

<b>C.T.C.P.A.</b>	<b>CONSERVES D'ASPERGES</b>	<b>DECISIONS N° 6 et 14</b>  <b>Avril 2004</b> <b>Mise à jour : indice b</b>
-------------------	-----------------------------	---

## **Titre I - DEFINITION**

### *Article 1*

Les conserves alimentaires d'asperges doivent être conformes aux critères ci-après et préparées à partir de tiges (turions) jeunes, tendres, fraîches ou surgelées d'*Asparagus officinalis* L.

Les variétés suivantes peuvent être utilisées :

- Asperges blanches : asperges de couleur blanche à crème ou blanc jaune avec éventuellement des pointes légèrement violettes
- Asperges à pointes vertes : asperges blanches dont la pointe et la portion attenante du turion ( ne dépassant pas la moitié de la longueur mesurée à partir de l'extrémité de la pointe) sont vertes.
- Asperges vertes : asperges de couleur verte, vert clair ou vert jaunâtre.

### *Article 2 - Préparation*

a) - La dénomination « asperges » avec mention du mode de présentation et du calibre est réservée aux conserves d'asperges additionnées d'un liquide de couverture composé d'eau et éventuellement de sel, de sucre (saccharose), d'acide citrique. Lorsque les asperges ne sont pas pelées la mention « non pelées » dans la dénomination de vente est obligatoire. Cette mention ne s'applique pas aux asperges vertes

b) - Tout autre mode de préparation du produit est admis à condition

- qu'il soit suffisamment différent des modes de préparation exposés dans la présente décision
- qu'il satisfasse à toutes les autres exigences de la présente décision
- qu'il soit décrit de façon appropriée sur l'étiquette afin qu'il n'y ait pas, pour le consommateur, possibilité de confusion ou d'erreur.

### *Article 3 - Mode de présentation*

La dénomination "Asperges" est réservée aux conserves d'asperges entières dont la longueur n'est pas inférieure à 9 cm.

La dénomination "Asperges courtes" est réservée aux conserves d'asperges dont la longueur est comprise entre 7 et 9 cm.

La dénomination "Asperges de plein champ " est réservée aux conserves d'asperges entières non calibrées (répartition naturelle des calibres) récoltées dans les 3 premières semaines de production et mise en conserve à l'état frais.

La dénomination "Asperges pic-nic", « Asperges miniature », désigne le produit préparé à partir de turions d'un diamètre compris entre 4 mm et 11 mm, et présentés en récipients d'une capacité égale à 212 ml. Les turions de diamètre inférieur ou supérieur ne peuvent être utilisés pour cette préparation.

La dénomination "Pointes d'asperges" est réservée aux conserves d'asperges préparées exclusivement avec les extrémités supérieures (bourgeons ) des turions, ayant une longueur de 3 cm à 7 cm.

## **DECISION N° 6 et 14 - Conserves d'Asperges - 2/5**

La dénomination "Asperges coupées" est réservée aux conserves d'asperges constituées d'asperges coupées transversalement en tronçons de 2 à 7 cm de long.

Cette dénomination peut être suivie de la mention « avec pointes », si la proportion de pointes n'est pas inférieure à 15% du poids net égoutté. Le pourcentage doit figurer dans la liste des ingrédients.

La dénomination "Morceaux d'asperges" est réservée aux conserves d'asperges constituées par des morceaux de longueur inférieure ou égale à 6 cm. Ils peuvent présenter des longueurs et des grosseurs différentes. La présence de pointes est admise.

La dénomination "Purée d'asperges" est réservée aux conserves constituées d'asperges cuites broyées et tamisées sans addition d'eau ni d'autre liquide.

La mention "préparée à partir d'asperges fraîches" peut être utilisée si les asperges ont été conditionnées dans les récipients à l'état frais.

Mélanges de deux calibres consécutifs : la dénomination de vente doit indiquer le pourcentage d'asperges de chaque calibre utilisé

### **Article 4 - Couleur**

Lors de l'utilisation d'asperges blanches à pointes vertes, d'asperges vertes, la couleur doit être mentionnée dans la dénomination de vente.

