

Analyse directe des sucres dans des mélanges complexes miels de Madagascar par ^{13}C RMN assistée par ordinateur avec première détection et quantification du D-glucitol

Ramamonjy Manoelson TIANASOA^{1*}, José Toussaint RAZAFINDRABE²,
Lygie RANDRIAMBOLA¹ et Amélie RAHARISOLOMALALA³

¹Laboratoire de Chimie Structurale, Département de Chimie Minérale et Chimie Physique,
Faculté des Sciences BP 906, Université d'Antananarivo, 101 Antananarivo, Madagascar

²Laboratoire de Chimie Physique des Macromolécules, Département de Chimie Minérale et Chimie Physique,
Faculté des Sciences BP 906, Université d'Antananarivo, 101 Antananarivo, Madagascar

³Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et de Chimie Bioorganique, Département de Chimie
Organique, Faculté des Sciences BP 906, Université d'Antananarivo, 101 Antananarivo, Madagascar

* Correspondance, courriel : rtianaso.manoelson@gmail.com

Résumé

Utilisant la méthode d'analyse directe des mélanges complexes sans prétraitement par RMN du carbone-13 assistée par ordinateur nous avons pu quantifier directement les constituants en sucre des huit échantillons de miel dont cinq proviennent de Madagascar et trois de France. Outre le D-glucose et du D-fructose, douze oligosaccharides minoritaires avec le D-glucitol ont été identifiés et quantifiés, comptant pour 60-81% en masse des miels étudiés. A notre connaissance, grâce à cette approche, le D-glucitol a pu être pour la première fois détecté et quantifié dans du miel. Ceci n'a pas été possible auparavant avec les méthodes classiques de chromatographie et de spectrométrie de masse. En plus, l'accord avec la littérature des calculs des équilibres tautomériques obtenus par cette méthode des isomères des sucres majoritaires et minoritaires démontre sa validité.

Mots-clés : *RMN du carbone-13, mélanges complexes, miels, sucres, oligosaccharides, D-glucitol, équilibre tautomérique.*

Abstract

Computer-Assisted ^{13}C -NMR Direct Analysis of Madagascar Honey Complex Mixture Sugars with First Detection and Quantification of D-Glucitol

Using the Assisted-Computer ^{13}C NMR complex mixture direct analysis without pre-treatment, we were able to directly quantify the sugar constituents of eight honey samples with five of them from Madagascar and three from France. In addition to the D-glucose and the D-fructose, twelve minor oligosaccharides were identified and quantified along with the D-glucitol, accounting for 60-81% in mass of the honeys studied. To our knowledge, thanks to this method, the D-glucitol was detected and quantified for the first time in honey. This has not been possible before with the classical chromatographic and mass spectroscopic methods.

Moreover, the validity of this NMR method was supported by the good agreement of the ratio obtained in the tautomeric equilibrium of major and minor sugar isomers with those from literature.

Keywords : *¹³C-NMR, complex mixtures, honeys, sugars, oligosaccharides, D-glucitol, tautomeric equilibrium.*

1. Introduction

Issue elle-même des principes de la Chimie durable, la structuration de la Chimie analytique durable repose sur trois concepts : (i) la réduction des quantités de solvants dans le pré-traitement des échantillons ; (ii) la réduction des quantités de solvants et de leur toxicité utilisés dans l'étape de mesure et (iii) le développement des méthodes analytiques directes ne nécessitant pas des solvants ou des réactifs [1]. La RMN en tant que méthode physique d'analyse, non invasive, représente en elle-même des caractéristiques désirées vers une chimie analytique durable. On peut citer l'hémetisation des procédures et des opérations analytiques ainsi que la réduction de l'échelle de détermination pour la réduction de perte des solvants et réactifs ainsi que les risques professionnelles d'exposition. La RMN a été utilisée pour l'analyse des constituants du miel en particulier pour l'analyse des sucres. Le miel est un mélange complexe constitué majoritairement de deux monosaccharides, le fructose et le glucose dont les teneurs totales peuvent varier considérablement de 42 à 85%, 146 de di- et trisaccharides (jusqu'à 22 composés) pour une teneur globale entre 2-15% [2]. Ce sont alors des solutions aqueuses sursaturées de sucre où l'eau est présente à une teneur variant de 14-20%.

Les concentrations en ces sucres majoritaires gouvernent avec la teneur en eau l'activité de l'eau a_{H_2O} qui empêche la fermentation des miels sous l'action des levures sur les sucres et l'oxydation des alcools correspondants en acides [3]. Ces concentrations en sucre, le taux d'humidité, contrôlent aussi avec la température, la viscosité des miels qui est également un paramètre physico-chimique et sensoriel important pour leur commercialisation [4]. Par ailleurs, face aux fraudes et aux risques de contaminations diverses, l'authentification des miels et le contrôle de leur qualité deviennent d'autant plus importants que les miels constituent des apports alimentaires et nutritifs appréciés et très répandus dans le monde. L'analyse des sucres dans les miels qui a démarré vers les années 50 avec les chromatographies sur papier [5] en passant sur les chromatographies sur couche mince s'est évoluée vers les techniques de CPG en couplage ou non avec la SM [6]. Ces dernières méthodologies sont toutefois pour la grande majorité handicapées par les étapes de dérivation des sucres et les problèmes de coélution des dérivés [7].

Les techniques de HPLC qui se sont développés par la suite se sont heurtées aux problèmes de rupture de colonne avec greffage aminé [8] conduisant au développement de la HPLC à échange d'anion utilisant du détecteur amperométrique pulsé [9]. L'analyse quantitative en RMN du carbone-13 en analyse des sucres dans les aliments a été introduite par Coxon [10], Rathbone [11], ou Tamate [12], suivie par celle de Low [13] dans domaine des miels. Les travaux de Mazzoni [14] apparus plus tard, font alors suite aux protocoles d'analyse par la RMN de carbone-13 développés par Casanova et son équipe au laboratoire de Chimie et Biomasse de l'Université de Corse à Ajaccio depuis 1994 [15]. Ils se basent sur l'analyse directe par carbone-13 des mélanges complexes naturels sans aucune préparation préalable. Tianasoa a utilisé extensivement ces techniques pour l'analyse directe des mélanges complexes de résines de pin de Madagascar et des mélanges complexes de sucres dans les miels [16]. De la même façon, Razafindrabe *et coll.* les ont utilisés pour l'analyse des sucres dans les vins d'origine de Madagascar [17]. Dans la foulée, Razafindrabe et Tianasoa ont publié la première identification du glycérol parmi les mélanges complexes de sucres dans les vins [18].

