

NORME
INTERNATIONALE

ISO
8451

Première édition
1991-08-15

**Tabac — Détermination de la teneur en
amidon — Méthode enzymatique**

iTeh STANDARD PREVIEW
Tobacco — Determination of starch content — Enzymatic method
(standards.iteh.ai)

ISO 8451:1991

[https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/ef9f87f1-513e-409b-ab96-
bc6a7229c559/iso-8451-1991](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/ef9f87f1-513e-409b-ab96-bc6a7229c559/iso-8451-1991)



Numéro de référence
ISO 8451:1991(F)

Avant-propos

L'ISO (Organisation internationale de normalisation) est une fédération mondiale d'organismes nationaux de normalisation (comités membres de l'ISO). L'élaboration des Normes internationales est en général confiée aux comités techniques de l'ISO. Chaque comité membre intéressé par une étude a le droit de faire partie du comité technique créé à cet effet. Les organisations internationales, gouvernementales et non gouvernementales, en liaison avec l'ISO participent également aux travaux. L'ISO collabore étroitement avec la Commission électrotechnique internationale (CEI) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les projets de Normes internationales adoptés par les comités techniques sont soumis aux comités membres pour vote. Leur publication comme Normes internationales requiert l'approbation de 75 % au moins des comités membres votants.

La Norme internationale ISO 8451 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 126, *Tabac et produits du tabac*, sous-comité SC 21, *Tabacs en feuilles*.

L'annexe A de la présente Norme internationale est donnée uniquement à titre d'information.

ITEH STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)
ISO 8451:1991
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/ef9f87f1-513e-409b-ab96-bc6a7229c559/iso-8451-1991>

Tabac — Détermination de la teneur en amidon — Méthode enzymatique

1 Domaine d'application

La présente Norme internationale prescrit une méthode pour la détermination de l'amidon naturel dans le tabac et les produits du tabac. Cette méthode s'applique à tous les types de tabac et produits du tabac.

NOTES

1 Les types d'amidon modifiés (phosphorylés ou oxydés) ne réagissent pas.

2 Si cette méthode est utilisée sur des tabacs ou produits du tabac ayant reçu des sauces contenant des sucres, déterminer la teneur en glucose avant hydrolyse et corriger ensuite la teneur en glucose après hydrolyse pour une détermination correcte de la teneur en amidon.

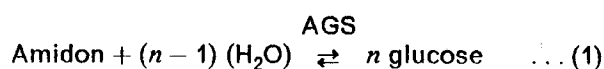
2 Définition

Pour les besoins de la présente Norme internationale, la définition suivante s'applique.

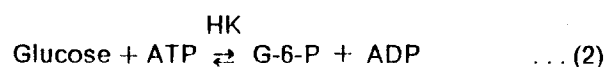
2.1 teneur en amidon du tabac: Teneur en substances déterminée par la procédure spécifiée dans la présente Norme internationale, exprimée en pourcentage d'amidon (*m/m*).

3 Réactions

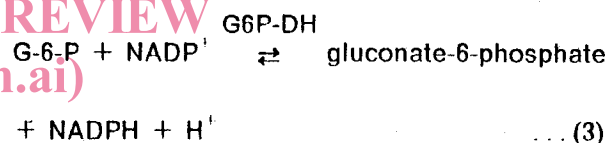
En présence de l'enzyme amyloglucosidase (AGS), l'amidon est hydrolysé en glucose à pH 4,6 [équation (1)].



Le glucose formé est déterminé avec de l'hexokinase (HK) et du glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6P-DH) à pH 7,6. Le glucose est phosphorylé en glucose-6-phosphate (G-6-P) par de l'adénosine-5'-triphosphate (ATP) [équation (2)] en présence d'hexokinase.



En présence de G6P-DH, le glucose-6-phosphate est oxydé par le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADP) en gluconate-6-phosphate (G-6-P) avec formation de la forme réduite de NADP (NADPH) [équation (3)].



La quantité de NADPH formée au cours de la réaction indiquée ci-dessus est stoechiométrique à la quantité de glucose. Elle est mesurée à une absorbance de 334 nm, 340 nm ou 365 nm.

4 Réactifs et préparation des solutions

4.1 Réactifs

Tous les réactifs utilisés doivent être de qualité analytique reconnue. L'eau utilisée doit avoir été récemment bidistillée dans un appareil en verre.