Pour les asperges blanches, la mention blanche n'est pas obligatoire.

### **Article 5 - Calibrage**

Les asperges entières, les asperges courtes, sont calibrées conformément au tableau suivant :

<b>DIAMETRE DES TURIONS</b>	<b>CATEGORIES</b>
Inférieur à 13 mm	Moyennes
Supérieur à 12 mm jusqu'à 18 mm	Grosses
Supérieur à 17 mm	Très grosses
Non calibrés	Non calibrées

Le diamètre est mesuré à la partie la plus épaisse sur l'asperge à l'état conservé, perpendiculairement à l'axe longitudinal. Pour les pointes d'asperges, s'il n'y a pas de calibrage, la mention "non calibrées" doit figurer dans l'étiquetage.

#### **Tolérance de calibrage :**

Pas plus de 20% en nombre de toutes les unités d'un récipient ne peuvent appartenir aux catégories des calibres voisins.

Pour les asperges des catégories moyennes et les asperges pic-nic, pas plus de 10% en nombre de toutes les unités d'un récipient ne doivent appartenir aux catégories des calibres voisins.

Pour tous les modes de présentation, à l'exception des asperges de plein champ et des mélanges d'asperges de calibre différents, le diamètre d'une unité la plus grosse contenue dans un récipient ne doit pas dépasser le double du diamètre de l'unité la plus mince.

### **Article 6 - Nombre de pièces par récipient**

Pour les asperges entières, le nombre de pièces par récipient doit être mentionné selon une gamme de nombres (nombre minimal, nombre maximal).

## DECISION N° 6 et 14 - Conserves d'Asperges-3/5

### Titre II - SPECIFICATIONS

#### Article 7

##### A) Caractéristiques de la matière première.

1°) - Les asperges employées à la préparation des produits visés par la présente décision doivent être fraîches, ou, suivant le cas, surgelées, saines, en bon état, posséder des pointes fermes, être exemptes de fibres ligneuses en excès, conformément aux dispositions du titre III ci-après, être bien droites et exemptes de taches".

Les turions tordus ne peuvent être employés qu'à la préparation des "pointes d'asperges", "asperges coupées ou en morceaux", et "purée d'asperges". Il en est de même des turions présentant des flétrissures, taches ou autres défauts légers, à condition que les portions défectueuses soient éliminées.

Les turions en mauvais état et les matières étrangères doivent être éliminés.

2°) - Les asperges employées à la préparation des produits visés par la présente norme doivent être soumises à un nettoyage et à un lavage appropriés.

3°) - Les asperges surgelées, destinées à la préparation des produits visés par la présente norme, doivent avoir été soumises à un procédé de congélation ultrarapide officiellement reconnu (décret du 9 septembre 1964, modifié). L'opération de congélation doit être conduite de manière à franchir très rapidement la zone de cristallisation maximum. Elle est suivie d'une stabilisation thermique permettant d'obtenir le plus rapidement possible une température à cœur des produits inférieure ou égale à -18°C.

#### Article 8

##### B) Caractéristiques générales du produit.

Les quantités nominales nettes et nettes égouttées pour les conserves définies au Titre I de la présente décision et pour les récipients les plus usités doivent correspondre aux indications du tableau ci-après :

	Taux de remplissage	BOÎTES METALLIQUES	RECIPIENTS EN VERRE
Capacité nominale en ml		212 340 425 525 850 920 1190	212 314 370 446 580 720 850
Poids net total en g		200 320 400 495 800 865 1120	190 280 330 420 530 660 780
Poids net égoutté en g			
- asperges blanches	59%	125 200 250 500 700	110 170 205 250 320 395 485
- asperges blanches en récipients rectangulaires et verticaux	65%	340 595	
- asperges vertes	54%	110 180 225 455 640	100 155 185 230 290 360 445

Dans le cas de récipient de capacité non prévue dans le tableau ci-dessus, le poids net total est calculé en fonction de la contenance nominale du récipient sur la base de 800 g pour la boîte de 850 ml.

