

DECISION
du Comité de Ministres de l'Union économique Benelux
complétant la Décision M (72) 14 concernant l'application de méthodes
d'analyse de référence Benelux en matière de potages
M (79) 8

Le Comité de Ministres de l'Union économique Benelux,

Vu l'article premier du Protocole du 29 avril 1969 relatif à la suppression des contrôles et formalités aux frontières intérieures du Benelux et à la suppression des entraves à la libre circulation,

Vu la Décision du Comité de Ministres du 29 mai 1972, M (72) 14 concernant l'application de méthodes d'analyse de référence Benelux en matière de potages, modifiée par la Décision du 26 janvier 1976, M (76) 5,

Considérant que l'incorporation fréquente d'acide glutamique dans les potages entraîne la nécessité d'établir une méthode d'analyse de référence pour y déterminer la présence de cet acide,

A pris la décision suivante :

Article 1^{er}

Les méthodes d'analyse annexées à la Décision du Comité de Ministres du 29 mai 1972, M (72) 14, concernant l'application de méthodes d'analyse de référence Benelux en matière de potages, modifiée par la Décision du 26 janvier 1976, M (76) 5 sont complétées par la méthode décrite ci-après pour l'acide glutamique dans les potages :

1. But et champ d'application

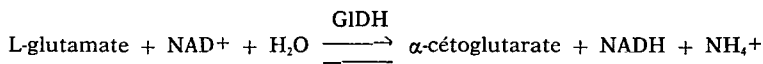
La présente prescription décrit la détermination enzymatique de l'acide glutamique dans les potages prêts à l'emploi, obtenus respectivement de concentrés et/ou de potages déshydratés, préparés selon les indications figurant sur l'emballage.

2. Définition

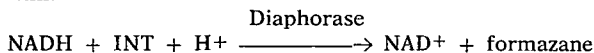
La teneur en acide glutamique mesurée de la façon décrite ci-après est exprimée en pour-cent en poids du potage prêt à l'emploi ou préparé selon les indications figurant sur l'emballage.

3. Principe

La désamination oxydative du L-acide glutamique par la nicotinamide-adénine-dinucléotide (NAD) en présence de l'enzyme glutamate-déhydrogénase (GIDH) produit de l' α -cétoglutarate de même que de la nicotinamide-adénine-dinucléotide (NADH) réduite.



Le NADH formé réagit au nitrotétrazoliumchlorure d'iode (INT) en présence de diaphorase en un formazane dont l'extinction est mesurée à 492 nm.



4. Réactifs

Sauf mention contraire expresse, tous les réactifs doivent être analytiquement purs. L'eau doit être de qualité bidistillée en récipient de verre ou équivalent.

- 4.1. Triéthanolamine-hydrochlorure.
- 4.2. Hydrophosphate dipotassique.
- 4.3. Dihydrophosphate potassique (selon Sørensen).
- 4.4. Solution d'hydroxyde de potassium 2 N.
- 4.5. Solution d'hydroxyde de potassium 0,2 N.
- 4.6. Triton X-100; Serva *)/Heidelberg ou équivalent. Pour pipeter cette solution visqueuse, utiliser une pipette à large embout.
- 4.7. Nicotinamide-adénine-dinucléotide, NAD.
- 4.8. Nitrotétrazoliumchlorure d'iode, INT.
- 4.9. Diaphorase, lyophilisée; 30 mg de lyophilisat renferme 10 mg d'enzyme.
- 4.10. Solution de glutamate-déhydrogénase (GIDH) dans de la glycérine; 10 mg/ml.
- 4.11. Acide glutamique.
- 4.12. Solution-tampon; pH = 8,6.
 - 4.12.1. Dissoudre 4,65 grammes de triéthanolamine hydrochlorure (4.1.) dans environ 80 ml d'eau; avec environ 11 ml d'hydroxyde de potassium 2 N (4.4.), porter le pH de la solution à 8,6, ajouter 1,6 ml de Triton X-100 (4.6.) et mélanger. Dans un ballon jaugé de 100 ml compléter jusqu'au trait avec de l'eau et mélanger à nouveau.
 - 4.12.2. Dissoudre 2,15 grammes d'hydrophosphate dipotassique (K_2HPO_4) et 17,5 grammes de dihydrophosphate potassique (KH_2PO_4) dans de l'eau et, dans un ballon jaugé de 100 ml, compléter jusqu'au trait avec de l'eau et mélanger.
 - 4.12.3. Préparer la solution-tampon pH = 8,6 en mélangeant 60 ml de la solution 4.12.1. et 15 ml de la solution 4.12.2. Cette solution-tampon se conserve pendant au moins 2 mois à la température ambiante.

*) Les marques mentionnées ne constituent pas une recommandation mais une simple identification.

