

L'HYDROXYMÉTHYLFURFURAL (1) DANS LES MIELS. MISE AU POINT D'UNE MÉTHODE DE DOSAGE

M. GONNET

*Station expérimentale d'Apiculture,
Centre de Recherches agronomiques du Sud-Est, Montfavet (Vaucluse)*

SOMMAIRE

Les techniques utilisées pour détecter l'hydroxyméthylfurfural dans les miels sont nombreuses. Nous en avons étudié quelques-unes au cours de ce travail.

Nous avons mis au point une méthode de dosage quantitative de l'HMF qui s'inspire de la réaction dite de FIEHE.

L'HMF est présent dans tous les échantillons de miel que nous avons soumis à l'analyse. Nous l'avons décelé en quantités appréciables :

1° — dans des échantillons de miel additionnés de sucre interverti ;

2° — dans des miels ayant subi un chauffage ;

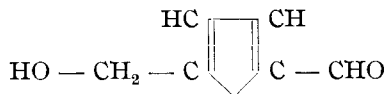
3° — dans des miels conservés à la température du laboratoire depuis quelques années.

La conservation du miel à une température voisine de + 14°C arrête ou ralentit considérablement la formation d'HMF.

I. INTRODUCTION

La dégradation thermique des hexoses peut, en présence d'un acide, amener la formation d'un dérivé hétérocyclique à fonction carbonylée : l'hydroxyméthyl-5 furfural. Le lévulose réagissant sous sa forme cyclique (lévulopyrannose) donne naissance à ce dérivé.

La formule de ce corps a été établie en 1910 par VAN EKENSTEIN et BLANSKMA.



Il n'est pas sans intérêt de noter que l'HMF est un produit intermédiaire de la réaction dite de MAILLARD (1912). Selon PETIT (1959) cette réaction, ou plus exactement ces réactions successives, non enzymatiques, se rencontrent très fréquemment. Elles se produisent chaque fois que se trouvent en présence glucides et amino-acides, ou d'une manière plus générale, glucides et protides.

(1) En abrégé : HMF.

Les modifications qui conduisent au brunissement de la plupart des substances organiques sont dues en grande partie à cet ensemble de réactions.

En ce qui concerne les miels, nous avons tenté de mettre au point une méthode d'analyse qui nous permette d'interpréter valablement nos résultats.

Avant de décrire cette méthode nous passerons tout d'abord en revue quelques-unes des techniques courantes employées pour déceler l'HMF dans les miels.

II. ÉTUDE DE QUELQUES RÉACTIONS COURANTES ET DE QUELQUES DOSAGES PERMETTANT DE DÉCELER LA PRÉSENCE D'HMF DANS LES MIELS

Nous nous efforcerons de définir la sensibilité de ces méthodes et les possibilités réelles qu'elles offrent.

A. — RÉACTIONS COLORIMÉTRIQUES

1°) Réaction de FIEHE

C'est la plus ancienne des méthodes proposée pour la recherche du sucre interverti dans les miels ; c'est encore aujourd'hui la plus utilisée. La réaction de FIEHE est caractérisée par la coloration rouge que donne l'HMF en présence de résorcine en solution chlorhydrique.

En 1908, FIEHE décrivait sa méthode comme suit : « Cinq grammes de miel sont triturés au mortier avec de l'éther conservé sur sodium. L'éther est décanté puis évaporé à sec dans une capsule à l'air libre. Au résidu sec, on ajoute, goutte à goutte, une solution fraîche à 1 p. 100 de résorcine dans l'acide chlorhydrique concentré ($d = 1,19$). En présence du sucre interverti apparaît en une heure une coloration rouge cerise. Avec les miels purs, une coloration orange ou rose peut se former, mais elle disparaît rapidement.

Bien que le principe de l'analyse semble valable, et nous l'avons d'ailleurs retenu, il s'avère difficile de puiser des renseignements précis en provoquant la réaction telle qu'elle est décrite ci-dessus. Il est bien certain en tous cas que la méthode ne saurait caractériser un quelconque traitement subi par le miel, comme semblait le prétendre FIEHE. Pour un miel pur, la couleur disparaît rarement, à l'inverse de ce que signalait l'auteur, mais évolue le plus souvent vers le rouge. La méthode initiale a subi par la suite d'intéressantes modifications. ROUX et MUTTELET (1914) dissolvent 20 g de miel dans 20 ml d'eau et épuisent cette solution par 20 ml d'éther. L'éther évaporé, ils ajoutent quelques gouttes de réactif de FIEHE à l'extrait sec. CAILLAS (1945) propose d'agiter 5 grammes de miel liquide avec 5 ml d'éther, dans un tube à essai. L'éther est décanté dans un autre tube et l'on ajoute 2 ml de réactif résorcinique qui glisse immédiatement sous l'éther. Le réactif reste incolore s'il s'agit d'un miel pur et, dans le cas contraire, la résorcine chlorhydrique prend immédiatement une teinte rose qui s'intensifie rapidement. Enfin, en 1961, GAUTHIER et *al.* procèdent de la manière suivante : ils agitent dans des tubes à centrifuger 5 g de miel en solution aqueuse à 50 p. 100, avec 5 ml d'éther. Après centrifugation, l'émulsion

étant cassée, ils prélèvent 2 ml de la couche étherée dans de petits tubes à essai et ajoutent 4 gouttes de réactif résorcinique. La coloration est observée par comparaison avec une gamme de référence, en l'occurrence une solution alcaline de phénol sulphonephtaléine et d'héliantine. Ce dernier essai représente déjà un réel progrès, car il aide à une classification valable des résultats.

