ces déterminations sont présentés à la figure 3.19 et les valeurs obtenues par le programme sont reprises à la figure 3.20.

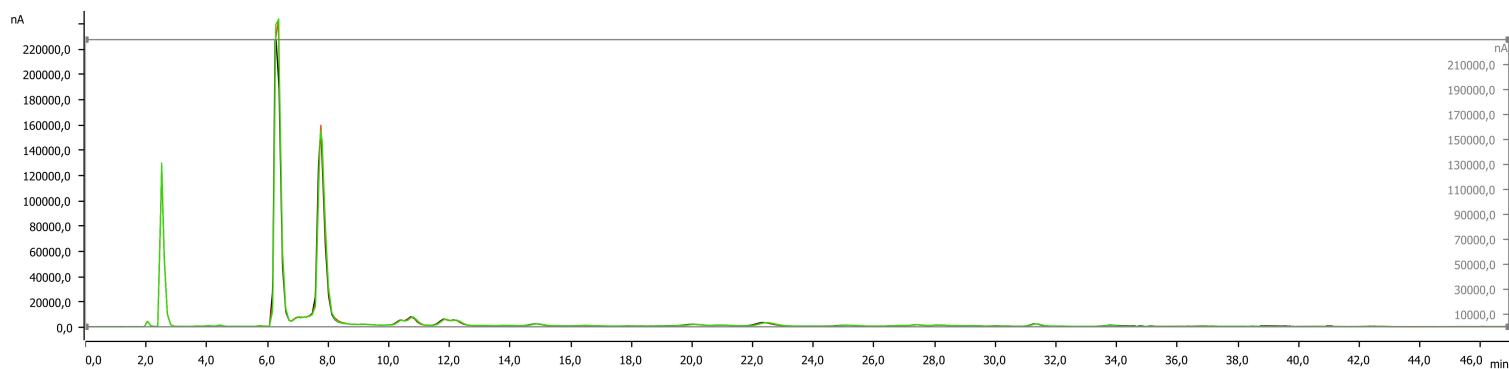


Figure 3.19: Analyse graphique de la répétabilité de la méthode à partir de plusieurs déterminations en série de la solution de miel 29943

Le graphique de la figure 3.19 montre une fois de plus que les tracés des courbes des analyses de la solution du miel 29943 se superposent presque parfaitement.

Cette superposition confirme donc la légitimité de la répétabilité de l'analyse par le détecteur ampérométrique puisque les réponses du système sont similaires.

En ce qui concerne les valeurs, les moyennes des résultats obtenus pour chaque glucide sont, encore une fois, proches des valeurs fournies par le programme pour chacune des analyses. Concernant les rapports entre les écarts-types et les moyennes,

	Trehalose [mg/L]	Glucose [mg/L]	Fructose [mg/L]	beta- Gentiobiose [mg/L]	Turanose [mg/L]	Sucrose [mg/L]	Isomaltotriose [mg/L]	Raffinose [mg/L]	Melezitose [mg/L]	Maltose [mg/L]	Maltotriose [mg/L]	Panose [mg/L]
Analyse 1	1,095	387,715	432,476	0,711	23,676	2,24	0	12,314	5,907	23,161	9,303	8,668
Analyse 2	1,089	371,726	389,11	0,71	23,985	2,329	0	12,636	6,116	23,142	9,476	7,352
Analyse 3	1,12	372,062	389,418	0,721	24,253	2,276	0	12,627	6,122	23,205	9,341	7,609
Ecart-type	0,016	9,136	24,949	0,006	0,289	0,045	0,000	0,183	0,122	0,032	0,091	0,698
Moyenne	1,101	377,168	403,668	0,714	23,971	2,282	0,000	12,526	6,048	23,169	9,373	7,876
Rapport Ecart- type/Moyenne	0,015	0,024	0,062	0,009	0,012	0,020	-	0,015	0,020	0,001	0,010	0,089

Figure 3.20: Valeurs obtenues par le programme à partir de l'analyse de plusieurs déterminations en série de la solution de miel 29943

ces derniers restent inférieurs à 2.5 % pour la majorité des sucres.

Il est cependant apparu deux exceptions qui sont le fructose avec un rapport de 6.1% et le panose avec un rapport de 8.8 %. Ce changement dans les résultats provient de la façon selon laquelle les pics correspondants ont été intégrés durant l'analyse 1 et les deux autres analyses. Cette différence d'intégration est montrée à la figure 3.21 avec le pic du panose.

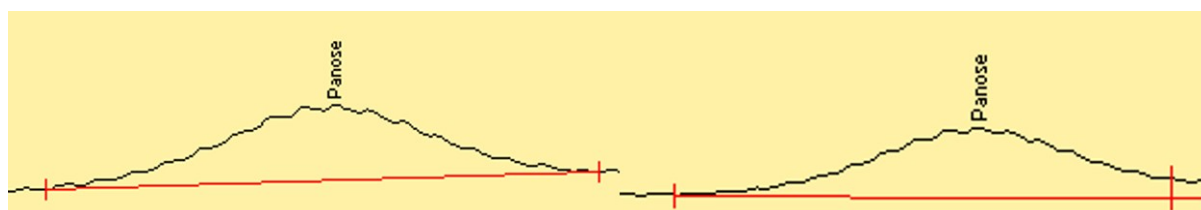


Figure 3.21: Différence d'intégration du pic du panose entre celle des analyses 2 et 3 à gauche et celle de l'analyse 1 à droite

La différence d'intégration provient du programme, qui peut considérer que, dans certains cas, un autre pic peut exister à côté de celui du panose. De ce fait, la ligne d'intégration entre les deux extrémités du pic ne sera plus directe et la surface sous le pic sera légèrement agrandie. Cette méthode d'analyse des pics est également appliquée au niveau du fructose, ce qui entraîne une variation dans les résultats obtenus.

A partir des résultats obtenus tant au niveau des courbes des graphiques que des valeurs qui leur sont associées, il est justifié d'affirmer que l'analyse par chromatographie à échange d'anions avec détection ampérométrique utilisant le système **Metrohm 930 Compact IC Flex** est répétable. Cependant, des précautions doivent être prises au niveau des méthodes d'intégration pour garantir la cohérence des résultats et minimiser les risques d'erreur potentiels.

### 3.4 Détermination de l'influence des éluants

Comme expliqué précédemment au point 1.4.3, les éluants ont une influence sur la vitesse d'éluion des glucides. L'objectif poursuivi ici est d'évaluer l'influence de la concentration molaire des éluants sur les résultats d'analyses des sucres dans le miel afin d'éventuellement obtenir une meilleure séparation des sucres par la colonne.

Les analyses sont réalisées avec, d'une part, l'éluant A qui est passé de 200 mM à 250 mM de NaOH tout en gardant l'éluant B à 500 mM de NaOH, et, d'autre part, l'éluant A qui est resté à 200 mM de NaOH et l'éluant B qui est passé de 500 à 600 mM de NaOH.

L'éluant de 250 mM a été réalisé en versant 13.13 mL de la solution de NaOH 19 M à la place de 10.5 lors de la préparation de l'éluant de 200 mM. Pour celui de 600 M, elle a été réalisé en versant 31.6 mL de la solution de NaOH à la place de 26.3 mL dans la préparation de l'éluant de 500 mM.