4.1.1 Acide citrique, monohydraté, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$.

4.1.2 Citrate trisodique, dihydraté, $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

4.1.3 Amyloglucosidase, AGS, environ 6 unités/mg de lyophilisat.

4.1.4 Hydrochlorure de triéthanolamine, $\text{C}_6\text{H}_{15}\text{NO}_3 \cdot \text{HCl}$.

4.1.5 Sulfate de magnésium, heptahydraté, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

4.1.6 Hydroxyde de sodium, solution $c(\text{NaOH}) = 5 \text{ mol/l}$.

4.1.7 Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate-sel disodique, NADP-Na₂.

4.1.8 Adénosine-5' triphosphate-sel disodique, ATP-Na₂H₂.

4.1.9 Hydrogénocarbonate de sodium, NaHCO₃.

4.1.10 Hexokinase/glucose-6-phosphate déhydrogénase, HK/G6P-DH.

4.1.11 Sulfoxyde diméthylque, CH₃SOCH₃.

4.1.12 Acide chlorhydrique, c(HCl) = 8 mol/l.

4.2 Préparation des solutions

4.2.1 Tampon de citrate, pH 4,6

Dissoudre 88 mg de monohydrate d'acide citrique (4.1.1) et 170 mg de dihydrate de citrate trisodique (4.1.2) dans de l'eau et compléter avec de l'eau jusqu'à 20 ml. Vérifier la valeur du pH au moyen d'une électrode en verre.

Le tampon est stable pendant au moins une année à + 4 °C.

Porter la solution tampon à une température comprise entre 20 °C et 25 °C avant emploi.

4.2.2 Solution d'amyloglucosidase (AGS)

Dissoudre 29 mg d'AGS (4.1.3) lyophilisée dans 1,2 ml de tampon de citrate (4.2.1).

La solution est stable pendant au moins 6 mois à + 4 °C.

4.2.3 Tampon de triéthanolamine, pH 7,6

Dissoudre 14 g d'hydrochlorure de triéthanolamine (4.1.4) et 0,25 g de heptahydrate de sulfate de magnésium (4.1.5) dans environ 80 ml d'eau, amener à pH 7,6 avec environ 5 ml de la solution d'hydroxyde de sodium (4.1.6) et compléter avec de l'eau jusqu'à 100 ml.

Le tampon est stable pendant au moins 4 semaines à + 4 °C.

Porter la solution tampon à une température comprise entre 20 °C et 25 °C avant emploi.

4.2.4 Solution de nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADP)

Dissoudre 60 mg de nicotinamide adénine dinucléotide phosphate-sel disodique (4.1.7) dans 6 ml d'eau.

La solution est stable pendant au moins 4 semaines à + 4 °C.

4.2.5 Solution d'adénosine-5'-triphosphate (ATP)

Dissoudre 300 mg d'adénosine-5' triphosphate-sel disodique (4.1.8) et 300 mg d'hydrogénocarbonate de sodium (4.1.9) dans 6 ml d'eau.

La solution est stable pendant au moins 4 semaines à + 4 °C.

4.2.6 Hexokinase/glucose-6-phosphate déhydrogénase

HK/G6P-DH (2 mg HK/ml suspension dans une solution de sulfate d'ammonium à 3,2 mol/l; 1 mg G6P-DH/ml suspension dans une solution de sulfate d'ammonium à 3,2 mol/l).

Utiliser la suspension non diluée.

La suspension est stable pendant au moins un an à + 4 °C.

5 Appareillage

Matériel courant de laboratoire, et notamment

5.1 Spectromètre, permettant d'opérer à 340 nm.

NOTE 3 Des photomètres, filtres à raies spectrales permettant d'opérer à 334 nm et 365 nm (lampes de mercure) peuvent aussi être utilisés.

5.2 Broyeur de laboratoire.

5.3 Tamis en fil métallique, d'ouverture de maille 0,3 mm.

5.4 Cuve en verre, ayant un parcours optique de 10 mm.

5.5 Flacon mélangeur à col étroit, de capacité 100 ml.

5.6 Bain thermostatique, capable d'être contrôlé entre 55 °C et 60 °C.

5.7 pH-mètre.

5.8 Papier filtre, filtration rapide.

5.9 Micropipettes.

5.10 Étuve, chauffant jusqu'à 60 °C.

NOTE 4 Il convient de nettoyer avant utilisation toutes les pipettes et les cuves avec une solution d'acide chromique ou avec des détergents spéciaux.

6 Mode opératoire

6.1 Préparation de l'échantillon

Sécher l'échantillon pour essai dans l'étuve (5.10) à une température inférieure à 60 °C puis le broyer. La totalité de l'échantillon doit passer au travers du tamis (5.3).

