

NORME
INTERNATIONALE

ISO
11213

Première édition
1995-02-01

**Amidon modifié — Dosage de l'acétyle —
Méthode enzymatique**

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

ISO 11213:1995

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/01934f78-d22f-4e69-b94b-2bd6a540b558/iso-11213-1995>



Numéro de référence
ISO 11213:1995(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 11213 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 93, *Amidon (amidons, féculés), dérivés et sous-produits*.

Les annexes A, B et C de la présente Norme internationale sont données uniquement à titre d'information.

ITeH STANDARD PREVIEW

(standards.iteh.ai)

ISO 11213:1995

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/01954178-d22f-4e69-b94b-2bd6a540b558/iso-11213-1995>

© ISO 1995

Droits de reproduction réservés. Sauf prescription différente, aucune partie de cette publication ne peut être reproduite ni utilisée sous quelque forme que ce soit et par aucun procédé, électronique ou mécanique, y compris la photocopie et les microfilms, sans l'accord écrit de l'éditeur.

Organisation internationale de normalisation
Case Postale 56 • CH-1211 Genève 20 • Suisse

Imprimé en Suisse

Amidon modifié — Dosage de l'acétyle — Méthode enzymatique

1 Domaine d'application

La présente Norme internationale prescrit une méthode enzymatique pour le dosage de l'acétyle contenu dans l'amidon modifié, granulaire ou soluble dans l'eau froide. Les teneurs en acétyle total et libre sont déterminées et la teneur en acétyle lié est calculée.

La méthode convient pour déterminer des teneurs en acétyle jusqu'à 2 % (*m/m*).

2 Références normatives

Les normes suivantes contiennent des dispositions qui, par suite de la référence qui en est faite, constituent des dispositions valables pour la présente Norme internationale. Au moment de la publication, les éditions indiquées étaient en vigueur. Toute norme est sujette à révision et les parties prenantes des accords fondés sur la présente Norme internationale sont invitées à rechercher la possibilité d'appliquer les éditions les plus récentes des normes indiquées ci-après. Les membres de la CEI et de l'ISO possèdent le registre des Normes internationales en vigueur à un moment donné.

ISO 1666:1973, *Amidon et fécule — Détermination de l'humidité — Méthodes par séchage à l'étuve*.

ISO 3696:1987, *Eau pour laboratoire à usage analytique — Spécification et méthodes d'essai*.

3 Principe

La teneur en acétyle total est déterminée en chauffant l'échantillon avec de l'acide chlorhydrique dilué qui

hydrolyse la fraction acétyle et dissout l'amidon. En présence de l'enzyme acétyl-CoA synthétase (ACS), l'acétate est converti avec l'adénosine-5-triphosphate (ATP) et la coenzyme A (CoA) en acétyl-Co-A. Ce dernier réagit ensuite avec l'oxaloacétate pour former du citrate en présence de citrate de synthase (CS).

L'oxyloacétate nécessaire à la réaction est formé à partir de malate et de nicotinamide-adénine-dinucléotide (NAD) en présence de malate-déshydrogénase (MDH). Dans cette réaction, le NAD est réduit en NADH et la formation de NADH peut être déterminée en mesurant l'augmentation de l'absorbance à une longueur d'onde prescrite. (Voir référence [1] citée dans l'annexe C.)

La teneur en acétyle libre est déterminée en réalisant une suspension de l'amidon modifié dans l'eau, en filtrant, puis en déterminant la teneur en acétyle du filtrat comme indiqué ci-dessus. La teneur en acétyle lié est calculée en soustrayant la teneur en acétyle libre de la teneur en acétyle total.

4 Réactifs et matériaux

Les réactifs utilisés doivent avoir une qualité analytique reconnue, sauf prescription contraire. L'eau utilisée doit être conforme aux spécifications de l'ISO 3696, qualité 2. Les enzymes utilisées doivent être de qualité équivalente aux enzymes correspondantes de Boehringer Mannheim¹⁾.

NOTE 1 Des kits d'essai appropriés disponibles dans le commerce peuvent être utilisés.

4.1 Acide chlorhydrique, solution à 1 mol/l.

4.2 Hydroxyde de sodium, solution à 5 mol/l.

1) Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la présente Norme internationale et ne signifie nullement que l'ISO approuve ou recommande l'emploi exclusif des produits ainsi désignés.

4.3 Solution tampon.

Dissoudre dans environ 70 ml d'eau les réactifs suivants:

7,5 g de triéthanolamine;

420 mg d'acide L-malique;

210 mg de chlorure de magnésium hexahydraté ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$).

