

## **Arrêté n° 80-367/CG du 3 septembre 1980 réglementant la commercialisation du miel en Nouvelle Calédonie**

### Historique :

|             |                                                                                                                                    |                                       |
|-------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|
| Créé par    | Arrêté n°80-367/CG du 3 septembre 1980 réglementant la commercialisation du miel en Nouvelle Calédonie                             | JONC du 8 septembre 1980<br>Page 1042 |
| Modifié par | Arrêté n° 87-105/CE du 26 juin 1987 relatif aux peines applicables aux infractions aux réglementations de l'Exécutif du Territoire | JONC du 7 juillet 1987<br>Page 943    |
| Modifié par | Délibération n°108/CP du 18 octobre 1996 adaptant la réglementation territoriale à la nouvelle rédaction du code pénal             | JONC du 12 novembre 1996<br>Page 4408 |

### **Article 1**

On entend par miel la denrée alimentaire produite par les abeilles mellifiques à partir du nectar des fleurs ou des sécrétions provenant de parties vivantes de plantes ou se trouvant sur elles, qu'elles butinent, transforment, combinent avec des matières spécifiques propres, emmagasinent et laissent mûrir dans les rayons de la ruche. Cette denrée alimentaire peut être fluide, épaisse ou cristallisée.

Il est interdit de détenir en vue de la vente, de mettre en vente, de vendre ou de distribuer à titre gratuit sous la dénomination « miel », complétée ou non par un qualificatif quelconque :

- soit un miel additionné d'un produit autre que le miel
- soit un produit qui ne répondrait pas aux définitions et règles fixées dans l'annexe et aux dispositions qui suivent.

### **Article 2**

Les principales variétés de miel sont les suivantes :

a) En fonction de l'origine

- « Miel de nectar » : le miel obtenu principalement à partir des nectars de fleurs ;
- « Miel de miellat » : le miel obtenu principalement à partir des sécrétions provenant des parties vivantes des plantes ou se trouvant sur elles ; sa couleur va du brun clair au brun verdâtre à une teinte presque noire.

b) En fonction du mode d'obtention

- « Miel de rayons » : le miel emmagasiné par les abeilles dans les alvéoles operculées de rayons fraîchement construits par elles-mêmes, ne contenant pas de couvain, et vendu en rayons, entiers ou non ;
- « Miel avec morceaux de rayons » : le miel qui contient un ou plusieurs morceaux de miel en rayons ;
- « Miel égoutté » : le miel obtenu par égouttage des rayons désoperculés ne contenant pas de couvain ;
- « Miel centrifugé » : le miel obtenu par centrifugation des rayons désoperculés ne contenant pas de couvain ;
- « Miel pressé » : le miel obtenu par pressage des rayons ne contenant pas de couvain sans chauffage ou avec chauffage modéré.

Les dénominations prévues par le présent article sont réservées aux produits qui y sont définis.

### **Article 3**

a) Lors de sa commercialisation, le miel doit répondre aux caractéristiques de composition énumérées en annexe.

b) En outre le miel doit être exempt de matières organiques et inorganiques étrangères à sa composition, par exemple : moisissures, insectes, débris d'insectes, couvain ou grains de sable lorsqu'il est commercialisé comme tel ou lorsqu'il est utilisé dans un produit quelconque destiné à la consommation humaine.

c) Le miel ne peut en aucun cas contenir des substances quelconques en quantité telle qu'elles puissent présenter un danger pour la santé humaine.

d) Le miel ne doit pas :

- présenter de goût ou d'odeur étranges ;
- avoir commencé à fermenter ou être effervescent ;
- avoir été chauffé de manière que les enzymes naturels soient détruits ou considérablement inactivés ;
- présenter une acidité modifiée artificiellement.

Par dérogation à ces dispositions, peut être commercialisé sous la dénomination « Miel d'industrie », un miel qui, tout en étant propre à la consommation humaine :

- ne correspond pas aux exigences relatives au goût, à l'odeur ou au chauffage ;
- présente un indice diastasique ou une teneur en hydroxyméthylfurfural qui ne réponde pas aux caractéristiques fixées en annexe.

### **Article 4**

a) Les mentions obligatoires à porter sur les emballages, récipients ou étiquettes du miel, mentions qui doivent être bien visibles et clairement lisibles et indélébiles, sont les suivantes :

- la dénomination « Miel » ou l'une des dénominations énumérées au 2 ci-dessus ; le cas échéant, la dénomination « Miel de pâtisserie » ou « Miel d'industrie ». Ces inscriptions doivent figurer en langue française ;

- le poids net exprimé en grammes ou en kilogrammes; toutefois est dispensé de porter l'indication du poids net, le miel dont le poids net est inférieur à 50 grammes ;

- le nom ou la raison sociale et l'adresse ou le siège social du producteur ou du conditionneur ;

- l'indication du pays d'origine pour les miels d'importation.

b) La dénomination « miel » prévue au 1 ci-dessus ou une des dénominations du 2 ci-dessus, peut être complétée par :

- une indication ayant trait à l'origine florale ou végétale si le produit provient de façon prépondérante de l'origine indiquée, et s'il en possède les caractéristiques organoleptiques physicochimiques et microscopiques ;

- un nom régional, territorial ou topographique, si le produit provient entièrement de l'origine indiquée.

c) Est interdite toute référence à des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales.

*N.B. : le b) est complété par les dispositions du décret du 4 août 1933 portant règlement d'administration publique pour l'application de la loi du 20 avril 1932, en ce qui concerne l'origine des miels importés, art.1 :*

*« Les miels d'origine étrangère, quel que soit le pays de provenance, ne pourront être introduits, mis en circulation ou en vente, en France, que s'ils portent l'indication du pays d'origine (pays où les miels ont été produits) dans les conditions fixées ci-après:*

*Dans le commerce en gros ou en demi-gros, l'indication du pays d'origine devra figurer sur le couvercle et sur l'étiquette principale des récipients dans lesquels les miels étrangers seront offerts à l'acheteur; cette indication sera libellée en caractères latins indélébiles, apparents et bien lisibles, de cinq millimètres de hauteur au minimum.*

*Les emballages extérieurs devront porter la même indication en lettres capitales (caractères latins) indélébiles, apparents et bien lisibles, de deux centimètres de hauteur au minimum. »*

## **Article 5**

*Modifié par arrêté n° 87-105/CE du 26 juin 1987 art 2-5°*

*Modifié par délibération n°108/CP du 18 octobre 1996 art 2-5°*

Sans préjudice de l'application des peines prévues par la législation sur les fraudes et falsifications, les infractions aux dispositions du présent arrêté seront punies des peines fixées à l'article 131-13-5° du code pénal.

## **Article 6**

Le présent arrêté sera applicable trois mois après la date de sa publication.

---

## ANNEXE I – Caractéristiques de la composition des miels

---

1 – Teneur apparente en sucres réducteurs, exprimé en sucre inverti :

- « Miel de nectar » : pas moins de 65 p.100.
- « Miel de miellat », seul ou en mélange avec le miel de nectar : pas moins de 60 p.100.

2 – Teneur en eau : pas plus de 21 p. 100.

3 – Teneur en saccharose :

- en général : pas plus de 5 p. 100.
- « miel de miellat », seul ou en mélange avec le « miel de nectar » : pas plus de 10 p. 100.

4 – Teneur en matières insolubles dans l'eau :

- en général : pas plus de 0,1 p. 100.
- « miel pressé » : pas plus de 0,5 p. 100.

5 – Teneur en matières minérales (cendres) :

- en général : pas plus de 0,6 p.100.
- « miel de miellat », seul ou en mélange avec le « miel de nectar » : pas plus de 1 p. 100.

6 – Teneur en acides libres :

- pas plus de 40 milli équivalents par kilogramme.

7 – Indice diastasique et teneur en hydroxyméthylfurfural (H.M.F.), déterminé après traitement et mélange :

a) Indice diastasique (échelle de Schade) :

- en général : pas moins de 8.
- miels ayant une faible teneur en enzymes (par exemple, miels d'agrumes) et une teneur en H.M.F. non supérieure à 15 mg par kilogramme : pas moins de 3.

b) H.M.F. : pas plus de 40 mg par kilogramme (sous réserve des dispositions visées sous (a), deuxième alinéa).

Les laboratoires chargés de concourir à l'application de la réglementation relative à la répression des fraudes sont tenus d'employer pour l'analyse physique, chimique et pollinique du miel les méthodes décrites en annexe II.