Nous avons vu que si la réaction de FIEHE permet de déceler de très faibles quantités d'HMF, elle n'en demeure pas moins qualitative et l'analyste est contraint d'interpréter les résultats.

2^o) Réaction de FEDER (1911)

Le principe de la réaction de FEDER est basé sur la coloration rouge que donne l'aniline en milieu chlorhydrique avec l'HMF.

Il suffit simplement, selon l'auteur, de triturer du miel dans une solution de chlorhydrate d'aniline et d'observer la coloration que prend le solvant. Une couleur rouge qui persiste 15 mn indique la présence de sucre interverti.

Bien qu'adoptée comme méthode officielle par les chimistes de l'A. O. A. C., la réaction de FEDER jouit d'un crédit moins important que le test de FIEHE. L'aniline chlorhydrique semble insuffisante pour déceler les traces d'HMF que révèle le réactif au résorcinol. D'autre part, la couleur paraît encore plus instable et plus difficile à évaluer avec cette dernière méthode. Cependant, cette épreuve est si simple et si rapide que bien des experts l'utilisent souvent.

La réaction de FEDER a reçu quelques modifications notamment par MITRA et CHATTERJI qui opèrent sur une solution aqueuse de miel (solution au 1/3) mélangée au réactif de FEDER. Les auteurs observent la teinte prise par l'aniline qui surnage au bout d'une heure. Pour un miel pur l'aniline reste incolore ; dans le cas contraire, elle devient brune tandis qu'un anneau rouge se forme à la partie supérieure du liquide.

3^o) Réaction selon MITRA et al. (1959)

Au résidu sec d'un extrait étheré de cinq grammes de miel, les auteurs ajoutent 3 ml d'HCl concentré et 3 ml d'huile de sésame. La présence d'HMF dans le milieu se traduit alors par une coloration rouge brillante, qui doit persister après mélange de la solution à 3 ml d'eau.

Cette réaction s'apparente au test de FIEHE et serait, selon les auteurs d'une sensibilité égale.

4^o) Autres réactions signalées

Réaction de HEANLE (méthode à l'acétone).

L'auteur se sert d'un extrait acétonique de miel qu'il mélange à l'HCl. La présence du sucre interverti doit provoquer une coloration rouge ; le miel cru peut donner une coloration jaune virant au rouge après quelque temps.

Réaction d'ARMANI-BARBONI.

Une solution aqueuse de miel au 1/5 est additionnée de 1 ml d'acétate de benzidine. Une coloration jaune intense dénote la présence de sucre interverti.

Nous possédons peu de renseignements sur ces deux méthodes qui sont d'ailleurs quasi inutilisées.

B — DOSAGES COLORIMÉTRIQUES

1°) *Réaction de FIEHE quantitative*

SHADE *et al.* (1956) dosent l'HMF dans le miel en utilisant le principe de la réaction de FIEHE. Ces auteurs signalent bien qu'ils se servent d'un colorimètre, mais ils ne précisent pas la longueur d'onde employée et ils n'indiquent pas non plus par quel moyen ils convertissent les données colorimétriques en μg d'HMF.

2°) *Dosage selon WINKLER (1955)*

WINKLER a adapté au miel une méthode colorimétrique permettant de doser les furfuraldéhydes. L'auteur se sert d'une solution de miel à 1/5. Les réactifs qu'il utilise sont une solution aqueuse d'acide barbiturique à 0,5 p. 100 et une solution à 10 p. 100 de p. toluidine dans l'isopropanol. La lecture s'effectue au spectrophotomètre sous 550 μ . Selon WINKLER cette méthode, moins précise que le dosage par spectrophotométrie dans l'UV (voir ci-dessous), donnerait des résultats satisfaisants. L'auteur l'a utilisée pour sa grande simplicité d'exécution. COLLON (1962) qui a utilisé cette méthode d'analyse pour les vins, lui reproche de ne pas être spécifique et la propose non pas comme méthode de dosage de l'HMF mais, plus justement, comme méthode servant à déceler les dérivés furfuriques.

3°) *Dosage par spectrophotométrie d'absorption dans l'UV*

Cette méthode d'abord décrite par SHOU et ABILDGAARD (1934) fut reprise et perfectionnée en 1955 par WINKLER. Ce dernier établit une équation permettant de déterminer la teneur en HMF d'un miel. Cependant GAUTHIER *et al.* ont mis en évidence des exceptions fréquentes à la précision du dosage proposé par WINKLER. Selon GAUTHIER toujours, la méthode paraît peu intéressante puisqu'elle ne permettrait pas de déceler avec certitude la présence dans le miel d'une proportion de sucre interverti inférieure à 20 p. 100. Par ailleurs on peut se demander si la méthode de WINKLER est suffisamment précise en ce qui concerne la préparation des échantillons. En effet récemment ROMANN et STAUB (1961) se sont intéressés tout spécialement au dosage de l'HMF par spectrophotométrie dans l'UV. Pour ces auteurs la méthode serait précise, mais elle nécessite un travail d'analyse expérimentale assez complexe et beaucoup plus long que celui proposé par WINKLER.