Ajouter la quantité suffisante de solution d'hydroxyde de potassium à 5 mol/l jusqu'à obtention d'un pH de 8,4. Le volume nécessaire est d'environ 8 ml.

La solution est stable pendant 1 an si on la conserve à + 4 °C.

4.4 Solution d'ATP-CoA-NAD.

Dissoudre dans 20 ml d'eau les réactifs suivants:

500 mg de sel disodique trihydraté cristallisé d'adénosine-5'-triphosphate [$\text{ATP-Na}_2\text{H}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$; 98 % (m/m)];

500 mg d'hydrogénocarbonate de sodium anhydre;

50 mg de sel de trilitium lyophilisé de coenzyme A [environ 85 % (m/m) de CoA];

250 mg d'acide libre monohydraté lyophilisé de nicotinamide-adénine-dinucléotide [$\beta\text{-NAD} \cdot \text{H}_2\text{O}$ > 98 % (m/m)].

La solution est stable pendant 1 semaine si on la conserve à + 4 °C.

4.5 Suspension de MDH-CS.

Disperser environ 1 100 U (Unité internationale) de malate-déshydrogénase (MDH prélevé sur du cœur de porc; EC 1.1.1.37) et environ 270 U de citrate de synthase (CS prélevé sur du cœur de porc; EC 4.1.37) dans 0,4 ml d'une solution de sulfate d'ammonium, $c[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4] = 3,2 \text{ mol/l}$.

La solution est stable pendant 1 an si on la conserve à + 4 °C.

NOTE 2 Une Unité internationale (1 U) catalyse la réaction de 1 μmol à 25 °C de substrat correspondant par minute.

4.6 Solution d'ACS.

Dissoudre 20 mg de lyophilisat contenant 5 mg d'acétyl-coenzyme A synthétase (ACS prélevé dans la levure; EC 6.2.1.1; $\approx 16 \text{ U}$) dans 0,4 ml d'eau.

La solution est stable pendant 5 jours si on la conserve à + 4 °C.

5 Appareillage

Matériel courant de laboratoire, et notamment:

5.1 Fioles coniques, de 250 ml de capacité, munies de bouchons à vis.

5.2 Bain-marie bouillant, avec agitateur.

5.3 Fioles jaugées, de 200 ml de capacité.

5.4 Micropipettes ou **seringues**.

5.5 Spectromètre d'absorption moléculaire, permettant des mesurages à 340 nm.

5.6 Cuves, en quartz ou autre matériau transparent à 340 nm, de 10 mm \pm 0,1 mm d'épaisseur.

5.7 Tamis, de 800 μm d'ouverture de mailles.

5.8 Broyeur à couteaux.

5.9 Bain d'eau thermostaté, dont la température peut être réglée entre 20 °C et 25 °C.

6 Préparation de l'échantillon

Passer l'échantillon au tamis de 800 μm (5.7). Si nécessaire, broyer l'échantillon au moyen du broyeur à couteaux (5.8) de manière que le matériau passe sans refus le tamis de 800 μm . Rendre l'échantillon bien homogène.

7 Mode opératoire

7.1 Hydrolyse des groupements acétyles

7.1.1 Dispersion de l'amidon granulaire

Peser, à 1 mg près, environ 1 g de l'échantillon préparé et l'introduire dans une fiole conique (5.1).

Ajouter 50 ml d'acide chlorhydrique (4.1) tout en agitant pour assurer une bonne dispersion. Continuer comme décrit en 7.1.3.

7.1.2 Dispersion de l'amidon gonflant

Ajouter 50 ml d'acide chlorhydrique (4.1) dans une fiole conique (5.1). Placer un agitateur magnétique et commencer l'agitation. Introduire lentement et soigneusement environ 1 g de l'échantillon préparé. S'assurer que la dispersion se fait correctement et sans grumeaux. Déterminer la masse de la prise d'essai en pesant par différence à 1 mg près.

7.1.3 Hydrolyse et filtration

Fermer la fiole conique en vissant le bouchon et la placer sous agitation dans le bain-marie bouillant (5.2) pendant 30 min.

Sortir la fiole et la laisser refroidir à environ $20\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$ en la plongeant dans un bain de glace. Ouvrir la fiole lorsque son contenu est complètement refroidi, ajouter 10 ml de solution d'hydroxyde de sodium (4.2), mélanger et transvaser le contenu quantitativement dans une fiole jaugée de 200 ml (5.3). Transférer la fiole jaugée dans le bain d'eau (5.9) pour équilibrer la température entre 20 °C et 25 °C . Contrôler la température et compléter avec de l'eau distillée jusqu'au trait repère. Filtrer au travers d'un papier filtre approprié. Rejeter les premiers 20 ml à 30 ml de filtrat et utiliser directement la solution restante comme solution d'essai dans le dosage enzymatique, comme décrit en 7.4.