Nous croyons savoir qu'aucune étude portant sur la composition en sucre des miels provenant de Madagascar n'a jamais été entreprise. Cet article présente alors la première investigation dans ce domaine que nous avons entreprise avec la RMN de carbone-13 assistée par ordinateur qui s'apparente aux techniques de la chimie analytique durable.

2. Méthodologie

2-1. Analyse directe des mélanges complexes par RMN du carbone-13

En général, deux facteurs majeurs sont responsables de la réponse non uniforme des noyaux de carbone-13 : (i) le temps de relaxation longitudinale T_1 des carbones, et (ii) les variations des effets NOE. Une relaxation totale des tous les carbones de l'ensemble des molécules supposées présentes dans le mélange est obtenue par un angle d'impulsion de 90° combinée à un délai d'attente égale à 5-7 fois T_1 du temps de relaxation le plus long. L'application simultanée mais coûteuse de ces paramètres avec découplage en créneaux inversés pour la suppression des effets NOE ont été pratiquées comme étant la séquence standard de la quantification par RMN du carbone-13. Pour y pallier, les travaux de Ng [19] et Kalinowski [20] mettaient en œuvre des séries rapides d'impulsion courte. Utilisant l'équation 1, on obtient alors les séquences optimales pour la minimalisation des différences d'aimantation des différents de carbone du mélange avec des T_1 différents avec le meilleur rapport Signal/Bruit dans le minimum de temps possible.

$$\frac{S}{B} = \frac{M_0 [1 - e^{(-D/T_1)}]}{\sqrt{D} [1 - e^{(-D/T_1)} \cos \alpha]} \quad (1)$$

2-2. Approche de l'analyse quantitative de Casanova

L'approche de l'analyse quantitative de Casanova et coll. s'est inspirée des travaux de Ng et Kalinowski, mais à l'opposé des techniques mentionnées ci-dessus, elle repose sur l'observation expérimentale qu'une *différence vraiment significative* de l'effet NOE sur les intensités des carbones ne se produit qu'entre les carbones quaternaires et les carbones protonés. On laisse alors l'effet NOE jouer son rôle principal qui produit une augmentation du rapport signal/bruit d'environ 200%. Ainsi on compense partiellement la faible sensibilité de la RMN ^{13}C permettant d'enregistrer des spectres dans un délai raisonnable. Théoriquement cet effet peut avoir une incidence différente en fonction du carbone considéré. Cependant, les plus gros écarts d'intensité ont lieu entre les carbones portant des hydrogènes et ceux qui n'en portent pas. On ne tient pas donc jamais compte de l'intensité des carbones quaternaires dans les calculs quantitatifs. Par ailleurs les facteurs d'accroissement NOE ne sont manifestement pas très différents pour les carbones protonés car lorsqu'on fait la moyenne des intensités de ces carbones on s'aperçoit que l'écart type est toujours faible ce qui indique que les accroissements d'intensités dus à l'effet NOE est comparable pour les carbones pris en compte dans les calculs de quantification. L'expérience a montré que l'utilisation des séquences d'impulsion intermédiaire avec des angles variant de 30° à 45° apparaît comme étant la meilleure approche pour la quantification des molécules dont les temps de relaxation des atomes T_1 varient beaucoup entre eux. Ces considérations expérimentales utilisées avec la séquence de découplage CPD WALTZ-16 constituent la base technique des analyses directes des mélanges complexes naturels du laboratoire de Chimie et Biomasse où Castolla et coll. ont utilisé séquence d'angle d'impulsion de 45° pour la quantification des triterpènes de squelette différente présents dans des extraits dichlorométhaniques [21]. Une expérience RMN permet alors d'optimiser le S/B et l'angle α de l'équation 1 en fonction de la classe de ces composés selon la **Figure 1**.

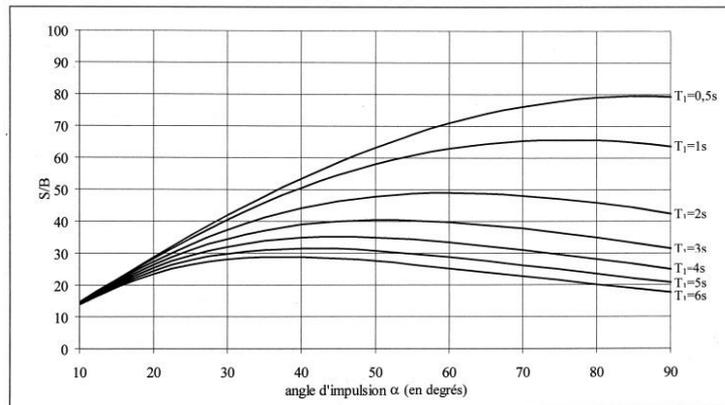


Figure 1 : Optimisation de S/B en fonction de l'angle d'impulsion

Dans la foulée, Rezzi a trouvé le meilleur compromis trouvé pour l'angle d'impulsion la valeur égale à 30° pour l'analyse des constituants des résines de pin [22].

2-3. Protocole pour l'analyse quantitative directe par RMN ^{13}C assistée par ordinateur

Trois principaux paramètres directement accessibles par le logiciel d'aide à l'identification déterminent la caractérisation des constituants d'un mélange (Figure 1): (i) le nombre de pics observés par rapport au nombre de pics attendus pour chaque molécule; (ii) le nombre de superposition de pics qui peuvent se produire quand deux carbones appartenant à deux molécules différentes ont fortuitement le même déplacement chimique; (iii) les variations des déplacements chimiques des carbones dans le spectre du mélange par rapport aux valeurs de référence ($\Delta\delta$). (Figure 2).

Trois étapes sont nécessaires pour la mise au point de l'analyse qualitative et particulièrement de l'analyse quantitative: (i) création et enrichissement de bibliothèques informatisées des spectres de référence enregistrés au laboratoire et décrits dans la littérature; (ii) Adaptation d'un protocole expérimental qui permette de réaliser une quantification correcte des constituants en tenant en compte les contraintes techniques en séquence RMN ainsi que les contraintes coûts (temps d'analyse); (iii) Validation du protocole par l'analyse sur des mélanges artificiels des composés de haut degré de pureté.