6.2 Prise d'essai

Peser, à 0,001 g près, de 0,5 g à 1 g d'échantillon pour essai broyé et bien mélangé, dans un flacon mélangeur de 100 ml (5.5). Effectuer deux déterminations.

6.3 Extraction

Ajouter 20 ml de sulfoxyde diméthylque (4.1.11) et 5 ml d'acide chlorhydrique (4.1.12) et laisser incuber 2 h à 60 °C au bain thermostatique en agitant de temps à autre. Après avoir laissé refroidir jusqu'à température ambiante, ajouter environ 50 ml d'eau, amener à un pH de 4 à 5 avec la solution d'hydroxyde de sodium (4.1.6) en secouant vigoureusement. Compléter au trait repère avec de l'eau et filtrer la solution. Éliminer les 10 premiers millilitres du filtrat et utiliser 0,1 ml (au plus 0,2 ml) pour exécuter l'essai immédiatement.

6.4 Détermination

Le mode opératoire à suivre en vue de la détermination est décrit ci-après:

| Pipetter dans la cuve | Essai à blanc | Essai |
|---------------------------|---------------|---------|
| Tampon de citrate (4.2.1) | — | 0,2 ml |
| Solution de l'échantillon | 0,1 ml | 0,1 ml |
| Amyloglucosidase (4.2.2) | — | 0,02 ml |

Mélanger et laisser incuber 15 min entre 55 °C et 60 °C dans le bain thermostatique (5.6); boucher les cuves avec leurs couvercles. Placer les cuves dans le spectromètre (5.1).

NOTE 5 Pendant les périodes d'incubation, le contenu de la cuve est convenablement mélangé à l'aide d'une petite baguette en verre ou en plastique.

Ajouter

| | | |
|-----------------------------------|---------|--------|
| Tampon de triéthanolamine (4.2.3) | 1 ml | 1 ml |
| NADP (4.2.4) | 0,1 ml | 0,1 ml |
| ATP (4.2.5) | 0,1 ml | 0,1 ml |
| Eau bidistillée | 1,72 ml | 1,5 ml |

Mélanger. Au bout de 3 min environ, lire l'absorbance des solutions (A_1). Amorcer la réaction en ajoutant

| | | |
|-------------------|---------|---------|
| HK/G6P-DH (4.2.6) | 0,02 ml | 0,02 ml |
|-------------------|---------|---------|

Mélanger. Une fois la réaction terminée (au bout de 10 min à 15 min environ), lire l'absorbance des solutions (A_2). Si, au bout de 15 min, la réaction n'est pas terminée, lire l'absorbance à des intervalles de 5 min jusqu'à ce que les valeurs relevées soient constantes pendant 5 min.

Dans le cas d'une augmentation constante des absorbances de A_2 , extrapoler l'absorbance au moment où la suspension de HK/G6P-DH a été ajoutée (voir annexe A).

Calculer les différences d'absorbance comme suit:

$$\Delta A_{\text{essai à blanc}} = A_2_{\text{essai à blanc}} - A_1_{\text{essai à blanc}}$$

$$\Delta A_{\text{essai}} = A_2_{\text{essai}} - A_1_{\text{essai}}$$

$$\Delta A = \Delta A_{\text{essai}} - \Delta A_{\text{essai à blanc}}$$

7 Expression des résultats

7.1 Calcul

Conformément à la formule générale, l'équation de la concentration est la suivante:

$$c = \frac{V_1 \cdot M_S \cdot F}{\epsilon \cdot d \cdot V_2 \cdot 1\,000} \Delta A \text{ (g/l)}$$

où

V_1 est le volume final, en millilitres;

V_2 est le volume de l'échantillon, en millilitres;

M_S est la masse moléculaire relative de la substance devant être soumise à l'essai (pour l'amidon: $M_{\text{glucose}} - M_{\text{eau}} = 162,1$);

F est le facteur de dilution (si l'échantillon a été dilué pendant la préparation);

d est la longueur du parcours optique, en centimètres;

ϵ est le coefficient d'absorption du NADPH à

$$340 \text{ nm} = 6,3 (\text{l} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$$

$$\text{Hg } 365 \text{ nm} = 3,5 (\text{l} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$$

$$\text{Hg } 334 \text{ nm} = 6,18 (\text{l} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$$

Il s'ensuit pour l'amidon:

$$c = \frac{3,04 \cdot 162,1 \cdot 1}{\epsilon \cdot 1 \cdot 0,1 \cdot 1 \cdot 000} \cdot \Delta A = 4,928$$

$$\frac{\Delta A}{\epsilon} \text{ (g amidon/l solution d'échantillon)}$$

$$\% \text{ amidon} = \frac{100 \cdot c \cdot 10}{m(100 - W)}$$

où

c est la concentration, en grammes par litre, d'amidon dans l'échantillon;

m est la masse, en grammes, de la prise d'essai (6.2);

W est la teneur en eau de l'échantillon de tabac préparé (6.1), en pourcentage en masse.

