

1032

RECOMMANDATION

**du Comité de Ministres de l'Union Economique Benelux
concernant l'application de méthodes d'analyse de référence
Benelux se rapportant à la recommandation M (63) 21, relative
à l'harmonisation des législations en matière de miel**

M (68) 49

Le Comité de Ministres de l'Union économique Benelux,

Vu les articles 3, 6 et 7 du Traité d'Union,

Vu l'article 9 de la Convention transitoire,

Vu la Recommandation du Comité de Ministres du 23 septembre 1963, relative à l'harmonisation des législations en matière de miel, M (63) 21,

Considérant qu'il y a lieu d'éviter des contestations nées de l'application de techniques d'analyse différentes ou de l'emploi de normes différentes,

Considérant qu'en particulier l'harmonisation du contrôle des denrées alimentaires exige la mise en œuvre de techniques identiques ou équivalentes et l'emploi de modes d'expression semblables et le recours à des normes identiques ou équivalentes,

Recommande :

Article unique

Les Gouvernements des trois pays du Benelux sont invités à introduire, avant le 1^{er} juillet 1969 dans leurs législations, comme seules méthodes de référence valables, les méthodes d'analyse ci-annexées relatives au miel.

Fait à Bruxelles, le 11 décembre 1968.

Le Président du Comité de Ministres,

P. GREGOIRE

1033

Méthode d'analyse du miel**M (68) 49, Annexe****1. Préparation de l'échantillon**

1.1. En vue de la détermination de l'indice diastasique et de la teneur en hydroxyméthylfurfural (H.M.F.), mélanger l'échantillon le mieux possible sans chauffage préalable et en prélever la quantité nécessaire à ces opérations.

1.2. Chauffer — à une température ne dépassant pas 50° C — le miel restant jusqu'à ce que sa consistance permette une homogénéisation. L'opération se fait en plongeant le récipient clos dans l'eau du bain-marie ou en le mettant dans une étuve.

Lorsque le récipient contenant le miel n'est pas en verre, transvaser tout son contenu dans un récipient en verre translucide fermant hermétiquement.

Après fusion et refroidissement, mélanger soigneusement le miel pour s'assurer que tout produit de condensation sur d'autres parties du récipient soit réincorporé.

1.3. Préparer une solution mère en dissolvant dans de l'eau distillée 50 g du miel préparé selon 1.2. et en complétant à 250 ml dans un ballon jaugé.

2. Teneur en résidu sec

Déterminer au pycnomètre la densité à 20° C de la solution mère préparée selon 1.3. Calculer le résidu sec (E) du miel en appliquant la formule suivante :

$$d \frac{20}{4} = d \frac{20}{20} \times 0,99823$$

$$E = 1302,7 \left(d \frac{20}{4} - 0,99823 \right)$$

3. Teneur en matières insolubles dans l'eau

Peser au centigramme près, une quantité appropriée de miel préparé selon 1.2., soit 20 g. Dissoudre le miel dans de l'eau distillée à 80° C, bien mélanger et filtrer dans un creuset en verre fritté G 3 préalablement séché et pesé. Laver soigneusement avec de l'eau chaude (80° C) jusqu'à élimination des sucres. Sécher le creuset pendant une heure à 100-103° C, laisser refroidir et peser à 0,1 mg près. Les résultats obtenus sont exprimés en pour-cent de poids de la substance sèche.

1034

4. Teneur en cendres

Dans une capsule de platine ou de silice calcinée et tarée, peser de 5 à 10 g de miel préparé selon 1.2. Chauffer prudemment jusqu'à ce que l'échantillon devienne noir et sec et qu'il n'y ait plus de risque de perte. Ensuite, calciner dans un moufle à 600° C jusqu'à poids constant. Laisser refroidir et peser. Exprimer les résultats en pour-cent de la substance sèche.

5. Acidité

Peser 10 g du miel préparé selon 1.2. et le dissoudre dans 75 ml d'eau distillée exempte de CO_2 .

Titrer avec une solution de 0,1 n d'hydroxyde de sodium exempte de carbonates, en présence de 4 ou 5 gouttes de phénolphthaléine. Le virage final de la coloration doit persister pendant 10 secondes. Dans le cas des échantillons foncés, recourir à un pH-mètre et titrer jusqu'à pH 8.3.