C. — DOSAGES PAR CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER

Pour déceler l'HMF dans les miels naturels et les miels artificiels, FRANCKZE et IWAINSKY emploient une méthode chromatographique. Le solvant utilisé est un mélange de butanol/éthanol/eau distillée (2/4/1) et le révélateur est de la résorcine en solution dans l'acide trichloracétique. Cette méthode paraît peu sensible aux auteurs, mais permet de reconnaître facilement un miel artificiel.

GAUTHIER *et al.* procèdent par chromatographie ascendante sur papier Whatman n° 1 : ils utilisent comme solvant un mélange de butanol/éthanol/eau distillée (40/11/19) et respectent un temps de migration de 18 heures. Le révélateur au naphtrésorcinol à 0,1 p. 100 dans HCl laisse apparaître des taches roses ou rouges

qui s'estompent et disparaissent au bout de 10 minutes. Selon GAUTHIER la méthode chromatographique serait peu sensible et ne permettrait pas de révéler la présence de moins de 10 p. 100 de sucre interverti dans un miel.

CONCLUSIONS

Les méthodes utilisées pour la recherche du sucre chimiquement interverti dans les miels relèvent de deux principes :

1^o. — Celles qui ont pour but de déceler la présence d'HMF. L'interprétation des résultats obtenus est souvent sujette à caution. La réaction de FIEHE est celle qui permet de déceler les plus faibles quantités d'HMF. La réaction de FEDER, bien que moins sensible, permet de mettre en évidence très rapidement la présence de sucre interverti lorsque celui-ci est en quantité appréciable. *Mais, dans la plupart des cas, ces méthodes ne sont susceptibles de fournir que des renseignements relativement peu précis.*

2^o. — Celles qui autorisent un dosage quantitatif ou semi-quantitatif de ce même HMF. *Ces analyses manquent souvent de sensibilité et elles permettent seulement de mettre en évidence des quantités appréciables de sucre interverti dans un mélange.*

III. TRAVAUX PERSONNELS. DOSAGE COLORIMÉTRIQUE DE L'HMF

A. — ÉTUDE DE LA RÉACTION

Nous avons mis au point un dosage colorimétrique quantitatif de la méthode de FIEHE. Le principe de la réaction reste donc exactement le même.

1^o) Solvant et réactif

— Solvant : Éther distillé et conservé à l'obscurité. Le solvant peut être préparé pour deux jours ; au-delà de cette période, nous jugeons préférable de le distiller à nouveau (1).

— Réactif : solution à 1 p. 100 de résorcine dans de l'acide chlorhydrique R. P. (d. 1,19).

2^o) Matériel utilisé

Spectrophotomètre « Spectral Junior » Jouan — spectre continu de 350 à 750 μ , largeur de bande 7 μ ; cuves carrées de 10 mm de côté.

3^o) Établissement de l'échelle colorimétrique de référence

Pour établir une échelle colorimétrique de référence, nous nous sommes servis d'HMF pur (2). Ce produit passe bien en solution dans l'éther, mais une solution titrée est pratiquement impossible à réaliser dans des conditions normales, le solvant étant

(1) Nous n'avons pas jugé utile de traiter l'éther par le sulfate ferreux comme le préconisent certains auteurs. Nos témoins restent cependant parfaitement incolores.

(2) Origine Fluka. L'HMF étant instable doit être conservé sous gaz inerte.

beaucoup trop volatil. L'éthanol s'avère plus intéressant mais la couleur rouge, qui caractérise l'HMF en présence du réactif résorcinique, s'estompe et disparaît rapidement en milieu alcoolique. Nous avons tourné cette difficulté en employant de très faibles quantités d'une solution d'HMF dans l'alcool.

Peser très exactement 50 mg d'HMF et les dissoudre dans quelques millilitres d'alcool éthylique absolu. Dans une fiole jaugée, amener à 10 ml avec ce même alcool. De faibles volumes, représentant 25-50-100-150-200-250 γ de la dilution précédente sont introduits dans des éprouvettes de 10 ml. On complète à 4 ml avec de l'éther et l'on ajoute la solution à 1 p. 100 de résorcine/HCl. La solution acide glisse sous la colonne d'éther, entraînant l'HMF ainsi qu'une partie du solvant (1/4 environ). Le volume final de la couche inférieure est ajusté à 5 ml avec le réactif. On porte alors 30 mn à l'obscurité où la réaction s'effectue. Ce dernier point est très important. Nous avons relevé des différences considérables en agissant à la lumière du jour, à la lumière diffuse et à l'obscurité. Si l'opération est conduite correctement, les deux colonnes de liquide, c'est-à-dire l'éther et l'HCl, doivent être claires et séparés l'une de l'autre par un anneau rouge, d'épaisseur et d'intensité variable, suivant la quantité d'HMF présente. L'éther est siphonné avec soin et la solution restante est homogénéisée. Un second séjour de 10 mn à l'obscurité est encore nécessaire avant la lecture. Nous avons constaté, en effet, une certaine instabilité de la transmission optique pendant les cinq premières minutes qui suivent le mélange. Au-delà de ce temps, un équilibre semble se produire et la couleur ne s'intensifie que très lentement et de façon régulière. En l'absence de lumière, elle demeure relativement stable entre 5 et 15 mn (tableau I).