Le poids net égoutté est calculé en fonction de la contenance nominale du récipient sur la base du taux de remplissage indiqué dans le tableau ci-dessus. Les valeurs obtenues sont arrondies à la plus proche valeur inférieure multiple de 5.

Pour les récipients en verre, la capacité nominale est réduite de 20 ml avant calcul.

En ce qui concerne le contrôle des quantités nettes et nettes égouttées, il est fait appel, par les Agents qui en sont chargés, aux méthodes de contrôle statistiques des préemballages définies par la réglementation en vigueur et aux dispositions générales relatives aux conserves de légumes appertisés.

Le contrôle métrologique de la quantité nette égouttée est effectué conformément aux modalités prévues pour le contrôle de la quantité nette, seules les erreurs en moins étant doublées.

## DECISION N° 6 et 14 - Conserves d'Asperges - 4/5

### Titre III - CARACTERES DE QUALITE

#### Article 9

#### I - Caractères normaux

Les conserves d'asperges, (autres que les purées), doivent en outre présenter les caractères minimum ci-après :

CARACTERES	PRODUITS	CONDITIONS EXIGÉES
1°) - Limpidité du liquide	Asperges blanches Asperges vertes	Liquide pratiquement limpide, ne laissant pas déposer, après un repos de 10 minutes, un sédiment dépassant 15% de la hauteur totale du liquide. Liquide pratiquement limpide, ne laissant pas déposer, après un repos de 10 minutes, un sédiment dépassant 20% de la hauteur totale du liquide.
2°) - Couleur	Asperges blanches et vertes	Couleur normale et franche sans nuance brune. Pas plus de 30% en nombre des asperges blanches dans un même préemballage ne doivent présenter des pointes vert-jaune avec une zone colorée d'une longueur maximale de 2 cm. Pas plus de 15% en nombre des asperges vertes dans un même préemballage ne doivent présenter une couleur blanche, crème ou blanc-jaune à la partie inférieure du turion, sur une longueur ne dépassant pas 20% de la longueur totale
3°) - Absence de défauts. a) - Sable ou terre b) - Turions ou morceaux tordus, présentant des taches ou flétrissures, attaques d'insectes, cicatrices, pointes désagrégées ou cassées, coupes défectueuses c) - Pointes ouvertes (1) d) - Longueur insuffisante	Asperges blanches et vertes Asperges blanches Asperges blanches Asperges vertes Asperges blanches et vertes	Absent 5% en nombre au maximum (3) 5% en nombre au maximum (3) 30% en nombre au maximum (dans le cas d'asperges coupées ou en morceaux, la proportion est rapportée aux pointes présentes) Au moins 15% en nombre des unités d'un même récipient doivent avoir la même longueur que la longueur prédominante, à 2 cm près. Au moins 95% en nombre des unités d'un même récipient doivent avoir la même longueur que la longueur prédominante, à 2 cm près. (longueur des pointes et morceaux)
4°) - Tendreté et texture - Turions présentant des fibres (2) dures. Morceaux présentant des fibres dures	Asperges blanches et vertes Asperges blanches Asperges vertes Asperges blanches Asperges vertes	20% en nombre au maximum. 20% en nombre au maximum et à condition que les fibres dures n'affectent que le tiers inférieur du turion. 15% en nombre au maximum 10% en nombre au maximum.
5°) - Odeur et saveur	Asperges blanches et vertes	Agréables, caractéristiques d'asperges fraîches, absence de toute odeur ou saveur étrangère ou anormale.

(1) Sont considérées comme pointes ouvertes les bourgeons légèrement ouverts

(2) sont considérés comme durs, les asperges ou les morceaux d'asperges qui ne peuvent pas être consommés en totalité ou qui possèdent des fibres ligneuses dissécables.

(3) Il est admis la présence d'un turion défectueux par préemballage

## **DECISION N° 6 et 14 - Conserves d'Asperges – 5/5**

### **II - Unités défectueuses**

Un préemballage est considéré comme défectueux si l'un des défauts mentionnés dans le tableau ci-dessus est supérieur aux tolérances.