Les résultats sont exprimés en ml d'acide normal pour 100 g de miel.

6. Dosage du saccharose vrai

Réactifs :

— *Solution d'hexacyanoferrate (II) de potassium* : dissoudre 106 g $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ dans l'eau distillée et diluer jusqu'à un litre.

— *Solution d'acétate de zinc* : dissoudre 219,5 g de $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Zn} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dans de l'eau distillée, ajouter 30 g d'acide acétique et diluer à l'eau distillée jusqu'à un litre.

— Acide acétique à 20 %

— Iodure de potassium

— Acide sulfurique 25 % en poids

— Thiosulfate de sodium 0,1 n

— Empois d'amidon 1 %

— *Réactif de Luff-Schoorl* : préparer les trois solutions suivantes :

a. 25 g de sulfate de cuivre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) dans 100 ml d'eau ;

b. 388 g de carbonate de sodium ($\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) dans 300 à 400 ml d'eau ;

c. 50 g d'acide citrique ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$) dans 50 ml d'eau.

Verser prudemment la solution c. dans la solution b. refroidie et brasser jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de dégagement d'acide carbonique. Ajouter à ce mélange, tout en remuant, la solution a. Laisser refroidir, compléter à un litre et filtrer après 24 heures. La solution ainsi préparée accuse un pH d'environ 9,9.

Contrôler le réactif comme suit :

1035

aa. A 25 ml de réactif ajouter 3 g d'iodure de potassium, dissous dans un peu d'eau, et 25 ml d'acide sulfurique 25 % en poids. Titrer avec du thiosulfate de sodium 0,1 n. A la fin de la titration, ajouter un peu d'empois d'amidon. La quantité de thiosulfate de sodium 0,1 n utilisée doit être de 25 ml.

bb. Dans un ballon jaugé de 100 ml, introduire 10 ml du réactif et porter au trait.

Dans un vase conique, mélanger 10 ml de ce réactif dilué et 25 ml d'acide chlorhydrique 0,1 n chauffer une heure au bain-marie bouillant. Laisser refroidir, ramener au volume initial avec de l'eau et titrer par NaOH 0,1 n en présence de phénolphthaléine. La quantité de NaOH 0,1 n utilisée doit être de 5,5 à 6,5 ml.

cc. Titrer par HCl 0,1 n en présence de phénolphthaléine, 10 ml de réactif dilué suivant bb. La quantité de HCl 0,1 n utilisée doit être de 6 à 7,5 ml.

— *Solution d'invertase* : abandonner à l'autolyse 25 g de levure pressée de boulangerie fraîche en suspension dans 150 ml d'eau à 20° C environ ; après 8 ou 15 jours, avant que le mélange ne devienne alcalin au tournesol, ajouter du talc et filtrer. Le filtrat est conservé sous toluène, à 4° C et à l'abri de la lumière.

6.1. Transférer 10 ml de la solution préparée selon 1.3 dans un ballon jaugé de 200 ml et compléter jusqu'au trait.

6.2. Introduire dans un ballon jaugé de 100 ml, 25 ml de la solution obtenue en 6.1 et 25 ml d'eau ; ajouter 4 à 5 gouttes d'acide acétique à 20 % et 2 ml de solution d'invertase. Agiter, boucher avec un tampon d'ouate et placer dans une étuve à 53-55° C pendant 2 à 3 h. Refroidir.

6.3. Ajouter à la solution obtenue en 6.2, 2 ml de la solution d'hexacyanoferrate (II) de potassium et 2 ml de la solution d'acétate de zinc en remuant vivement après chaque addition. Compléter jusqu'au trait à l'aide d'eau distillée. Filtrer le liquide sur filtre sec et rejeter les premières portions du filtrat. Utiliser les fractions suivantes pour le dosage du sucre interverti selon la méthode de Luff-Schoorl décrite en 6.5.

6.4. Répéter les opérations décrites en 6.3. sur 25 ml de la solution obtenue en 6.1., additionnée de 25 ml d'eau. Effectuer sur les dernières fractions du filtrat le dosage du sucre interverti selon la méthode de Luff-Schoorl décrite en 6.5.