TABLEAU I

Stabilité de la coloration en fonction du temps et des différentes concentrations d'HMF

HMF en γ	Temps de réaction à l'obscurité en minutes 30 +	Résultats en densité optique				
		460 m μ	480 m μ	500 m μ	520 m μ	540 m μ
25	5	0,065	0,10	0,11	0,10	0,08
	10	0,065	0,10	0,11	0,10	0,08
	15	0,065	0,10	0,11	0,10	0,08
50	5	0,105	0,172	0,195	0,175	0,125
	10	0,108	0,175	0,197	0,177	0,127
	15	0,108	0,180	0,200	0,180	0,132
100	5	0,242	0,395	0,427	0,372	0,260
	10	0,245	0,397	0,430	0,375	0,262
	15	0,247	0,402	0,435	0,380	0,267
150	5	0,362	0,562	0,637	0,577	0,452
	10	0,367	0,567	0,640	0,585	0,457
	15	0,375	0,577	0,647	0,590	0,462
200	5	0,505	0,772	0,837	0,757	0,577
	10	0,515	0,785	0,847	0,762	0,580
	15	0,522	0,795	0,857	0,767	0,587
250	5	0,607	0,902	0,977	0,882	0,697
	10	0,630	0,920	0,980	0,906	0,706
	15	0,640	0,930	0,997	0,916	0,716

Dans la région du spectre étudiée, le maximum d'absorption se situe dans la bande des 500 m μ (fig. 1).

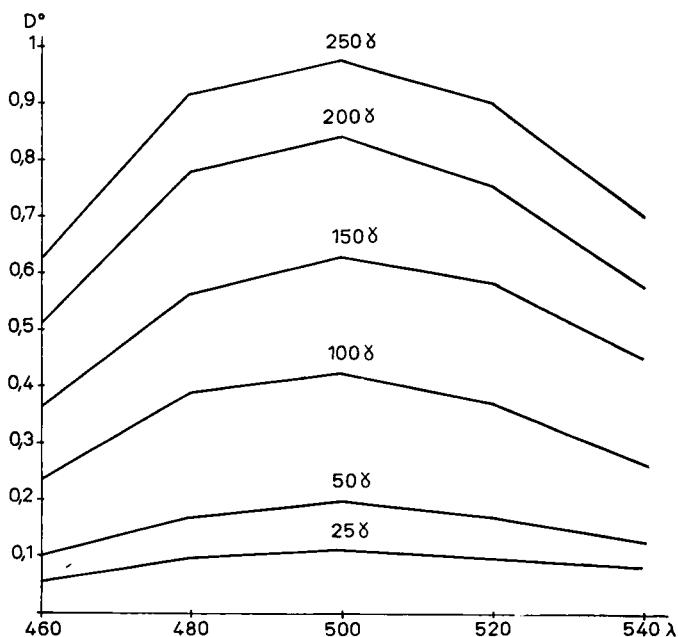


FIG. 1. — Courbes d'absorption de l'HMF en solution dans la résorcine chlorhydrique (concentrations en HMF de 25 à 250 γ)

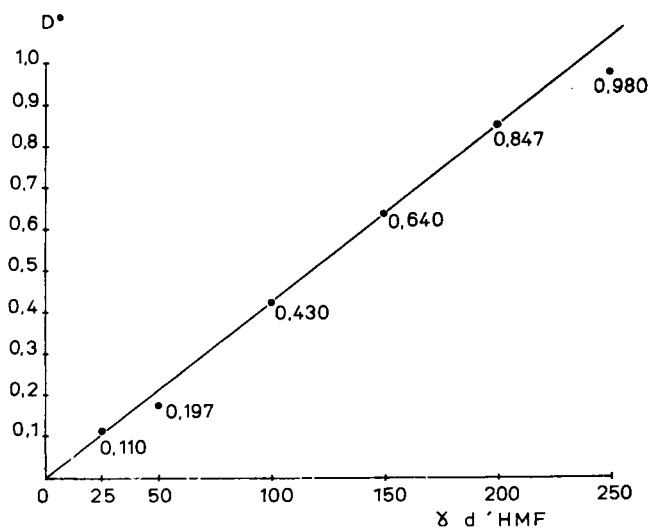


FIG. 2. — Densité optique en fonction de la concentration en HMF

Des témoins (éther/éthanol/résorcine HCl) préparés dans des conditions analogues à celles décrites ci-dessus doivent rester incolores.

Les résultats obtenus et la concordance de nombreuses répétitions nous ont permis d'établir une échelle de correspondance représentée par une courbe de référence (fig. 2). On remarquera que pour ces concentrations comprises entre 25 et 200 γ , la coloration suit la loi de BEER-LAMBERT.