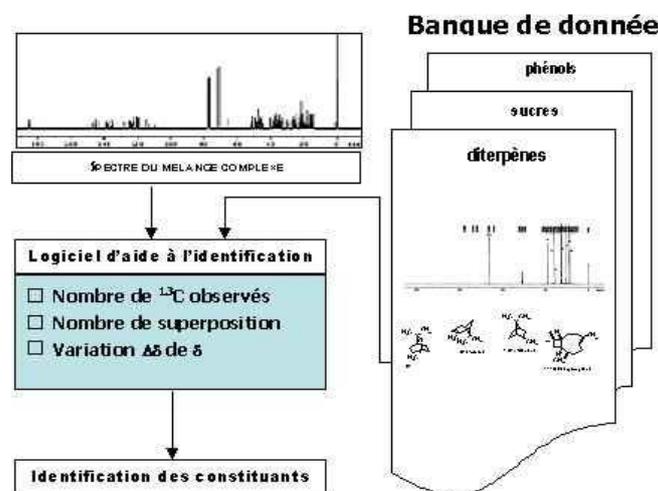


Figure 2 : Protocole expérimentale d'analyse des mélanges complexes par RMN du carbone-13

2-4. Calcul quantitatif et méthode de validation

Le calcul quantitatif se base sur l'intégration des pics protonés, non superposés et parfaitement résolus des spectres, réalisée à partir de la *moyenne* des intégrales sélectionnées (A_c) pour chaque molécule des constituants du mélange afin d'éviter des variations d'impacts éventuelles d'effet NOE entre les différents signaux de la molécule. Pour chaque moyenne calculée, on teste la moyenne des écart-types pour valider les mesures. L'expérience a montré que l'utilisation des séquences d'impulsion intermédiaire avec des angles variant de 30° à 45° apparaît comme étant la meilleure approche pour la quantification des molécules dont les temps de relaxation des atomes T_1 varient beaucoup entre eux. On quantifie chacun des constituants du mélange par la mesure de l'intégration de leurs signaux par rapport à une *référence interne* de quantité connue que l'on ajoute dans le mélange. La moyenne des intégrales des pics est donc pour une molécule donnée : $A_c = \frac{\sum_1^n A_i}{\sum_1^n n_i}$ (1); n_i étant le nombre de pics protonés, non superposés et parfaitement résolus pour une molécule donnée parmi les constituants du mélange (1); l'écart-type E est donnée par la relation : $E_c = (A_i)$; et l'écart moyen défini en % par : $E_c = 100 \cdot A_c / E$; pour une mesure valide : $E_c \leq 10\%$. On peut procéder ainsi à l'application de la formule des % moyen en masse de chaque constituant. Alors, la comparaison des intégrations des signaux des composés et de la référence interne permet de calculer la masse de chacun des constituants du mélange selon la formule de *l'équation (2)*:

$$m_c = \frac{\chi A_c \times M_c \times m_R}{A_R \times M_R} \quad (2)$$

m_c : masse calculée du composé; A_R et A_c : aires du ou des carbones pris en compte respectivement pour la référence interne et pour le composé considéré; m_R : quantité ajoutée (mg) de référence interne; M_R et M_c : masses molaires de la référence interne et du composé considéré. Le coefficient χ dépend de la symétrie de la référence interne utilisée: 2 pour le diglyme et 4 pour le dioxane.

3. Matériel et méthodes

Collecte des miels. Le miel d'eucalyptus (miel1, Ambositra), le miel de Morondava (miel 4) ont été achetés sur le marché local d'Antananarivo (août 2005), tandis le letchis (miel2, 2004) et le miel de forêt (miel3, 2005) ont été fournis par le département de Biologie Végétale de la Faculté des Sciences de l'Université d'Antananarivo. Le miel Michaud (miel5) a été acheté en Corse (Novembre 2005) et les autres miels dont le miel Elisa (miel6), le miel de bruyère (miel7) et le miel de maquis (miel8) ont été fournis par des apiculteurs de Ferrals Les Montagnes (Owen, décembre 2005). Tous ont été conservés sans précautions spéciales jusqu'à utilisation pour analyse.

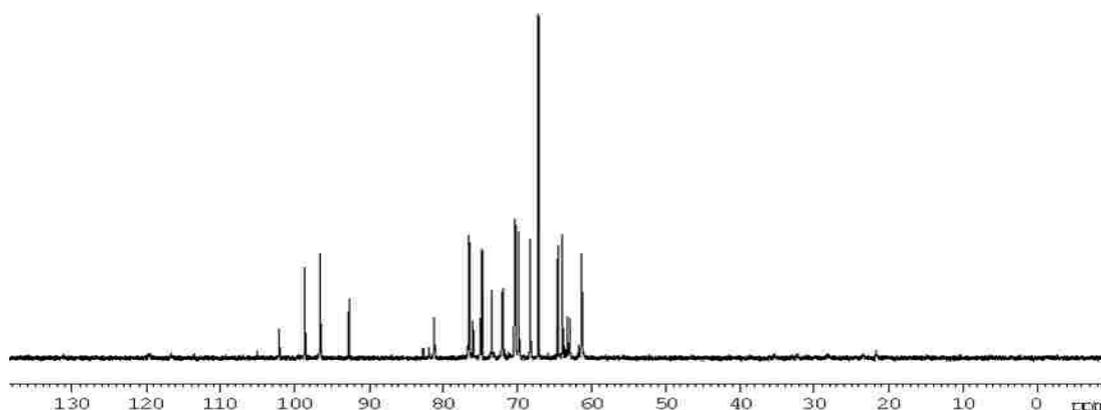
Préparation des échantillons pour analyse. Environ 50-70 mg de miel (pesé et noté soigneusement) sont dissous dans un bêcher dans du mélange H_2O/D_2O 95:5 en volume au l'on ramène ensuite à 0,5 ml après transfert dans un tube RMN de 5mm. On ajoute avec précaution quelques gouttes de dioxane-1,4 (5-7 mg) et dont on note soigneusement la masse qui va servir de référence interne pour l'enregistrement du spectre RMN. Pour les miels 1-5 (miels locaux et miel Michaud), on laisse le mélange s'équilibrer à la température ambiante de la salle ($21^\circ C$) avant l'enregistrement RMN. Pour les miels de bruyère et le miel de maquis, les spectres ont été immédiatement enregistrés après la préparation des échantillons

