



**NC BIORESSOURCES**

L'innovation est naturelle

Mars 2019

# Recherche de marqueurs chimiques du miel de niaouli

Comparaison des polyphénols contenus dans 7 échantillons de miels de niaouli avec 9 échantillons d'autres miels de Nouvelle-Calédonie

# Contexte et objectifs de l'étude

L'étude des polyphénols de 18 miels présentée dans ce rapport a été commandée par le Centre d'Apiculture (CPA) de l'ADECAL Technopole et fait partie d'un programme de caractérisation des miels locaux et en particulier du miel monofloral de niaouli, en vue de développer la commercialisation de miels monofloraux à plus forte valeur ajoutée.

Cette étude fait suite au rendu d'un rapport bibliographique concernant les différentes techniques d'analyse de la chimie des miels (remis le 30 octobre 2017) et d'un protocole détaillé et budgétisé (remis le 15 décembre 2017) qui suggéraient l'étude des polyphénols et des composés volatils du miels à l'aide de techniques fiables, robustes et applicables avec les outils disponibles localement.

En cohérence avec d'autres analyses de miel sous-traitées à un laboratoire extérieur, le CPA a souhaité s'engager uniquement dans l'analyse des polyphénols dans un premier temps et de mener une étude exploratoire sur un nombre limité de miels.

# Contexte et objectifs de l'étude

L'étude préliminaire dont les résultats sont restitués dans ce rapport avait pour but de:

1. Valider l'efficacité de la méthode d'analyse (extraction, concentration des polyphénol et analyse qualitative et quantitative des différent composés extraits).
2. Offrir une première comparaison des profils chimiques de miels monofloral de niaouli avec ceux d'autres miels (sans niaouli) et mettre en évidence des polyphénols qui pourraient servir de marqueur chimique du miel de niaouli (à valider statistiquement par la suite).

Budget de l'étude (HT): 608 280 xpf

# Modifications du protocole employé

Le protocole d'analyse des extraits enrichis en polyphénols prévoyait l'utilisation d'une HPLC-UV/MS appartenant à l'UNC.

Pendant la période de réalisation de cette étude, cet appareil était indisponible du fait d'une panne et à cause du déménagement des appareils de l'UNC dans leur nouveaux locaux (appareil toujours indisponible).

Pour pallier à l'impossibilité d'analyser les extraits de polyphénols des miels en Nouvelle-Calédonie, NC Bioressources a travaillé avec un laboratoire universitaire partenaire en Suisse.

Ce changement a entraîné : une qualité dans les données d'analyses supérieure aux attentes, mais avec une majoration des coûts d'analyse et un temps de traitement bien supérieur.

# Résumé de l'étude menée

- Extraction spécifique des polyphénols du miel par filtration sur cartouche SPE
- Analyse des extraits enrichis en polyphénols par UHPLC-OrbitrapMS (Univ. Geneve\_Suisse)

*Illustration de la technique:*

<https://www.youtube.com/watch?v=fqfyyravJkA>



# Résumé de l'étude menée

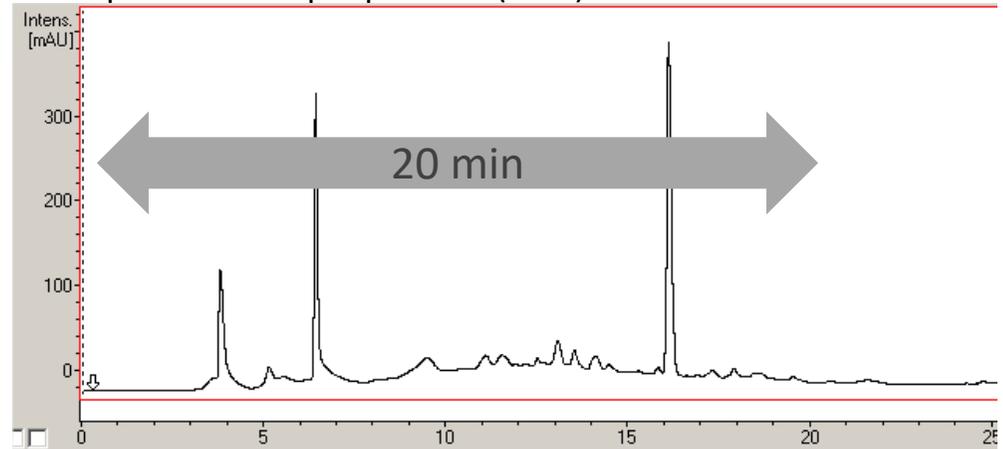
- Extraction spécifique des polyphénols du miel par filtration sur cartouche SPE
- Analyse des extraits enrichis en polyphénols par UHPLC-OrbitrapMS (UNIGE)
- Comparaison statistique des résultats obtenus (2 modes d'ionisation: positif  $\rightarrow$   $[M+H]^+$  et négatif  $\rightarrow$   $[M-H]^-$ )
- Identification des pics correspondant à des marqueurs potentiels du miel de niaouli
- Logiciels utilisés pour le traitement des données:



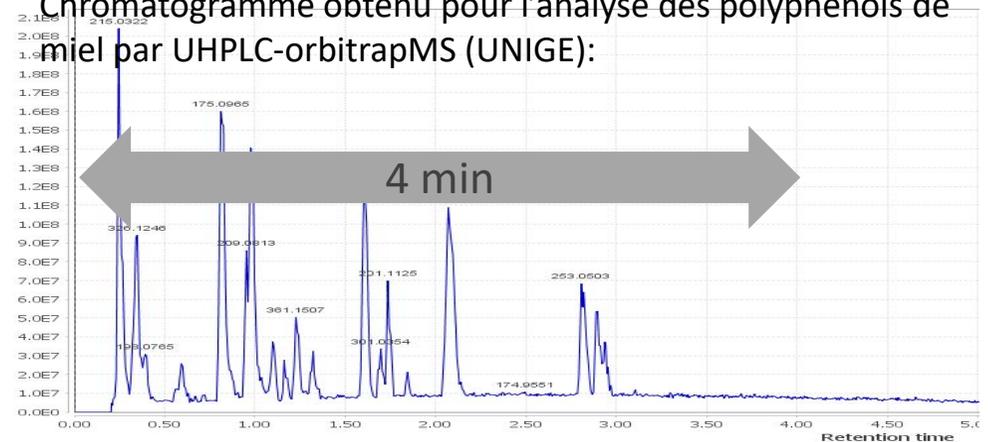
# Intérêt des outils d'analyse modernes

- Rapidité: 40 -> 6min
- Précision & Résolution
- Qualité des données (Masse haute résolution associée a chaque pic)