7.2 Acétate libre

7.2.1 Dispersion de l'amidon granulaire

Disperser sous agitation 10 g de l'échantillon préparé dans 100 ml d'eau distillée dans une fiole conique (5.1).

Continuer comme décrit en 7.2.3.

7.2.2 Dispersion de l'amidon gonflant

Ajouter environ 100 ml d'eau distillée dans une fiole conique (5.1). Placer un agitateur magnétique et commencer l'agitation. Introduire lentement et soigneusement environ 2 g d'échantillon préparé. S'assurer que la dispersion se fait correctement et sans grumeaux. Déterminer la masse de la prise d'essai en pesant par différence à 1 mg près.

7.2.3 Dissolution et filtration

Fermer la fiole conique et agiter pendant 30 min.

Transvaser le contenu de la fiole conique quantitativement dans une fiole jaugée de 200 ml (5.3). Transférer la fiole jaugée dans le bain d'eau (5.9) pour équilibrer la température entre 20 °C et 25 °C . Contrôler la température et compléter avec de l'eau distillée jusqu'au trait repère. Filtrer au travers d'un papier filtre approprié. Rejeter les premiers 20 ml à 30 ml de filtrat et utiliser directement la solution restante comme solution d'essai dans le dosage enzymatique, comme décrit en 7.4.

7.3 Essai de contrôle

Pour contrôler la méthode, l'essai peut être réalisé sur un matériau de référence tel que l'acétate de sodium anhydre [teneur en acétyle = $52,4\%$ (*m/m*)]. Pour ce faire, peser, à 0,1 mg près, environ 100 mg d'acétate de sodium anhydre. Transférer ensuite dans une fiole jaugée de 1 000 ml. Placer la fiole jaugée dans le bain d'eau (5.9) pour équilibrer la température entre 20 °C et 25 °C . Contrôler la température et compléter avec de l'eau distillée jusqu'au trait repère. Continuer comme décrit en 7.4.

7.4 Dosage enzymatique de l'acide acétique

Effectuer le dosage enzymatique de l'acide acétique selon le schéma d'analyse ci-après dans les conditions suivantes:

- longueur d'onde: 340 nm ;
- température: 20 °C à 25 °C .

Lire les absorbances par rapport à une cuve (5.6) remplie d'eau.

NOTE 3 Les mesurages peuvent aussi être effectués aux longueurs d'onde suivantes avec les coefficients d'absorption molaire (κ) correspondants utilisés dans les calculs:

- Hg, 365 nm : $\kappa = 3,4\text{ l}\cdot\text{mmol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$;
- Hg, 334 nm : $\kappa = 6,18\text{ l}\cdot\text{mmol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.

Pipetter dans les cuves (5.6) les quantités de réactifs indiquées dans le schéma d'analyse du tableau 1.

Tableau 1 — Schéma d'analyse pour le dosage enzymatique de l'acide acétique

Réactif et action	Témoin	Solution avec échantillon
Solution tampon (4.3)	1,00 ml	1,00 ml
Solution d'ATP-CoA-NAD (4.4)	0,20 ml	0,20 ml
Eau bidistillée	2,00 ml	1,50 ml
Solution d'essai	—	0,50 ml
Mélanger le contenu de chaque cuve et lire les absorbances (A_0). Ajouter dans chaque cuve		
Suspension MDH-CS (4.5)	0,01 ml	0,01 ml
Mélanger le contenu de chaque cuve et lire les absorbances (A_1) après environ 3 min.		
Déclencher ensuite la réaction en ajoutant dans chaque cuve		
Solution ACS (4.6)	0,02 ml	0,02 ml
Mélanger le contenu de chaque cuve, attendre la fin de la réaction (environ 10 min à 15 min) et lire les absorbances (A_2). Si après environ 15 min, la réaction n'est pas terminée, continuer à lire les absorbances toutes les 2 min tant que l'absorbance augmente d'une manière régulière pendant 2 min.		
NOTE — Il est possible de modifier le volume de solution avec échantillon pour des concentrations d'acétate très fortes ou très faibles; le volume total final doit être toujours égal à 3,23 ml.		