---

## **ANNEXE II – Méthodes officielles d'analyse du miel et des produits alimentaires au miel**

---

### *Examen général et préparation de l'échantillon de miel*

Le miel est le plus souvent vendu au détail dans des emballages de 1 kg, 500 grammes ou 250 grammes qui peuvent être de verre, de matière plastique ou de carton paraffiné ; les autres modes de conditionnement sont rares.

Préalablement à toute analyse on notera :

- 1° Le type de conditionnement ;
- 2° Les caractères organoleptiques du miel : couleur, odeur, saveur ;
- 3° L'aspect physique ;
- 4° La masse brute et la masse de l'emballage.

Procéder ensuite à l'homogénéisation du produit par un brassage énergique dans l'emballage d'origine au moyen d'une spatule pendant au moins une à deux minutes. Si le miel est très dur le ramollir en élevant sa température à 25° C environ sans jamais dépasser 30° C. Si l'analyse doit durer longtemps, il est préférable de conserver l'échantillon homogénéité de miel à + 4° C.

### *Détermination de la teneur en eau par réfractométrie*

#### *1° Objet*

La présente méthode a pour objet de déterminer la teneur en eau du miel, à l'aide du réfractomètre.

#### *2° Définition*

On entend par teneur en eau, le pourcentage pondéral d'eau déterminé selon le protocole ci-après.

#### *3° Principe*

Déterminer l'indice de réfraction du miel parfaitement liquéfié. La table ci-jointe indique la teneur en eau correspondante.

#### *4° Appareillage*

- 4.1. Flacon avec fermeture hermétique ;
- 4.2. Etuve à 50° +2° C ;
- 4.3. Baguette de verre ;
- 4.4. Réfractomètre du type Abbe à thermomètre incorporé.

#### *5° Mode opératoire*

Arrêté n°80-367/CG du 3 septembre 1980

Mise à jour le 16/11/2009

a) Préparation de l'échantillon :

Introduire dans le flacon (4.1) quelques grammes de miel homogénéisé, obturer le flacon et le placer à l'étuve (4.2) pendant un temps suffisant pour assurer la disparition des cristaux de sucre. Homogénéiser par agitation et laisser refroidir.

b) Mesure de l'indice de réfraction et détermination de la teneur en eau :

A l'aide de la baguette de verre (4.3) déposer rapidement une goutte de miel sur le prisme du réfractomètre (4.4), fermer l'appareil, lire l'indice de réfraction, et noter la température du prisme. Si la mesure a été effectuée à une température différente de 20° C, la lecture doit être corrigée pour ramener l'indice de réfraction à 20° C.

La correction est additive, si la mesure est faite au-dessus de 20° C, soustractive dans le cas contraire.

Le terme correctif est de 0,000 23 par degré C.

6° Expression des résultats

En se rapportant à la table suivante, on obtient le pourcentage d'eau correspondant à l'indice de réfraction à 20° C :

| Indice<br>de réfraction à 20° C | Pourcentage<br>réel d'eau | Indice<br>de réfraction à 20° C | Pourcentage<br>réel d'eau |
|---------------------------------|---------------------------|---------------------------------|---------------------------|
| 1,5041 .....                    | 13,0                      | 1,4910 .....                    | 18,2                      |
| 1,5035 .....                    | 13,2                      | 1,4905.....                     | 18,4                      |
| 1,5030 .....                    | 13,4                      | 1,4900.....                     | 18,6                      |
| 1,5025 .....                    | 13,6                      |                                 |                           |
| 1,5020 .....                    | 13,8                      | 1,4895.....                     | 18,8                      |
| 1,5015 .....                    | 14,0                      | 1,4890.....                     | 19,0                      |
| 1,5010 .....                    | 14,2                      | 1,4885.....                     | 19,2                      |
| 1,5005 .....                    | 14,4                      | 1,4880.....                     | 19,4                      |
| 1,5000 .....                    | 14,6                      | 1,4876.....                     | 19,6                      |
|                                 |                           | 1,4871.....                     | 19,8                      |
| 1,4995 .....                    | 14,8                      | 1,4866.....                     | 20,0                      |
| 1,4990 .....                    | 15,0                      | 1,4862.....                     | 20,2                      |
| 1,4985 .....                    | 15,2                      | 1,4858.....                     | 20,4                      |
| 1,4980 .....                    | 15,4                      | 1,4853.....                     | 20,6                      |

|              |      |             |      |
|--------------|------|-------------|------|
| 1,4975 ..... | 15,6 | 1,4849..... | 20,8 |
| 1,4970 ..... | 15,8 | 1,4844..... | 21,0 |
| 1,4965 ..... | 16,0 | 1,4828..... | 21,5 |
| 1,4960 ..... | 16,2 | 1,4815..... | 22,0 |
| 1,4955 ..... | 16,4 | 1,4802..... | 22,5 |
| 1,4950 ..... | 16,6 | 1,4789..... | 23,0 |
| 1,4945 ..... | 16,8 | 1,4777..... | 23,5 |
| 1,4940 ..... | 17,0 | 1,4764..... | 24,0 |
| 1,4935 ..... | 17,2 | 1,4752..... | 24,5 |
| 1,4930 ..... | 17,4 | 1,4739..... | 25,0 |
| 1,4925 ..... | 17,6 | 1,4726..... | 25,5 |
| 1,4920 ..... | 17,8 | 1,4714..... | 26,0 |
| 1,4915 ..... | 18,0 | 1,4702..... | 26,5 |

---

### *Détermination de la teneur en matières insolubles dans l'eau*

#### *1° Objet*

La présente méthode a pour objet de déterminer la teneur en matières insolubles du miel dans l'eau.

#### *2° Définition*

On entend par matières insolubles dans l'eau le pourcentage pondéral des substances isolées suivant le protocole ci-après.

#### *3° Principe*

Une masse connue de miel est diluée dans l'eau en réglant le pH entre 7 et 9 de manière à éviter que les protéines qui sont un constituant normal du miel ne colmatent le filtre. La solution est filtrée sur membrane d'ester de cellulose d'un diamètre de pores de cinq microns.

#### *4° Réactifs*

4.1. Solution aqueuse d'hydroxyde de sodium 0,1 N ;

4.2. Eau distillée ou de pureté équivalente.

#### *5° Appareillage*

5.1. Vase cylindrique de 100 ml ;

5.2. Agitateur magnétique ;

5.3. pH mètre ;

5.4. Pipette de 10 ml ;

5.5. Filtre à membrane d'ester de cellulose, diamètre 25 mm porosité 5 p et support approprié ;

5.6. Fiole à vide ;

5.7. Balance analytique ;

5.8. Etuve à  $45^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{ C}$  ;

5.9. Pinces fines (brucelles) à bouts plats et lisses ;

5.10. Dessiccateur garni d'un déshydratant efficace.

#### *6° Mode opératoire*

Peser, dans un vase cylindrique de 100 ml (5.1) à 0,005 gramme près, une masse de miel M1 voisine de 5 grammes. Ajouter 50 ml d'eau environ (4.2) et dissoudre à froid au moyen de l'agitateur magnétique (5.2) jusqu'à disparition complète des cristaux de sucre. Plonger les électrodes du pH mètre dans la solution et, sans cesser l'agitation, ajouter goutte à goutte à la pipette (5.4) la solution d'hydroxyde de sodium (4.1), jusqu'à l'obtention d'un pH compris entre 7 et 9. Il en résulte une notable clarification du liquide. Peser à 0,0001 gramme près la membrane filtrante (5.5.) préalablement séchée à l'étuve (5.8) pendant une heure : soit M2 la masse de la membrane. A l'aide des pinces (5.9), placer la membrane sur son support connecté au dispositif d'aspiration (5.6). Verser la solution de miel sur la membrane, rincer abondamment le vase (5.1) pour rassembler toutes les matières insolubles sur la membrane d'une part, et assurer l'élimination des matières solubles d'autre part. Retirer la membrane de son support (5.9) à la pince et sécher deux heures à l'étuve (5.8). Laisser refroidir au dessiccateur (5.10) et peser à 0,000 1 gramme près ; Soit M3 la masse de la membrane chargée de l'insoluble.

#### *7° Expression des résultats*

Masse de l'insoluble dans l'eau pour 100 grammes de miel :

$$\frac{M3 - M2}{M1} \times 100$$

#### *Détermination de la teneur en cendres*

##### *1° Objet*

La présente méthode a pour objet de déterminer la teneur en cendres.

##### *2° Définition*

On appelle cendres l'ensemble des produits fixes de l'incinération du miel conduite de façon à obtenir la totalité des cations (ammonium exclu) sous forme de carbonates et d'autres sels minéraux anhydres.