Chromatogramme obtenu pour l'analyse des polyphénols de miel par HPLC-simplequad MS (UNC):



Chromatogramme obtenu pour l'analyse des polyphénols de miel par UHPLC-orbitrapMS (UNIGE):



# Validation de la méthode utilisée

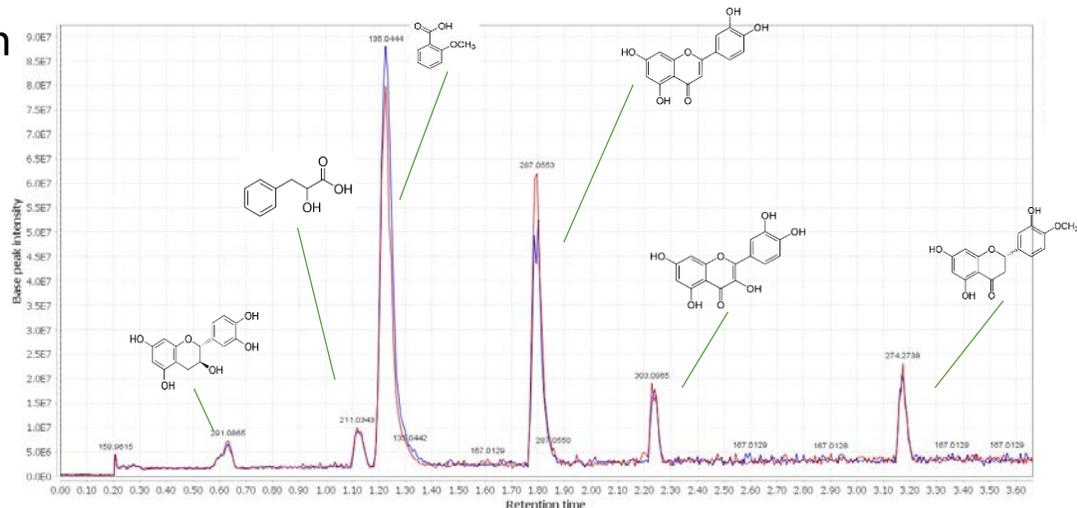
Mélange de 6 standards  
(composés purs commerciaux)  
analysé avant (tracé en rouge sur  
les chromatogrammes) et après  
avoir subit le processus d'extraction  
(tracés bleus sur les  
chromatogrammes)