- 4.13. Solution de nicotinamide-adénine-dinucléotide (solution NAD).
Dissoudre 60 mg de NAD dans 12 ml d'eau. La solution se conserve pendant 4 semaines au moins à + 4 °C.
- 4.14. Solution de nitrotétrazoliumchlorure d'iode (solution INT).
Dissoudre 30 mg de tétrazoliumchlorure d'iode dans 50 ml d'eau. La solution se conserve pendant 4 semaines au moins à + 4 °C.

NOTE

L'INT et ses solutions sont sensibles à la lumière et doivent donc être conservés autant que possible dans l'obscurité, même pendant l'analyse.

- 4.15. Solution de diaphorase ; 1 mg d'enzyme par ml de solution.
Dissoudre 9 mg de diaphorase lyophilisée dans 3 ml d'eau. La solution se conserve pendant 4 semaines au moins à + 4 °C.
- 4.16. Solution de référence d'acide glutamique.
Dissoudre 50 mg d'acide glutamique (4.11.) dans environ 25 ml d'eau, porter le pH de la solution à 7,0 à l'aide d'hydroxyde de potassium 0,2 N (4.5.) et, dans un ballon jaugé de 50 ml, compléter jusqu'au trait avec de l'eau et mélanger.
- 4.17. Solution de référence diluée d'acide glutamique.
Pipeter 5,0 ml de la solution de référence 4.16. dans un ballon jaugé de 100 ml, compléter jusqu'au trait avec de l'eau et mélanger. La concentration (c) d'acide glutamique de la solution est de 50.10^{-3} mg/ml. Préparer cette solution extemporanément.

5. Appareillage

Verrerie de laboratoire usuelle ainsi que :

- 5.1. pH-mètre.
- 5.2. Photomètre à filtre ou spectrophotomètre lisible à 0.001 unités d'extinction (par exemple Zeiss PL-4 ou équivalent) réglable à la longueur d'onde de 492 nm. S'il est disponible, utiliser un porte-cuvette thermostatisé.
- 5.3. Bain-marie à thermostat réglé à 25 °C et pourvu d'un moteur à pompe rotative.
- 5.4. Pipettes enzymatiques dont les gradations ne vont pas jusqu'à la pointe.
- 5.5. Cuvettes à chemin optique de 1 cm.
- 5.6. Spatules en matière synthétiques à extrémité courbée à angle droit pour mélanger le contenu des cuvettes.

6. Préparation de l'échantillon

- 6.1. Pour la préparation de l'échantillon, utiliser tels quels les potages prêts à l'emploi. Pour les potages concentrés et déshydratés, utiliser le potage obtenu selon le mode d'emploi figurant sur l'emballage.
- 6.2. Dans un bécher, peser à 1 mg près 1 gramme (M gramme) du produit bien homogénéisé obtenu selon 6.1., suspendre dans environ 70 ml d'eau. Chauffer la suspension pendant 10 minutes au bain-marie de 70° C, refroidir à la température ambiante, compléter dans un ballon jaugé de 200 ml (V_1 ml) jusqu'au trait avec de l'eau et mélanger. Filtrer une partie de la solution d'échantillon sur un filtre plissé et utiliser le filtrat pour la mesure décrite sous 7.1.

7. Mode opératoire

7.1. Solution d'échantillon

- 7.1.1. A l'aide d'un bain-marie (5.3.) à thermostat réglé à 25° C, porter à 25° C la température de la solution-tampon (4.12.3.), la solution d'échantillon diluée et filtrée (6.2.) ainsi qu'une quantité appropriée d'eau.
- 7.1.2. Placer deux cuvettes (5.5.) ainsi qu'une cuvette remplie d'eau (7.1.1.) dans le porte-cuvette réglé à 25° C du photomètre à filtre ou du spectrophotomètre (5.2.). Dans chacune des cuvettes vides, déposer une spatule en matière synthétique (5.6.).
- 7.1.3. Sur la partie incurvée de la spatule en matière synthétique, pipeter (5.4.) successivement 1,00 ml de solution-tampon à 25° C; 0,20 ml de solution NAD (4.13.); 0,20 ml de solution INT (4.14.); 0,05 ml de solution de diaphorase (4.15.); 0,20 ml (v_1 ml) de solution d'échantillon filtrée (6.2.) ainsi que 1,30 ml d'eau à 25° C.
- 7.1.4. Répéter cette opération dans la deuxième cuvette. Prendre 1,50 ml d'eau à 25° C au lieu de 0,20 ml de solution d'échantillon filtrée et 1,30 ml d'eau.
- 7.1.5. A l'aide d'une spatule en matière synthétique, mélanger le contenu des cuvettes et, après 2 minutes, mesurer l'extinction E_{1M} de la solution (7.13.) et l'extinction E_{1B} de la solution à blanc (7.1.4.) à 492 nm en présence d'eau comme référence.
- 7.1.6. Dans la cuvette contenant la solution d'échantillon et la cuvette contenant la solution à blanc, pipeter sur la partie incurvée de la spatule en matière synthétique chaque fois 0,05 ml de solution de GIDH (4.10.) et mélanger.
- 7.1.7. Attendre que la réaction ait cessé — ce qui se produit après 10 minutes environ lorsque l'extinction ne change plus — et noter les extinctions E_{2M} et E_{2B} mesurées à 492 nm en présence d'eau comme référence.