La figure 3.22 montre la comparaison entre les 3 combinaisons d'éluants appliqués à l'analyse de 3 miels différents utilisés. Pour chaque comparaison, la courbe rouge représente la réponse obtenue en utilisant le mode gradient standard présenté dans la méthodologie au point 2.3.1. La courbe noire représente la réponse obtenue en utilisant le mode gradient avec un éluant de 250 mM de NaOH et un éluant de 500 mM. Finalement, la courbe verte représente quant à elle la réponse obtenue en utilisant le mode gradient avec un éluant de 200 mM de NaOH et un éluant de 600 mM.

Une première observation est que la courbe noire possède des pics qui apparaissent plus tôt que ceux des courbes vertes et rouges. Cette avance est visible dans la plupart des cas dès l'apparition des pics du glucose et du fructose. Elle est explicable notamment par ce qui a été écrit au point 1.4.3. En effet, les ions hydroxydes jouent un double rôle lors de la chromatographie à échange d'anions. Ceux-ci permettent d'ioniser les sucres et jouent également le rôle de "pousseur" en entrant en compétition avec les analytes liés à la résine les poussant à être élués. De ce fait, comme l'éluant A dans le "système noir" est plus concentré en NaOH, il libèrera plus d'ions hydroxydes dans la colonne, ce qui va pousser les glucides à se faire éluder et ce qui va donc diminuer le temps d'attente avant qu'ils ne soient analysés par le détecteur ampérométrique.

Les systèmes rouges et verts, quant à eux, possèdent le même éluant A ce qui va résulter en une presque parfaite superposition des deux courbes. Les faibles différences entre ces deux courbes peuvent provenir de légères imprécisions lors de la pesée ou de la dilution, ou d'un léger changement de la composition des miels dans le bac de stockage puisque les miels évoluent avec le temps comme il avait été dit précédemment au point 1.1.2.

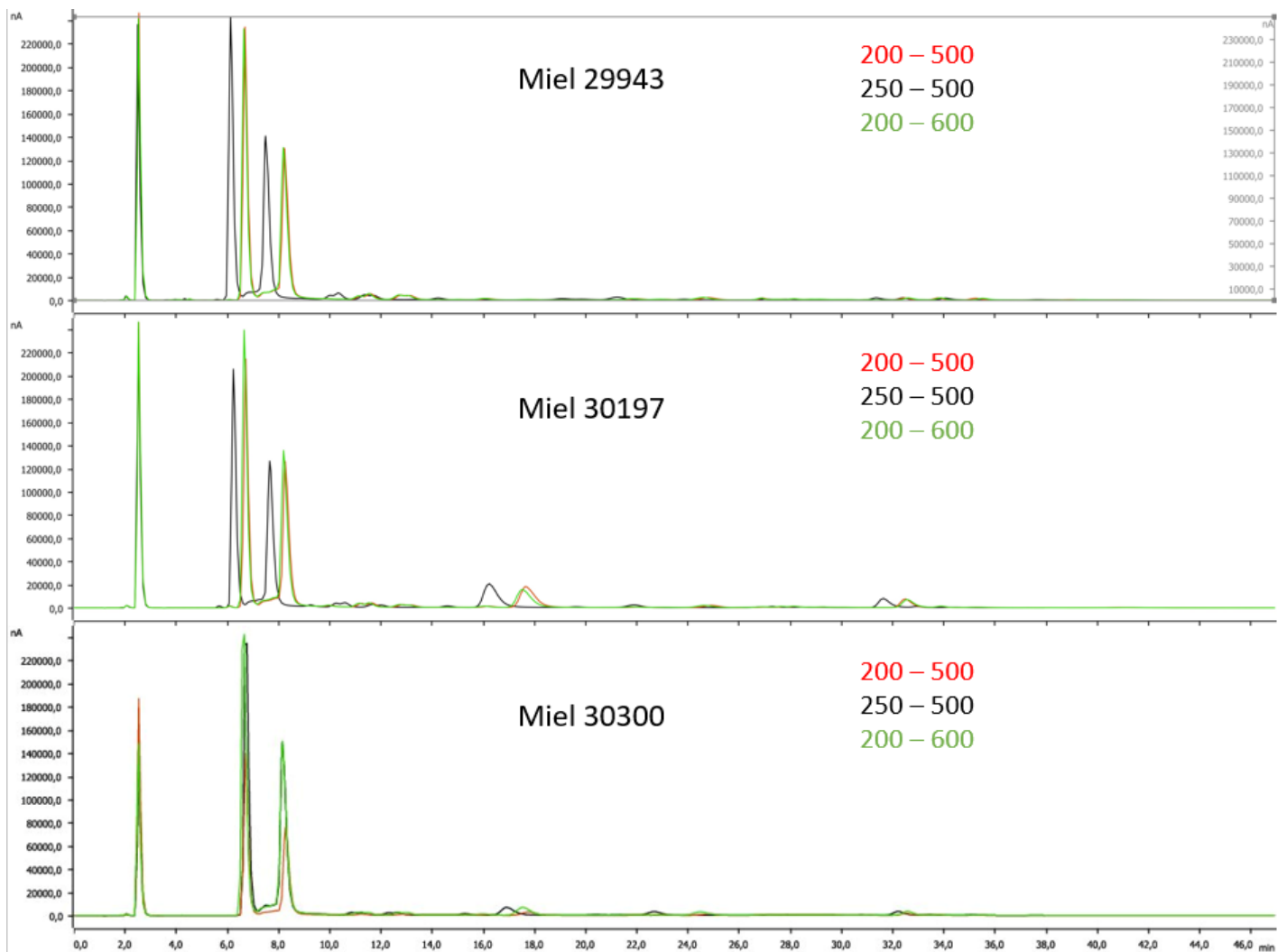


Figure 3.22: Comparaison graphique des résultats obtenus pour 3 modes d'éluants différents utilisés

Il serait attendu que l'utilisation d'un éluant plus concentré en NaOH comme éluant B diminuerait le temps d'éluion des glucides après que celui-ci soit appliqué lors de l'analyse. La figure 3.22 ne montre cependant pas de différence entre la courbe rouge et la courbe verte après 20 minutes, moment où l'éluant B commence à être injecté. La force d'éluion des ions hydroxyles peut ne pas être suffisante pour éluder les oligosaccharides et donc l'utilisation d'acétate de sodium dans les éluants permet d'éluder ces glucides puisque sa force d'éluion est supérieure. Ce phénomène a été déjà détaillé dans le point 1.4.3.

Afin de déterminer si l'utilisation de l'éluant de 250 mM à la place de celui de 200 mM peut être envisagée, il faut vérifier si les résultats fournis par cette méthode correspondent à ceux de la méthode de référence.

La figure 3.23 montre les différences relatives entre les résultats obtenus pour l'analyse des miels 29943, 30197 et 30300 par la méthode de référence et par la méthode utilisant des éluants de 250 mM et de 500 mM de NaOH. Ces différences montrent que les valeurs obtenues par la seconde méthode diffèrent de manière relativement importante de celles obtenues par la méthode de référence.