B. — APPLICATION AUX MIELS

1^o) Extraction de L'HMF dans le miel

Pour extraire l'HMF du miel, on utilise le plus souvent l'éther. Ce solvant a l'avantage d'être assez sélectif. Généralement, les auteurs prétendent épuiser un poids déterminé de miel pur ou en solution aqueuse par 1, 2, 3 fois son volume d'éther et rarement plus. Or l'HMF contenu dans un miel diffuse assez mal dans le solvant. Nous avons tenté d'épuiser 5 g d'un miel à réaction de FIEHE positive, en employant dix fois de suite son volume d'éther. Après chaque extraction, on ajoutait quelques gouttes de réactif résorcinique. Après une trentaine de minutes, les couleurs observées variaient alors du rouge au rose clair, mais jamais la réaction n'était strictement négative. *C'est donc volontairement et à seule fin « d'arracher » tout l'HMF ou presque de la prise d'essai, que nous avons utilisé un faible volume de solution sucrée par rapport à un volume important de solvant.*

Peser cinq grammes de miel, les dissoudre dans quelques centimètres cubes d'eau distillée et compléter à 10 ml dans une fiole jaugée. A 2 ml de prise d'essai (pipette de précision) on ajoute, dans un bécher de 150 ml, 40 ml d'éther fraîchement distillé. La solution est brassée au moyen d'un agitateur magnétique ; le miel reste en contact intime avec le solvant durant 5 mn. L'extrait éthéré est décanté tandis que la solution de miel est extraite à nouveau par 40 ml d'éther pendant 5 mn. Le résidu final est rincé par 20 ml de solvant dans une ampoule à décanter. Les trois fractions obtenues sont regroupées et l'éther évaporé lentement au bain-marie (pendant une heure) jusqu'à 2 ml environ qui sont récupérés dans des éprouvettes de 10 ml. Le solvant, très volatil, permet le rinçage correct du bécher (3 à 4 fois) ; on amène le volume final de l'extrait éthéré à 4 ml.

2^o) Réaction colorée

Elle est provoquée dans les conditions et de la manière décrite au paragraphe « Établissement de l'échelle colorimétrique ». Un témoin nous permet de juger de la pureté du solvant utilisé.

Si la quantité d'HMF de la prise d'essai se révèle supérieure à 200 γ , on aura tout intérêt à augmenter la dilution.

IV. L'HMF DANS LES MIELS

La présence d'HMF dans les miels est considérée comme la preuve d'une addition de sucre interverti par voie chimique. D'autre part, nous savons (SHADE et *al.*, 1956 ; HADORN et KOVACS, 1960) que les miels chauffés contiennent également une

certaine quantité d'HMF. Il serait donc intéressant de pouvoir distinguer ces derniers de ceux qui n'ont subi aucun traitement en se basant sur la présence ou l'absence d'HMF. Mais le phénomène est en réalité plus complexe puisque certains miels non chauffés et n'ayant subi aucune addition de sucre interverti, recèlent cependant une quantité non négligeable d'HMF. En effet, le vieillissement naturel du miel peut suffire à la production de ce dérivé comme l'a constaté MALLIK (1958).

Grâce à la méthode de dosage quantitative que nous avons mise au point, nous avons pu reprendre avec précision l'étude concernant la présence de l'HMF dans les miels et mettre en évidence les différences significatives qui existent entre les échantillons.

Nous avons étudié, tout d'abord, l'incidence des traitements thermiques sur la production d'HMF dans un miel déterminé. Comparativement, ce même miel nous a servi pour préparer des mélanges avec du sucre interverti par voie chimique. Le miel, en question enregistré sous le numéro 41/61 fut récolté par la Station expérimentale d'Apiculture de Montfavet en 1961 et conservé 8 mois à la température du laboratoire et à l'obscurité, sa teneur en eau est de 16,4 p. 100 et son pH 3,90. Un gramme d'échantillon témoin contient 25 µg d'HMF.

Nous avons étudié ensuite la teneur en HMF de miels d'origines variées, traités et conservés de différentes manières.

A. — PRODUCTION D'HMF PAR CHAUFFAGE DU MIEL

1^o) *Chauffage des échantillons*

Cinq grammes de miel sont pesés dans des béchers. Ces béchers sont fermés au moyen d'un bouchon percé dans lequel est fixé un thermomètre permettant de noter la température du miel. Les échantillons sont placés dans une étuve thermostatée à des températures de 60°-70°-80°C. pour des temps de 4, 6 et 10 heures.

2^o) *Résultats*

Les résultats groupés sur la figure 3 indiquent clairement qu'un chauffage à 60°C ne provoque pas, même s'il dure 10 heures, de changement notable dans la teneur en HMF. Une différence assez nette apparaît à 70°C et s'accroît à 80°C.

B. — PRÉSENCE D'HMF PAR ADDITION DE SUCRE INTERVERTI PAR VOIE CHIMIQUE

1^o) *Préparation des échantillons*

Le sucre interverti a été mélangé à cinq grammes de miel en vue d'obtenir des concentrations de 3 p. 100, 5,5 p. 100, 10,5 p. 100, 15 p. 100, 19 p. 100. Notre sucre de référence, préparé par hydrolyse citrique du saccharose selon la technique de KIGER (1948), contient 0,17 p. 100 d'HMF dosé par notre méthode et 28 p. 100 d'eau.

2^o) *Résultats*

Les résultats sont consignés sur la figure 3. On notera la forte teneur en HMF des mélanges de miel et de sucre interverti par voie chimique.

Comparaison des résultats entre A et B

Nous devons tout d'abord noter qu'un chauffage prolongé à une température élevée, altère considérablement le goût et la saveur du produit des abeilles. Ainsi, après un traitement de 6 h et de 10 h à 80°C le miel, fortement bruni, avait perdu une grande partie de ses qualités organoleptiques. Il est bien évident que les traitements thermiques employés lors du conditionnement des miels ne sont jamais aussi poussés. Pour ces raisons nous avons éliminé volontairement de nos comparaisons les miels ayant subi un chauffage à 80°C pendant plus de 4 heures. De toute manière, il est bien entendu qu'un miel ne doit jamais subir de tels traitements sous peine d'altérations graves.