6.5. Pipeter 25 ml de réactif de Luff-Schoorl, 5 ml d'eau et 20 ml du filtrat obtenu en 6.3 ou 6.4 dans un vase conique de 300 ml. Ajouter quelques fragments de pierre ponce et munir le vase conique d'un réfrigérant à reflux. Placer le récipient sur un treillis métallique recouvert d'un carton d'amiante percé d'un trou de même diamètre que le fond du vase conique.

1036

Porter le contenu du vase conique à ébullition en deux minutes et maintenir pendant exactement dix minutes en ébullition modérée. Si toute la solution cuivrique est réduite, diminuer la quantité de solution obtenue selon 6.3 ou 6.4 et, après adjonction de 25 ml de réactif de Luff-Schoorl, ajouter de l'eau de façon que le volume atteigne 50 ml. (Le dosage donne les meilleurs résultats lorsque les 25 ml de solution contiennent entre 15 et 60 mg de sucre réducteur).

6.6. Refroidir rapidement jusqu'à 20° C. Ajouter 3 g d'iodure de potassium dissous dans un peu d'eau, puis ajouter prudemment, tout en agitant continuellement, 25 ml d'acide sulfurique.

Titrer immédiatement la solution par le thiosulfate de sodium 0,1 n en agitant continuellement. Vers la fin de la titration, ajouter 1 à 2 ml d'empois d'amidon.

6.7. Exécuter de la même manière un essai à blanc, en remplaçant la solution sucrée par 25 ml d'eau.

6.8. Calculer de la manière suivante la teneur en saccharose. Retrancher le nombre de ml de thiosulfate de sodium 0,1 n utilisés pour le dosage, du nombre de ml de thiosulfate de sodium utilisés pour l'essai à blanc. Chercher à l'aide de la table de Luff-Schoorl la quantité de sucre interverti correspondant à la différence.

Soit m mg cette quantité dans la solution obtenue en 6.3

et m' mg cette quantité dans la solution obtenue en 6.4.

La teneur du miel en saccharose, exprimée en g pour cent, est donnée par la formule

$$2 (m - m') \times 0,95.$$

6.9. TABEL VOLGENS LUFF-SCHOORL

0,1 n Na ₂ S ₂ O ₃ ml	Glucose, fructose ou sucre interverti mg	Différence
1	2.4	2.4
2	4.8	2.4
3	7.2	2.5
4	9.7	2.5
5	12.2	2.5
6	14.7	2.5
7	17.2	2.6
8	19.8	2.6
9	22.4	2.6
10	25.0	2.6
11	27.6	2.7
12	30.3	2.7
13	33.0	2.7

1037

14	35.7	2.8
15	38.5	2.8
16	41.3	2.9
17	44.2	2.9
18	47.1	2.9
19	50.0	3.0
20	53.0	3.0
21	56.0	3.1
22	59.1	3.1
23	62.2	

7. Recherche des édulcorants synthétiques

Liste des réactifs et produits accessoires

- solution saturée de sulfate de sodium
- sulfate de sodium anhydre
- acétate d'éthyle
- éthanol p.a. 96 %
- éthanol-eau 1:1
- acide sulfurique 4 n
- Solutions d'édulcorants synthétiques :

solution de cyclamate : dissoudre 100 mg de cyclamate de soude dans 100 ml du mélange éthanol-eau

solution de dulcine : dissoudre 100 mg de dulcine dans 100 ml d'éthanol

solution de saccharine : dissoudre 100 mg de saccharine dans 100 ml d'éthanol.

Plaques pour chromatographie sur couche mince

Dans un mixer mélanger 9 g de cellulose acétylée à 10 % (MN-300 Ac Macherey-Nagel & Co) 6 g de poudre de polyamide pour chromatographie sur couche mince (Woelm ou équivalent) avec 60 ml d'éthanol jusqu'à suspension homogène. Étendre une couche de 0,25 mm sur des plaques pour chromatographie. Laisser sécher à l'air, puis 10 min. dans une étuve à 70° C. Refroidir les plaques dans un exsiccateur.

— Phase mobile : mélanger 45 vol. de Shell sol. A, *) 6 vol. de n-propanol, 7 vol. d'acide acétique et 2 vol. d'acide formique. A préparer extemporanément. Garnir l'intérieur de la cuvette avec du papier filtre pour favoriser la saturation de l'atmosphère.