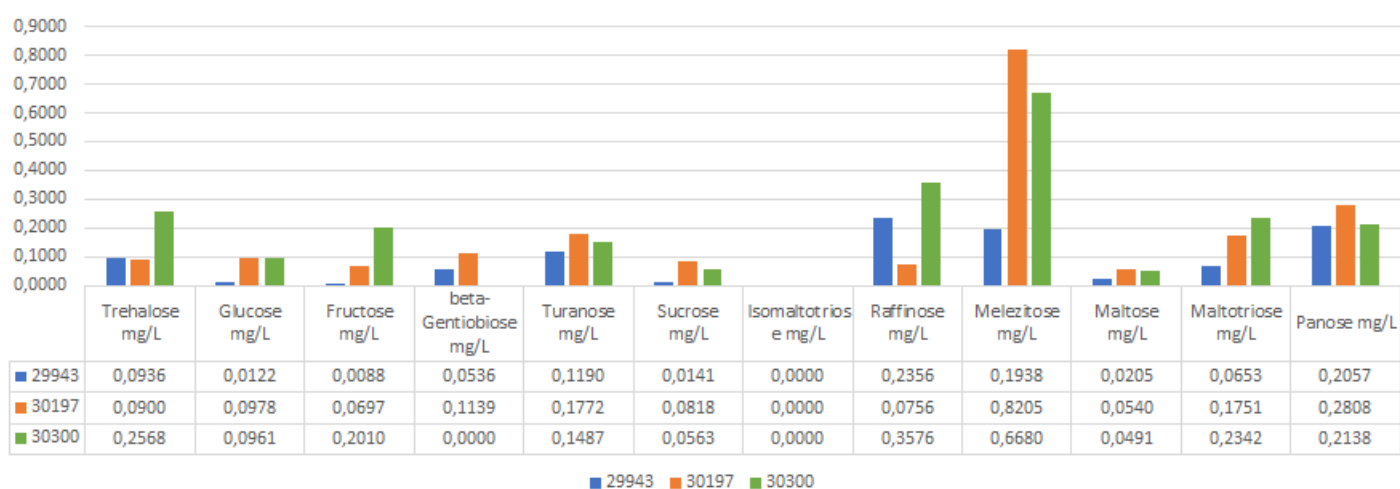


Figure 3.23: Différences relatives entre les valeurs obtenues par la méthode de référence et celle utilisant des éluants de 250 mM et de 500 mM de NaOH lors de l'analyse des 3 miels

Il ressort que pour la plupart des sucres, des différences relatives de l'ordre de 5 à 20% sont observées. Une explication de ces différences est que les pics vont être rapprochés à cause du décalage, ce qui peut induire une superposition de ceux-ci diminuant ainsi la précision des valeurs obtenues. Les différences entre les résultats peuvent même atteindre dans certains cas des valeurs bien plus élevées comme pour le mélézitose qui présente des différences relatives de 66 et 82 %. Comme le mélézitose est un trisaccharide présent en faible concentration dans ces miels, il est d'autant plus impacté par une légère imprécision lors de l'intégration du pic par le programme. Cela va engendrer une augmentation importante de l'erreur relative même si les résultats sont proches.



Les écarts entre les valeurs des concentrations obtenues pour chaque sucre par les deux méthodes sont cependant trop importants pour considérer que ces méthodes fournissent des résultats similaires ou presque. De ce fait, il est justifié de conclure que la méthode utilisant des éluants composés de 250 mM et de 500 mM de NaOH ne répond pas aux attentes en terme de résultats, même si elle permet de diminuer le temps d'analyse par sa capacité à faire éluer les sucres plus rapidement. Par conséquent, seule l'utilisation de la méthode de référence utilisant des éluants composés de 200 mM de NaOH et de 500 mM de NaOH est légitime puisqu'elle permet d'obtenir des résultats corrects tout en évitant d'utiliser une solution plus concentrée en NaOH.

### 3.5 Détermination de la détection d'adultération dans du miel

Afin de déterminer si le système **Metrohm 930 Compact IC Flex** peut détecter des adultérations dans un miel, des analyses ont été effectuées. Pour ce faire, le miel 29943 a été adultéré volontairement à l'aide de solutions de sucres disponibles dans le commerce. Les concentrations de chaque sucre du miel analysé sont reprises dans la figure 3.24. Ces concentrations ont été obtenues en moyennant les résultats de trois déterminations successives.

Trehalose [mg/L]	Glucose [mg/L]	Fructose [mg/L]	beta-Gentiobiose [mg/L]	Turanose [mg/L]	Sucrose [mg/L]	Isomaltotriose [mg/L]	Raffinose [mg/L]	Melezitose [mg/L]	Maltose [mg/L]	Maltotriose [mg/L]	Panose [mg/L]
1,180	385,223	446,467	0,696	24,251	3,035	0,000	12,919	6,572	23,139	11,315	22,351

Figure 3.24: Concentrations moyennes des sucres dans la solution du miel 29943

La première adultération qui a été analysée est une solution de miel à laquelle du glucose pur a été ajouté. Pour ce faire, dans la préparation de la solution de miel, à la place de 5 g de miel, une solution de 4.5 g a été mélangée avec une solution de 0.5 g de glucose, ce qui correspond à une adultération de 10 % de ce sucre.

La figure 3.25 reprend les concentrations du miel et du sucre utilisé ainsi que les valeurs théoriques attendues et les concentrations mesurées par le programme. La figure reprend également l'ensemble des erreurs relatives qui sont aussi représentées graphiquement sur la figure 3.26.

	Trehalose [mg/L]	Glucose [mg/L]	Fructose [mg/L]	beta-Gentiobiose [mg/L]	Turanose [mg/L]	Sucrose [mg/L]	Isomaltotriose [mg/L]	Raffinose [mg/L]	Melezitose [mg/L]	Maltose [mg/L]	Maltotriose [mg/L]	Panose [mg/L]
<b>29943 5g</b>	1,180	385,224	446,467	0,696	24,251	3,035	0,000	12,919	6,572	23,139	11,315	22,351
<b>Glucose 0,5g</b>	0,000	100,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<b>Concentrations Théoriques</b>	1,062	446,701	401,820	0,626	21,826	2,731	0,000	11,627	5,915	20,825	10,184	20,115
<b>Concentrations mesurées</b>	1,042	413,247	398,667	0,632	22,162	2,832	0,000	11,501	5,586	20,438	10,711	18,814
<b>Erreurs relatives</b>	<b>0,019</b>	<b>0,075</b>	<b>0,008</b>	<b>0,009</b>	<b>0,015</b>	<b>0,037</b>	-	<b>0,011</b>	<b>0,056</b>	<b>0,019</b>	<b>0,052</b>	<b>0,065</b>

Figure 3.25: Comparaison des valeurs théoriques de l'adultération du miel 29943 avec 10 % massique de glucose avec les valeurs mesurées au moyen du programme **MagIC Net 4.1**