7.2. *Mesure du coefficient d'extinction molaire*

7.2.1. Pour calculer le coefficient d'extinction molaire de l'acide glutamique, il faut mesurer l'extinction d'une solution de référence d'acide glutamique, de la façon décrite sous 7.1. Il faut également mesurer, de la façon décrite sous 7.1., une solution à blanc conjointement à la référence d'acide glutamique. Prendre 0,20 ml (V_2 ml) de solution de référence diluée (4.17.) au lieu de 0,20 ml de solution d'échantillon filtrée (7.1.3.) et exécuter le titrage en double.

8. **Calculs**

8.1. Calculer la teneur en acide glutamique, en pour-cent en poids du potage prêt à l'emploi ou préparé selon le mode d'emploi (6.1. et 6.2.) à l'aide de la formule :

$$\% \text{ acide glutamique} = \Delta E \times \frac{V \times M_w}{\epsilon \times d \times v_1 \times 1000} \times \frac{V_1}{1000} \times \frac{100}{M}$$

$$\% \text{ acide glutamique} = \Delta E \times \frac{3,00 \times 147,13}{\epsilon \times 1 \times 0,20 \times 1000} \times \frac{200}{1000} \times \frac{100}{M}$$

$$\text{ou } \% \text{ acide glutamique} = 44,139 \times \frac{\Delta E}{\epsilon \times M}$$

où :

$\Delta E = (E_{2M} - E_{1M}) - (E_{2B} - E_{1B})$ mesuré sous 7.1. pour la solution à blanc et celle de l'échantillon

V = le volume total des solutions (7.1.) pipetées dans la cuvette
 $V = 3,00$ ml

M_w = le poids moléculaire de l'acide glutamique ; $M_w = 147,13$

V_1 = le volume de la solution d'échantillon (6.2.) ; $V_1 = 200$ ml

ϵ = le coefficient d'extinction molaire moyen calculé selon 8.2.

d = le chemin optique, en cm, des cuvettes utilisées ; $d = 1,000$ cm

v_1 = le volume de la solution d'échantillon mise en œuvre (7.1.3.) ;
 $v_1 = 0,20$ ml

M = le poids de la denrée en grammes (6.2.)

8.2. Calculer le coefficient d'extinction molaire en $\text{cm}^2/\mu \text{ mol}$ à l'aide de la formule :

$$\epsilon = \Delta E \times \frac{V \times M_w}{c \times d \times v_1 \times 1000} \quad \frac{\text{cm}^2}{\mu \text{ mol}}$$

$$\text{ou } \varepsilon = \Delta E \times \frac{3,00 \times 147,13}{c \times 1 \times 0,20 \times 1000} \quad \begin{array}{l} \text{cm}^2 \\ / \\ \mu \text{ mol} \end{array}$$

$$\text{ou } \varepsilon = 2,207 \times \frac{\Delta E}{c} \quad \begin{array}{l} \text{cm}^2 \\ / \\ \mu \text{ mol} \end{array}$$

où :

$\Delta E = (E_{2M} - E_{1M}) - (E_{2B} - E_{1B})$ mesuré sous 7.2. pour la solution à blanc et celle de référence

$V =$ le volume total des solutions (7.2.) pipetées dans les cuvettes ;
 $V = 3,00$ ml

$Mw =$ le poids moléculaire de l'acide glutamique ; $Mw = 147,13$

$c =$ la concentration en mg/ml de la solution de référence diluée d'acide glutamique (4.17.)

$d =$ le chemin optique des cuvettes en cm ; $d = 1,000$ cm

$v_2 =$ le volume de la solution de référence mise en œuvre (7.2.1.) ;
 $v_2 = 0,20$ ml

Pour le calcul, décrit sous 8.1., de la teneur en acide glutamique des échantillons, utiliser la moyenne des coefficients d'extinction molaire calculés.

Article 2

1. Les Gouvernements des trois pays du Benelux prendront les mesures nécessaires pour que la méthode d'analyse de référence pour l'acide glutamique dans les potages, décrite à l'article 1^{er} de la présente décision soit considérée, au plus tard dans les trois mois de la signature de la décision comme seule méthode de référence.
2. Dans les 6 mois qui suivent l'expiration du délai prévu au § 1, chacun des trois Gouvernements fera rapport au Comité de Ministres sur les mesures qui ont été prises pour l'exécution de cette décision. Le texte des mesures d'exécution nationales sera joint à ce rapport.

FAIT à Bruxelles, le 4 mai 1979.

Le Président du Comité de Ministres,

G. THORN