— Révélateur : dissoudre 200 mg de dichlorofluorescéine dans 100 ml d'éthanol.

*) Le Shell sol. A, est un mélange d'hydrocarbure commercialisé par Shell.

1038

7.1. Isolement

7.1.1. Dissoudre 20 g de miel dans 40 ml de solution saturée de Na_2SO_4 , y ajouter 10 ml de H_2SO_4 4 n et 10 ml d'éthanol 96 % et mélanger.

7.1.2. Extraire à trois reprises, chaque fois par 25 ml d'acétate d'éthyle.

7.1.3. Réunir les extraits d'acétate d'éthyle, les sécher sur du Na_2SO_4 anhydre et évaporer jusqu'à 4 ml.

7.2. Identification

7.2.1. Déposer 3 μl de la solution obtenue, sur la ligne de départ d'une plaque pour chromatographie sur couche mince.

7.2.2. Déposer ensuite 2 μl des solutions de cyclamate, de dulcine et de saccharine sur la ligne de départ.

7.2.3. Eluer la plaque à l'aide de la phase mobile préparée extemporanément jusqu'à ce que la distance entre la ligne de départ et le front atteigne 10 cm.

7.2.4. Vaporiser le révélateur sur la plaque après évaporation de la phase mobile.

7.2.5. Examiner le chromatogramme ainsi obtenu à la lumière ultraviolette (254 nm).

8. Recherche des antiseptiques**Liste des réactifs**

— Ether acidifié : 98 vol. éther + 2 vol. d'acide acétique glacial

— Sulfate de sodium anhydre

— Solutions témoins : 1 % dans l'éthanol

— Plaques pour chromatographie en couche mince : mélanger 15 g de Kieselgel G et 15 g de Kiesegur G avec 60 ml d'une solution aqueuse à 0,02 % d'Ultraporph. La solution d'Ultraporph W.T. (B.A.S.F.) doit être de préparation récente (conserver dans un flacon brun). Étaler le mélange homogène sur des plaques pour chromatographie sous une épaisseur de 0,25 mm. Sécher les plaques à l'air, puis les activer par chauffage de 30 min. à 110° C.

— Phase mobile : mélanger 100 vol. d'éther de pétrole, 40 vol. de chloroforme et 10 vol. d'acide formique.

— Cuve de chromatographie : saturée avec le solvant mobile.

Révélateurs

— Acide benzoïque :

a) 4,5 ml H_2O_2 (30 %)
4,5 ml d'eau

1039

1 ml solution saturée de Mn SO_4

b) solution 0,3 % Fe SO_4

— Acide sorbique :

a) mélanger 5 vol. d'une solution aqueuse de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 0,5 % + 5 vol. H_2SO_4 0,3 n

b) solution saturée d'acide thiobarbiturique sans l'eau.

— Acide salicylique : solution de FeCl_3 0,1 % dans l'eau

— Acide déhydroacétique : solution de FeCl_3 0,1 % dans l'eau

— Acide bromoacétique :

a) mélanger 3 vol. de solution de rouge de phénol (24 mg rouge de phénol dans 2,4 ml NaOH 0,1 n, compléter à 100 ml avec de l'acétone) et 1 vol. de solution d'acétate sodique (6 g d'acétate de sodium + 3 vol. d'acide acétique, compléter à 100 ml avec de l'eau).

b) solution de chloramine T : dissoudre 25 mg de chloramine T dans 15 ml d'un mélange d'acétone-eau 1 : 1.

— Acide parahydroxybenzoïque et ses esters : réactif de Millon. Dissoudre 10 g mercure dans 10 g acide nitrique fumant. Ajouter 10 à 20 vol. d'eau. Eventuellement, filtrer le dépôt.

8.1. Isolement

8.1.1. Agiter pendant 3 minutes, 50 ml de la solution préparée selon 1.3. avec 50 ml d'éther acidifié.

8.1.2. Laisser se séparer les couches et décanter la couche étherée sur filtre. Répéter l'extraction à l'aide de 30 puis de 20 ml d'éther acidifié.