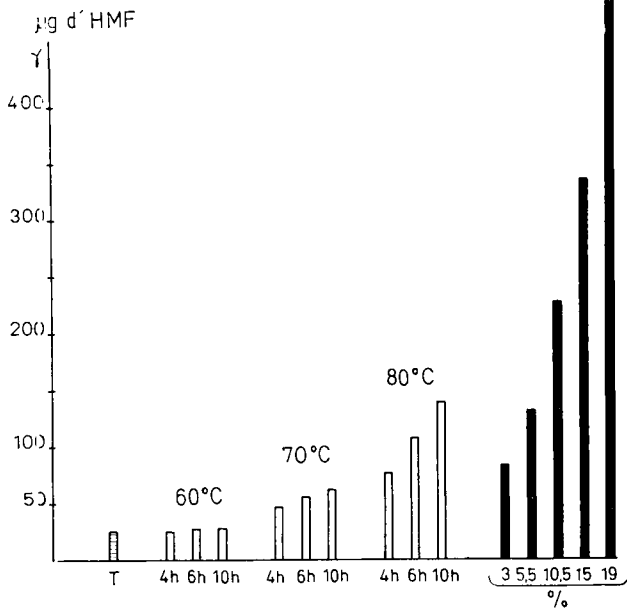


FIG. 3. -- Influence du chauffage et de l'addition d'un sucre inverti sur la teneur en HMF d'un miel

- En blanc : Miels chauffés
- En noir : Miels additionnés de sucre inverti
- T : Miel témoin.

Si nous examinons la figure 3, nous constatons que la quantité d'HMF produite durant un chauffage de 4 h, 6 h ou 10 h à 70°C demeure toujours inférieure à celle qui correspond à une addition de 3 p. 100 de notre préparation de sucre inverti. Il faut atteindre une température de 80°C maintenue pendant 4 heures pour arriver à équivalence avec un échantillon de miel additionné de 3 p. 100 de sucre inverti par voie chimique.

Nous montrerons plus loin que certains miels crus, qui n'ont pas subi d'addition de sucre interverti révèlent des quantités d'HMF très fortes. Mais il s'agit de produits maintenus plusieurs mois à une température de l'ordre de 35°C et, tout comme les miels fortement chauffés, ils ont perdu leurs qualités de produits naturels.

On remarquera sur la fig. 3 qu'un miel additionné de 19 p. 100 de sucre interverti contient 490 µg d'HMF par gramme d'échantillon. *Il est exclu qu'un miel récolté dans nos régions, pris à l'état frais et traité dans des conditions normales, ne faisant donc intervenir qu'un chauffage contrôlé (1) puisse révéler une quantité d'HMF aussi importante.* Dans une telle éventualité, il ne pourrait s'agir que d'un miel additionné de sucre interverti ou d'un miel fortement altéré par chauffage et dans les deux cas ce miel ne serait plus naturel.

C. — PRODUCTION D'HMF EN FONCTION DE LA TEMPÉRATURE DE CONSERVATION ET DU VIEILLISSEMENT

1°) Échantillons

Les miels que nous avons choisis dans notre collection pour y doser l'HMF, ne sont pas très âgés, mais leurs conditions de conservation sont parfaitement connues. Le lecteur se reportera au tableau 2 où figurent à côté de la teneur en HMF, le millésime, la teneur en eau, le pH, l'acidité, le mode de traitement et de conservation.

2°) Résultats

Le tableau 2 montre nettement l'importance de la température pour la conservation du miel. Durant le stockage des échantillons à 14°C, la production d'HMF se trouve considérablement ralentie. Au laboratoire, où la température peut varier entre 15 et 25°C suivant les saisons, le taux d'HMF dans les miels augmente de manière sensible. On en décèle 164,3 µg par gramme de miel sur l'échantillon n° 1 de 1957 (2). Il est à noter que cette dégradation lente du produit sucré n'entraîne pas de pertes notables d'arôme ni de saveur, contrairement aux résultats obtenus lors d'un chauffage.

On constate également que le chauffage léger à 35°C qui favorise la décantation du miel, peut être prolongé de 15 jours à 1 mois sans causer de dommages apparents au produit. Mais il ne faut pas poursuivre ce traitement au-delà comme le montrent les deux exemples suivants :

— le miel n° 29 de 1960 maintenu 3 mois à + 35°C et 17 mois à la température du laboratoire, contient 93,4 µg d'HMF/gramme de miel.

— le lot n° 4 traité 8 mois à + 35°C et ensuite conservé 24 mois au laboratoire, contient 504,8 µg d'HMF/gramme de miel. Il faut dire que ce dernier lot possède la saveur particulière des miels surchauffés et qu'il ne pourrait prétendre de ce fait à une commercialisation normale.

(1) Nous entendons par chauffage contrôlé soit :

· Un chauffage de décantation à 30-35°C prolongé pendant une à deux semaines au maximum.

· La refonte à 45°C environ pendant le temps nécessaire à la liquéfaction de la masse (LOUVEAUX et TRUBERT, 1958).