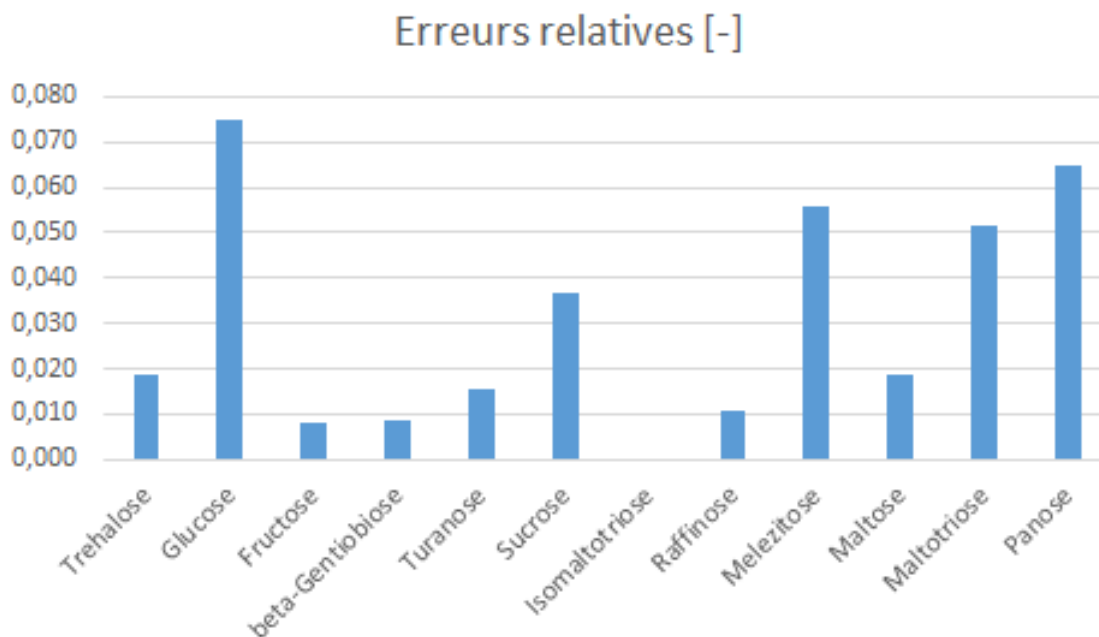


Figure 3.26: Représentation graphique des erreurs relatives entre les concentrations théoriques de l'adultération du miel 29943 avec 10 % massique de glucose avec les valeurs mesurées au moyen du programme **MagIC Net 4.1**

Il en ressort que la totalité des erreurs relatives des concentrations des glucides mesurées par rapport à celles théoriques est inférieure à 10 %. Plus de la moitié de ces erreurs relatives s'avèrent être en-deçà de 2 %. En effet, une diminution proportionnelle des concentrations de tous les glucides, hormis celui ajouté, peut être observée. Cela signifie donc que l'adultération par ajout de 10 % de glucose peut être analysée et détectée au moyen du système de chromatographie à échange d'anions avec détection ampérométrique fourni par le producteur Metrohm.

Cependant, très rares sont les adultérations au moyen de glucose pure. De ce fait, afin de déterminer si le système est habilité à détecter correctement une falsification, des adultérations au moyen d'une solution de sucres ont été préparées. Les concentrations des glucides de l'adultérant sont répertoriées sur la figure 3.27. Ces concentrations ont été obtenues en moyennant les résultats de plusieurs déterminations successives.

La figure 3.27 montre que la solution de sucres utilisée comme adultérant est principalement composée de glucose, fructose, maltose et de panose. Il est donc attendu que les concentrations mesurées des autres sucres diminuent de manière

Trehalose [mg/L]	Glucose [mg/L]	Fructose [mg/L]	beta-Gentiobiose [mg/L]	Turanose [mg/L]	Sucrose [mg/L]	Isomaltotriose [mg/L]	Raffinose [mg/L]	Melezitose [mg/L]	Maltose [mg/L]	Maltotriose [mg/L]	Panose [mg/L]
0,673	372,418	241,777	0,000	0,213	0,000	0,000	0,402	1,370	220,600	5,653	73,066

Figure 3.27: Concentrations moyennes des sucres dans la solution d'adultérant

proportionnelle avec la quantité de miel pur dans la solution adultérée.

Une première adultération a été analysée avec 20 % massique d'adultérant. La figure 3.28 reprend les concentrations théoriques attendues dues à cette adultération et les concentrations mesurées par le programme. La figure reprend également l'ensemble des erreurs relatives qui sont aussi représentées graphiquement sur la figure 3.29.

20 % Adult.	Trehalose [mg/L]	Glucose [mg/L]	Fructose [mg/L]	beta-Gentiobiose [mg/L]	Turanose [mg/L]	Sucrose [mg/L]	Isomaltotriose [mg/L]	Raffinose [mg/L]	Melezitose [mg/L]	Maltose [mg/L]	Maltotriose [mg/L]	Panose [mg/L]
Concentrations Théoriques	1,078	382,662	405,529	0,557	19,443	2,428	0,000	10,416	5,532	62,631	10,183	32,494
Concentrations mesurées	0,822	387,584	410,322	0,669	19,580	2,634	0,000	10,894	5,697	63,932	10,362	36,890
Erreurs relatives	0,238	0,013	0,012	0,201	0,007	0,085	-	0,046	0,030	0,021	0,018	0,135

Figure 3.28: Comparaison des valeurs théoriques de l'adultération du miel 29943 avec 20 % massique de la solution de sucres avec les valeurs mesurées au moyen du programme **MagIC Net 4.1**

Comme le montre ces deux figures, les concentrations mesurées de la solution adultérée correspondent en grande majorité à ce qui était attendu par la théorie. Seuls le tréhalose, le  $\beta$ -gentobiose et le panose présentent des erreurs relatives importantes. Ces dernières s'expliquent notamment par le fait que, les deux premiers soient présents en très faibles concentrations ce qui augmente grandement l'erreur relative pour une petite différence de résultats. En ce qui concerne le panose, cela provient du problème d'intégration présenté à la figure 3.21.

Une autre adultération, de 10 % massique, a également été analysée. L'objectif de cette dernière est de voir si un plus faible ajout d'adultérant peut être détecté par le système.

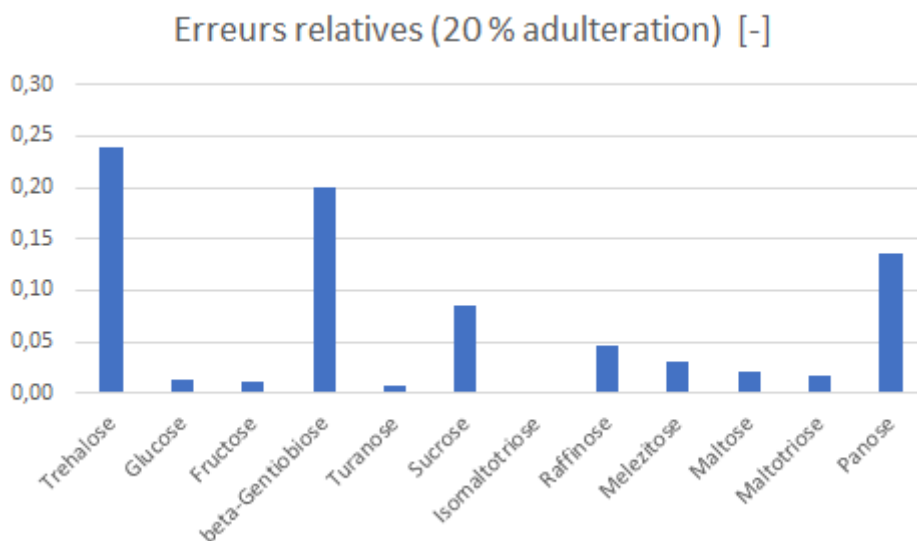


Figure 3.29: Représentation graphique des erreurs relatives entre les concentrations théoriques de l'adulteration du miel 29943 avec 20 % massique de la solution de sucres avec les valeurs mesurées au moyen du programme **MagIC Net 4.1**

La figure 3.30 reprend les concentrations théoriques attendues et les concentrations mesurées par le programme, ainsi que l'ensemble des erreurs relatives.