(standards.iteh.ai)

ISO 11213:1995

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/01934f78-d22f-4e69-b94b-2bd6a540b558/iso-11213-1995>

8 Expression des résultats

8.2 Teneur en acétyle total

8.1 Différence d'absorbance

Calculer la différence d'absorbance à l'aide de l'équation

$$\Delta A = \left[(A_2 - A_0)_s - \frac{(A_1 - A_0)_s^2}{(A_2 - A_0)_s} \right] - \left[(A_2 - A_0)_b - \frac{(A_1 - A_0)_b^2}{(A_2 - A_0)_b} \right]$$

où

ΔA est la valeur numérique de la différence d'absorbance;

A_0 , A_1 et A_2 sont les valeurs numériques des absorbances mesurées conformément au schéma d'analyse du tableau 1;

s est un indice désignant la solution avec échantillon;

b est un indice désignant le témoin.

Calculer la teneur en acétyle total à l'aide de l'équation

$$w_a = \frac{5,56 \times \Delta A}{\kappa \times m_1} \times \frac{100}{100 - w_m}$$

où

w_a est la valeur numérique de la teneur en acétyle total, en pourcentage en masse, de l'échantillon pour essai;

ΔA est la valeur numérique de la différence d'absorbance calculée conformément à 8.1;

κ est la valeur numérique du coefficient d'absorption molaire de NADH à 340 nm, en litres par millimole centimètre ($\kappa = 6,30 \text{ l} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$);

m_1 est la valeur numérique de la masse, en grammes, de la prise d'essai (voir 7.1.1 ou 7.1.2);

w_m est la valeur numérique de l'humidité, en pourcentage en masse, de l'échantillon.

Si l'on prélève une partie aliquote de solution avec échantillon différente de celle de 0,50 ml prescrite dans le tableau 1, l'équation doit alors être adaptée en conséquence. Lorsque l'essai de contrôle (7.3) est effectué, un facteur (de dilution) de 5 doit être introduit car la solution d'essai est complétée à 1 000 ml et non à 200 ml comme dans le mode opératoire pour l'échantillon pour essai (voir 7.1 et 7.2).

NOTE 4 Une explication complète de l'équation dérivée est donnée dans l'annexe A.

8.3 Teneur en acétyle libre

Calculer la teneur en acétyle libre à l'aide de l'équation

$$w_f = \frac{5,56 \times \Delta A}{\kappa \times m_2} \times \frac{100}{100 - w_m}$$

où

w_f est la valeur numérique de la teneur en acétyle libre, en pourcentage en masse, de l'échantillon pour essai;

ΔA , κ et w_m ont les mêmes significations qu'en 8.2;

m_2 est la valeur numérique de la masse, en grammes, de la prise d'essai (voir 7.2.1 ou 7.2.2).

8.4 Teneur en acétyle lié

Calculer la teneur en acétyle lié à l'aide de l'équation

$$w_{ba} = w_a - w_f$$

où

w_{ba} est la valeur numérique de la teneur en acétyle lié, en pourcentage en masse, de l'échantillon pour essai;

w_a est la valeur numérique de la teneur en acétyle total, en pourcentage en masse, de l'échantillon pour essai;

w_f est la valeur numérique de la teneur en acétyle libre, en pourcentage en masse, de l'échantillon pour essai.

9 Fidélité

La fidélité de la méthode a été établie par un essai interlaboratoire organisé par l'ISO/TC 93/GT 3, *Fonc-*

tions chimiques, en 1990 et exécuté conformément à l'ISO 5725 (référence [2] citée dans l'annexe C). Ont participé à cet essai 11 laboratoires: des échantillons d'amidon de maïs modifié, de fécule de pomme de terre modifiée et d'amidon de blé modifié ont été examinés. Se reporter à l'annexe B pour connaître le résumé des résultats statistiques de cet essai. Le niveau de probabilité est de 95 % lorsque les limites de répétabilité et de reproductibilité sont atteintes.

9.1 Répétabilité

La différence absolue entre deux résultats d'essai individuels indépendants, obtenus à l'aide de la même méthode sur un matériau identique soumis à l'essai dans le même laboratoire par le même opérateur utilisant le même appareillage dans un court intervalle de temps, ne doit pas être supérieure à 5 % du résultat le plus élevé.

9.2 Reproductibilité

La différence absolue entre deux résultats d'essai individuels indépendants, obtenus à l'aide de la même méthode sur un matériau identique soumis à l'essai dans des laboratoires différents par des opérateurs différents utilisant des appareillages différents, ne doit pas être supérieure à 8 % du résultat le plus élevé.

10 Rapport d'essai

Le rapport d'essai doit indiquer

- la référence à la présente Norme internationale;
- la méthode selon laquelle l'échantillonnage a été effectué;
- la méthode utilisée;
- le(s) résultat(s) d'essai obtenu(s);
- si la répétabilité a été vérifiée, le résultat final cité qui a été obtenu.