· La pasteurisation à 78°C maximum pour un temps qui ne doit pas excéder 10 mn.

(2) Il est utile de rappeler que cet échantillon n'a jamais subi de traitement thermique.

TABLEAU 2

Teneur en HMF de différents échantillons de miel

No	Époque de récolte	Teneur en eau (%)	pH	Acidité libre meq/kg	Traitements subis par le miel		µg HMF/gramme
					Température et temps de conservation	Traitements thermiques subis après la récolte	
1	Printemps 1957	16,4	3,50	28,8	t labo — 60 mois		164,3
2	Été 1958	15	3,85	36,4	t labo — 42 mois		97,7
2'					t labo — 18 mois ⁽¹⁾ 14°C — 24 mois		41,6
3	Printemps 1959	16,8	3,95	31,80	t labo — 36 mois		38,9
3'					t labo — 12 mois ⁽¹⁾ 14°C — 24 mois		20,5
4	Été 1959	16,9	3,65	32,4	t labo — 24 mois	8 mois à 35°C	504,8
4'					14°C — 24 mois		364,8
6	Été 1959	17	3,55	20,4	t labo — 32 mois		59,8
7	Été 1959	18	3,60	26,8	t labo — 32 mois		71,7
19	Printemps 1960	16,5	3,60	22,4	t labo — 24 mois		81,5
20	Été 1960	16,4	3,80	22	t labo — 20 mois	1 mois à 35°C	41,6
20'					14°C — 20 mois		18,1
22	Été 1960	16,4	3,85	22,8	t labo — 20 mois	1 mois à 35°C	36,1
22'					14°C — 20 mois		15,8
23	Été 1960	17	3,85	22,8	t labo — 20 mois	1 mois à 35°C	36,1
23'					14°C — 20 mois		15,8
24	Été 1960	14	3,90	17,80	t labo — 20 mois	1 mois à 35°C	38,9
24'					14°C — 20 mois		22,7
29	Été 1960	17	3,95	26,4	t labo — 17 mois	3 mois à 35°C	93,4
29'					14°C — 17 mois		52,2
31	Printemps 1961	15,5	3,80	16,4	t labo — 12 mois	8 jours à 35°C	27,8
31'					14°C — 12 mois		13
33	Printemps 1961	17,6	3,70	19,2	t labo — 12 mois	8 jours à 35°C	47,2
33'					14°C — 12 mois		20,5
39	Été 1961	17	4,05	40,4	t labo — 8 mois	15 jours à 35°C	60,9
39'					14°C — 8 mois		52,2
40	Été 1961	16,3	4,05	30,5	t labo — 8 mois	1 mois à 35°C	36,1
40'					14°C — 8 mois		33,3

(1) Notre chambre de cristallisation thermostatée à 14°C ne fut terminée que courant 1960, ce qui explique les deux modes successifs de conservation pour un même échantillon.

L'HMF s'élabore dans tous les miels conservés à la température ambiante au cours du vieillissement. Cette formation progressive s'effectue de manière très inégale et une détermination exacte et complète des causes de ces inégalités nous manque encore. L'échantillon n° 1 de 1957 qui montre la plus forte quantité d'HMF pour les miels crus, pourrait déjà correspondre à un miel additionné de 5 à 10 p. 100 de sucre interverti par voie chimique.

V. CONCLUSIONS

Au cours de ce travail nous avons mis au point une méthode de dosage quantitative dont la sensibilité nous a permis d'étudier dans les miels, d'une manière précise, l'influence de quelques facteurs sur la présence d'HMF. Des résultats obtenus, nous retiendrons les points suivants :

1. — *Un miel chauffé 4 h à 80°C (c'est-à-dire de façon tout à fait anormale) ne contenait pas plus d'HMF qu'un échantillon du même miel cru additionné de 3 p.100 de sucre interverti par voie chimique.* Nous pouvons, en conséquence, affirmer que des miels frais chauffés dans des conditions correspondant à une technique rationnelle de traitement, ne peuvent pas être confondus avec des miels additionnés de sucre chimiquement interverti dans des proportions notables.

2. — *Un chauffage modéré (aux environs de 35°C) mais prolongé pendant plusieurs mois, de même qu'un stockage à la température ordinaire pendant plusieurs années, peuvent amener la formation d'HMF dans le miel en quantité appréciable.* Nous pourrions rapprocher ici les travaux de HADORN et KOVACS (1960) étudiant l'influence du chauffage sur les miels. Ces auteurs ont montré que les miels d'origine tropicale et subtropicale contenaient plus d'HMF que les miels récoltés dans les climats tempérés. Nous pensons, avec eux, que les écarts de températures correspondant aux différentes latitudes expliquent une variation de la teneur en HMF en fonction des origines.

3. — Nous venons de voir que la température joue un rôle capital dans la formation d'HMF dans les miels. *Nous avons montré, à ce sujet, que la température de + 14°C (température optimum pour la cristallisation) ralentit considérablement la production d'HMF et peut même la bloquer.* On remarque, en effet, une différence très nette de formation de ce dérivé si l'on conserve le miel à + 14°C ou à la température du laboratoire (pour des temps de conservation allant jusqu'à 24 mois). Cette température de + 14°C peut donc être particulièrement conseillée pour éviter l'apparition rapide d'HMF dans les miels, au cours de leur stockage.