10 % Adult.	Trehalose [mg/L]	Glucose [mg/L]	Fructose [mg/L]	beta-Gentiobiose [mg/L]	Turanose [mg/L]	Sucrose [mg/L]	Isomaltotriose [mg/L]	Raffinose [mg/L]	Melezitose [mg/L]	Maltose [mg/L]	Maltotriose [mg/L]	Panose [mg/L]
Concentrations Théoriques	1,129	383,943	425,998	0,626	21,847	2,731	0,000	11,667	6,052	42,885	10,749	27,422
Concentrations mesurées	1,183	390,083	428,000	0,657	23,589	3,123	0,000	11,925	6,060	45,716	12,524	33,671
Erreurs relatives	0,048	0,016	0,005	0,049	0,080	0,144	-	0,022	0,001	0,066	0,165	0,228

Figure 3.30: Comparaison des valeurs théoriques de l'adulteration du miel 29943 avec 10 % massique de la solution de sucres avec les valeurs mesurées au moyen du programme **MagIC Net 4.1**

Cette figure montre qu'une fois de plus, à l'exception de trois sucres, les erreurs relatives obtenues sont faibles. Cela signifie que le système reconnaît bien la présence d'une adulteration. Parmi les trois sucres mal analysés, se trouve encore le panose. En ce qui concerne les deux autres, il ne s'agit plus du tréhalose et du  $\beta$ -gentobiose mais du sucrose et du maltotriose dont les erreurs sont également dues à la façon selon laquelle les droites d'intégration ont été placées.

Par conséquent, il est légitime de considérer que le système **Metrohm 930 Compact IC Flex** de la société Metrohm est apte à détecter des adultérations dans un miel et en connaître la proportion adultérée. Cependant, il ne faut pas oublier que durant cette analyse, les concentrations du miel pur étaient connues contrairement à une analyse à l'aveugle d'un miel afin de déterminer si ce dernier est adultéré ou non.

## 3.6 Déterminations des limites de l'analyse des glucides par chromatographie HPAEC-PAD

Durant les plus de 400 analyses qui ont été réalisées, plusieurs problèmes sont apparus dont certains ont déjà été introduits précédemment. Cette section a pour objectif de présenter les différentes limitations qui peuvent être rencontrées lors de l'analyse de glucides par l'ensemble du système de chromatographie à échange d'anions fourni par la société Metrohm.

Tout d'abord, comme présenté au point 3.3, lors de l'analyse des courbes, prodiguées par le détecteur ampérométrique, au moyen du programme **MagIC Net 4.1**, le programme va automatiquement mettre la présence de pics aux endroits où il considère qu'il y en a. Or, il peut considérer la présence d'un pic qui n'existe pourtant pas. Il peut arriver que ce pic se situe juste à côté d'un autre pic bien réel. Dans ce cas, le système va créer une droite entre les extrémités les plus éloignées de ceux-ci et va ajouter une ligne verticale pour limiter les surfaces de chacun des pics. Cela est montré à la figure 3.21 avec le pic du panose qui est directement suivi d'un autre qui n'existe pas vraiment. Dès lors, la surface d'intégration du vrai pic va augmenter. Cette augmentation peut avoir un impact plus ou moins important en fonction de la hauteur du pic et de la position de la nouvelle droite par rapport à l'ancienne.

Comme expliqué précédemment, il est possible, à partir du programme, de rajouter manuellement la présence d'un pic entre deux points de la courbe. Il n'est cependant pas possible d'enlever un pic si le programme considère qu'il y en a un. De ce fait, comme cette manière d'intégrer peut se réaliser à n'importe quelle analyse, il est obligatoire de vérifier que cette intégration n'a pas eu lieu pour considérer l'analyse comme juste.

Une autre des limitations déjà présentée, est la difficulté d'analyser les composés en faibles concentrations. Comme le montre encore la figure 3.21, les courbes sont faites à partir de petits segments de droites qui ne cessent de monter et descendre. Dans le cas d'un analyte de faible concentration, les différents points formant ces segments ne vont pas permettre de faire la distinction entre un pic et un segment de droite horizontal.

Le miel est un composé qui évolue avec le temps. Cela est notamment dû à l'action des différentes enzymes qu'il possède comme expliqué au point 1.1.1. De ce fait, les concentrations de ses glucides vont être modifiées. Des analyses d'un miel séparées par un temps certain vont par conséquent présenter des résultats différents. Cela ne remet pas en cause la répétabilité de l'analyse mais impose à

l'opérateur d'effectuer ses expérimentations sur une solution de cet aliment dans une période restreinte pour valider ses analyses.

Au niveau du système **Metrohm 930 Compact IC Flex**, une des principales limitations se trouve au niveau du doseur et du système de pompage. En effet, lorsqu'un éluant doit être changé puisque sa quantité devient trop faible dans le récipient pour que le système puisse le pomper, l'ensemble du système doit être vidé au moyen du programme afin d'éviter d'y avoir une circulation alors que celui-ci est ouvert et, également, afin d'éviter d'avoir une aspiration d'air. Après le changement de l'éluant, le système a besoin de retrouver un état stable. De ce fait, les trois premières analyses qui suivent ce changement fournissent de mauvais résultats. Ce problème va, dans certains cas plus rares, affecter les résultats jusqu'à la cinquième analyse après changement.

En ce qui concerne les échantillons, le système va permettre de faire la distinction entre un emplacement occupé par ces derniers et un emplacement vide permettant d'empêcher de lancer l'analyse d'un emplacement vide. Cependant, le système ne va pas prévenir quand un des récipients a été vidé. De ce fait, si une détermination est lancée avec un récipient vide, le système va lancer l'analyse. Les résultats obtenus ne seront donc pas ceux de l'échantillon espéré. Le nombre d'analyses possible par échantillon se situe donc autour de dix, ce qui demandera de vérifier la quantité restante de solution dans le récipient après plusieurs répétitions afin de vérifier que les résultats obtenus correspondent à l'analyse demandée.

Enfin, lors d'une détermination, si de l'air se trouve dans le système, la pompe va détecter une diminution de la pression ce qui peut endommager le système. De ce fait, le programme va prévenir que la pression est sortie des limites et la pompe va arrêter d'aspirer. Cependant, la détermination lancée sur le programme va continuer sans pour autant qu'il n'y ait du flux dans le système. Il faut à ce moment tout arrêter à partir du programme afin de retirer manuellement les quelques bulles présentes au moyen d'une seringue. Ce problème étant assez rare, il n'empêche pas de lancer des déterminations en série sans devoir vérifier continuellement la machine. Il est quand même nécessaire de vérifier régulièrement que ce problème n'est pas apparu.