Les conserves de purées d'asperges doivent présenter une couleur normale et franche sans nuance brune, une odeur et une saveur agréables caractéristiques d'asperges fraîches, être exemptes de toute odeur ou saveur étrangère ou anormale, ainsi que de sable ou de terre.

### **Titre V - METHODE D'EXAMEN**

#### *Article 10*

Les prélèvements d'échantillons et l'appréciation des différents caractères visés par la présente décision seront effectués selon les méthodes prescrites par les autorités chargées du contrôle et celles énoncées dans les dispositions générales applicables aux conserves de légumes appertisés pour le contrôle des masses nettes égouttées et du contrôle des spécifications qualitatives.

Il est précisé qu'en ce qui concerne la détermination du poids du produit égoutté et l'appréciation des caractères de qualité, les méthodes à suivre sont celles indiquées en ANNEXE (fiches n°1, 2 et 3).

-----

	<b>DETERMINATION DES QUANTITES NETTES ET NETTES EGOUTTEES DES CONSERVES DE LEGUMES APPERTISES</b>	Fiche : N° 1  Date : Mars 2001  Mise à jour : indice b
---	---	--

## ① - MODE OPERATOIRE :

La température du produit est ramenée à 20°C ± 5°C. Les mesures sont effectuées à température ambiante du laboratoire.

Peser le récipient avant ouverture (Pb), l'ouvrir\*, verser le contenu sur un tamis plat à mailles carrées de 2,5 mm (épaisseur du fil 0,85 mm selon norme ISO 3310/1) préalablement taré. Le diamètre de ce tamis sera de 20 cm pour les récipients de capacité inférieure ou égale à 850 ml et de 30 cm pour les récipients de capacité supérieure à 850 ml.

Incliner le tamis d'environ 20° par rapport à l'horizontale pour faciliter l'égouttage.

Egoutter 2 minutes à partir du moment où le produit est sur le tamis.

Peser le tamis et son contenu (Pe 2).

Rincer le récipient vide et son couvercle, les sécher puis les peser (Pr).

La masse nette = Pb - Pr

La masse nette égouttée = Pe2 - Pe1

Pe1 = la masse du tamis

Toutes les masses sont déterminées avec une précision de 1 g.

\*Les boîtes à ouverture facile doivent être ouvertes côté fond opposé à l'ouverture facile afin d'éviter d'abîmer le contenu lors du transvasement .

## ② - CAS PARTICULIERS :

**Mode opératoire applicable aux conserves de flageolets et de légumineuses et aux produits dont le liquide de couverture est pris en empois.**

Après avoir versé le contenu du récipient sur le tamis comme indiqué ci-dessus, recouvrir ce dernier d'un autre tamis de même caractéristique ou d'une grille adéquate. Immerger complètement le tamis ainsi recouvert dans une grande quantité d'eau à 20°C ±5, 2 fois 10 secondes. Séparer les deux tamis ou enlever la grille. Incliner le tamis inférieur d'environ 20° par rapport à l'horizontale puis procéder comme en 1.

	<b>DETERMINATION PONDERALE DES ELEMENTS DEFECTUEUX</b>	<b>Fiche : N° 2</b> <b>Date : Mars 1995</b> <b>Mise à jour : Indice a</b>
---	--	---

**- MODE OPERATOIRE :**

Après égouttage et détermination de la masse nette égouttée (voir Fiche 1) séparer les éléments défectueux en les classant par catégorie tel que définis dans les différentes décisions. Les peser à 0,1 g près.

Calculer les pourcentages par rapport à la masse nette égouttée mesurée.

	<b>MESURES DIMENSIONNELLES</b>	<b>Fiche : N° 3</b> <b>Date : Mars 2001</b> <b>Mise à jour : Indice b</b>
---	--------------------------------	---

### **- MODE OPERATOIRE :**

Les mesures dimensionnelles (longueur, épaisseur, diamètre) sont effectuées à l'aide d'un pied à coulisse au 1/10ème de millimètre.

Les mesures doivent être effectuées de telle façon que le pied à coulisse ne marque pas, ni n'écrase les légumes ou la partie de légume à mesurer.