> complémentarité des détection  
en mode d'ionisation positif et  
négatif

> 73% des standards retrouvés à  
l'issue du processus d'extraction

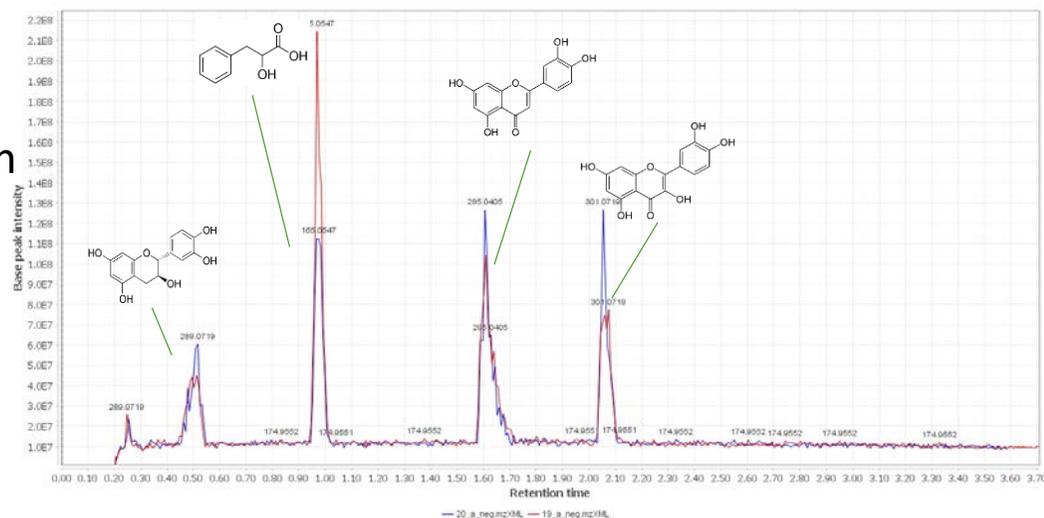
Ionisation

Pos



Ionisation

Neg

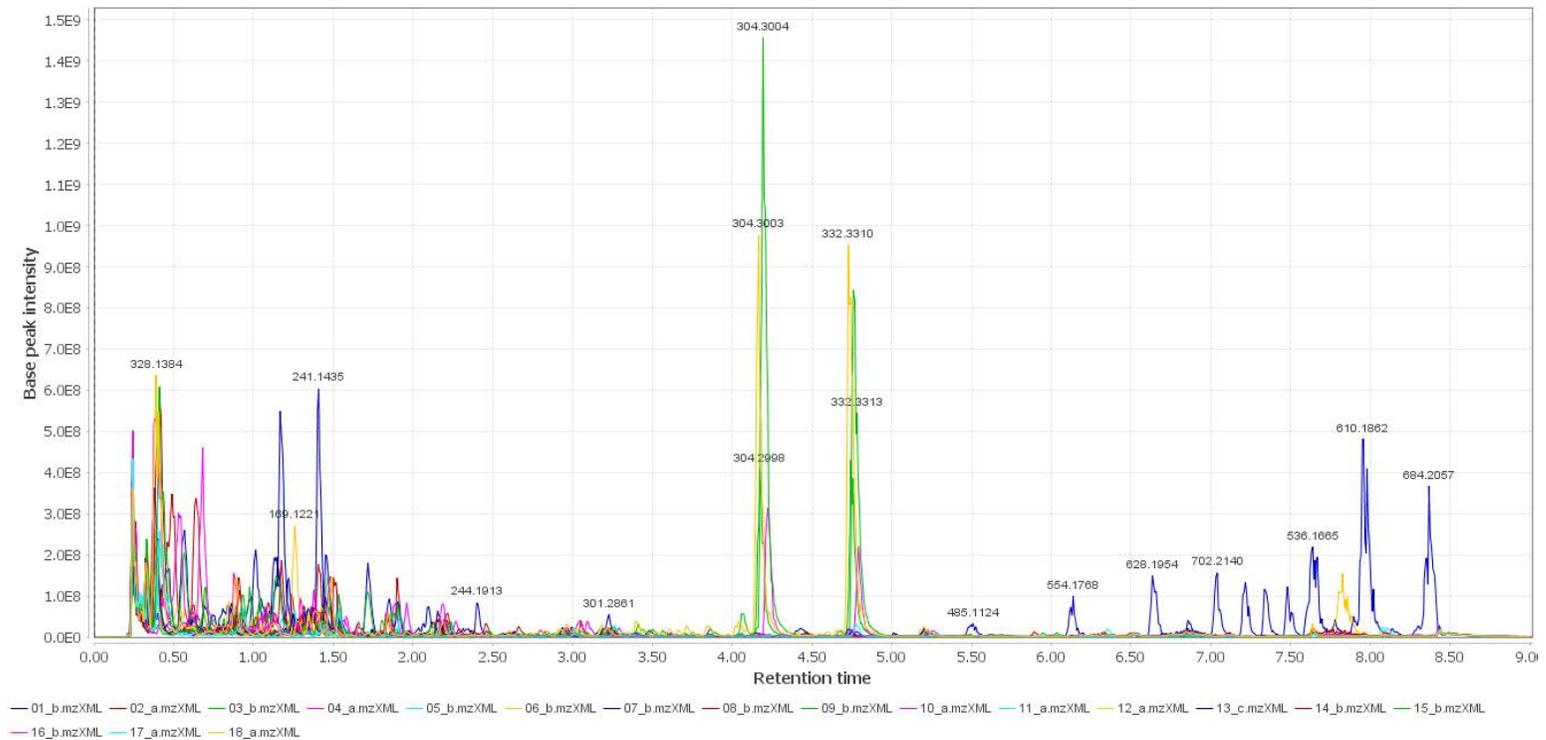


# Echantillons de miels analysés

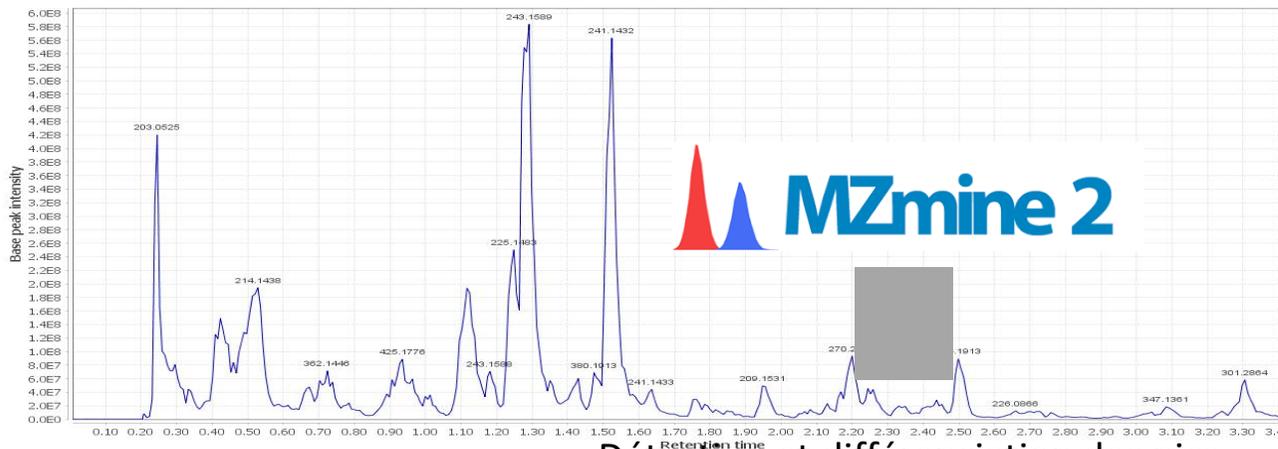
N° analyse LC-MS	Echantillons	N°CPA	Masse extrait polyphénolique Pour 100g de miel	Polyphénols (mg GAE/100g miel) - CARI
	<b>Miels toutes fleurs:</b>			
1	Kingué – Amer - Tomo	1803	0,06	65,8
2	Toutes fleurs Lifou	1804	0,06	52,1
3	Toutes fleurs Lifou	1805	0,11	41,2
4	Toutes fleurs Lifou	1806	0,05	40,7
5	Toutes fleurs Maquis	1815	0,05	
6	Toutes fleurs Lifou	1816	0,05	
7	Toutes fleurs Forêt	1818	0,07	
8	Toutes fleurs Maquis	1820	0,05	
9	Toutes fleurs Nouméa	1821	0,06	
10	Toutes fleurs Lifou	1822	0,05	
	<b>Miels de Niaouli:</b>			
11	Niaouli	1713	0,12	50,7
12	Niaouli	1714	0,05	47
13	Niaouli	1715	0,05	48,7
14	Niaouli	1716	0,04	41,9
15	Niaouli	1717	0,06	
16	Niaouli	1718	0,03	48,5
17	Niaouli	1719	0,09	41,6
18	'Niaouli' (43% petite sensitive;37% niaouli)	1720	0,05	63,3