##### *3° Principes*

Le miel est incinéré après addition de nitrate de lanthane qui accélère la combustion des matières organiques.

#### 4° Réactifs

4.1 Solution alcoolique de nitrate de lanthanés à 14,4 grammes par litre d'éthanol à 40 p. 100.

#### 5° Appareillage

5.1. Capsule de platine, ou en matière inaltérable dans les conditions de l'opération ;

5.2. Pipette de 10 ml ;

5.3. Bain d'eau bouillante ;

5.4. Four électrique réglé à 625° + 25° C ;

5.5. Dessiccateur garni d'un déshydratant efficace ;

5.6. Fiole jaugée de 100 ml ;

5.7. Balance analytique.

#### 6° Mode opératoire

Peser une masse MO de miel voisine de 5 grammes à 0,01 gramme près dans une capsule (5.1) tarée à 0,001 gramme près. Ajouter à la pipette (5.2) 10 ml de la solution (4.1). Evaporer à sec au bain d'eau (5.3), carboniser d'abord lentement en évitant les projections, puis porter au four (5.4) jusqu'à obtention de cendres gris clair. La calcination sera poursuivie jusqu'à ce que la différence entre deux pesées consécutives faites à 30 minutes d'intervalle n'excède pas 1 mg. Peser après refroidissement dans un dessiccateur (5.5) ; soit M1. Déterminer dans les conditions identiques la masse M2 du résidu minéral provenant des 10 ml de nitrate de lanthane (4.1).

#### 7° Expression des résultats

Masse des cendres pour 100 grammes de miel :

$$\frac{(M1-M2)}{MO} \times 100$$

Mesure du pH : détermination de l'acidité libre des lactones et de l'acidité totale.

#### 1° Définitions

L'acidité libre est l'acidité titrable par l'hydroxyde de sodium jusqu'au pH mètre du point équivalent, soit P.H.E.

L'acidité des lactones correspond à l'acidité combinée non titrable directement.

L'acidité totale est la somme de l'acidité libre et de l'acidité des lactones.

#### 2° Principe

Le pH est mesuré sur une solution de miel à 10 p.100.

B) L'acidité libre est obtenue en traçant la courbe de neutralisation du miel par une solution d'hydroxyde de sodium et détermination du pH du point équivalent.

Arrêté n°80-367/CG du 3 septembre 1980

Mise à jour le 16/11/2009

L'acidité due aux lactones est obtenue en ajoutant un excès d'hydroxyde de sodium à la solution de miel et en déterminant cet excès par un titrage en retour par l'acide sulfurique.

### 3° Réactifs

- 3.1. Solution d'hydroxyde de sodium à 0,05 N (titrée extemporanément) ;
- 3.2. Solution d'acide sulfurique à 0,05 N ;
- 3.3. Eau distillée ou de pureté équivalente exempte des  $CO_2$  .

### 4° Appareillage

- 4.1. pH mètre ;
- 4.2. Agitateur magnétique ;
- 4.3. Deux microburettes de 10 ml ;
- 4.4. Balance analytique ;
- 4.5. Fiole jaugée de 50 ml ;
- 4.6. Vase cylindrique de 50 ml ;
- 4.7. Pipettes de 25 ml.

### 5° Mode opératoire

Peser au centigramme près 5 grammes environ de miel. Soit M. Dissoudre dans quelques millilitres d'eau distillée (3.3.). Verser dans une fiole jaugée (4.5.) et compléter à 50 ml. Prélever 25 ml avec la pipette (4.7.) et verser dans un vase (4.6.). Noter le pH.

Agiter modérément le liquide avec un agitateur magnétique (4.2.) et doser potentiométriquement avec l'hydroxyde de sodium (3.1.). Noter immédiatement le pH après chaque addition d'hydroxyde de sodium. Les additions d'hydroxyde de sodium seront de 0,2 ml en début de dosage, puis de 0,1 ml dès que les variations de pH deviennent plus importantes.

Lorsque les variations de pH redeviendront minimales (pH compris entre 8,5 et 9), ajouter l'hydroxyde de sodium restant dans la microburette (4.3.) une solution d'acide sulfurique 0,05 N (3.2.) pour opérer un dosage potentiométrique en retour.

Tracer les courbes de neutralisation en portant les pH en ordonnées et les volumes d'hydroxyde de sodium et d'acide sulfurique en abscisses. Déterminer graphiquement le point équivalent E de la courbe de neutralisation du miel (milieu du segment rectiligne de cette courbe). Le dosage de l'acidité libre doit être effectué en quatre minutes maximum.

### 6° Expression des résultats

Soit :

Le volume en millilitre d'hydroxyde de sodium (3.1.) versé pour atteindre le pH du point équivalent E lors de la neutralisation du miel ;

Le volume en millilitre d'acide sulfurique (3.2.) pour atteindre le pH du point équivalent lors du dosage en retour ;

La normalité de l'hydroxyde de sodium.

L'acidité libre est exprimée en milliéquivalents d'hydroxyde de sodium nécessaires pour porter à pH 1 000 grammes de miel.

Acidité libre :

$$\frac{1000 \times V \times N}{M} = \text{Milliéquivalents \%}$$

b) L'acidité due aux lactones est exprimée en milliéquivalents d'hydroxyde de sodium, pour 1 000 grammes de miel :

Acidité combinée :

$$\frac{1000 \times (10 - V) N - 0,05V}{M} = \text{Milliéquivalents \%}.$$

c) L'acidité totale est exprimée en milliéquivalents d'hydroxyde de sodium correspondants à la somme des acides libres et combinées de 1 000 grammes de miel :

Acidité totale = Acidité libre + Acidité combinée.

### *Détermination de la conductivité électrique à 20° C*

#### *1° Objet*

Cette méthode a pour objet de vérifier que la valeur de la conductivité électrique du miel analysé est compatible avec son appellation florale.

#### *2° Définition*

La conductivité électrique d'un miel est la conductibilité mesurée à 20° C d'un volume cubique de 1 cm de côté, d'une solution à 20 p. 100 de matière sèche.

#### *3° Principe*

Mesure de la résistivité d'une solution de miel à 20 p.100 à l'aide d'un résistivimètre et calcul de la conductivité correspondante.

#### *4° Appareillage*

- 4.1. Balance analytique ;
- 4.2. Résistivimètre ;
- 4.3. Cellule de mesure de résistivité ;
- 4.4. Bain thermostatique ;
- 4.5. Firole jaugée de 25 ml ;

4.6. Vase cylindrique de 50 ml.

#### *5° Mode opératoire*

Peser (4.1) une masse de miel telle que :

$$M = \frac{5 \times 100}{M.S.}$$

Où M.S. est la teneur en matière sèche du miel.

Dissoudre le miel dans quelques ml d'eau distillée ou de pureté au moins équivalente fraîchement bouillie, et compléter à 25 ml dans une fiole jaugée (4.5.). Verser cette solution de miel dans un vase de 50 ml (4.6.) qui sera placée dans un bain thermostatique (4.4.). Plonger la cellule de mesure (4.3.) dans une solution de miel, lorsque la température est à  $20^{\circ} \pm 0,5^{\circ} \text{C}$ , faire la lecture.

#### *6° Expression des résultats*

La conductivité du miel est mesurée en Siemens par cm1 : S.cm1.

Conventionnellement la conductivité est donnée en  $10^{-4}$  S. cm1.

*Evaluation de la teneur en hydroxyméthylfurfural (H.M.F.)*

#### *1° Objet*

La présente méthode a pour objet d'évaluer la quantité d'hydroxyméthylfurfural (H.M.F.).

#### *2° Principe*

Mesure à une longueur d'onde déterminée de la coloration rouge due à l'action de l'H.M.F. sur l'acide barbiturique et la paratoluidine.

#### *3° Réactifs*

3.1. Eau distillée fraîchement bouillie ou de pureté équivalente.

3.2. Solution d'acide barbiturique : dans une fiole de 100 ml (4.1.), dissoudre 500 mg d'acide barbiturique dans 70 ml d'eau distillée (3.1.) au bain d'eau (4.2.). Refroidir et compléter avec de l'eau (3.1.) jusqu'au trait de jauge.

3.3. Réactif à la paratoluidine : dans une fiole jaugée de 100 ml (4.1), dissoudre 10 grammes de paratoluidine dans 50 ml d'isopropanol (chauffer légèrement si nécessaire). Ajouter après refroidissement 10 ml d'acide acétique cristallisable. Compléter jusqu'au trait de jauge avec l'isopropanol. Conserver le réactif en flacon brun et au réfrigérateur. Ce réactif doit être renouvelé journallement car il brunit assez rapidement.