Le calibre des haricots verts ou beurre doit être mesuré entre les deux lignes de suture.

Le calibre des salsifis doit être mesuré à la partie la plus étroite du morceau ou du tronçon.

	<b>MESURE DE LA DEPRESSION INTERNE DANS LES CONSERVES DE LEGUMES APPERTISES</b>	<b>Fiche : N° 6</b>  <b>Date : Mars 1995</b>  <b>Mise à jour : Indice a</b>
---	---	---

## ① - PRINCIPE :

La mesure de la dépression interne s'effectue à l'aide d'un vacuomètre muni d'un perforateur.

## ② - APPAREILLAGE :

- Vacuomètre ou Manomètre à vide métallique de type "Bourdon" mesurant les dépressions par rapport à l'atmosphère gradué en millibars dont l'échelle de lecture permet d'apprécier 25 millibars, muni d'un embout perforateur à ventouse permettant la prise directe de la dépression dans l'emballage.
- Vacuomètre électronique ou tout autre appareil permettant la mesure de la dépression par rapport à l'atmosphère, de précision équivalente muni d'un embout perforateur à ventouse.

## ③ - MODE OPERATOIRE :

Positionner le perforateur sur une partie plane de l'emballage (fond des boîtes, couvercle de bocal), pour avoir le meilleur contact avec la ventouse. Appuyer fermement sans à coup le perforateur pour que la pointe fixée dans la ventouse perce l'emballage. Lire aussitôt la valeur affichée sur le vacuomètre en maintenant un appui ferme.

Après chaque mesure, la pointe doit être essuyée pour éviter toute obstruction de la tubulure reliée ou soudée au vacuomètre.

	<b>DETERMINATION DE LA TENEUR EN MATIERES GRASSES</b>	Fiche : N° 7 Date : Mars 1995 Mise à jour : Indice a
---	---	--

## ① - PRINCIPE :

Extraction de l'échantillon séché par du n hexane ou de l'éther de pétrole. Elimination du solvant par évaporation, séchage du résidu sec puis pesée après refroidissement.

## ② - APPAREILLAGE :

- broyeur homogénéiseur à hélice
- appareil d'extraction continu de type Soxhlet ou similaire
- cartouche d'extraction
- étuve à 104°C ± 3°C
- dessiccateur garni d'un déshydratant efficace
- balance analytique

## ③ - REACTIF :

- n hexane ou éther de pétrole 40-65
- sulfate de sodium anhydre

## ④ - MODE OPERATOIRE :

Sécher pendant une heure à l'étuve réglée à 104°C ± 3°C la fiole de l'appareil d'extraction. Laisser refroidir la fiole jusqu'à la température ambiante dans le dessiccateur et peser à 1 mg près (soit Mo cette masse).

Broyer et homogénéiser la totalité du produit (légumes + liquide de couverture ou sauce) contenu dans le préemballage afin d'obtenir une pâte lisse. Dans un bécher de 100 ml peser exactement 10 g environ, à 1 mg près, du produit homogénéisé. Ajouter en mélangeant à l'aide d'un agitateur, du sulfate de sodium anhydre jusqu'à obtention d'une masse sèche se détachant facilement des parois du bécher. Transvaser cette

masse sèche de façon quantitative dans la cartouche d'extraction. Mettre la cartouche dans l'appareil d'extraction.

Verser dans la fiole de l'appareil d'extraction un volume de solvant d'extraction égal à 1,5 à 2 fois la capacité du tube intérieur de l'appareil.

Ajuster le ballon à l'appareil d'extraction.

Chauffer la fiole au bain-marie ou sur un appareil similaire approprié pendant quelques heures selon la vitesse d'extraction et l'appareil utilisé (4 heures en général).

Après extraction le solvant est éliminé totalement. Evaporer les dernières traces au bain marie.

Sécher la fiole pendant une heure à  $104^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  et après refroidissement à la température ambiante dans le dessiccateur.

Peser à 1 mg près (soit  $M_1$  cette masse).

Effectuer au moins deux déterminations sur le même échantillon préparé.