4. — Nous savons que d'autres facteurs peuvent influencer sur la production d'HMF dans un miel. SHADE et *al.* (1956), par exemple, ont signalé qu'une forte teneur en eau favorisait l'apparition d'HMF. Nous avons essayé de faire quelques rapprochements valables sur d'autres facteurs pouvant avoir une importance, mais la trop grande diversité des échantillons ne nous a pas permis jusqu'à présent de trouver des rapports précis de cause à effet.

Reçu pour publication en septembre 1962

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier tout spécialement M. ANDRÉ, Chargé de Recherches, Directeur de la Station de Technologie des Produits végétaux, C. R. A. du Sud-Est, qui a bien voulu suivre notre travail et nous aider de ses précieux conseils.

SUMMARY

HYDROXYMETHYLFURFURAL IN HONEY. A METHOD FOR ITS ESTIMATION

The object of this work was principally :

- a) to perfect a method for the quantitative estimation of hydroxymethylfurfural in honey;
- b) to examine the influence of various factors on the HMF level found in different honeys.

HMF was found in all samples analysed, but in most cases in negligible quantities. It was however, discovered in appreciable amounts :

- in samples of honey to which invert sugar had been added ;
- in honey which had been heated ;
- in honeys stored for several years at laboratory temperature.

The formation of HMF is arrested or slowed down when honey is kept at temperatures in the region of + 14° C.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.

- ARMANI-BARBONI, d'après MESNARD, 1958. *L'Abeille et ses produits*, p. 108.
- CAILLAS A., 1945. *Les produits de la ruche*, 2^e éd. Orléans, 110-113.
- COLLON Y., 1962. L'hydroxyméthylfurfural dans les jus de raisin. Formation et méthodes de dosage. *Ann. Technol. agric.*, **11**, 167-174.
- EKENSTEIN A. van, BLANSKMA J., 1910. *Ber. dtsch. chem. Ges.*, **43**, 2355.
- FEDER R., 1911. *Z. Unters. Lebensmittel*, **22**, 412.
- FIEHE J., 1908. Eine Reaktion zur Erkennung und Unterscheidung von Kunsthonigen und Naturhonigen. *Z. Unters. Lebensmittel*, **16**, 75.
- FRANZKE Cl., IWAINSKY H., 1956. Über den Nachweis und die Bestimmung von Oxymethylfurfural in Honigen und Kunsthonigen. *Fette-Seifen-Anstrichmittel*, **58**, 859-862.
- GAUTHIER J. A., RENAULT J., JULIA-ALVAREZ M., 1961. Recherches du sucre interverti dans le miel. *Ann. Fals. Exp. Chim.*, **628**, 177-193 ; **629**, 253-260 ; **633-634**, 397-411.
- HADORN H., KOVACS A. S., 1960. Zur Untersuchung und Beurteilung von ausländischen Bienenhonig auf Grund des Hydroxy-methylfurfural und Diastasegehaltes. *Mitt. Lebensmittel Hyg.*, **51**, 373-390.
- HEANLE, d'après KIGER, 1948. Le pain d'épices, p. 42. *Dunod Ed.*, Paris.
- KIGER J., 1948. Le pain d'épices, p. 40. *Dunod Ed.*, Paris.
- LOUVEAUX J., TRUBERT E., 1958. Étude technique sur la fonte du miel cristallisé. *Ann. Abeille*, **1**, 19-30.
- MAILLARD L. C., 1912. Action des acides aminés sur les sucres : sur la formation des mélanoidines par voie méthodique. *C. R. Acad. Sci.*, **154**, 66-68.
- MALLIK A. K., 1958. Analysis of Indian honey. *J. Inst. Chem. (India)*, **30**, 171-173.
- MESNARD P., 1958. In TRIEU R., *L'Abeille et ses produits*, 101-110, Coueslant, Cahors.
- METHODS OF ANALYSIS of Association of Official Agricultural Chemists, 1955. 8^e éd. Washington.
- MITRA S., CHATTERJI, 1957. *J. Sci. Culture*, **23**, 97.
- MITRA S., MATHEW T. J., MALLIK A. K., 1959. Application of Baudoin test to the analysis of honey : a new test for the detection of HMF. *J. Inst. Chem. (India)*, **31**, 175-176.

- PETIT L., 1959. Recherches sur la réaction de MAILLARD. *Ann. Technol. Agric.*, **8**, 1-33.
- ROMANN E., STAUB M., 1961. Hydroxymethylfurfural in Honig. *Mitt. Lebensmittel Hyg.*, **52**, 44-58.
- ROUX F., MUTTELET C. F., 1914. Les aliments sucrés. 141-146, *Lib. Polytechnique*, Ch. Béranger Éd., Paris et Liège.
- SHADE J., MARSH G. L., ECKERT J. E., 1956. Improved methods of determining diastase and hydroxymethyl-furfural in honey and their relationship to the bacteriostatic quality of honey. *Proc. 10th internat. Congr. Entomol., Montréal*, **4**, 17-25.
- SHOU S. A., ABILDGAARD J., 1934. *Z. Unters. Lebensmittel*, **63**, 502.
- WINKLER O. von, 1955. Beitrag zum Nachweis und zur Bestimmung von oxymethylfurfural in Honig und Kunsthonig. *Z. Unters. Lebensmittel*, **102**, 161-167.
-