#### *4° Appareillage*

4.1. Fioles jaugées de 100 ml ;

4.2. Bain d'eau bouillante ;

4.3. Pipette de précision de 10 ml ;

4.4. Pipette de précision de 1 ml ;

Arrêté n°80-367/CG du 3 septembre 1980

Mise à jour le 16/11/2009

4.5. Balance analytique ;

4.6. Vase cylindrique de 25 ml ;

4.7. Fiole jaugée de 10 ml ;

4.8. Tube à essai ;

4.9. Pipette de 2 ml ;

4.10. Pipette de 5 ml ;

4.11. Spectrophotomètre ou photocomorimètre à 55 nm avec cuves de 10 mm d'épaisseur.

#### *5° Mode opératoire*

Peser à 0,01 gramme près 2 grammes de miel dans un vase (4.6.), les dissoudre dans 4 à 5 ml d'eau (3.1.). Transvaser la solution obtenue dans une fiole jaugée de 10 ml (4.7.). Rincer le vase et compléter la fiole jusqu'au trait de jauge avec de l'eau (3.1.). Verser dans un premier tube à essai 2 ml de solution de miel, 5 ml de réactif à la paratoluidine (3.3.) et 1 ml d'eau (3.1.) (témoin). Verser dans un deuxième tube à essai 2 ml de solution de miel, 5 ml de réactif à la paratoluidine (3.3.) et 1 ml de solution d'acide barbiturique (3.2.) (essai). Agiter les deux tubes à plusieurs reprises ; Faire le zéro de l'appareil sur le témoin, suivre l'extinction à 550 nm et noter le maximum  $D^\circ$  qui généralement, s'obtient entre deux et quatre minutes. La préparation du tube essai ne doit pas dépasser deux minutes.

#### *6° Expression des résultats*

Dans les conditions du mode opératoire, pour la longueur d'onde et l'épaisseur de cuve choisie, la teneur en H.M.F. exprimée en mg pour 1 000 grammes de miel est donnée par la formule :

$$\frac{192 \times \text{extinction}(D^\circ)}{\text{épaisseur de la cuve (en cm)}}$$

Le facteur 192 a été obtenu expérimentalement à partir d'H.M.F. pur.

### *Détermination de l'activité de l'amylase*

#### *1° Objet*

La présente méthode a pour objet de vérifier l'activité de l'amylase.

#### *2° Définition*

On appelle activité de l'amylase du miel, le nombre de ml d'une dilution aqueuse à 1p.100 (masse/volume) d'amidon standard hydrolysé en une heure par 1 gramme de miel.

#### *3° Principe*

Une solution de miel à pH déterminé est mélangée à une solution d'amidon. Pour suivre l'hydrolyse, on prélève de petites quantités du mélange qu'on verse dans une solution d'iode. On note le temps requis pour atteindre un point final, défini arbitrairement, et mesuré à 650nm.

#### *4° Réactifs*

4.1. Solution mère d'iode ; Dans une fiole jaugée de 1 000ml, dissoudre 8,8 grammes d'iode dans 50 ml d'eau distillée ou de pureté équivalente, contenant 22 grammes d'iodure de potassium. Après dissolution, ajuster à 1 000 ml avec de l'eau distillée. Conserver à l'abri de la lumière.

4.2. Solution d'iode 0,000 7 N. Dans une fiole jaugée de 500 ml introduire 20 grammes d'iodure de potassium et quelques dizaines de ml d'eau distillée, agiter jusqu'à dissolution complète ; Ajouter exactement 5 ml de solution mère d'iode (4.1.), et compléter au trait de jauge. Cette solution doit être renouvelée fréquemment.

4.3. Solution tampon à pH 5,3. Préparer une solution de phosphate disodique (0,2 m) et une solution 0,1 N d'acide acétique.

La solution tampon se réalise en mélangeant 11 ml de la première à 9 ml de la seconde. On vérifie le pH qui est rajusté si nécessaire à la valeur exacte de 5.3. Cette solution doit être renouvelée fréquemment.

4.4. Solution de chlorure de sodium à 0,5 M.

4.5. Solution d'amidon à 2p. 100. D'une part, peser 2 grammes d'amidon (préparé par avance voir note jointe) dans une coupelle et les mettre en suspension dans 20 ml d'eau distillée, ou de pureté équivalente. (Bien suivre ce mode de préparation afin d'éviter de trop grandes variations des témoins).

4.6. Eau distillée ou de pureté équivalente, bouillie et refroidie.

#### *5° Appareillage*

5.1. Spectrophotomètre, ou photocolorimètre réglé à 66 nm cuve carrée de 10 mm de côté ;

5.2. Bain thermostatique  $40^{\circ} \pm 0,2^{\circ} \text{C}$  ;

5.3. Eprouvette de 25 ml ;

5.4. Vase cylindrique de 50 ml ;

5.5. Fiole jaugée de 25 ml ;

5.6. Tubes à essai ;

5.7. Pipette graduée de 1 ml ;

5.8. Balance analytique.

#### *6° Mode opératoire*

a) Témoin sans amylase

Dans un vase cylindrique (5.4.), verser 5 ml de solution d'amidon (4.5.) et 10 ml d'eau distillée (4.6.) mélanger. Prélever 0,5 ml de cette dilution et les verser dans une éprouvette de 25 ml (5.3.) contenant déjà 5 ml de solution d'iode (4.2.). Mélanger et compléter à 18 ml avec de l'eau distillée (4.6.). faire la lecture au spectrophotomètre à 600nm.

L'absorbance doit être de 0,760 ( $\pm 0,02$ ). Si le nombre trouvé est différent, refaire le témoin en augmentant ou en diminuant le volume final du mélange, en fonction de l'absorbance. Le témoin en augmentant ou en diminuant le volume final du mélange, en fonction de l'absorbance. Le témoin doit être vérifié chaque fois que l'on change de solution d'iode ou de solution d'amidon.

b) Dosage :

Dans un vase cylindrique de 50ml (5.4.), peser à 0,01 gramme près 5 grammes de miel. Les dissoudre avec 15 ml d'eau distillée (4.6.) ajouter 3 ml de solution tampon (4.3).

Verser le contenu du vase cylindrique dans une fiole jaugée de 25 ml (5.5.) contenant 1,5 ml de la solution de chlorure de sodium (4.4.). Compléter jusqu'au trait de jauge avec de l'eau distillée (4.6.) et mélanger.

Dans un premier tube à essai (5.6.), verser 5 ml de solution d'amidon (4.5.) et dans un deuxième tube à essai 10 ml de solution de miel. Plonger pendant quinze minutes les deux tubes dans un bain d'eau thermostaté à 40 ° C (5.2.). Verser ensuite la solution de miel dans celle d'amidon et mélanger énergiquement. Le mélange est maintenu à 40 ° C. Après cinq minutes mesurées au chronomètre (5.7.), prélever 0,5 ml, les verser dans une éprouvette graduée de 25 ml (5.3.) contenant 5 ml de solution d'iode (4.2.). Les cinq minutes doivent être écoulées quand le mélange entre en contact avec l'iode. Ramener la dilution aux environs de 18 ml conformément à l'essai témoin (a). Mélanger et faire une lecture au spectrophomètre (5.1.). On admet arbitrairement que l'amidon est entièrement dégradé quand on atteint l'absorbance de 0,235 à la longueur d'onde de 660 nm.

Le tableau suivant permet de prévoir approximativement le temps nécessaire pour atteindre le point final, en fonction de l'absorbance mesurée sur la prise d'essai cinq minutes après le mélange de la solution de miel avec la dilution d'amidon.

| ABSORBANCE (D°)    | TEMPS APPROXIMATIF                               |
|--------------------|--------------------------------------------------|
| après cinq minutes | (en minutes)                                     |
| d'hydrolyse        | requis pour atteindre le point final de réaction |
| 0,7                | 30 ou plus                                       |
| 0,65               | 25-30                                            |
| 0,60               | 16-20                                            |
| 0,55               | 13-15                                            |
| 0,50               | 11-12                                            |
| 0,45               | 9-10                                             |
| 0,40               | 8-9                                              |

Quelques minutes avant d'atteindre le temps final probable, il convient d'effectuer sur le mélange miel – amidon des prélèvements aussi rapprochés que possible, de manière à encadrer l'absorbance 0,235 par deux valeurs correspondant à des prélèvements entre lesquels il se soit écoulé moins d'une minute. On calcule alors simplement par interpolation le temps T qui aurait été nécessaire pour atteindre exactement l'absorbance 0,235.