8.1.3. Sécher les extraits étherés réunis sur du Na_2SO_4 anhydre. Filtrer. Evaporer jusqu'à 5 ml environ.

8.2. Identification

8.2.1. Sur la ligne de départ de la plaque chromatographique, déposer en traits de 1,5 cm de long 20 μl de la solution obtenue. Déposer de façon identique sur un même trait 10 μl de la solution d'acide benzoïque, 5 μl de la solution d'acide déhydroacétique et 3 μl des autres témoins.

8.2.2. Développer la plaque avec la phase mobile jusqu'à ce que le front de solvant atteigne 15 cm au-dessus de la ligne de départ. Retirer la plaque, laisser sécher à l'air. Développer une deuxième fois de la même manière.

8.2.3. Examiner la plaque sous lumière U.V. (366 nm). Localiser les spots.

8.2.4. Révélation des chromatogrammes

1040

Acide benzoïque : vaporiser avec la solution a ; sécher et vaporiser avec la solution b. L'acide benzoïque donne une tache brune sur fond blanc.

Acide sorbique : vaporiser avec le mélange $K_2Cr_2O_7 + H_2SO_4$, sécher la plaque à l'étuve, vaporiser la solution d'acide thiobarbiturique, chauffer à nouveau. L'acide sorbique donne une tache rose.

Acide salicylique : vaporiser avec la solution de chlorure ferrique. L'acide salicylique donne une coloration violette.

Acide déhydroacétique : vaporiser avec la solution de chlorure ferrique. L'acide déhydroacétique donne une coloration jaune sur fond blanc.

Acide monobromacétique : exposer la plaque 10 min. à des vapeurs d'ammoniaque ; chauffer 10 min. à 100° C pour éliminer l'excès d'ammoniaque. Vaporiser le mélange rouge de phénol, acétate sodique puis directement la solution de chloramine T. L'acide monobromacétique donne une tache bleue sur fond jaune.

Acide p. hydroxybenzoïque et ses esters : vaporiser le réactif de Millon et chauffer à l'étuve. L'acide p. hydroxybenzoïque et ses esters donnent une tache rouge.

8.2.5. Remarques générales

1) Il est préférable de vaporiser les réactifs en très faible quantité. Si la réaction n'est pas suffisamment nette, chauffer à l'étuve à 100° C. Si nécessaire recommencer la vaporisation, suivie de chauffage une deuxième et même une troisième fois.

2) Vaporiser le réactif spécifique uniquement sur la zone du chromatogramme où peut se trouver l'antiseptique recherché ; couvrir le reste de la plaque.

3) Examiner les plaques sous U.V. longueur d'onde 366 n.m.

9. Propriétés fermentatives

Réactifs

— Solution tampon (pH = 5,3) : dissoudre 43,5 g d'acétate de sodium ($CH_3COONa \cdot 3H_2O$) dans de l'eau distillée fraîchement bouillie, ajouter 4,5 ml d'acide acétique glacial et compléter à 250 ml avec la même eau distillée. Cette solution peut se conserver longtemps.

— Solution de chlorure de sodium 0,5 mol. : dissoudre 2,92 g de NaCl dans de l'eau distillée fraîchement bouillie et compléter à 100 ml. Cette solution ne se conserve que quelques jours (moisissures).

— Solution d'amidon 2 % : (utiliser pour la préparation de ce réactif de l'amidon soluble préparé et standardisé selon 9.1 à 9.4.) Peser une quantité d'amidon correspondant à 2,000 g de matière desséchée ; l'introduire dans un ballon jaugé de 100 ml. Ajouter 5 ml de solution tampon et environ 75 ml d'eau distillée. Mettre l'amidon en suspension dans le liquide et chauffer dans un bain-marie bouillant pendant 5 min.

1041

Au début du chauffage le ballon est continuellement agité en lui imprimant un mouvement de rotation jusqu'à ce que l'amidon soit dissout. Refroidir et compléter au trait de jauge.

Conservation : 24 heures.

- Acide chlorhydrique 1 n.
- Acide chlorhydrique 0,1 n.
- Solution d'iode 0,02 n.
- Solution d'iode 0,0007 n.

Dans un ballon jaugé de 100 ml dissoudre 4 g d'iodure de potassium au moyen d'une petite quantité d'eau distillée bouillie. Y ajouter 0,70 ml de solution d'iode 0,1 n, mélanger et compléter au trait de jauge avec de l'eau distillée bouillie.