# Conclusion

L'adultération en sucres dans le domaine du miel est une fraude qui ne cesse de frapper le monde alimentaire trompant le consommateur sur le produit qu'il achète. Pour contrer cela, il est nécessaire de développer de nouvelles méthodes peu chères et accessibles financièrement aux apiculteurs et aux consommateurs permettant de détecter ces falsifications.

L'objectif de ce travail a donc été de déterminer s'il est possible de développer une nouvelle méthodologie se basant sur la technique HPAEC-PAD à partir d'un chromatographe fabriqué par la société Metrohm qui permet de détecter des fraudes en sucres dans le miel.

La faisabilité de la méthodologie a été évaluée en passant par plusieurs étapes. La première a été d'identifier les temps d'élution des différents sucres afin d'établir quels pics leur correspondaient ainsi que d'évaluer la possibilité d'étudier d'autres sucres à partir du système de chromatographie **Metrohm 930 Compact IC Flex**. Il en est ressorti que les sucres analysables par la technique HPAEC-PAD au moyen d'un chromatographe fabriqué par la société Metrohm sont le tréhalose, le glucose, le fructose, le  $\beta$ -gentiobiose, le turanose, le sucrose, l'isomaltotriose, le raffinose, le mélézitose, le maltose, l'erlose, le maltotriose et le panose. Cependant, il a également été vu que d'autres sucres présents dans le miel peuvent être éludés en même temps que l'un de ces glucides, ce qui peut expliquer une erreur lors de l'analyse d'un miel puisque le programme ne permet pas de faire la distinction entre deux analytes de même temps d'élution.

La deuxième étape a eu pour but de vérifier l'exactitude des résultats sur base des méthodes de mesure des concentrations du logiciel **MagIC Net 4.1** à partir des réponses fournies par le détecteur ampérométrique. Il en ressort que les résultats obtenus ne sont pas assez précis puisque les valeurs des concentrations mesurées par le programme ne sont pas en accord avec les valeurs théoriques obtenues par chromatographie gazeuse ou par un ensemble de laboratoires via diverses méthodes. En effet, les erreurs relatives entre ces valeurs dépassent les 50 % pour la majorité des sucres.

La dernière étape de cette première partie a été de déterminer si les résultats fournis

par le chromatographe et son détecteur ampérométrique ainsi que ceux fournis par le logiciel sont répétables. Cela a été réalisé en effectuant des analyses répétées d'échantillons d'une solution de sucres et d'une solution de miel. Il en résulte que les graphes des mesures du courant au niveau du détecteur ampérométrique sont superposables pour des analyses du même échantillon, ce qui légitime la répétabilité de la détection. En ce qui concerne les résultats, il peut parfois arriver qu'un problème d'intégration fournisse des résultats légèrement différents. Cette différence est notamment expliquée par une erreur d'intégration du programme. Cependant, dans la majeure partie des sucres évalués par le programme, les mesures obtenues sont sensiblement identiques. De ce fait, les mesures par le logiciel **MagIC Net 4.1** peuvent également être considérées comme répétables.

La deuxième partie a consisté en la détermination de l'influence de la concentration en NaOH dans les éluants sur la vitesse d'élution et sur la qualité des résultats. Cette détermination a été effectuée en augmentant la concentration en NaOH dans l'un des deux éluants, puis en observant l'impact de cette variation sur les résultats. Il s'avère qu'utiliser un second éluant plus concentré en NaOH ne permet pas de faire éluder les glucides plus rapidement puisque la force d'élution des ions hydroxydes n'est pas suffisante pour impacter les oligosaccharides qui sont éludés après l'application de cet éluant. En ce qui concerne le premier éluant, augmenter sa concentration permet une élution plus rapide grâce au rôle des ions hydroxydes. Cependant, cette augmentation de la vitesse d'élution se répercute sur les résultats qui deviennent moins précis avec une différence relative entre ceux-ci et ceux obtenus par la méthode de référence de l'ordre de 5 à 20% pour la plupart des sucres. De ce fait, l'utilisation des éluants de 200 mM de NaOH et 0.1 M de NaOAc, et de 500 mM de NaOH et 0.1 M de NaOAc est préconisée.

La troisième partie a permis d'évaluer par quelques essais si cette méthodologie possède la capacité de détecter des adultérations en sucres dans le miel. Après analyse d'un miel avec différents pourcentages d'adultération, les résultats obtenus ont confirmé la présence de sucres exogènes. En effet, la plupart des erreurs relatives entre les concentrations mesurées des solutions adultérées et les concentrations théoriques de ces adultérations sont inférieures à 10 %. Les rares erreurs relatives plus élevées sont observées pour des sucres présents à très faibles concentrations. De ce fait, il est légitime de considérer la technique HPAEC-PAD à partir d'un chromatographe fabriqué par la société Metrohm comme apte à détecter des adultérations en sucres dans des miel.

Pour terminer, la dernière partie a été consacrée à évaluer les limites de la technologie. En ce qui concerne les limites de l'analyse, il a été identifié cer-

tains problèmes liés à l'intégration des pics. Ces problèmes surviennent lorsque le programme identifie à tort un pic qui n'existe pas, ce qui altère la précision de l'intégration d'un pic réel qui lui est adjacent. Une autre limitation de ce type est la difficulté d'analyse d'un composé présent en faible concentration en raison de la trop faible différence entre son pic et un segment de droite horizontal.

Une autre limitation est due au système de pompage lors du renouvellement d'un éluant puisque le système doit être vidé pour exécuter ce changement. Lorsque le changement de solution a été effectué, les trois premières analyses réalisées vont présenter des résultats faussés dus à la remise en route du système entier par ce système de pompage.

Cependant, malgré ces quelques limitations, l'analyse par la technique HPAEC-PAD reste réalisable et efficace la majeure partie du temps.

En conclusion, au vu des résultats obtenus, la technique HPAEC-PAD au moyen du système de chromatographie **Metrohm 930 Compact IC Flex** de la société Metrohm n'est pas encore en capacité d'analyser et de caractériser correctement les miels dans l'objectif de déterminer si ces derniers ont subi des adultérations de leurs sucres. La maîtrise et la précision des analyses doivent en effet encore être améliorées.

Ce système de mesure n'est cependant pas à écarter totalement de la lutte contre la fraude dans le miel comme il a été vu que le reste des caractéristiques présente des réponses favorables à son utilisation.

Il pourrait donc être intéressant de poursuivre le développement de cette technique afin de permettre son utilisation dans le domaine du contrôle des miels. Ce développement peut se faire en se penchant notamment sur l'amélioration des résultats fournis par la méthodologie présentée, mais également en cherchant à déterminer la reproductibilité du système, ou à encore optimiser les temps d'analyse en utilisant par exemple une autre concentration d'acétate de sodium de manière à éluder plus rapidement les oligosaccharides tel que le maltotriose et le panose.