# Résultats obtenus

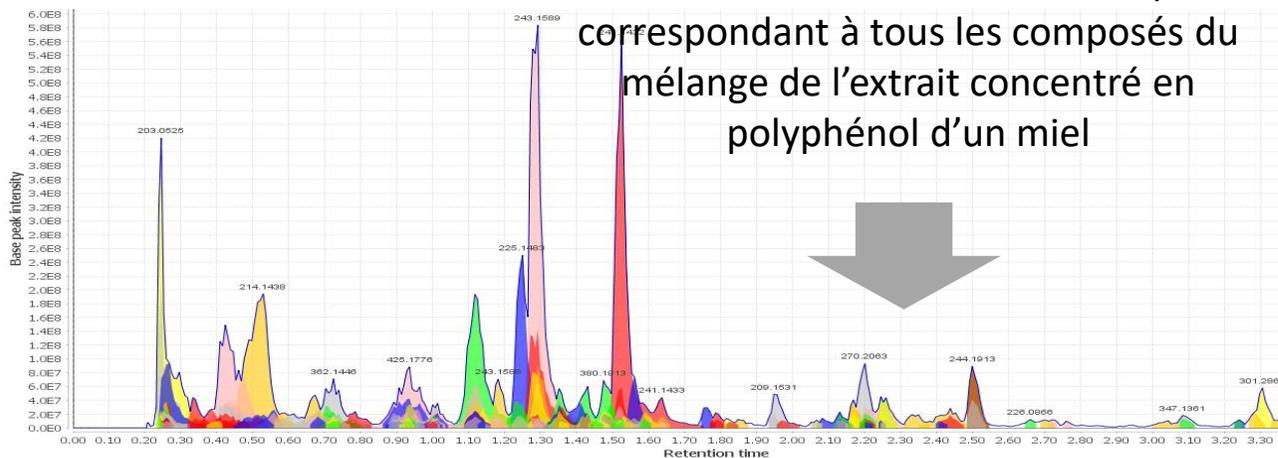
Superposition des chromatogrammes LC-MS de tous les miels analysés  
(mode d'ionisation positif):



# Traitement des données



Détection et différenciation des pics  
correspondant à tous les composés du  
mélange de l'extrait concentré en  
polyphénol d'un miel



- 240 pics détectés en pos
- 195 pics détectés en neg
- chaque pic est caractérisé par:
  - temps de rétention
  - Masse mol (hrms)
  - Masse Fragments
  - Aire du pic (abondance relative des différents composés)

> MATRICE DE DONNÉES

# Traitement des données

Matrice des données sur l'aire des pics détectés dans tous les miels pour comparer les profils de tous les échantillons analysés.

L'aire des pics est proportionnelle à la concentration de la molécule.

L'annotation des pics sur la base de leur masse moléculaire confrontée à la base de donnée des produits naturels NPDB permet une pré-identification

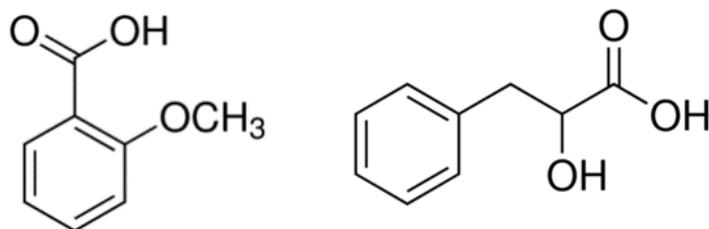
ID	Average		Identity	Peak shape	02_a.mzXML			01_b.mzXML		
	m/z	RT			Status	Height	Area	Status	Height	Area
1	308.1126	0.48	Azaaridone A		●	3.5E8	1.9E9	●		
2	146.0601	0.63	5-Cyclohexene-1,2,3,4-tetrol; ...		●	3.4E8	1.1E9	●	4.4E7	1.0E8
3	203.0525	0.24			●	3.4E8	5.0E8	●	3.6E8	6.2E8
4	365.1052	0.24	Furo[2,3-b]quinoline-4,6,7-trio...		●	2.2E8	3.3E8	●	2.2E8	3.7E8
5	247.1328	1.89	11(7->8)-Abeo-3,8-dihydroxy-1...		●	1.4E8	2.4E8	●	2.0E7	3.2E7
6	328.1388	0.40	1-(1,2-Dihydroxyethyl)-7-carbo...		●	1.3E8	3.7E8	●	2.1E8	5.2E8
7	153.1274	0.89			●	1.1E8	2.9E8	●	2.5E7	6.4E7
8	243.1590	1.17	2,4-Dodecadiene-8,10-diynoi...		●	1.0E8	1.9E8	●	5.5E8	1.4E9
9	360.1497	0.26	Alstoscholarine, (E)-form		●	1.0E8	2.7E8	●	8.4E7	2.2E8
10	241.1436	1.50	2-Heptyl-4-hydroxyquinoline; ...		●	7.5E7	1.4E8	●	6.0E8	1.3E9
11	166.0862	0.41	1-Deoxyglucitol; D-form		●	7.1E7	1.5E8	●	6.7E7	1.1E8
12	241.1434	1.02	2-Heptyl-4-hydroxyquinoline; ...		●	5.8E7	1.4E8	●	2.1E8	7.1E8
13	265.1409	1.18			●	5.4E7	9.5E7	●	1.5E8	4.8E8
14	328.1388	0.26	1-(1,2-Dihydroxyethyl)-7-carbo...		●	4.9E7	5.4E7	●	1.1E8	1.1E8
17	225.1483	1.20	Plantaguanidinic acid		●	4.4E7	9.3E7	●		
20	325.2271	2.20	Broussonetine W		●	4.1E7	7.6E7	●	4.3E7	8.8E7
21	527.1580	0.24			●	4.1E7	6.0E7	●	2.6E7	3.7E7
22	551.2614	1.90			●	4.0E7	4.8E7	●		
24	169.1223	1.31			●	3.9E7	7.2E7	●	3.4E7	5.4E7
28	350.1207	0.40	Holmioside, 5-Deoxy		●	3.2E7	8.0E7	●	5.6E7	1.2E8