Analyse par RMN du carbone-13. Tous les spectres RMN ont été enregistrés sur appareil Bruker Avance 400 opérant à 9,4 T (400,13 pour ^1H ; 100,63 MHz pour ^{13}C) avec une sonde de 5mm et à la température ambiante de 21°C. Les déplacements chimiques (δ) sont donnés en ppm par rapport au dioxanne-1,4 comme pris comme référence interne à ($^{13}\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$; 67,12 ppm). Les enregistrements sont effectués avec une largeur spectrale complète de 250 ppm avec découplage standard en mode CPD (Composite Phase Decoupling) avec les paramètres suivants : largeur d'impulsion = 2,67 μs (angle de Ernst égal à 30°); temps d'acquisition = 1,3 s (64K de données); temps de relaxation : 1 s (donnant un temps total de répétition de 2,3 s). La résolution digitale est de 0,183 Hz/pt ; le nombre d'accumulation est de 3000 pour un échantillon. Les données de FID sont multipliées par une fonction exponentielle (1,0 Hz) avant transformée de Fourier.

Identification et quantification des sucres. Une liste de données RMN du carbone-13 des différents sucres avec les différents oligosaccharides contenus dans des miels d'origine botanique et géographique différente a été préparée à partir des données des bases de données informatiques et des fiches manuelles du Laboratoire de Chimie et Biomasse ainsi que des données provenant des recherches effectuées sur Internet (SDBS ; NMRSHFTDB). L'identification et la quantification des différents sucres ont été alors effectuées à partir de cette liste enregistrée sur simple feuille de calcul Excel en tenant compte des écarts moyens de la moyenne des pics pour chaque sucre identifié. Les calculs des formes tautomériques ainsi que la simulation graphique des spectres s'effectuent sur la même feuille de calcul Excel.

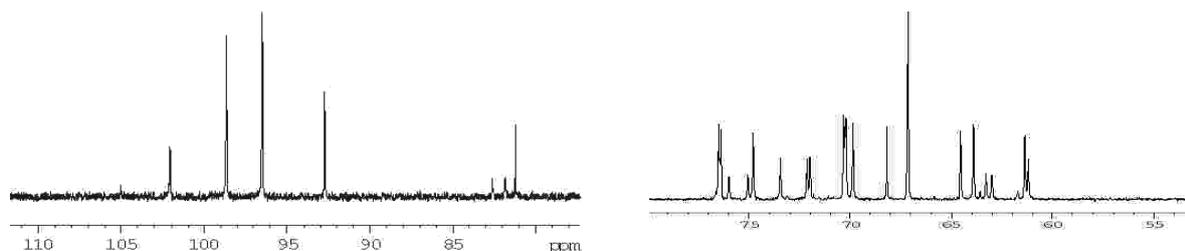
4. Résultats et discussion

L'allure générale des mélanges complexes de sucre dans les miels analysés directement par carbone-13 est exemplifiée par le spectre du miel d'eucalyptus ci-dessous (*Spectre 1*):



Spectre 1 : Spectre RMN carbone-13 du miel d'eucalyptus (Ambositra) à 100,625 MHz

Le spectre 2 ci-dessus montre la région entre 90 et 105 ppm des carbones anomériques et des carbones impliqués dans les liaisons glycosidiques qui forme l'empreinte digitale des sucres.



Spectre 2 : Région des carbones anomériques et **Spectre 3** : région 50-80 ppm des pics des sucres glycosiques du miel / minoritaires du miel avec le pic du dioxane à 67,50 ppm

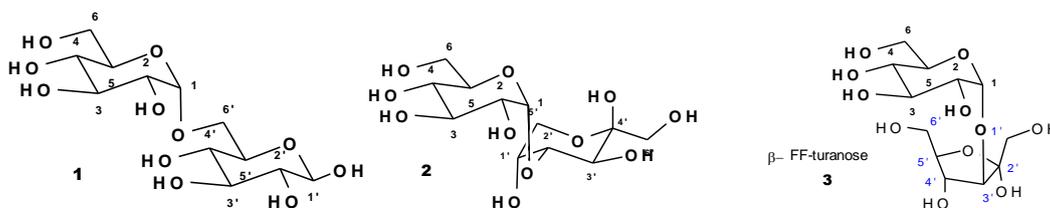
Tableau 1 : Composition en masse des isomères glucidiques identifiées par RMN du 13C

N°	Isomères glucidiques	miel1	miel2	miel3	miel4	miel5	miel6	miel7	miel8
1	α,D-glucopyranose	11,9%	7,4%	6,8%	8,2%	7,9%	8,2%	11,2%	12,9%
2	β,D-glucopyranose	20,3%	12,2%	12,0%	13,6%	13,5%	13,6%	16,8%	15,0%
3	α,D-fructofuranose	1,9%	2,9%	2,4%	1,6%	1,6%	1,6%	1,8%	1,5%
4	β,D-fructofuranose	0,8%	0,6%	0,6%	0,4%	0,4%	0,5%	0,5%	0,3%
5	α,D-fructopyranose	7,2%	11,2%	9,3%	6,8%	6,7%	6,8%	8,0%	6,7%
6	β,D-fructopyranose	22,0%	36,6%	30,7%	21,0%	23,3%	23,4%	27,1%	22,8%
7	α-Maltose	-	-	0,5%	0,6%	0,6%	-	0,5%	-
8	β-maltose	1,2%	0,5%	0,8%	0,9%	0,9%	0,4%	0,8%	0,5%
9	α-isomaltose	-	-	-	0,6%	0,7%	0,4%	0,6%	0,5%
10	β-isomaltose	-	0,6%	0,7%	0,8%	0,9%	0,7%	1,0%	0,7%
11	α-F-F-maltulose	-	-	-	0,5%	0,4%	-	-	0,4%
12	β-F-F-maltulose	-	0,6%	-	0,6%	0,4%	0,4%	0,4%	0,5%
13	β-F-P-maltulose	1,1%	1,2%	0,7%	0,9%	0,8%	0,4%	0,7%	0,6%
14	α-F-F-Turanose	-	0,6%	0,4%	0,4%	0,4%	0,6%	-	-
15	β-F-P-turanose	1,0%	0,5%	0,7%	0,7%	0,7%	0,6%	0,6%	-
16	β-F-F-Turanose	1,0%	0,9%	0,7%	0,8%	0,7%	0,6%	0,7%	0,6%
17	α-G-Nigérose	-	-	-	0,4%	0,5%	0,5%	-	-
18	β-G-nigérose	-	1,0%	-	0,6%	0,5%	0,6%	-	0,5%
19	α-iso-maltotriose	-	-	-	0,5%	0,7%	-	-	-
20	β-iso-maltotriose	-	-	-	0,9%	1,1%	-	-	0,7%
21	Mélézitose	-	0,7%	0,6%	0,7%	0,8%	0,5%	-	0,7%
22	Erlose	-	0,8%	0,6%	0,8%	1,1%	0,5%	1,0%	0,7%
23	D-glucitol	0,7%	0,4%	0,3%	0,3%	0,4%	0,3%	-	-
24	Raffinose	-	0,8%	0,6%	0,3%	0,7%	-	-	0,7%
25	α-gentibiose	-	0,5%	-	-	-	-	-	-
26	β-mélibiose	-	0,9%	-	-	-	-	-	-