#### 7° Expression des résultats

T étant le temps en minutes nécessaire pour atteindre l'absorbance 0,235 l'activité de l'amylase se calcule ainsi :

$$\text{Activité de l'amylase} = \frac{300\text{ml}}{T}$$

**Remarques :**

Quantité de miel par prise d'essai :

$$\frac{5\text{ ml} \times 10 \times 0,5}{25 \times 15} = \frac{1}{15} = \text{g.}$$

Volume de solution d'amidon à 1 p.100 par prise d'essai :

$$\frac{5\text{ ml} \times 0,5 \times 2}{15} = \frac{1}{3} = \text{ml}$$

Il est recommandé d'observer la plus grande propreté pour le matériel utilisé ainsi que pour la manipulation.

**NOTE :**

Préparation de l'amidon pour la détermination de l'activité de l'amylase dans les miels.

*1° Objet*

En raison des variations importantes obtenues dans la coloration des mélanges iode-amidon, selon la provenance de l'amidon utilisé, il est apparu indispensable d'imposer le mode de préparation de ce réactif.

*2° Réactifs*

- 2.1. Fécule de pomme de terre du commerce ;
- 2.2. Ethanol à 95 % ;
- 2.3. Solution aqueuse d'acide chlorhydrique 2 N ;
- 2.4. Eau distillée ou de pureté équivalente.

*3° Appareillage*

- 3.1. Ballon de 500 ml muni d'un réfrigérant ;
- 3.2. Bain d'eau bouillant ;
- 3.3. Entonnoir de Büchner et fiole à vide ;
- 3.4. Etuve thermostatée et ventilation.

*4° Mode opératoire*

Dans un ballon de 500 ml (3.1.) faire bouillir au bain d'eau (3.2.) pendant une heure à reflux 20 grammes de fécule de pomme de terre (2.1.) mélangée à 100 ml d'éthanol à 95p. 100 (2.2.) et à 7 ml d'HCl 2 N (2.3.). Refroidir, filtrer sur un Büchner muni d'un papier filtre en s'aidant d'une légère dépression (3.3.) rincer l'amidon sur le filtre à l'eau distillée froide (2.4.) à 5 reprises et avec chaque fois 50 ml d'eau distillée (2.4.). sécher l'amidon réparti en couche mince à l'étuve à  $100 \pm 2^\circ \text{C}$  (3.4.) pendant une heure.

## Analyse des sucres

### **I Dosage chimique des sucres réducteurs avant et après inversion : calcul de la teneur en sucres hydrolysables exprimée en saccharose apparent.**

#### *1° Objet*

La présente méthode a pour objet de déterminer les teneurs en sucres réducteurs avant et après inversion.

#### *2° Définition*

Les sucres réducteurs sont ceux qui présentent une fonction aldéhydrique ou cétonique libre.

#### *3° Principe*

Après défécation on dose par la méthode de Luff Schoorl les sucres directement réducteurs et ceux obtenus après hydrolyse. On exprime les résultats en sucre inverti.

#### *4° Réactifs*

##### 4.1. Défécant :

4.1.1. Eau distillée ou de pureté équivalente ;

4.1.2. Solution Carrez I (diluée) :

Dissoudre dans de l'eau distillée 36 grammes de potassium hexacyanoferrate (II)  $K_4(CN)_6$ , 3 H<sub>2</sub>O. compléter à 1000 ml avec de l'eau distillée.

##### 4.2. Pour l'inversion :

4.2.1. Acide chlorydrique concentré,

4.2.1. Hydroxyde de sodium 1 N ;

4.2.3. Solution aqueuse de méthylorange à 0,1 p.100.

##### 4.3. Réactif selon Luff- Schoorl :

4.3.1. Acide citrique monohydraté : 50 grammes ;

Eau distillée : 50 ml ;

4.3.1. Carbonate de sodiul anhydre : 143,8 grammes ;

Eau distillée chaude : 300 ml environ ;

4.3.3. Sulfate de cuivre  $CuSO_4, 5 H_2O$  : 25 grammes ;

Eau distillée : 100ml.

Mettre dans une fiole jaugée de 1 litre la solution de carbonate de sodium (4.3.2.) et verser prudemment la solution d'acide citrique (4.3.1.) tout en agitant. Ajouter ensuite la solution de sulfate de cuivre (4.3.3.). Après refroidissement, compléter à 1 litre avec de l'eau distillée. Après 24h, filtrer. Contrôler la normalité du réactif ainsi obtenu ( $CuO$ , 1N,  $Na_2CO_3$ , 2N). Le pH de la solution doit être de 9,4 environ.

*Arrêté n°80-367/CG du 3 septembre 1980*

*Mise à jour le 16/11/2009*

4.4. solution de thiosulfate de sodium 0,1 N ;

4.5. Solution d'amidon : ajouter un mélange de 5 grammes d'amidon soluble dans 30 ml d'eau à 1 litre d'eau bouillante. Faire bouillir trois minutes, laisser refroidir, ajouter éventuellement 10 mg d'iodure mercurique comme agent conservateur.

4.6. Acide sulfurique 6 N ;

4.7. Iodure de potassium à 30 p.100m/v (conserver à l'abri de la lumière) ;

4.8. Grains de pierre ponce traitées à HCl, lavés à l'eau et séchés.

#### *5° Appareillage*

5.1. Thermomètre à mercure gradué par degrés C (0 à 100° C)

5.2. Fiole conique de 300 ml à rodage s'adaptant à l'appareil (5.3.)

5.3. Réfrigérant ascendant

5.4. Bain d'eau à température réglable (entre 40° C et 80° C)

5.5. Fioles jaugées de 100 ml, 200 ml, 250 ml

5.6. Pipettes jaugées de 1 ml, 10 ml, 25 ml

5.7. Burette de 25 ml graduée en 0,1 ml

5.8. Entonnoir muni d'un filtre approprié

5.9. Balance analytique.

#### *6° Mode opératoire*

6.10. Mise en solution des sucres et défécation :

Peser, à 2 mg près environ 10 grammes de miel, les dissoudre dans 100 ml d'eau distillée introduire cette solution dans une fiole jaugée de 250 ml (5.6.). Ajouter à la pipette (5.6.) 25 ml de solution Carrez-I et agiter pendant une minute. Ajouter ensuite 25 ml de solution de Carrez- II et agiter à nouveau pendant une minute. Compléter au trait de jauge, mélanger et filtrer sur filtre plissé sec (5.8.).

6.2. Inversion :

Prélever exactement 10 l de la solution déféquée et les introduire dans une fiole jaugée de 200 ml (5.5.) y ajouter 40 l d'eau distillée, 1 ml d'acide chlorhydrique concentré (4.2.1.) et trois gouttes de méthylorange (4.2.3.). Agiter et plonger la fiole dans un bain d'eau (5.4.) ; chauffer progressivement de telle manière que la température de la solution de miel atteigne 70° en douze minutes. La température est contrôlée pendant toute l'opération à l'aide d'un thermomètre (5.1.). Laisser refroidir jusqu'à 20 °C et neutraliser par l'hydroxyde de sodium (4.2.2.) jusqu'au virage de l'indicateur. Compléter à 200 ml avec de l'eau distillée.

6.3. Dosage

6.3.1. Dosage avant inversion (sucres réducteurs) :

Diluer au vingtième la solution obtenue en (6.1.) et effectuer le dosage sur cette solution diluée. Dans une fiole conique de 300 ml (5.2.) placer 25 ml de réactif de Luff-Schoorl et 25 ml de la solution diluée. Ce volume de liqueur sucrée ne doit pas contenir plus de 60 mg de sucres réducteurs.

Ajouter quelques grains de pierre ponce (4.8.). Adapter à la fiole un réfrigérant ascendant (5.3.). Porter le liquide à ébullition en deux minutes et maintenir cette ébullition pendant dix minutes exactement. Refroidir immédiatement sous courant d'eau froide. Après refroidissement complet, ajouter 10 ml de solution d'iodure de potassium (4.7.), 25 ml d'acide sulfurique 6N (4.6.) (en raison de l'effervescence ajouter l'acide par petites portions mais aussi rapidement que possible) et 2 l de solution d'amidon (4.5.).

Titrer par la solution de thiosulfate de sodium 0,1 N (4.4.). Soit  $n$  le nombre de millilitres utilisés. Par ailleurs, effectuer un dosage témoin dans lequel 25 ml de solution sucrée. Soit  $n_2$  le volume de thiosulfate utilisé.