#### **EXPRESSION DES RESULTATS :**

La teneur en matières grasses en pour cent en masse de l'échantillon est égale à

$$(M_1 - M_0) \times \frac{100}{E}$$

$M_0$  masse en grammes de la fiole

$M_1$  Masse en grammes de la fiole et de la matière grasse après séchage

$E$  Masse en grammes de la prise d'essai

Exprimer le résultat avec une seule décimale.

#### **Répétabilité :**

La différence entre les résultats de deux déterminations effectuées simultanément ou rapidement l'une après l'autre ne doit pas être supérieure à 0,5 g de matière grasse pour 100 g d'échantillon.

	<b>DETERMINATION DE LA TENEUR EN IMPURETES MINERALES SABLES - GRAVIERS</b>	<b>Fiche : N° 8</b>  <b>Date : Mars 1995</b>  <b>Mise à jour : indice a</b>
---	--	---

## **① - PREPARATION DE L'ECHANTILLON :**

Homogénéiser l'ensemble des légumes égouttés après la détermination de la masse nette égouttée pour les préemballages de volume inférieur ou égal à 850 ml.

Pour les préemballages de volume supérieur, prélever 500 g de la masse nette égouttée et l'homogénéiser.

### ***CAS PARTICULIER DES EPINARDS HACHES OU EN PUREE :***

Pour les préemballages de volume inférieur ou égal à 850 ml, homogénéiser entièrement leur contenu. Pour les préemballages de volume supérieur, mélanger soigneusement avec un agitateur tout le contenu. Peser 500 g de produit et les homogénéiser dans un homogénéisateur à hélice.

## **② - MODE OPERATOIRE :**

Peser exactement à 0,5 g près la totalité du produit homogénéisé en ①, puis suivre le mode opératoire de la norme NFV05103 13/07/62 Détermination de la teneur en impuretés minérales d'origine terreuse.

	<b>DOSAGE DES SUCRES PAR VOIE ENZYMATIQUE DU SACCHAROSE ET DU GLUCOSE</b>	Fiche : N° 9 Date : Mars 1995 Mise à jour : indice a
---	---	--

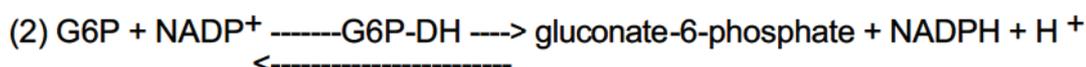
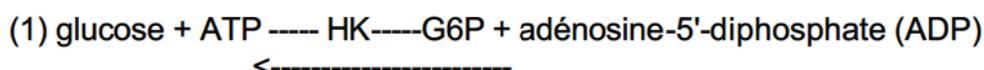
## 1 - PRINCIPE :

On dose le glucose avant et après l'hydrolyse enzymatique du saccharose.

### - Dosage du glucose avant inversion :

L'hexokinase (HK) catalyse la phosphorylation du glucose par l'adénosine 5' triphosphate (ATP) à pH 7,6.

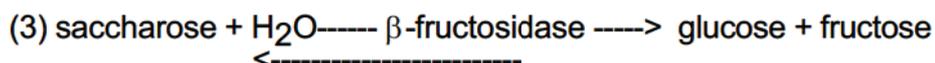
Dans une réaction catalysée par la glucose-6-phosphate-déshydrogénase (G6P-DH) le glucose-6-phosphate formé (G6P) est oxydé spécifiquement en présence de nicotinamide-adénine-dinucléotide-phosphate (NADP) en gluconate-6-phosphate, avec formation de nicotinamide-adénine-dinucléotide-phosphate réduit (NADPH).



La formation de NADPH, mesurée par l'augmentation de l'extinction à la longueur d'onde de 334, 340 ou 365 nm est proportionnelle à la quantité de glucose présente.

### - Inversion enzymatique :

Le saccharose est hydrolysé à pH 4,6 par la  $\beta$ -fructosidase (invertase) en glucose et fructose.



Le dosage du glucose après inversion (glucose total) se fait parallèlement selon le procédé décrit plus haut. La différence entre les teneurs en glucose avant et après inversion permet de calculer la teneur en saccharose.