Il doit, en outre, mentionner tous les détails opératoires non prévus dans la présente Norme internationale, ou facultatifs, ainsi que les incidents éventuels susceptibles d'avoir agi sur le(s) résultat(s) d'essai.

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

Annexe A (informative)

Équation dérivée pour le calcul de la teneur en acétyle

La concentration d'acétyle total dans la solution d'essai est calculée à l'aide de l'équation

$$\rho_{\text{at}} = \frac{M_r \times V_2 \times \Delta A}{1\,000 \times V_1 \times d \times \kappa}$$

où

ρ_{at} est la valeur numérique de la concentration d'acétyle total, en grammes par litre, dans la solution d'essai;

M_r est la masse moléculaire relative de la fonction acétyle ($M_r = 43$);

V_1 est la valeur numérique du volume, en millilitres, de la solution d'essai ($V_1 = 0,50$ ml);

V_2 est la valeur numérique du volume total final, en millilitres, de la solution avec l'échantillon ($V_2 = 3,23$);

ΔA est la valeur numérique de la différence d'absorbance calculée conformément à 8.1;

d est la valeur numérique de l'épaisseur, en centimètres, de la cuve ($d = 1$ cm);

κ est la valeur numérique du coefficient d'absorption molaire de NADH à 340 nm, en litres par millimole centimètre ($\kappa = 6,30 \text{ l} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

La teneur en acétyle total de l'échantillon pour essai humide est calculée à l'aide de l'équation

$$w_{\text{ah}} = \frac{\rho_{\text{at}} \times V_3}{10 \times m_1}$$

où

w_{ah} est la valeur numérique de la teneur en acétyle total, en pourcentage en masse, de l'échantillon pour essai humide;

ρ_{at} est la valeur numérique de la concentration d'acétyle total, en grammes par litre, dans la solution d'essai;

V_3 est la valeur numérique du volume, en millilitres, de la solution d'essai avant filtration ($V_3 = 200$ ml);

m_1 est la valeur numérique de la masse, en grammes, de la prise d'essai (voir 7.1.1 ou 7.1.2).

Ainsi

$$\begin{aligned} w_{\text{ah}} &= \frac{M_r \times V_2 \times \Delta A}{1\,000 \times V_1 \times d \times \kappa} \times \frac{V_3}{10 \times m_1} \\ &= \frac{43 \times 3,23 \times 200 \times \Delta A}{1\,000 \times 0,50 \times 1 \times 10 \times \kappa \times m_1} \\ &= \frac{5,56 \times \Delta A}{\kappa \times m_1} \end{aligned}$$

La teneur en acétyle total de l'échantillon pour essai, rapportée à la matière sèche, est calculée à l'aide de l'équation

$$w_a = w_{\text{ah}} \frac{100}{100 - w_m} = \frac{5,56 \times \Delta A}{\kappa \times m_1} \times \frac{100}{100 - w_m}$$

où w_m est la valeur numérique de l'humidité, en pourcentage en masse, de l'échantillon.

Annexe B (informative)

Résultats statistiques de l'essai interlaboratoire

Paramètre	Échantillon ¹⁾				
	WL	ML	MH	PL	PH
Nombre de laboratoires retenus après élimination des laboratoires aberrants	10	10	10	11	11
Nombre de laboratoires aberrants	1	1	1	0	0
Nombre de résultats acceptés	20	20	20	22	22
Teneur moyenne en acétyle [% (m/m)]	1,00	0,70	1,19	0,61	1,92
Écart-type de répétabilité, s_r [% (m/m)]	0,006	0,013	0,013	0,007	0,050
Coefficient de variation de répétabilité, CV_r (%)	0,6	1,9	1,08	1,20	2,61
Limite de répétabilité, $r = 2,8 \times s_r$ [% (m/m)]	0,017	0,037	0,036	0,021	0,142
Écart-type de reproductibilité, s_R [% (m/m)]	0,009	0,015	0,020	0,024	0,088
Coefficient de variation de reproductibilité, CV_R (%)	0,95	2,16	1,69	3,97	4,60
Limite de reproductibilité, $R = 2,8 \times s_R$ [% (m/m)]	0,027	0,042	0,057	0,069	0,250
1) H Teneur élevée L Teneur faible M Amidon de maïs modifié P Fécule de pomme de terre modifiée W Amidon de blé modifié					

ISO 11213:1995

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/01934f78-d22f-4e69-b94b-2bd6a540b558/iso-11213-1995>