#### 6.3.2. Dosage après inversion :

Effectuer le même dosage en utilisant 25 ml de la solution obtenue en (6.2.) soit  $n_1$  le volume de thiosulfate utilisé.

### 7° Expression des résultats calculs

La table de Luff-Schoorl indique le nombre de mg de sucres correspondant à  $(n_2 - n)$  et à  $(n_2 - n_1)$  ml de thiosulfate 0,1 N pour 25 ml de solution sucrée.

#### 7.1. Teneur en sucres réducteurs avant inversion.

Soit  $S$  le nombre de mg de sucre interverti correspondant au thiosulfate utilisé  $(n_2 - n)$ .

Sucres réducteurs exprimés en sucre interverti (en grammes p. 100 de miel) :

$$S.I. \text{ grammes p}100 = \frac{S_1 \times 200 \times 250 \times 100}{25 \times 10 \times 10 \times 1000} \text{ soit } 2,0 N$$

#### 7.2. Teneur en sucres réducteurs totaux après inversion :

Soit  $S_1$  le nombre de mg interverti correspondant au thiosulfate utilisé  $(n_2 - n_1)$ .

Sucres réducteurs totaux exprimés en sucre interverti (en grammes p 100 de miel) :

$$S.I.T. \text{ grammes p}100 = \frac{S_1 \times 200 \times 250 \times 100}{25 \times 10 \times 10 \times 1000} \text{ soit } 2,0 S_1$$

#### 7.3. Teneur en sucres hydrolysables exprimée en saccharose apparent (S.A) :

$$S.A. \text{ grammes p}100 = (2,0 S_1 - 2,0 S) \times 0,95$$

**TABLE DE LUFF-SCHOORL**

| Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub><br>0,1 N | GLUCOSE FRUCTOSE<br>C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub><br>sucres intervertis |             | Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub><br>0,1N | GLUCOSE FRUCTOSE<br>C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub><br>sucres intervertis |            |
|--------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|-------------|-------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|------------|
|                                                        | Millilitres                                                                             | Milligramme |                                                       | Millilitres                                                                             | Différence |
|                                                        |                                                                                         | Différence  |                                                       | Milligramme                                                                             | Différence |
| 1                                                      | 2,4                                                                                     | 2,4         | 13                                                    | 33                                                                                      | 2,7        |
| 2                                                      | 4,8                                                                                     | 2,4         | 14                                                    | 35,7                                                                                    | 2,8        |
| 3                                                      | 7,2                                                                                     | 2,5         | 15                                                    | 38,5                                                                                    | 2,8        |
| 4                                                      | 9,7                                                                                     | 2,5         | 16                                                    | 41,3                                                                                    | 2,9        |
| 5                                                      | 12,2                                                                                    | 2,5         | 17                                                    | 44,2                                                                                    | 2,9        |
| 6                                                      | 14,7                                                                                    | 2,5         | 18                                                    | 47,1                                                                                    | 2,9        |
| 7                                                      | 17,2                                                                                    | 2,6         | 19                                                    | 50                                                                                      | 3          |
| 8                                                      | 19,8                                                                                    | 2,6         | 20                                                    | 53                                                                                      | 3          |
| 9                                                      | 22,4                                                                                    | 2,6         | 21                                                    | 56                                                                                      | 3,1        |
| 10                                                     | 25                                                                                      | 2,6         | 22                                                    | 59,1                                                                                    | 3,1        |
| 11                                                     | 27,6                                                                                    | 2,7         | 23                                                    | 62,2                                                                                    |            |
| 12                                                     | 30,3                                                                                    | 2,7         |                                                       |                                                                                         |            |

## II Chromatographie sur couche mince

### 1° Objet

Cette méthode a pour objet d'identifier par chromatographie en couche mince les différents sucres présents.

### 2° Principe

Le principe est celui de la chromatographie sur couche mince.

Les sucres sont identifiés par comparaison avec des sucres témoins.

### 3° Réactifs

3.1. Kieselgur pour C.C.M.

3.2. Gel de silice sans liant pour C.C.M.

Arrêté n°80-367/CG du 3 septembre 1980

Mise à jour le 16/11/2009

3.3. Acétate d'éthyle pur,

3.4. Acide acétique pur cristallisable,

3.5. Réactif de révélation des sucres :

2 ml d'aniline et 2 grammes de dyphénylamine sont dissous chacun dans 50ml d'acétone. Mélanger les deux solutions avec 10 ml d'acide phosphorique à 85 p.100.

3.6. Pyridine

3.7. Solution d'acide borique 0,1N.

3.8. Eau distillée ou de pureté équivalente,

3.9. Solution pyridinique de sucres témoins contenant pour 100 ml :

|                 |       |
|-----------------|-------|
| Fructose.....   | 2,5 g |
| Glucose.....    | 2,5 g |
| Saccharose..... | 0,5 g |
| Maltose.....    | 0,5 g |
| Mélibiose.....  | 0,5 g |
| Raffinose.....  | 0,5 g |
| Mélézitose..... | 0,5 g |

3.10. Solvant de migration (à préparer extemporanément)

|                       |              |
|-----------------------|--------------|
| Acétale d'éthyle..... | 60 ml (3.3.) |
| Acide acétique.....   | 40 ml (3.5.) |
| Eau distillée.....    | 20 ml (3.8.) |

#### *4° Appareillage*

4.1. Dispositif de C.C.M. comprenant : applicateur, chambre de développement, plaque de verre de 20 X 20 cm , pulvérisateur, micropipettes,

4.2. Dessicateur sous vide,

4.3. Etuve thermostatée et ventilée,

4.4. Fioles jaugées de 20 ml.

#### *5° Mode opératoire*

a) Préparation des plaques

Utiliser comme support le mélange d'absorbants à parties égales gel de silice (3.2.) et Kieselgur (3.1.).

Pour préparer quatre plaques de 0,8 mm d'épaisseur, ajouter à 60 grammes du mélange d'absorbants 135 ml de la solution d'acide borique (3.7.) et mélanger énergiquement à l'homogénéisateur. Laisser la pâte reposer jusqu'à ce que sa consistance permette un étalement uniforme. Les plaques enduites sont laissées au repos en position horizontale pendant une heure. Elles sont ensuite activées trente minutes à 100° C dans une étuve thermostatée (4.3.). Après activation, les plaques sont stockées dans un dessiccateur sous vide (4.2.).

#### b) Préparation de la chambre de développement

Verser le solvant (3.10.) dans la chambre de développement dont les faces ont été tapissées avec une feuille de papier filtre préalablement imbibée de solvant (3.10.). Cette précaution est indispensable pour obtenir une sursaturation rapide de l'atmosphère de la cuve éliminant l'effet marginal.

#### C° Préparation de la solution de miel et des plaques à chromatographier.

Peser 4 g de miel à étudier et les dissoudre au moyen de pyridine (3.6.) dans une fiole jaugée de 20 ml (4.4.). Tracer sur le revêtement d'une plaque à l'aide d'un crayon à pointe effilée deux trapèzes. Déposer sur les petites bases de ces trapèzes 10 ml de la solution de miel à analyser sur l'autre. Laisser évaporer la pyridine et placer verticalement la plaque dans la chambre de développement. La plaque doit plonger dans le solvant sur une hauteur d'un centimètre. Lorsque le front du solvant a atteint le sommet de la plaque, retirer celle-ci de la cuve et chasser le solvant en la plaçant dans une étuve ventilée chauffée à 65-70° C (4.3.).

Après refroidissement, nébuliser sur la plaque environ 25 ml de réactif de révélation (3.5.). La plaque est alors portée dans une étuve chauffée à 90-100° C. Au bout de quelques minutes, les spots des différents sucres apparaissent.

#### 6° Lecture des résultats

a) Les Rf obtenus pour une même distance de migration de 17,5 cm sont plus élevés pour la migration en bandes trapézoïdales que pour une migration classique suivant une seule direction. Bonne séparation des polysaccharides. Voici quelques exemples de Rf en migration trapézoïdales et migration classique :

| Sucres     | Migration trapézoïdale | Migration classique |
|------------|------------------------|---------------------|
| Fructose   | 0,67                   | 0,47                |
| Glucose    | 0,68                   | 0,48                |
| Saccharose | 0,60                   | 0,38                |
| Maltose    | 0,57                   | 0,35                |
| Mélibiose  | 0,49                   | 0,28                |
| Mélézitose | 0,46                   | 0,24                |
| Raffinose  | 0,42                   | 0,21                |
| Somaltose  | 0,54                   | 0,31                |

#### b) Colorations obtenues :

Elles dépendent de la quantité de révélateur utilisée de la température et de la durée de la révélation.