## ② - REACTIFS :

Tous les réactifs utilisés doivent être de pureté analytique reconnue, l'eau utilisée doit être bidistillée.

### - Solution tampon citrate pH 4,6 :

- . acide citrique 1 H<sub>2</sub>O 6,9 g
- . citrate trisodique 2 H<sub>2</sub>O 9,1 g
- ajouter environ 150 ml d'eau distillée, mélanger
- . ajouter une solution de soude à 0,2 mole/litre jusqu'à pH 4,6.
- . eau distillée QS 200 ml

La solution est stable un an à +4°C.

### - Solution de β-fructosidase :

- . β-fructosidase 10 mg
- . eau bidistillée 2 ml

La solution est stable une semaine à +4°C.

### - Solution tampon triéthanolamine pH 7,6 :

- . chlorhydrate de triéthanolamine 14,0 g
- . sulfate de magnésium (SO<sub>4</sub> Mg 7H<sub>2</sub>O) 0,25 g
- ajouter environ 80 ml d'eau bidistillée, mélanger,
- . solution de soude à 5 moles/litre environ 5 ml
- (le pH doit être ajusté à 7,6 avec la soude)
- . eau bidistillée Q S 100 ml

Cette solution est stable 4 semaines à +4°C.

- **Solution de nicotinamide-adénine-dinucléotide-phosphate (NADP) :**

. NADP Na <sub>2</sub> H	60 mg
. eau bidistillée	6 ml

Cette solution est stable 4 semaines à +4°C

- **Solution d'adénosine 5' -triphosphate (ATP) :**

. ATP Na <sub>2</sub> H <sub>2</sub>	300 mg
. carbonate acide de sodium (NaHCO <sub>3</sub> )	300 mg
. eau bidistillée	6 ml

Cette solution est stable 4 semaines à +4°C.

- **Solution d'hexokinase/glucose-6-phosphate déshydrogénase (HK/G6P - DH) :**

Utiliser la suspension (2 mg de HK/ml, 1 mg de G6P-DH/ml) sans dilution.

Cette suspension est stable un an à + 4°C.

- **solution étalon de glucose :** contenant 1 g/l de glucose

- **solution étalon de saccharose :** contenant 1 g/l de saccharose

**③ - APPAREILLAGE :**

Matériel courant de laboratoire et notamment

- homogénéiseur de laboratoire.

3.1 - **Pipettes et micro-pipettes** permettant de délivrer 0,02 ; 0,1 ; 0,2 ; 1 ; 1,7 ; 1,8 ; 1,9 ml et 10 ml **NF B 35-305**

3.2 - **Spectrophotomètre** permettant des mesures à 340 nm et muni de cuves de 1 cm de trajet optique. Il est possible d'utiliser des cuves à usage unique.

Photocolorimètre à filtre permettant une mesure à 334 ou 365 nm.

### 3.3 - Balance analytique.

## **4** - MODE OPERATOIRE

### 4.1 - Préparation de l'échantillon

#### - échantillons liquides

Utiliser pour l'essai des solutions claires incolores ou légèrement colorées directement ou après dilution si nécessaire. Filtrer les solutions troubles ou clarifier les avec les réactifs de Carrez.

#### - échantillons solides

Broyer les échantillons solides ou pâteux (fruits, légumes, confitures...) avec un mixer, un hachoir. Peser l'échantillon bien homogénéisé, extraire à l'eau (chauffer à 60°C si nécessaire). Transférer quantitativement dans une fiole jaugée, ajuster. Filtrer. Utiliser la solution limpide éventuellement diluée comme essai.

### 4.2 - Essai étalon

Pour chacune des déterminations, effectuer un essai étalon dans les mêmes conditions que les essais respectifs (4.4 et 4.5) mais en remplaçant la prise d'essai par 0,1 ml de solution étalon de saccharose (3.8) ou de glucose (3.9) ou de fructose (3.10).

### 4.3 - Essai à blanc

Effectuer un essai à blanc dans les mêmes conditions que la détermination du saccharose mais en remplaçant la prise d'essai par de l'eau.