# Bibliography

- [1] T. Ždiniaková, C. Loerchner, O. De Rudder, T. Dimitrova, G. Kaklamanos, A. Breidbach, M.A. Respaldiza Hidalgo, I.M. Vaz Silva, V. Paiano, F. Ulberth, and A. Maquet. Eu coordinated action to deter certain fraudulent practices in the honey sector. (KJ-NA-31-461-EN-N (online)), 2023.
- [2] conseil de l’Union européenne. Directive 2001/110/ce du conseil du 20 décembre 2001 relative au miel. 1 2002.
- [3] K. Hostettler, R. Brogioli, S. Arpagaus, B. Müller-Werner, and D. Jensen. Sugars in honey using hpaec-pad: What is the best column? 2016.
- [4] C.V.K. Sreeranjit and J.J. Lal. Glucose | properties and analysis. In Benjamin Caballero, editor, *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)*, pages 2898–2903. Academic Press, Oxford, second edition edition, 2003.
- [5] R.F. Tester and J. Karkalas. Carbohydrates | classification and properties. In Benjamin Caballero, editor, *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)*, pages 862–875. Academic Press, Oxford, second edition edition, 2003.
- [6] A.M. Shendurse and C.D. Khedkar. Glucose: Properties and analysis. In Benjamin Caballero, Paul M. Finglas, and Fidel Toldrá, editors, *Encyclopedia of Food and Health*, pages 239–247. Academic Press, Oxford, 2016.
- [7] X. Qi and R.F. Tester. Fructose, galactose and glucose – in health and disease. *Clinical Nutrition ESPEN*, 33:18–28, 2019.
- [8] T. Barclay, M. Ginic-Markovic, P. Cooper, and N. Petrovsky. The chemistry and sources of fructose and their effect on its utility and health implications. *Journal of Excipients and Food Chemicals*, 3, 06 2012.
- [9] P. Missio da Silva, C. Gauche, L. Valderimo Gonzaga, A. Carolina Oliveira Costa, and R. Fett. Honey: Chemical composition, stability and authenticity. 2016.

- [10] T. M. Wrodnigg, and B. Eder. *The Amadori and Heyns Rearrangements: Landmarks in the History of Carbohydrate Chemistry or Unrecognized Synthetic Opportunities?*, pages 115–152. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2001.
- [11] M. Y. Achouri, M. A. Selka, A. Chenafa, S. Brahim, M. A. Messafeur, and H. Toumi. Teneur en 5-hydroxyméthylfurfural (hmf) dans les miels du nord-ouest de l’algérie. *Toxicologie Analytique et Clinique*, 31(2):100–105, 2019.
- [12] K. Lazarevic, M. Jovetic, and Z. Tesic. Physicochemical parameters as a tool for the assessment of origin of honey. *Journal of AOAC International*, 100, 05 2017.
- [13] Development of a robust method for the quantitative determination of disaccharides in honey by gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1135(2):212–218, 2006.
- [14] G. Avigad. 4 - disaccharides. In P.M. DEY, editor, *Carbohydrates*, volume 2 of *Methods in Plant Biochemistry*, pages 111–188. Academic Press, 1990.
- [15] M. Wahiba. Etude comparative entre quelques miels locaux et les autres importes. Master’s thesis, Université Saad Dahleb - Blida, 2017.
- [16] M.C. Zamora and J. Chirife. Determination of water activity change due to crystallization in honeys from argentina. *Food Control*, 17(1):59–64, 2006.
- [17] M.L. Al, D. Daniel, A. Moise, O. Bobis, L. Laslo, and S. Bogdanov. Physicochemical and bioactive properties of different floral origin honeys from romania. *Food Chemistry*, 112(4):863–867, 2009.
- [18] T. Tabouret. Rôle de l’activité de l’eau dans la cristallisation du miel. *Apidologie*, 10(4):341–358, 1979.
- [19] I. Manikis and A. Thrasyvoulou. The relation of physicochemical characteristics of honey and the crystallization sensitive parameters. *Apiacta*, 36:106–112, 01 2001.
- [20] L. Persano Oddo, M. G. Piazza, A. G. Sabatini, and M. Accorti. Characterization of unifloral honeys. *Apidologie*, 26(6):453–465, 1995.
- [21] J. M. K. Sniderman, Kia A. Matley, S.G. Haberle, and D.J. Cantrill. Pollen analysis of australian honey. *PLOS ONE*, 13(5):1–24, 05 2018.

- [22] A. Thrasyvoulou, C. Tananaki, G. Goras, E. Karazafiris, M. Dimou, V. Liolios, D. Kanelis, and S. Gounari. Legislation of honey criteria and standards. *Journal of Apicultural Research*, 57(1):88–96, 2018.
- [23] S. Carabetta, R. Di Sanzo, L. Campone, S. Fuda, L. Rastrelli, and M. Russo. High-performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection (hpaec–pad) and chemometrics for geographical and floral authentication of honeys from southern italy (calabria region). *Foods*, 9(11), 2020.
- [24] E. C. Martin. Some aspects of hygroscopic properties and fermentation of honey. *Bee World*, 39(7):165–178, 1958.
- [25] J. W. White. Honey. volume 24 of *Advances in Food Research*, pages 287–374. Academic Press, 1978.
- [26] United States. Science and Education Administration. Beekeeping in the united states. 10 1986.
- [27] J.A. Snowdon and D.O. Cliver. Microorganisms in honey. *International Journal of Food Microbiology*, 31(1):1–26, 1996.
- [28] J. Majtan, M. Bucekova, I. Kafantaris, P. Szweda, K. Hammer, and D. Mossialos. Honey antibacterial activity: A neglected aspect of honey quality assurance as functional food. *Trends in Food Science Technology*, 118:870–886, 2021.
- [29] S. Ayoub Meo, S. Ahmad Al-Asiri, A. Latief Mahesar, and M. Javed Ansari. Role of honey in modern medicine. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 24(5):975–978, 2017. Current Research in Apiculture.
- [30] M.I. Khalil, S.A. Sulaiman, and L. Boukraa. Antioxidant properties of honey and its role in preventing health disorder. *The Open Nutraceuticals Journal*, 3(1), 2010.
- [31] E. Bruneau. Nourrissement et adultération des miels. *Abeilles et Cie*, (161), 2014.
- [32] C. Cordella, J. Militão, and D. Cabrol-Bass. AdultÉration des miels par des sirops de sucres industriels : Etude par analyse discrimiannte et modélisation au moyen de la simpls. 01 2003.
- [33] Conseil de l’Union Européenne. Directive 2001/110/ce du conseil du 20 décembre 2001 relative au miel. 12 2001.