Cependant, quelles que soient ces conditions, on obtient toujours des nuances différentes pour la plupart des sucres. A titre indicatif, les colorations qu'il est possible d'observer sont les suivantes :

Raffinose : gris foncé,  
Mélézitose : brun violacé,

|            |   |             |
|------------|---|-------------|
| Maltose    | : | bleu clair, |
| Mélibiose  | : | bleu foncé, |
| Saccharose | : | gris moyen. |

### III Chromatographie sur papier

#### 1° Objet

Cette méthode a pour objet d'identifier par chromatographie sur papier, les différents sucres présents.

#### 2° Principe

Le principe est celui de la chromatographie sur papier. Les sucres sont identifiés par comparaison avec les sucres témoins.

#### 3° Réactifs

##### 1 Solution de référence :

Préparer à raison de 40 mg de sucre par ml d'eau distillée ou de pureté équivalente ; fructose, glucose, saccharose, maltose, mélézitose, raffinose.

##### 2 Eluant :

Butanol N, acide acétique cristallisable, eau (4 :1 :1).

##### 3 Révélateur :

P. anisidinechlorydrate en solution à 1 p.100 dans l'éthanol absolu. La solution est filtrée sur papier.

#### 4° Appareillage

1 Cuve équipée pour la chromatographie descendante (hauteur moyenne 70 cm),

2 Etuve ventilée pour révélation,

3 Micropipette de 10 ml (graduée en 2,5 ml),

4 Papier pour chromatographie Whatman n° 1 ou de qualité équivalente.

#### 5° Mode opératoire

Le miel est dilué à 15 p.100 de matière sèche (déterminée par réfractométrie). Préparer la feuille de papier pour chromatographie de la façon suivante : à quelques centimètres du bord supérieur de la feuille, tracer, à l'aide d'un crayon à pointe effilée, une droite sur toute la largeur de cette feuille. Sur ce trait et en respectant 3 cm environ de marge, marquer un point tous les 5 cm. On obtient ainsi 7 à 8 points.

Déposer sur chacun des points ainsi déterminés 2,5 ml de solution de miel à étudier, et sur un point voisin, 2,5 ml de solution de référence (3.1.). Effectuer la chromatographie descendante avec l'éluant (3.2.) dans une atmosphère saturée par les vapeurs d'acide acétique et butanol ; pour cela laisser en permanence au fond de la cuve une couche de l'éluant (3.2.) de 1 à 2 cm d'épaisseur. La cuve est placée dans un local sombre à la température de 20° C environ. Dans ces conditions les chromatogrammes seront retirés de la cuve après trois jours, puis séchés par ventilation. Pulvériser le révélateur (3.3) sur toute la surface du chromatogramme.

Placer les feuilles dans une étuve à 115° C (4.2.) pendant 10 minutes. Des taches jaunes et brunes correspondant aux différents sucres apparaissent.

#### *6° Lecture des résultats*

Les sucres sont identifiés par comparaison aux témoins. La surface ainsi que l'intensité de la coloration des taches permettent une appréciation quantitative intéressante pour décider des sucres tels que le saccharose ou le maltose dans le miel.

### **IV Chromatographies en phase gazeuse**

#### *1° Objet*

Vérification de la composition en sucre des miels.

#### *2° Définition*

Identification et dosage des sucres du miel par chromatographie en phase gazeuse.

#### *3° Principe*

Séparation par chromatographie en phase gazeuse des triméthylsilyls dérivés des sucres des miels, sur colonne non polaire, et détermination quantitative des différents constituants par la mesure des aires des pics correspondants.

#### *4° Réactifs*

- 4.1. Pyridine anhydre conservée sur hydroxyde de potassium,
- 4.2. Triméthylchlorosilane (à conserver à l'abri de l'humidité),
- 4.3. Hexaméthylsilasane,
- 4.4. Xylose pour étalon interne,
- 4.5. Fructose, glucose, saccharose, maltose, théhalose, raffinose, mélézitose, mélibiose pour sucres de référence,
- 4.6. Solution à 0,2 p.100 de xylose dans la pyridine anhydre (à conserver au froid),
- 4.7. Eau distillée ou de pureté équivalente.

#### *5° Appareillage*

- 5.1. Chromatographe à ionisation de flamme permettant le travail en isotherme et en programmation de température, avec intégrateur,
- 5.2. Colonne en acier inoxydable de 3 mètres de long et 3 mm de diamètre à 4 p.100 d'une phase stationnaire du type méthyl-phényl silocone déposée sur terre de diatomée lavée aux acides et diméthylchlorosilanisée de granulométrie comprise entre 0,145 ml et 0,120 mm (1),
- 5.3. Microseringue de 10μ, graduée en μ ;
- 5.4. Lysophilisateur,

- 5.5. Ampoules à lyophiliser de 15 ml,
- 5.6. Balance analytique,
- 5.7. Firole jaugée de 250 ml,
- 5.8. Pipette de 5 ml,
- 5.9. Pipette de 1 et 2 ml divisés en dixièmes de ml,
- 5.10 Agitateur oscillant.

#### 6° Mode opératoire

Peser au cg près 2,5 grammes de miel, les transvaser quantitativement dans la firole de 250 ml ajuster avec de l'eau (4.7.). Prélever 5 ml de cette solution (50 mg de miel) et chasser l'eau par lyophilisation. Reprendre le miel par 5 ml de solution pyridinique de xylose (4.6.). Agiter quelques secondes pour dissoudre les sucres. Ajouter dans l'ordre :

1ml d'hexaméthylidisilasane (4.3.)

0,5 ml de triméthylchlorosilane (4.2.).

Boucher immédiatement l'ampoule à lyophiliser (5.5) dans laquelle est effectuée la silanisation et agiter avec un agitateur oscillant (5.10) pendant 30 minutes. Laisser reposer douze heures environ, le mélange réactionnel peut être injecté tel quel dans le chromatographe.

Préalablement à l'analyse d'un miel, déterminer, pour chaque sucre à doser, le facteur de correction massique reliant la quantité de produit injecté et l'aire du pic correspondant à l'aire du pic étalon interne (xylose) injecté en quantité connu en même temps que le miel analysé.

Nous avons la relation :

$$F = \frac{A_e}{A_i} \times \frac{M_i}{M_e}$$

où

F facteur de correction massique :

Ae Aire du pic de l'étalon interne (xylose)

Mi Masse du sucre étudié dans la solution de référence

Me Masse de l'étalon interne (xylose) dans la solution de référence

Ae Aire du pic du sucre étudié

Pour effectuer la détermination des facteurs de correction massique préparer une solution de référence contenant pour 500 ml les quantités suivantes de sucres, anhydres :

Xylose 1 g 20 p 100 par rapport à la matière sèche

Glucose 1,65 g 33 p 100 par rapport à la matière sèche

Fructose 1,65 g 33 p 100 par rapport à la matière sèche

Arrêté n°80-367/CG du 3 septembre 1980

Mise à jour le 16/11/2009

Saccharose 0,20 g 4 p 100 par rapport à la matière sèche

Maltose 0,20 g 4 p 100 par rapport à la matière sèche

Raffinose 0,15 g 3 p 100 par rapport à la matière sèche

Mélézitose 0,15 g 3 p 100 par rapport à la matière sèche

5 ml de cette solution seront lyophilisés et silanisés comme il a été dit précédemment après redissolution dans la pyridine. Les facteurs de correction massique, ainsi déterminés, sont constants pour une colonne donnée et des conditions opératoires fixes. Ces facteurs seront vérifiés à intervalles réguliers, ou après tout changement des conditions d'analyse.

A titre indicatif, les conditions opératoires choisies sont :

Injecteur : 275° C

Détecteur : 250° C

Hydrogène : 30ml/ minute

Azote : 30ml/ minute

Programme de chauffe:

Programmation linéaire à 2° C minute

Température initiale: 140° C

Température finale : 240° C.

Les sucres séparés sont identifiés par leur temps de rétention. Les aires des différents pics sont déterminées par un procédé courant d'intégration.

### *7° Expression des résultats*

Les teneurs des différents sucres sont calculées à partir des aires correspondantes d'après la relation :

$$mi = Fi \times \frac{Ai}{Ae} \times 10 \times 2$$

où

mi Pourcentage du sucre étudié dans le miel

Fi Facteur de correction massique du sucre étudié

Ai Aire du pic étudié

Ae Aire du pic de l'étalon interne

## *Evaluation de l'activité bactériostatique du miel*

### *1° Objet*

La présente méthode a pour objet d'évaluer l'activité bactériostatique du miel.