-> CSV file pour traitement statistique:  
3 \* 18 échantillons; 1220 MS features

# Traitement des données

Pré-identification des composés détectés sur la base de la masse moléculaire des pics.

- Le miel de niaouli renferme principalement des petits phénols et acides phénols:



- La qualité et la précision des données obtenues dans cette études offrent de grandes perspectives pour l'identification des composés phénoliques des miels.
- Cet aspect du traitement des données pourra être finalisé lors d'une étude ultérieure.

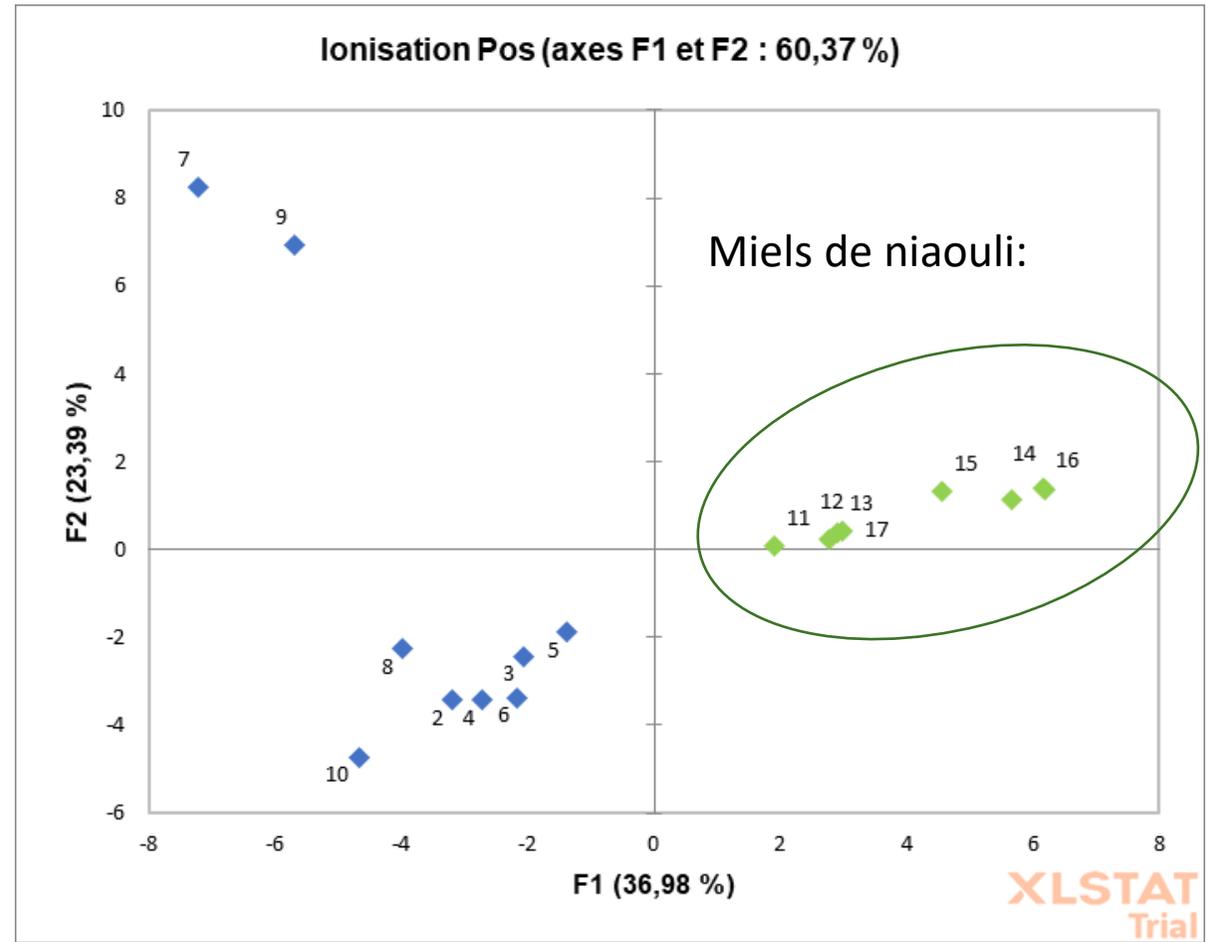
# Résultats

les miels de niaouli sont ils remarquables?