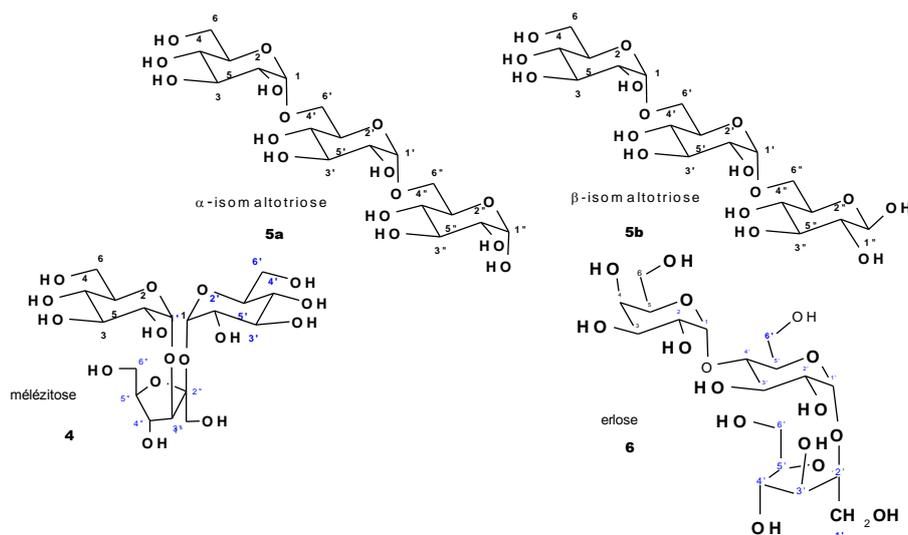
L'inspection des régions entre 40 et 80 ppm sur la liste des déplacements chimiques et surtout celle à gauche du pic du dioxane-1,4 permet de détailler les particularités du miel (*Spectre 3*). Pour l'ensemble des échantillons comprenant les neuf miels d'origines botaniques et géographiques différentes de Madagascar et de France, 26 isomères dont 12 oligosaccharides minoritaires ont été ainsi identifiés et quantifiés. Le D-glucitol a été identifié dans les limites de détection de l'appareil à des concentrations de 0,3% à 0,7% dans six des huit miels étudiés (*Tableau 1*).

Composition glucidique des différents échantillons de miel. Miel 1 (miel d'eucalyptus d'Ambositra, Madagascar); miel2 (miel des forêts de Madagascar); miel3 (miel de letchis de Madagascar); miel4 (miel commercial de Morondava, Madagascar); : miel 5 : miel commercial Michaud de Corse; miel6 :(miel Elisa Ferrals les Montagnes, France); miel7 (miel de bruyère, Ferrals les Montagnes, France); miel8 : (miel de maquis, Ferrals les Montagnes, France).

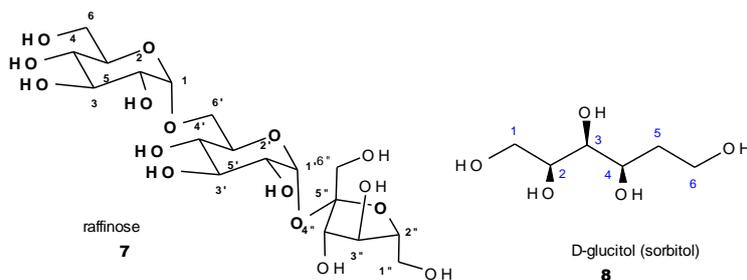
Comme attendu, les différentes formes tautomères des deux sucres majoritaires le D-Glucose et le D-fructose ont été identifiés et quantifiés dans tous les miels étudiés. Il en est de même des disaccharides tels que le β -maltose 1, le β -F-P-maltulose 2 et le β -F-F-turanose 3 tandis que leurs analogues tautomériques n'ont été identifiés que dans une moindre mesure.



Le turanose est un constituant mineur typique des miels qui ne se trouve pratiquement que dans ceux-ci et dont la forme tautomérique majoritaire est le β -F-F-turanose 3. Le turanose est présent en faible quantité de 0 à 3 % suivant l'origine du miel [14]; avec d'autres sucres, il sert d'indicateur de falsification des miels. D'autres diholosides comme l' α -gentibiose 7 (qui se retrouve principalement sous forme d'hétéroside dans la nature) et β -mélibiose 8 (constituant minoritaire dans les miels ou gelées royales) n'ont été détectés que dans le miel des forêts (miel2). Trois trisaccharides le mélézitose 4, l'isomaltotriose 5 et l'erlose 6 ont été identifiés et quantifiés parmi certains de nos échantillons de miel. L'erlose se trouve dans la gelée royale et les miels; il a le même pouvoir sucrant que le sucrose, cependant moins cariogène que ce dernier. L'ensemble de leur pourcentage peut être pris comme critère de discrimination géographique.



Le raffinose 7 qui se trouve dans un nombre important de légumes comme, les haricots, choux communs, asperge ou dans le soja etc.[20], a été identifié comme un oligosaccharide dans les miels. Un alditol, le D-glucitol 8 a été le dans les miels locaux (1-4) et le miel5.