### *2° Définition*

L'activité antibactérienne du miel peut être caractérisée par une note de 0 à 5 en fonction de la dilution nécessaire pour obtenir l'inhibition de croissance d'une culture de *Bacillus subtilis* (souche Caron, institut Pasteur).

### *3° Principe*

Observer au bout de vingt-quatre heures à 35 ° C le développement bactérien de *Bacillus subtilis* dans un milieu de culture convenable contenant le miel à analyser en proportions croissantes.

### *4° Réactifs*

#### 4.1. Milieu de culture composé de :

|               |   |            |
|---------------|---|------------|
| Peptone       | : | 10 grammes |
| Agar agar     | : | 25 grammes |
| Eau distillée | : | 1 000 ml   |

4.2. Sérum physiologique à 7 grammes de NaCl par litre d'eau distillée ; stérilisée pendant quinze minutes, à 120° C (5.1.)

4.3. Culture de *Bacillus subtilis* en suspension dans un sérum physiologique. Cette bactérie est maintenue en activité par des repiquages tous les deux mois dans un milieu liquide peptone stérile à 1P.100.

### *5° Appareillage*

5.1. Autoclave,

5.2. Etuve à 35± 1°C,

5.3. Bain d'eau ou étuve à 50± 2°C,

5.4. Boîte de pétri stériles,

5.5. Tubes à essai stériles,

5.6. Pipettes stériles de 10 ml graduées par 0,5 ml,

5.7. Pipettes pasteur stériles,

5.8. Agitateurs en verre coudés et stérilisés à la flamme,

5.9. Bec bunsen.

#### 6° Mode opératoire

Le milieu de culture de peptone/agar (4.1.) est distribué en tubes à essai (5.5.) par volume de 7,5, 9, 10,5, 12 et 13,5 ml puis stérilisé à l'autoclave (5.1.) pendant quinze minutes à 120° C. Chaque analyse est réalisée avec une série complète de cinq tubes.

Préparer une solution de miel à 50p. 100 (masse volume) dans un sérum physiologique (4.2.) ; Maintenir à une température voisine de 50° C (5.3.) une série de tubes contenant le milieu de culture d'une part, la solution de miel d'autre part. A l'aide d'une pipette (5.6.) prélever la solution de miel et la mélanger au milieu dans les proportions suivantes :

|          |     |     |      |     |                                            |
|----------|-----|-----|------|-----|--------------------------------------------|
| à        | 7,5 | 9   | 10,5 | 12  | 13,5 ml de milieu :                        |
| mélanger | 7,5 | 6   | 4,5  | 3   | 1,5 m de la solution physiologique de miel |
| soit     | 25% | 20% | 15%  | 10% | 5% de miel dans le milieu de culture final |

Agiter énergiquement et écouler chacun de ces mélanges en boîtes de Pétri stériles (5.4.). Déposer après refroidissement à l'aide d'une pipette Pasteur (5.7.) 4 gouttes de suspension bactérienne (4.3.) que l'on étale avec une spatule de verre (5.8.) sur toute la surface de la plaque gélosée. Les opérations sont effectuées devant la flamme d'un bec bunsen (5.9.). Mettre les boîtes de Pétri ensemencées à l'étuve à 35° C (5.2.) et les laisser séjourner vingt-quatre heures.

Ce temps écoulé, procéder à la lecture.

#### *7° Expression des résultats*

Noter l'activité bactérienne de 0 à 5 suivants la convention suivante :

|                                                                |   |
|----------------------------------------------------------------|---|
| Inhibition avec 5 p 100 de miel dans le milieu                 | 5 |
| Pas d'inhibition avec 5 p100 mais inhibition avec<br>10 p 100  | 4 |
| Pas d'inhibition avec 10 p100 mais inhibition avec<br>15 p 100 | 3 |
| Pas d'inhibition avec 15 p100 mais inhibition avec<br>20 p 100 | 2 |
| Pas d'inhibition avec 20 p100 mais inhibition avec<br>25 p 100 | 1 |
| Pas d'inhibition même avec 25 p100                             | 0 |

On peut atteindre une précision de 0,25 entre ces notes lorsque l'inhibition n'est pas totale et que le développement bactérien couvre un quart, un demi ou trois quarts de la surface gélosée dans une boîte.

## **L'examen microscopique de miel et des produits au miel**

### **Avant propos**

L'examen microscopique et, plus particulièrement l'analyse pollinique supposant des connaissances spécialisées il convient de se reporter à l'Atlas photographique d'analyse pollinique des miels, tome III. 1970, des annexes microphotographiques aux méthodes officielles d'analyse (service de la répression des fraudes et du contrôle de la qualité), 42 bis, rue de Bourgogne, Paris (7<sup>e</sup>).

### **I MIEL**

#### *1° Objet*

L'examen microscopique du miel a pour objet d'obtenir des informations sur :

Son origine botanique,

Son origine géographique,

Son mode d'extraction,

Sa souillure éventuelle par des matières insolubles dans l'eau,

Son état de conservation,

Son degré de filtration.

Par l'identification de ses constituants microscopiques.

#### *2° Principe*

Tous les miels naturels contiennent en suspension avant et après leur extraction des constituants figurés microscopiques dont les plus importants sont les grains de pollen provenant des fleurs que l'abeille a visitées pour la récolte du nectar. Outre les grains de pollen, les miels naturels peuvent contenir en très faibles quantités :

Des spores de champignons, des algues microscopiques, des levures, des grains d'amidon, des fragments d'insectes, des poussières atmosphériques, etc...

Par centrifugation d'une solution de miel dans l'eau, on peut concentrer les éléments figurés dans un très faible volume et en confectionner une préparation dont l'examen sous le microscope apporte les informations recherchées (voir ci-dessus : objet).

#### *3° Réactifs*

3.1. Eau distillée ou de pureté équivalente

3.2. Glycérine gélatinée de Kaiser : 7 grammes de gélatine sont coupés en petits morceaux et placés dans 42 ml d'eau distillée pendant deux heures pour permettre le gonflement. Ensuite, en agitant constamment, on ajoute 50 g de glycérine pure et 0,5 g de phénol cristallisé. On chauffe 15 min. On filtre sur laine de verre mouillée.

#### *4° Appareillage*

4.1. Balance analytique

4.2. Vase cylindrique de 50 ml

4.3. Tubes à centrifugation à fond conique de 50ml

4.4. Centrifugation de laboratoire tournant à 2 500-3 000 tours/mn (accélération centrifuge relative : environ 1350)

4.5. Pipettes de Pasteur stériles (à usage unique)

4.6. Lame porte-objet

4.7. Plaque chauffante

4.8. Lamelle couvre-objet

4.9. Microscope (objectifs 10x, 40x, 60x, 100x, oculaires 6x ou 8x)

4.10 Bain d'eau

#### *5° Mode opératoire*

10 gr. De miel sont pesés exactement à 0,1 gr près (4.1.) dans un vase cylindrique (4.2.). On ajoute 20 ml d'eau distillée (3.1.) chaude (ne pas dépasser 40° C). La solution obtenue est versée dans un tube à centrifugation (4.3.). On centrifuge (4.4.) pendant 5 mn à 2 500-3 000 tours minute. On jette le liquide surnageant avec précaution. On prélève le culot de centrifugation avec la pipette de Pasteur stérile (4.5.) et on le dispose sur la lame porte-objet (4.6.). On étale le culot sur une surface d'environ 1 cm<sup>2</sup>. On laisse sécher sur une plaque chauffante (4.7.). On dépose une goutte de glycérine gélatinée (3.2.) préalablement liquéfiée en la portant à 45° C environ au bain d'eau (4.8.). On recouvre avec une lamelle couvre-objet (4.9.). Après refroidissement et solidification de la glycérine gélatinée, on examine au microscope (4.10.).

#### *6° Interprétation des résultats*

L'identification des différents constituants figurés visibles au microscope se fait par comparaison avec des préparations de référence et en utilisant l'iconographie contenue dans les publications spécialisées.

L'identification des pollens, des spores de champignons, et autres éléments figurés d'origine végétale renseigne sur l'origine botanique et géographique du miel.

La mesure ou la simple estimation du volume du culot de centrifugation permet d'obtenir des informations sur le mode d'extraction et le degré de filtration du miel.

L'abondance relative des levures renseigne sur l'état de conservation du miel.

L'abondance relative des poussières atmosphériques, des particules minérales, des fragments d'insectes ou des grains d'amidon renseigne sur la pureté du miel.