Conservation : quelques jours.

9.1. Préparation de l'amidon soluble

9.1.1. Dans un récipient conique plongé dans un bain-marie et muni d'un réfrigérant à reflux, faire bouillir pendant 1 heure, 20 g de fécule de pommes de terre en présence d'un mélange de 100 ml d'éthanol à 95 % et 7 ml d'acide chlorhydrique 1 n. Refroidir, filtrer sur creuset filtrant (porosité 90 — 150 μ) et laver à l'eau jusqu'à ce que l'eau de lavage ne donne plus de réaction des chlorures. Essorer à fond et sécher l'amidon à l'air à 35° C.

9.2. Détermination de la teneur en humidité de l'amidon soluble

9.2.1. Peser exactement une quantité voisine de 2 g d'amidon soluble, répartir en couche mince sur le fond d'un pèse-filtre ($\varnothing$ 5 cm).

9.2.2. Sécher pendant 1½ h à 130° C. Laisser refroidir dans un exsiccateur et peser à nouveau. La perte de poids rapportée à 100 g constitue la teneur en humidité.

9.3. Détermination de l'indice de bleuissement de l'amidon soluble

9.3.1. Introduire dans un ballon jaugé de 100 ml une quantité d'amidon soluble correspondant à 1,000 g de matière sèche. Ajouter 80 ml d'eau et 2,5 ml de solution-tampon et mettre en suspension. Chauffer ensuite le ballon en le plongeant dans un bain-marie bouillant durant 5 minutes. Agiter continuellement par rotation jusqu'à ce que l'amidon soit dissout. Refroidir et compléter jusqu'au trait de jauge.

9.3.2. Introduire successivement dans un ballon jaugé de 100 ml environ 75 ml d'eau distillée, 1,0 ml d'acide chlorhydrique n et 1,5 ml de solution d'iode 0,02 n. Ensuite, ajouter sous agitation continue et au moyen d'une pipette jaugée 0,5 ml de solution d'amidon selon 9.3.1, compléter au trait de jauge, mélanger soigneusement et laisser reposer pendant 1 h à l'abri de la lumière.

1042

9.3.3. Après 60 à 80 minutes mesurer l'extinction E_1 en cuvette de 2 cm à la température de 20° C et à la longueur d'onde de 575 nm. Porter la cuvette à la température de 20° C en la plaçant dans l'eau du thermostat immédiatement avant la mesure.

9.3.4. Effectuer en même temps un essai identique à blanc (sans amidon). Mesurer l'extinction E_2 . L'indice de bleuissement de l'amidon soluble examiné est égal à $E_1 - E_2$.

9.4. Préparation de l'amidon standard

On obtient des amidons possédant des indices de bleuissement différents en utilisant des féculs de pommes de terre de provenances différentes ou en variant le temps de chauffage ou la concentration d'acide chlorhydrique. En mélangeant des amidons d'indices de bleuissement différents, préparer un échantillon standard possédant un indice de bleuissement de $1 \pm 0,1$.

9.5. Détermination de l'indice diastasique (I.D.)

L'I.D. correspond au nombre d'unités d'amylase présentes dans 1 g de miel. Une unité correspond à la quantité d'enzyme (α -amylase) qui, en 1 heure de temps, hydrolyse 0,010 g d'amidon jusqu'au stade final fixé (transmission 50 %).

9.5.1. Remarques :

- a) Utiliser de l'eau distillée fraîchement bouillie pour toutes les préparations.
- b) Garnir la partie supérieure des pipettes d'un tampon d'ouate afin d'éviter toute contamination par des traces de salive.

9.5.2. Préparation de la solution de base à 20 % de miel

Peser dans un petit béccher 5,00 g de l'échantillon de miel préparé selon 1.1 et mélanger avec un peu d'eau.

Ajouter 2,5 ml de tampon acétate et transvaser dans un ballon jaugé de 25 ml.

Ajouter 1,5 ml de solution de NaCl et compléter au trait. Pour la détermination de l'I.D. utiliser toujours une solution de miel fraîchement préparée (depuis 6 h au maximum).