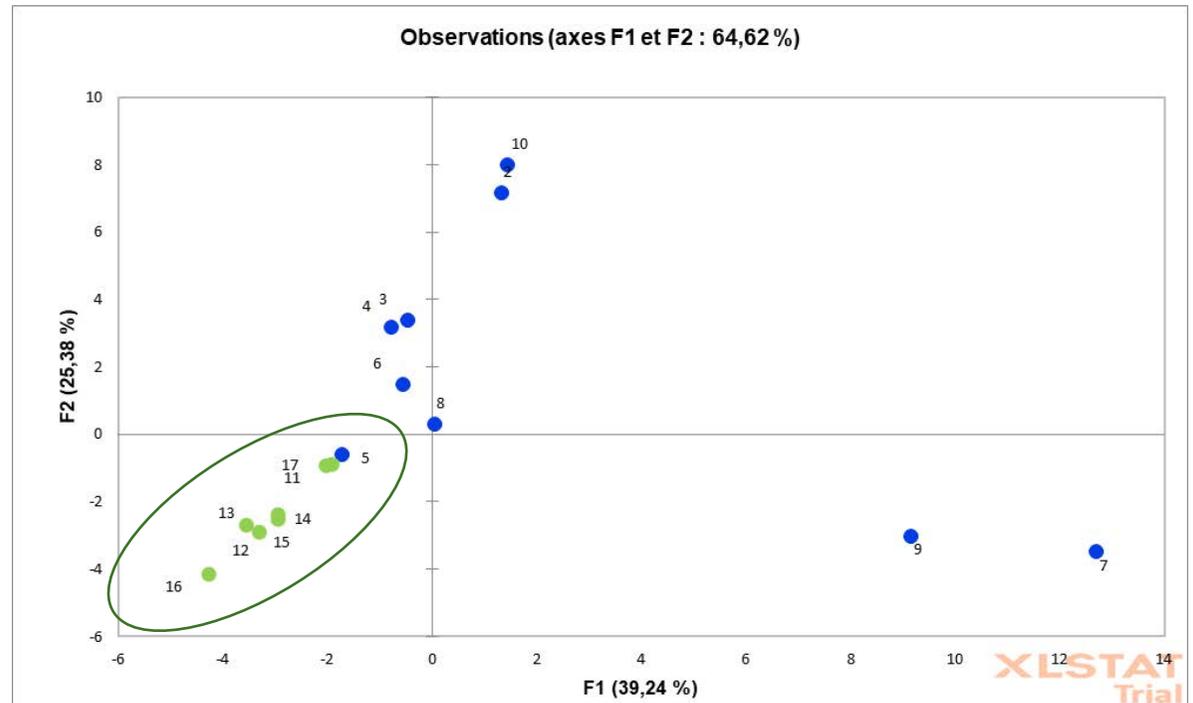
# Résultats

## *ionisation* +

Les premières analyses statistiques portant sur la comparaison des aires des pics détectés en ionisation positive permettent d'isoler un cluster de miels de niaouli

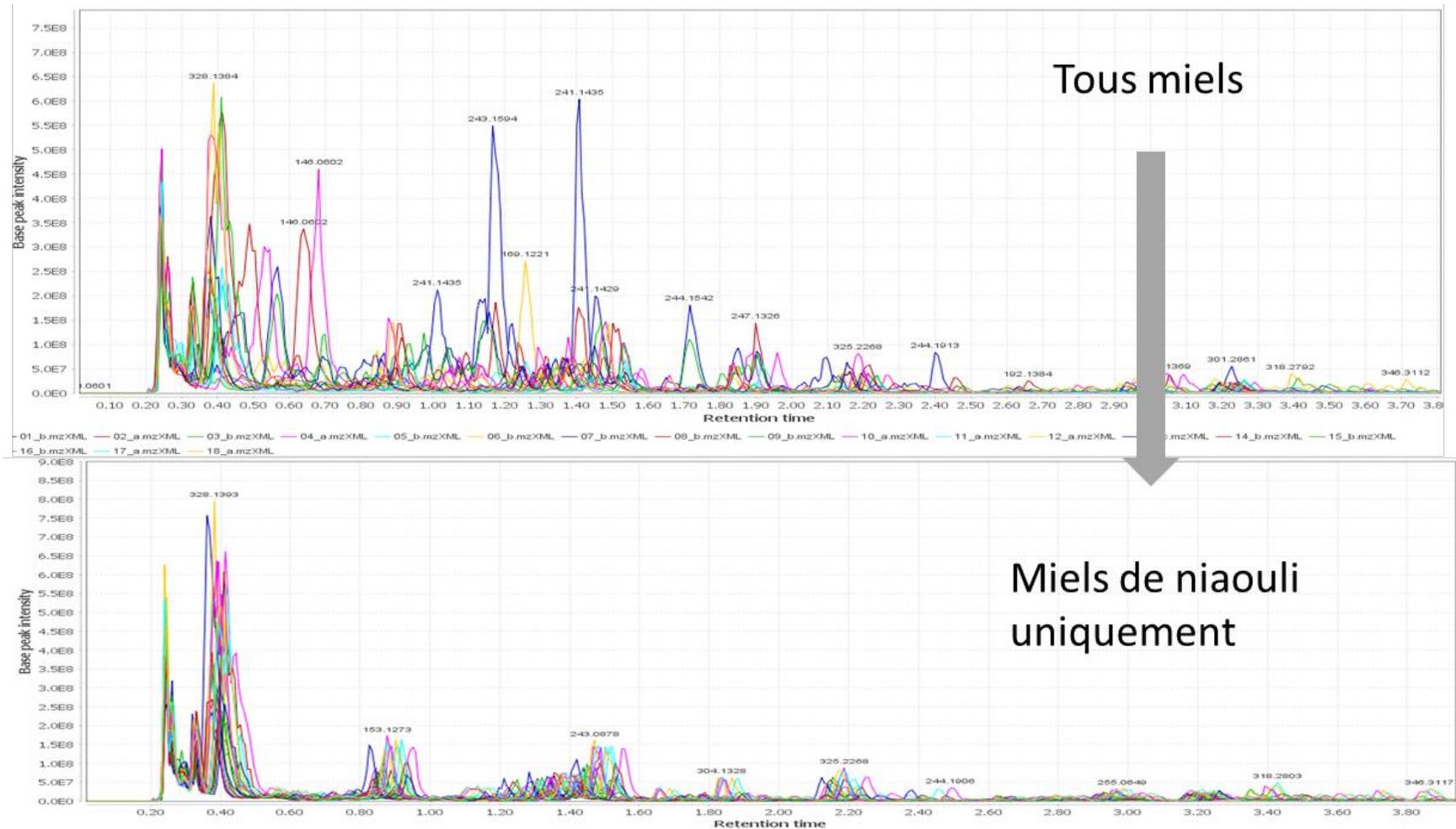


Les miels de niaouli sont moins bien distingués lors des analyses en mode d'ionisation négative