7.2 Répétabilité

Si la différence entre les résultats de deux déterminations, réalisées le même jour par le même analyste avec le même appareillage, sur le même échantillon, dépasse 0,2 % (m/m) d'amidon, deux autres déterminations doivent être réalisées.

7.3 Reproductibilité

La différence entre les valeurs de deux déterminations séparées obtenues dans des laboratoires différents, en utilisant des prises d'essai d'un même échantillon, ne doit pas dépasser 0,2 % (m/m) d'amidon.

8 Rapport d'essai

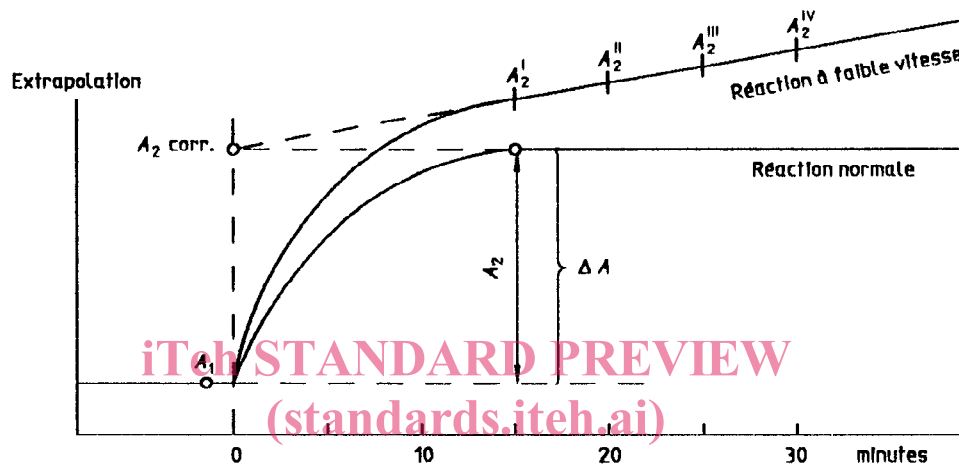
Le rapport d'essai doit indiquer la méthode utilisée et les résultats obtenus. Il doit, en outre, mentionner tous les détails opératoires non prévus dans la présente Norme internationale ou facultatis, ainsi que les incidents éventuels susceptibles d'avoir agi sur les résultats.

Le rapport d'essai doit donner tous les renseignements nécessaires à l'identification complète de l'échantillon.

Annexe A (informative)

Réactions «normale» et «à faible vitesse»

Voir figure A.1.



ISO 8451:1991

Figure A.1

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/ef9f87f1-513e-409b-ab96-bc6a7229c559/iso-8451-1991>

Réaction «normale»

$$\Delta A = A_2 - A_1$$

Réaction «à faible vitesse»

On mesure A_1 , puis A_2 au bout de 15 min. Les valeurs mesurées au bout d'un autre intervalle de 5 min sont chacune: A_2^{II} , A_2^{III} , A_2^{IV} , ...

Une réaction à faible vitesse existe si les différences d'absorbance de A_2^{I} à A_2^{II} ou de A_2^{II} à A_2^{III} , respectivement, etc. sont constantes.

Graphiquement, la valeur A_2 corrigée peut être trouvée si la ligne droite A_2^{I} - A_2^{II} s'étend au-delà de A_2^{I} jusqu'au moment de l'addition de l'enzyme initiale (0 min, A_2 corr.).

Mathématiquement (par extrapolation), la valeur A_2 corrigée peut être obtenue comme suit:

$$A_2 \text{ corr.} = A_2^{\text{I}} - 3 \times (A_2^{\text{II}} - A_2^{\text{I}})$$

\uparrow \uparrow
 (= 15 min) (= 5 min)

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 8451:1991

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/ef9f87f1-513e-409b-ab96-bc6a7229c559/iso-8451-1991>

CDU 663.97:543.854.746

Descripteurs: tabac, analyse chimique, dosage, amidon, méthode enzymatique.

Prix basé sur 5 pages