9.6. Détermination du volume final

9.6.1. Le volume final doit être déterminé à l'avance ; il a une valeur constante propre pour chaque préparation d'amidon.

9.6.2. Faire une solution d'amidon diluée en ajoutant au moyen d'une pipette 5 ml de solution d'amidon 2 % à 10 ml d'eau et mélanger.

9.6.3. Pipeter 5,0 ml d'acide chlorhydrique 0,1 n dans une éprouvette bouchée émeri de 50 ml (ou un tube à essai bouché émeri de même contenance).

1043

9.6.4. Ajouter 0,5 ml de solution d'amidon diluée selon 9.6.2. et, au moyen d'une pipette contrôlée, en agitant constamment par rotation, 5,0 ml de solution d'iode 0,0007 n.

9.6.5. D'une burette de 50 ml, ajouter par portions successives la quantité d'eau nécessaire pour obtenir une solution possédant une extinction de 1,75 à 1,77.

9.6.6. Mesurer l'extinction, après chaque addition d'eau, en cuvette de 2 cm à la température de 20° C et à la longueur d'onde de 575 nm, et par rapport à un essai à blanc obtenu en diluant 5,0 ml de solution d'iode approximativement au volume final présumé.

Après chaque mesure, réserver le contenu de la cuvette dans l'éprouvette. Après chaque addition d'eau, rincer la cuvette avec la nouvelle solution obtenue. Faire attention de ne perdre aucune goutte de liquide.

9.6.7. Pour contrôle répéter l'essai comme suit :

ajouter successivement à 5,0 ml d'acide chlorhydrique 0,1 n, 0,5 ml de solution d'amidon diluée 9.6.2., ensuite le volume d'eau déterminé selon 9.6.5. à 9.6.6. Ajouter enfin en agitant 5,0 ml de solution d'iode 0,0007 n.

9.6.8. Laisser cette solution au repos et à l'abri de la lumière pendant 1 heure, remplir la cuvette et la placer dans l'eau du thermostat à 20,0° C jusqu'à ce que le contenu de la cuvette atteigne cette température.

9.6.9. Déterminer l'extinction. Corriger le volume final si nécessaire.

9.7. Détermination de la teneur en amylase

9.7.1. Pipeter dans une éprouvette bouchée émeri de ± 25 ml, 10,0 ml de solution de miel à 20 % selon 9.5.2.

9.7.2. Remplir une autre éprouvette avec la solution d'amidon à 2 %.

9.7.3. Placer les deux éprouvettes fermées dans l'eau du thermostat à 40,0° C (lester au moyen de plomb).

9.7.4. Quand les deux solutions ont la même température, ajouter au moyen d'une pipette 5,0 ml de la solution d'amidon 2 % aux 10 ml de la solution de miel, bien agiter et noter le temps (initial).

9.7.5. Après des périodes de temps déterminées (toutes les 2 à 6 minutes selon le pouvoir enzymatique), pipeter au moyen d'une pipette de 1 ml, 0,50 ml du mélange en réaction, les introduire dans un cylindre de 50 ml bouché émeri ou un tube à essai de même capacité, contenant déjà 5 ml d'acide chlorhydrique 0,1 n. (L'action enzymatique est immédiatement interrompue par l'acide chlorhydrique).

9.7.6. Noter chaque fois les temps de réaction correspondants.

1044

9.7.7. Ajouter ensuite la quantité d'eau déterminée selon 9.6.7. ; mélanger et ajouter en agitant continuellement 5,0 ml de la solution d'iode 0,0007 n.

9.7.8. Répéter l'opération sur les prélèvements prévus en 9.7.5. jusqu'à ce que l'ajoute d'iode ne donne plus qu'une coloration jaune-brun (la transmission est alors environ 60 à 70 %).

9.7.9. Après mélange laisser reposer les cylindres pendant 1 heure à l'abri de la lumière.

9.7.10. Faire un essai à blanc avec les mêmes réactifs mais en prenant 0,5 ml d'eau au lieu de la solution de miel.

9.7.11. Mesurer les extinctions comme décrit en 9.3.3. et 9.3.4. Traduire les lectures en transmission.

9.8. Calcul de l'indice diastasique (I.D.)

9.8.1. Porter sur du papier millimétré les temps de réaction en minutes par rapport aux transmissions. (Dans l'intervalle compris entre 35 et 70 % de transmission les points sont pratiquement en ligne droite).