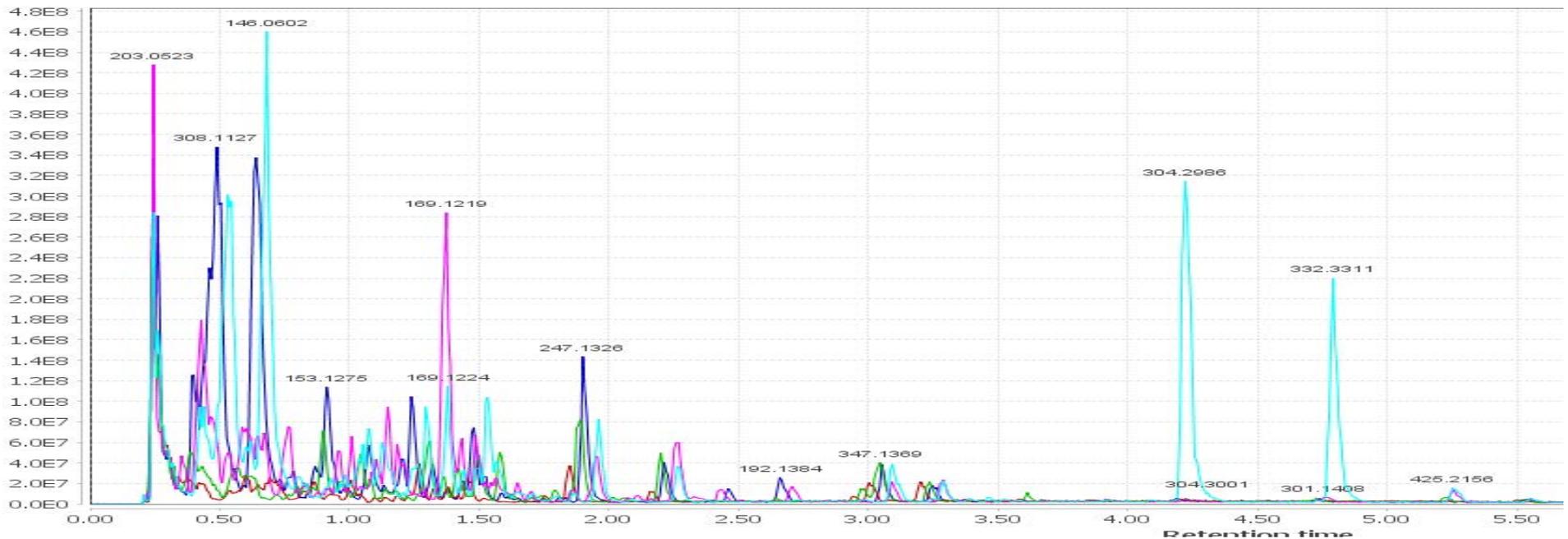


# Signature chimique des miels de niaouli (mode d'ionisation positive):

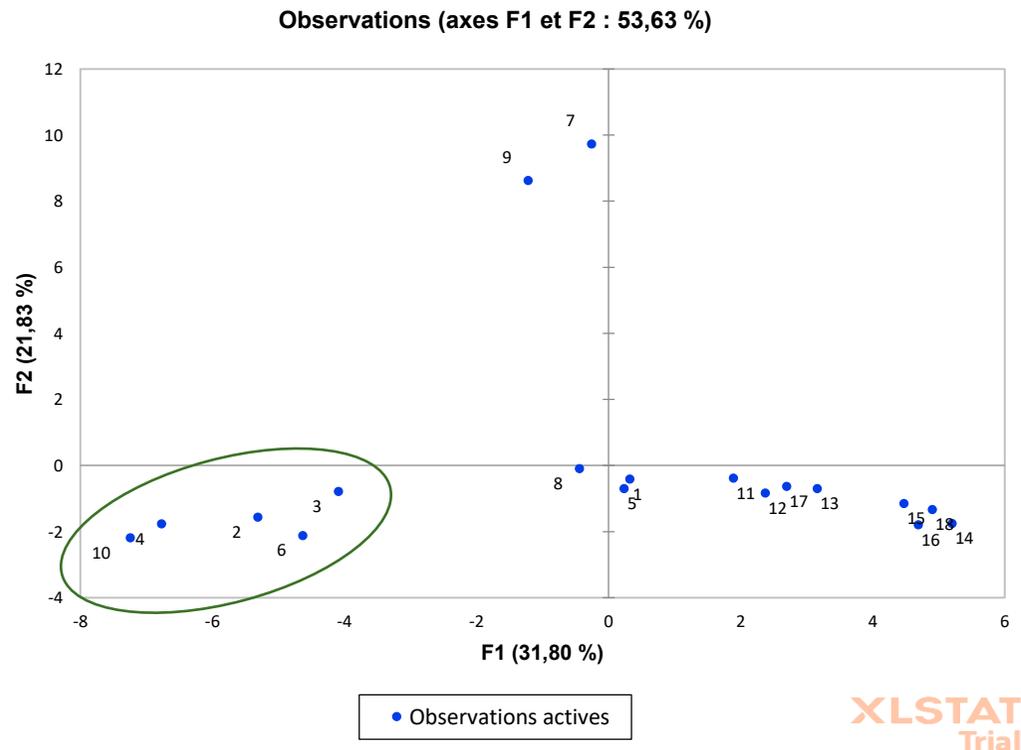


# Résultats

Qu'en est il des miels de Lifou?