Le D-glucitol est un sucre majeur chez les espèces ligneuses de la famille *Rosaceae*. Il possède des multiples usages en agro-alimentaire et en pharmacie et est bien connu comme substituant du saccharose dans les régimes des diabétiques. A notre connaissance, c'est pour la première fois que le cet alditol a été identifié et quantifié dans les miels. Les calculs des formes tautomériques obtenus par la technique RMN du carbone-13 utilisée ici permet d'une part, valider cette méthode et d'autre part, d'appliquer le calcul pour les tautomères des sucres minoritaires qui ne sont pas été identifiables (**Tableau 2**).

Tableau 2 : Ratio des formes tautomériques à l'équilibre du glucose et fructose dans les échantillons de miel (1-8)

Formes tautomères	Miels								Réfs.	
	miel1	miel2	miel3	miel4	miel5	miel6	miel7 ^a	miel8 ^a	Mazzoni [14]	Horton [21]
α,D-glucopyranose	37,0%	37,7%	37,6%	37,6%	36,9%	37,5%	40,0%	46,3%	37,5%	34,0%
β,D-glucopyranose	63,0%	62,3%	62,4%	62,4%	63,1%	62,5%	60,0%	53,7%	62,5%	66,0%
α,D-fructofuranose	5,9%	5,7%	5,6%	5,4%	5,1%	5,1%	4,9%	4,8%	5,2%	5,0%
β,D-fructofuranose	22,6%	21,8%	21,7%	22,8%	20,9%	21,0%	21,4%	21,4%	22,7%	23,0%
α,D-fructopyranose	3,2%	1,1%	1,4%	1,2%	1,2%	1,5%	1,4%	1,0%	1,9%	2,4%
β,D-fructopyranose	68,3%	71,4%	71,3%	70,5%	72,9%	72,4%	72,3%	72,8%	70,2%	70,0%

Nous avons eu recours aux répartitions obtenues à partir des termes correctifs des résultats expérimentaux provenant des travaux de Mazzoni [14] des mélanges artificiels de sucres purs pour compléter les données pour la teneur des isomères minoritaires des oligosaccharides (**Tableau 3**).

Tableau 3 : Répartition expérimentale et calculée des formes tautomériques des oligosaccharides

sucres	miel1	miel2	miel3	miel4	miel5	miel6	miel7	miel8	Réf. ^a
α—Maltose	39,4%	<i>39,4%*</i>	39,0%	39,2%	39,4%	<i>39,4%*</i>	39,6%	<i>39,4%*</i>	39,7%
β—maltose	60,6%	<i>60,6%*</i>	61,0%	60,8%	60,6%	<i>60,6%*</i>	60,4%	<i>60,6%*</i>	60,3%
α—isomaltose	-	<i>41,8%*</i>	<i>41,8%*</i>	41,5%	43,4%	32,9%	36,8%	40,9%	42,1%
β—isomaltose	-	<i>58,2%*</i>	<i>58,2%*</i>	58,5%	56,6%	67,1%	63,2%	59,1%	57,9%
α—F-F-maltulose	<i>8,2%*</i>	<i>8,2%*</i>	<i>8,2%*</i>	26,4%	26,1%	<i>8,3%*</i>	<i>8,6%*</i>	26,8%	8,9%
β—F-F-maltulose	<i>29,1%*</i>	<i>29,1%*</i>	<i>29,1%*</i>	29,0%	24,5%	<i>45,9%*</i>	<i>34,4%*</i>	32,7%	26,7%
β—F-P-maltulose	<i>62,7%*</i>	<i>62,7%*</i>	<i>62,7%*</i>	44,6%	49,4%	<i>45,9%*</i>	<i>57,1%*</i>	40,5%	64,4%
α—F-F-Turanose	<i>17,7%*</i>	29,5%	22,9%	22,9%	23,0%	34,3%	<i>17,7%*</i>	<i>17,7%*</i>	17,0%
β—F-P-turanose	<i>38,9%*</i>	24,1%	38,6%	38,6%	39,1%	31,4%	<i>39,9%*</i>	<i>38,9%*</i>	40,9%
β—F-F-Turanose	<i>43,4%*</i>	46,4%	38,6%	38,6%	37,8%	34,3%	<i>42,4%*</i>	<i>43,4%*</i>	42,1%
α—G-Nigérose	-	<i>39,1%*</i>	-	-	47,6%	46,3%	-	<i>39,1%*</i>	38,6%
β—G-nigérose	-	<i>60,9%*</i>	-	-	52,4%	53,7%	-	<i>60,9%*</i>	61,4%
α—iso-maltotriose	-	-	-	-	37,5%	-	-	<i>36,4%*</i>	36,4%
β—iso-maltotriose	-	-	-	-	62,5%	-	-	<i>63,6%*</i>	63,6%

Répartition expérimentale et calculée des formes tautomériques des oligosaccharides : *les pourcentages en italique marqués avec l'astérisque * sont calculés à partir des teneurs des isomères qui ont été identifiés et en utilisant les proportions relatives des tautomères issues des travaux de Mazzoni. ^a : valeurs de référence provenant des travaux Mazzoni. La combinaison des résultats expérimentaux avec les termes correctifs des tautomères pour les oligosaccharides permet d'établir une répartition finale des classes de sucres (**Tableau 4**). Outre les deux sucres majeurs : le D-glucose et le D-fructose, l'ensemble des miels 1-8 rendent compte pour 12 types de sucres dont 7 disaccharides, le maltose, l'isomaltose, le turanose et le nigérose, le gentibiose et le mélibiose ; 4 trisaccharides : l'isomaltotriose, le mélézitose et l'erlose et un alditol inédit, le D-glucitol qui a été identifié et quantifié pour la première fois par notre méthode d'analyse directe par RMN du carbone-13.

Le taux en masse de sucre varie de 61% à 82%, le plus élevé étant celui du miel multifloral des forêts de Madagascar. Ce dernier montre aussi la plus grande diversité osidique, l'isomaltotriose en moins, avec 13 constituants identifiés et quantifiés provenant sans doute de l'origine multiflorale du miel. Dans ses études portant sur des échantillons de miel de Corse avec la RMN du carbone-13, Mazzoni [14] a trouvé des pourcentages variant de 60,4 à 71,4% dont le miel de maquis avec 69,3% mais où manquent le mélézitose, l'erlose ainsi que le nigérose mais où l'isomaltotriose a été identifié à une teneur de 2,5%. Notons que certains disaccharides tels que le maltulose et le turanose qui sont difficilement identifiables par les techniques chromatographiques à cause des problèmes de co-élution [23] sont tous résolus dans l'ensemble des huit échantillons. Da Costa Leite *et al.* [24] a considéré que le raffinose pourrait être considéré comme indicateur de miel de nectar ; ceci pourrait se recouper avec le taux relativement faible de mélézitose observé sur les miels (<0,7%) qui est plus élevé dans les miellats.