9.8.2. Lire le temps de réaction (t) correspondant à une transmission de 50 %. Pour le déterminer avec une exactitude suffisante, il convient de faire les mesures à 3 ou 4 points entre 35 et 70 % de transmission.

9.8.3. L'indice diastasique est alors :

$$\text{I.D.} = \frac{60}{t} \cdot \frac{0,10}{0,01} \cdot \frac{1,0}{2,0} - \frac{300}{t}$$

t = temps de réaction en minutes nécessaire pour atteindre une transmission de 50 %. (Voir définition sous 9.5. Le mélange en réaction contient 0,1 g d'amidon et 2,0 g de miel).

Les propriétés fermentatives sont considérées comme intactes si l'indice diastasique est égal ou supérieur à 8.

10. Détermination de l'hydroxyméthylfurfural (HMF) par colorimétrie selon Winckler

Réactifs :

— Solution d'acide barbiturique : Peser dans un ballon jaugé de 100 ml, 500 mg d'acide barbiturique, séché au préalable à 105° C et ajouter 70 ml d'eau. Placer le ballon au bain-marie jusqu'à dissolution de l'acide barbiturique. Laisser refroidir et compléter au trait de jauge, avec de l'eau. Conserver la solution au frigo.

— Solution de p-toluidine : dissoudre 10,0 g de p-toluidine p.a. dans environ 50 ml d'isopropanol en chauffant légèrement au bain-marie. Introduire cette solution dans un ballon jaugé de 100 ml et ajouter 10 ml d'acide acétique glacial. Laisser refroidir et compléter au trait

1045

de jauge avec de l'isopropanol. La solution se conserve en flacon brun, au frigo. A renouveler après 3 ou 4 jours.

10.1 L'ensemble des opérations suivantes doit s'effectuer en une heure au maximum.

10.2. Préparer une solution mère en dissolvant dans de l'eau distillée désaérée 10 g de miel préparé selon 1.1 et en complétant à 50 ml dans un ballon jaugé avec la même eau distillée désaérée.

10.3. Prendre deux éprouvettes et introduire dans chacune d'elles au moyen d'une pipette 2,0 ml de la solution de miel, puis y ajouter 5,0 ml de solution de p-toluidine. Ajouter avec une pipette 1,0 ml d'eau dans l'éprouvette n° 1 et agiter. Ajouter avec une pipette 1,0 ml de solution d'acide barbiturique dans l'éprouvette n° 2, agiter et déclencher simultanément un chronomètre compte secondes.

10.4 Introduire rapidement les solutions en cuvettes de 1 cm dans le spectrophotomètre réglé à la longueur d'onde de 550 nm. Lire les extinctions de la solution 2 par rapport à la solution 1 de minute en minute pendant 4 à 5 minutes à partir de l'adjonction de la solution barbiturique.

10.5 La courbe des extinctions en fonction du temps doit présenter un maximum entre 2 et 4 minutes. Soit A cette extinction maximum.

10.6. La teneur en HMF mg/100 g s'obtient par le calcul suivant :
$$A \times 19,2$$

Le HMF est considéré comme étant absent si le résultat ne dépasse pas 4 mg/100 g.

11. Filth-test

Réactif :

— Acide nitrique p.s. 1,37.

11.1. Dissoudre 200 g du miel préparé selon 1.2., dans 200 ml d'eau chaude acidifiée par 5 ml de HNO_3 .

11.2 Filtrer ensuite directement, par aspiration, sur papier filtre de 7 cm à filtration rapide.

Rincer par la plus petite quantité possible d'eau chaude et examiner le filtre au microscope.

12. Colorants

L'examen est effectué conformément à la Recommandation M (65) 4 du Comité de Ministres de l'Union économique Benelux relative à l'application d'une méthode de référence Benelux pour la recherche et l'identification des colorants synthétiques, solubles dans l'eau, présents dans les denrées alimentaires.

1046

13. Pollen

Faire un examen microscopique.

14. Examen microbiologique

14.1. Moisissures

A l'examen macroscopique, la surface du miel ne peut pas révéler la présence de moisissures.