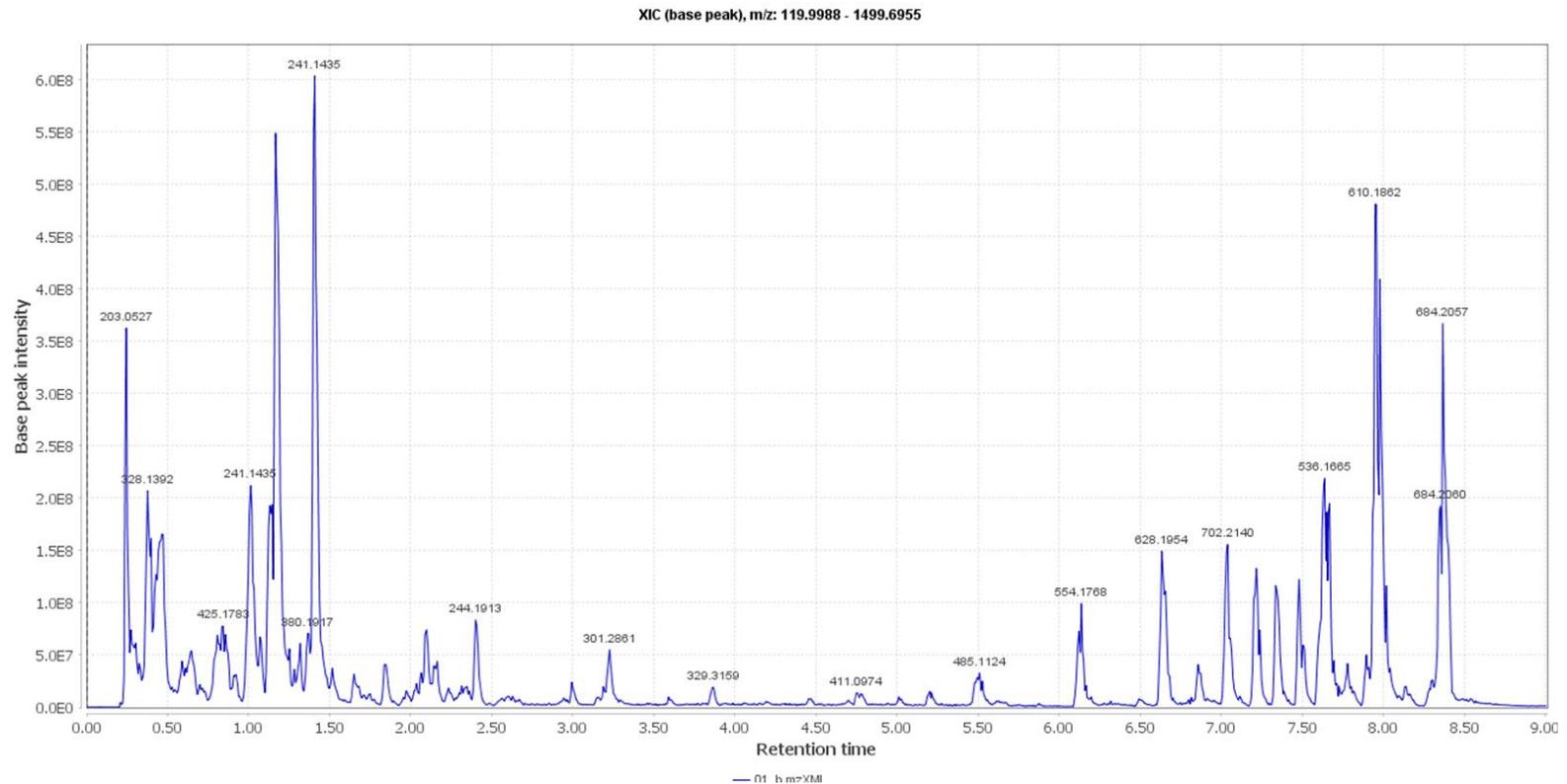


# Ségrégation des miels de Lifou



# Autre miel original:

chromatogramme obtenu par l'analyse du miel de kingué en mode d'ionisation positif: le miel de kingué se caractérise par l'abondance de composés apolaires (à droite du chromatogramme) probablement responsable du caractère amer de ce miel.



# Conclusions

- Méthode d'extraction validée pour les molécules ciblées (petits phénols et flavonoïdes)
- Méthode d'analyse à fort potentiel analytique (robustesse et précision):
- Très prometteur pour l'identification d'un ou plusieurs marqueurs du miel de niaouli.
- Gain analytique pertinent pour la phase exploratoire – alternative locale suffira pour le contrôle qualité.
  
- La distinction entre miels monofloraux de niaouli et autres miels est particulièrement visible en mode d'ionisation positif – notamment de petits acides phénoliques:
  - Pic n°148 :  $R_t=0,30'$ ;  $(M+H)=294,1544$
  - Pic n°283 :  $R_t=0,34'$ ;  $(M+H)=276,1440$
  - Pic n°985 :  $R_t=1,39'$ ;  $(M+H)=224,1433$
  - Pic n°993 :  $R_t=1,84'$ ;  $(M+H)=304,1332$
  - Pic n°1084 :  $R_t=1,14'$ ;  $(M+H)=251,1311$

# Perspectives

- Augmenter l'échantillonnage et la diversité des miels analysés et inclure l'analyse des nectars de fleurs 2019
- Approfondir le traitement des données notamment pour la pré-identification des marqueurs et autres composés des miels 2020
- Par ailleurs, l'augmentation de l'échantillonnage et le traitement des données qui en résulte constituera une base de donnée intéressante pour étudier ultérieurement les spécificité d'autres miels (ex: lifou, kingué,...)



**NC BIORESSOURCES**

L'innovation est naturelle

Etude réalisée par Paul Coulerie

Tel : (+687) 25 54 08

Mobile : (+687) 73 73 22

p.coulerie@ncbioressources.nc