- [34] F. Ulberth. 26 - advances in testing for adulteration in honey. In Gerard Downey, editor, *Advances in Food Authenticity Testing*, Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, pages 729–753. Woodhead Publishing, 2016.
- [35] H. Hasar, U. C. Hasar, Y. Kaya, H. Ozturk, M. Izginli, I. Y. Ozbek, T. Oztas, MI Yildirim Canbolat, and M. Ertugrul. Prediction of water-adulteration within honey by air-line de-embedding waveguide measurements. *Measurement*, 179:109469, 2021.
- [36] K.W. Se, R.A. Wahab, S.N. Syed Yaacob, and S.K. Ghoshal. Detection techniques for adulterants in honey: Challenges and recent trends. *Journal of Food Composition and Analysis*, 80:16–32, 2019.
- [37] Conseil de l’Union Européenne. Scientific support to the implementation of a coordinated control plan with a view to establishing the prevalence of fraudulent practices in the marketing of honey results of honey authenticity testing by liquid chromatography-isotope ratio mass spectrometry. 12 2016.
- [38] E. Brochmann-Hanssen. Gas chromatography and its application to pharmaceutical analysis. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 51(11):1017–1031, 1962.
- [39] W. Q. Al-Bukhaiti, A. Noman, A. S. Qasim, and A. Al-Farga. Gas chromatography: Principles, advantages and applications in food analysis. *International Journal of Agriculture Innovations and Research*, 6(1):2319–1473, 2017.
- [40] R.A. Shellie. Gas chromatography. In J. A. Siegel, P. J. Saukko, and M. M. Houck, editors, *Encyclopedia of Forensic Sciences (Second Edition)*, pages 579–585. Academic Press, Waltham, second edition edition, 2013.
- [41] H. Hashim. chromatography and hplc principles. 01 2018.
- [42] M. A. Kamal and P. Klein. Determination of sugars in honey by liquid chromatography. *Saudi journal of biological sciences*, 18(1):17–21, 2011.
- [43] W. Yuluan, L. Donghui, D. Hao, W. Juan, L. Haiying, X. Yanping, G. Xindong, Q. Fangfang, H. Wanqing, W. Li, and W. Bin. Geographical origin of cereal grains based on element analyser-stable isotope ratio mass spectrometry (ea-sirms). *Food Chemistry*, 174:553–557, 2015.
- [44] A. Simsek, M. Bilsel, and A.C. Goren.  $^{13}C/^{12}C$  pattern of honey from turkey and determination of adulteration in commercially available honey samples using ea-irms. *Food Chemistry*, 130(4):1115–1121, 2012.

- [45] M. Tosun. Detection of adulteration in honey samples added various sugar syrups with  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  isotope ratio analysis method. *Food Chemistry*, 138(2):1629–1632, 2013.
- [46] H. Craig. Isotopic standards for carbon and oxygen and correction factors for mass-spectrometric analysis of carbon dioxide. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 12(1):133–149, 1957.
- [47] D.S. Brar, K. Pant, R. Krishnan, S. Kaur, P. Rasane, V. Nanda, S. Saxena, and S. Gautam. A comprehensive review on unethical honey: Validation by emerging techniques. *Food Control*, 145:109482, 2023.
- [48] J. Zhang, H. Chen, C. Fan, S. Gao, Z. Zhang, and L. Bo. Classification of the botanical and geographical origins of chinese honey based on  $^1\text{H}$  nmr profile with chemometrics. *Food Research International*, 137:109714, 2020.
- [49] A.W. Syed, Guo Boli, X. Zhang, H. Imtiaz, and Y. Wei. Recent development in the application of analytical techniques for the traceability and authenticity of food of plant origin. *Microchemical Journal*, 152:104295, 2020.
- [50] G. Zhang and W. Abdulla. On honey authentication and adulterant detection techniques. *Food Control*, 138:108992, 2022.
- [51] Y. Chin-Hong, M. Syahidah Akmal, A. Fatimatuzzahra' Abd, N. Fatin Ilyani, M. Mohd Zulkiffi, I. Baharudin, S.D. Kelly, A. Cannavan, and E. Seow. Detecting adulteration of stingless bee honey using untargeted  $^1\text{H}$  nmr metabolomics with chemometrics. *Food Chemistry*, 368:130808, 2022.
- [52] K. Rachineni, V. M. Rao Kakita, N.P. Awasthi, V.S. Shirke, R.V. Hosur, and S. Chandra Shukla. Identifying type of sugar adulterants in honey: Combined application of nmr spectroscopy and supervised machine learning classification. *Current Research in Food Science*, 5:272–277, 2022.
- [53] C. Corradini, A. Cavazza, and C. Bignardi. High-performance anion-exchange chromatography coupled with pulsed electrochemical detection as a powerful tool to evaluate carbohydrates of food interest: Principles and applications. 2012, 2018.
- [54] Y. Zhang and Y.C. Lee. Chapter 6 high-performance anion-exchange chromatography of carbohydrates on pellicular resin columns. In Ziad El Rassi, editor, *Carbohydrate Analysis by Modern Chromatography and Electrophoresis*, volume 66 of *Journal of Chromatography Library*, pages 207–250. Elsevier, 2002.



- [55] M. R. Hardy and J. S. Rohrer. 1.11 - high-ph anion-exchange chromatography (hpaec) and pulsed amperometric detection (pad) for carbohydrate analysis. In Joseph J. Barchi, editor, *Comprehensive Glycoscience (Second Edition)*, pages 266–289. Elsevier, Oxford, second edition edition, 2021.
- [56] A. Condylis. Chromatographie et échange d'ions. *Rev. Met. Paris*, 61(12):1065–1068, 1964.
- [57] J. S. Rohrer and J. D. Olechno. Secondary isotope effect: the resolution of deuterated glucoses by anion-exchange chromatography. *Analytical Chemistry*, 64(8):914–916, 1992.
- [58] T. J. Paskach, H. P. Lieker, P. J. Reilly, and K. Thielecke. High-performance anion-exchange chromatography of sugars and sugar alcohols on quaternary ammonium resins under alkaline conditions. *Carbohydrate Research*, 215(1):1–14, 1991.
- [59] Y.C Lee. Carbohydrate analyses with high-performance anion-exchange chromatography. *Journal of Chromatography A*, 720(1):137–149, 1996.
- [60] T. Chouana. *Caractérisation structurale et activités biologiques des polysaccharides d'Astragalus gombo bunge*. Theses, Université Clermont Auvergne [2017-2020], November 2017.
- [61] C. B. Y. Cordella, J. S. L. T. Militão, and D. Cabrol-Bass. A simple method for automated pretreatment of usable chromatographic profiles in pattern-recognition procedures: application to HPAEC?PAD chromatograms of honeys. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 377(1):214–219, sep 2003.
- [62] C. B. Y. Cordella, J. S. L. T. Militão, M.C. Clément, and D. Cabrol-Bass. Honey characterization and adulteration detection by pattern recognition applied on HPAEC-PAD profiles. 1. honey floral species characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(11):3234–3242, apr 2003.
- [63] M. Aggrawal and J. Rohrer. Hpaec-pad determination of carbohydrates in honey to evaluate samples for quality and adulteration. 2017.
- [64] E. Mellado-Mojica, N. P. Seeram, and M. G. López. Comparative analysis of maple syrups and natural sweeteners: Carbohydrates composition and classification (differentiation) by HPAEC-PAD and FTIR spectroscopy-chemometrics. *Journal of Food Composition and Analysis*, 52:1–8, sep 2016.
- [65] Chris Pohl. Recent developments in ion-exchange columns for ion chromatography. *LC-GC*, 31:16–22, 04 2013.

**UNIVERSITÉ CATHOLIQUE DE LOUVAIN**  
École polytechnique de Louvain

Rue Archimède, 1 bte L6.11.01, 1348 Louvain-la-Neuve, Belgique | [www.uclouvain.be/epl](http://www.uclouvain.be/epl)