Tableau 4 : Répartition globale par classe de sucre des miels 1-8

N°	Composés	miel1	miel2	miel3	Miel4	miel5	miel6	miel7	miel8
1	D-Glucose	32,1%	19,7%	18,9%	21,8%	21,4%	21,7%	28,1%	27,9%
2	D-fructose	31,9%	51,3%	43,1%	29,8%	32,0%	32,3%	37,4%	31,3%
3	Maltose	2,0%	0,8%	1,4%	1,4%	1,5%	0,7%	1,3%	0,8%
4	Isomaltose	-	1,0%	1,1%	1,3%	1,6%	1,1%	1,6%	1,1%
5	Maltulose	1,8%	1,9%	1,1%	2,1%	1,6%	0,9%	1,2%	1,4%
6	Turanose	2,4%	2,0%	1,8%	1,9%	1,8%	1,8%	1,6%	1,4%
7	Nigérose	-	1,6%	-	1,0%	1,0%	1,0%	-	0,8%
8	Isomaltotriose	-	-	-	1,4%	1,8%	-	-	1,1%
9	Mélézitose	-	0,7%	0,6%	0,7%	0,8%	0,5%	-	0,7%
10	Erllose	-	0,8%	0,6%	0,8%	1,1%	0,5%	1,0%	0,7%
11	D-glucitol	0,7%	0,4%	0,3%	0,3%	0,4%	0,3%	-	0
12	Raffinose	-	0,8%	0,6%	0,3%	0,7%	-	-	0,7%
13	Gentibiose	-	0,5%	-	-	-	-	-	-
14	Mélibiose	-	0,9%	-	-	-	-	-	-
	Composition sucres totaux	70,9%	82,4%	69,5%	62,9%	65,7 %	60,8 %	72,2 %	67,9 %

Miel1 : miel d'eucalyptus de Madagascar ; miel2 : miel des forêts de Madagascar ; miel3 : miel de letchis de Madagascar ; miel4 : miel de Morondave ; miel5 : miel commercial Michaud de Corse ; miel6 : miel Elisa Ferrals les Montagnes, France ; miel7 : miel de bruyère, Ferrals les Montagnes, France ; miel8 : miel de maquis, Ferrals les Montagnes, France.

Dans les miels qui peuvent être considérés comme des solutions d'eau *supersaturées* de sucre, la tendance à se cristalliser est ainsi un processus naturel qui dépend surtout du rapport des deux sucres majoritaires que sont le D-fructose et le D-glucose. Plus particulièrement, White [25], a montré que la vitesse de cristallisation dépend de la teneur en glucose du miel vu que celui-ci a une solubilité presque deux fois moindre que le D-fructose. Ainsi, les miels avec du glucose ayant une teneur inférieure à 28% ou un rapport glucose/eau < 1,7 restent plus longtemps liquide (miel d'eucalyptus 1). Le *tableau 5* résume les teneurs en glucose et en fructose et les différents paramètres associés.

Tableau 5 : Comparaison des paramètres dérivés des teneurs en glucose et fructose

Paramètres	miel1	miel2	miel3	miel4	miel5	Miel6	miel7	miel8
G	32,1%	19,7%	18,9%	21,8%	21,4%	21,7%	28,1%	27,9%
F	31,9%	51,3%	43,1%	29,8%	32,0%	32,3%	37,4%	31,3%
F+G	64,0%	70,9%	62,0%	51,6%	53,4%	54,0%	65,5%	59,2%
F/G	0,99	2,61	2,29	1,37	1,49	1,49	1,33	1,12

L'examen des proportions F+G montre que le miel des forêts 2 (70,9%), le mail d'eucalyptus 1 (64,0%), le miel de letchis 3 (62,0%) et le miel Elisa Ferrals les Montagnes, France 7 sont en accord avec les limites des normes de l'Union Européenne (<60%) [26].

5. Conclusion

La méthodologie d'analyse directe des mélanges complexes des sucres dans les miels par carbone-13 se présente comme une originale approche qui réduit l'utilisation des matières premières, des étapes intermédiaires dans leur prétraitement et de l'utilisation des solvants pouvant être toxiques. Elle se base sur la détermination des bases de données spectrales des composés déjà connus pour leur identification et leur quantification dans ces mélanges naturels. Ainsi, nous avons pu quantifier directement les constituants en sucre des huit échantillons de miel comptant pour 60-81% en masse des miels étudiés. Notre méthode par la RMN du carbone-13 a été validée par la vérification des équilibres tautomériques du D-Glucose et du D-fructose ainsi que des douze autres oligosaccharides identifiés et quantifiés. Mais grâce à cette méthode, le D-glucitol a pu être pour la première fois détecté et quantifié dans six de nos huit échantillons de miel, ce qui n'a pas été possible auparavant avec les méthodes classiques de chromatographie et de spectrométrie de masse. D'autres études sont envisageables pour déterminer la faisabilité de cet alditol comme discriminateur de variabilité spécifique des origines géographiques ou botanique des miels. Nous croyons savoir que ce travail est le premier dans son genre à être entrepris avec les miels locaux provenant de Madagascar.

Remerciements

Nous adressons nos vifs remerciements à l'Agence Universitaire de la Francophonie d'avoir octroyé une bourse pour M. Tianasoa Ramamonjy Manoelson pour le Centre de recherche sur les systèmes physiques de l'environnement de l'Université de Corse pour stage RMN, aux Professeurs Joseph Casanova, Vincent Castola, Ange Bigelli et Felix Toma ainsi que Dr Kai Liu pour leur accueil et accompagnement au Laboratoire de Chimie et Biomasse au moment de ce stage.

Références

- [1] - S. ARMENTA, S. GARRIGUES, M. de la Guardia Green Analytical Chemistry, *Trends in Analytical Chemistry*, 27(6) (2008) 497-511.
- [2] - L. W. DONER, The Sugars of Honey — A Review, *J. Sci. Food. Agric.*, 28 (1977) 443-456.
- [3] - J. CHIRIFE, M. C. ZAMORA, A. MOTTO The correlation between water activity and % moisture in honey: . DONER, The Sugars of Honey — A Review , *J. Sci. Food. Agric.* 28 (1977) 443-456. Fundamental aspects and application to Argentine honeys, *Journal of Food Engineering*, 72 (2006) 287–292.
- [4] - S.YANNIOTIS, S. SKALTSI, S. KARABURNIOTI, Effect of moisture content on the viscosity of honey at different temperatures, *Journal of Food Engineering* 72 (2006) 372–377.
- [5] - S. M. PARTRIDGE, Aniline Hydrogen Phthalate as a Spraying Reagent for Chromatography of Sugars. *Nature* 164 (1949) 443.
- [6] - M.L. SANZ, J. SANZ, I. MARTINEZ-CASTRO, Gas chromatographic–mass spectrometric method for the qualitative and quantitative determination of disaccharides and trisaccharides in honey, *Journal of Chromatography A* 1059 (1-2) (2004) 143–148
- [7] - A.G. MAC INNES D.H. BALL, F.P. COOPER, and J. BISHOP, Separation of carbohydrate derivatives by gas-liquid partition chromatography, *J. Chromatogr.* 1 (1958) 556-557.
- [8] - E. BRONS, J. OLIEMAN, Study of the high-performance liquid chromatographic separation of reducing sugars, applied to the determination of lactose in milk, *J. Chromatogr.* 159 (1983) 79-86.
- [9] - T. R. I. CATALDI, C. CAMPA, I. G. CASELLA, and S.A. BUFO, Determination of Maltitol, Isomaltitol, and Lactitol by High-pH Anion-Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection, *J. Agric. Food Chem.* 47 (1) (1999) 157-163.

- [10] - B. COXON, "Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy of Food-related Disaccharides and Trisaccharides". *Dev. Food Carbohydr.* 2 (1980) 351-390.
- [11] - E. B. RATHBONE, *Analysis of Food Carbohydrates*; Elsevier Applied Science: London, 1985
- [12] - J. TAMATE, J. H. BRADBURY, Determination of Sugars in Tropical Root Crops Using (1NMR Spectroscopy: Comparison with H.P.L.C. Method. *J. Sci. Food Agric.* 36 (1985) 1291-1302.
- [13] - N. H. LOW, T. BRISBANE, G. BIGAM, and P. SPORNS, Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance for the Qualitative and Quantitative Analysis of Structurally Similar Disaccharides, *J. Agric. Food Chem.* 36 (5) (1988) 953-957.
- [14] - V. MAZZONI, Analyse de mélanges naturels par RMN du carbone-13: extraits lipidiques, miels et huiles essentielles, *Thèse de Doctorat de l'Université de Corse* (1998) 232p.
- [15] - A. BIGELLI, F. TOMI, J. CASANOVA, Computer-aided carbon-13 NMR study of phenols contained in liquids produced by pyrolysis of biomass. *Biomass Bioenergy*, 6 (1994) 461-464.
- [16] - S. NG Analysis of Positional Distribution of Fatty Acids in Palm Oil by 13C NMR Spectroscopy, *Lipids* 1985, 20, 778-782.
- [17] - H. O. KALINOWSKI, S. BERGER, S. BRAUN, *Carbon-13 NMR Spectroscopy*, Chap. 2, p. 45, John Wiley & Sons, Chichester (1991).
- [18] - M. TIANASOA RAMAMONJY, Apports des Techniques RMN 1D et 2D aux Analyses structurales. Apports des Techniques RMN du Carbone-13 a l'Analyse Quantitative des Mélanges Complexes D'Intérêts Industriel et Nutritionnel, *Thèse de Doctorat de l'Université d'Antananarivo* (2008) 151 pages
- [19] - J. T. RAZAFINDRABE, Contribution à l'Etude des Vins DE Madagascar par Analyse Directe des Mélanges Complexes des Extraits Utilisant la RMN du Carbone-13 Assistée par Ordinateur, *Thèse de Doctorat de l'Université d'Antananarivo* (2010) 146 pages
- [20] - .T., RAZAFINDRABE *, M. TIANASOA RAMAMONJY, Facile Application de la RMN du Carbone-13 à l'Identification et à la Quantification du Glycérol dans les Vins : Etudes des Vins Provenant de Madagascar, *accepté Décembre 2012 Afrique Science*
- [21] - V. CASTOLA, A. BIGHELLI and J. CASANOVA, Direct qualitative and quantitative analysis of triterpenes using C-13 NMR spectroscopy exemplified by dichloromethanic extracts of cork. *Appl. Spectrosc.* 53 (1999) 344-350.
- [22] - S. REZZI, A. BIGHELLI, V. CASTOLA and J. CASANOVA, Direct Identification and Quantitative Determination of Acids and Natural Diterpenes Using 13-C NMR Spectroscopy : Application to the Analysis of Oleoresin of *Pinus Nigra*, *Applied Spectrosc.* 56 (2002) 312-317.
- [23] - S.R. JOSHI, H PECHHACKER, A WILLIAM and W von der OHE, Physico-chemical characteristics of *A. dorsata*, *A. cerana* and *A. mellifera* honey from Chitwan district, central Nepal », *Apidologie*, 31 (2000) 367-375.
- [24] - T. NAKAKUKI, Present status and future of functional oligosaccharide development in Japan, *Pure and Applied Chemistry* (2002) 74.
- [25] - D. HORTON, Z. WALASZEK, Tautomeric Equilibria of Some Sugars by Partially Relaxed, 13C-Pulse Fourier-transform Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, *Carbohydr. Res.* 102 (1982) 11-22.
- [26] - K. W. SWALLOW , N. H. LOW, Analysis and quantitation of the carbohydrates in honey using high-performance liquid chromatography, *J. Agric. Food Chem.* 38 (9) (1990) 1828-1832.
- [27] - C. LEITE, J. M. TRUGO, L. C. COSTA, L. S. M. QUINTEIRO, L. M. C. BARTH, O. M. DUTRA, Determination of oligosaccharides in Brazilian honeys of different botanical origin. *Food Chemistry* 70 (2000) 93-98.
- [28] - J. WHITE. Composition of American honeys, *Techn. Bull.* N° 1261, US Department of Agriculture (1962).
- [29] - Council of the European Union. Council Directive 2001/110/ec of 20 December relating to honey. Official Journal of the European Communities, 10 (2002) 47-52.