### 4.4 - Détermination du glucose et du saccharose

Les réactions enzymatiques se font directement dans les cuves de lecture du spectrophotomètre.

- mesurer la densité optique à une longueur d'onde de 334, 340 ou 365 nm dans une cuve de 1 cm d'épaisseur, à une température constante entre 20 à 25°C, en ajustant le zéro soit sur l'air (pas de cuve sur le trajet optique), soit sur une cuve remplie d'eau distillée.

- introduire dans des cuves :

	Témoin	Dosage direct	Dosage après hydrol.
. solution tampon citrate	0,20 ml	rien	0,20 ml
. solution à doser ou solution étalon	rien	0,10 ml	0,10 ml
. solution de $\beta$ -fructosidase	0,02 ml	rien	0,02 ml

mélanger, conserver les cuves à une température de 20 à 25°C pendant 15 minutes, ajouter :

. solution tampon triéthanolamine	1,00 ml	1,00 ml	1,00 ml
. eau bidistillée	1,70 ml	1,82 ml	1,60 ml
. solution de NADP	0,10 ml	0,10 ml	0,10 ml
. solution d'ATP	0,10 ml	0,10 ml	0,10 ml

Mélanger, lire la densité optique des solutions ( $E_1$ ) au bout de 3 minutes environ. Démarrer la réaction enzymatique par addition de :

. solution de HK/G6P-DH	0,02 ml	0,02 ml	0,02 ml
-------------------------	---------	---------	---------

Mélanger, attendre la fin de la réaction (environ 10 à 15 minutes) et mesurer la densité optique des solutions ( $E_2$ ). Si la réaction n'est pas terminée au bout de 15 minutes, continuer à lire les densités optiques de 5 minutes en 5 minutes jusqu'à ce que l'augmentation soit constante.

Si l'on observe des augmentations d'extinctions constantes, extrapoler au temps d'addition de la HK/G6P-DH.

Calculer les différences d'extinction ( $E_2 - E_1$ ) du témoin et du dosage.

Déduire la différence d'extinction du témoin de celle du dosage

$$\Delta E = \Delta E_d - \Delta E_t = (E_2 - E_1)_{\text{dosage}} - (E_2 - E_1)_{\text{témoin}}$$

et ce, avant et après hydrolyse.

## 5 - EXPRESSION DES RESULTATS

La formule générale pour le calcul des concentrations est la suivante :

$$C \text{ en g/L} = \frac{V \times PM}{\varepsilon \times d \times v \times 1000} \times \Delta E$$

dans laquelle :

V est le volume total dans la cuve, 3,14 ml

v est le volume de la prise d'essai

PM est le poids moléculaire de la substance à doser

d est l'épaisseur de la cuve en cm (1 cm)

$\varepsilon$  est le coefficient d'extinction du NADPH, 6,3 pour 340 nm, 3,5 pour 365 nm, 6,18 pour 334 nm.

On obtient ainsi pour le glucose :

$$\begin{aligned} C \text{ en g/L} &= \frac{3,14 \times 180,16}{\varepsilon \times 1 \times 0,1 \times 1000} \times \Delta E \text{ glucose avant hydrolyse} \\ &= 5,657 \times \frac{\Delta E}{\varepsilon} \end{aligned}$$

et pour le saccharose :

$$\begin{aligned} C \text{ en g/L} &= \frac{3,14 \times 342,3}{\varepsilon \times 1 \times 0,1 \times 1000} \times (\Delta E \text{ glucose total} - \Delta E \text{ glucose avant hydrolyse}) \\ &= 10,75 \times \frac{\Delta E \text{ glu. tot.} - \Delta E \text{ glu. av. hyd.}}{\varepsilon} \end{aligned}$$

Si une dilution a été effectuée lors de la préparation de l'échantillon, multiplier le résultat par le facteur de dilution F.

La quantité de saccharose et de glucose dans la cuve doit être comprise entre 5 et 150  $\mu\text{g}$  (mesure à 365 nm) ou 5 à 80  $\mu\text{g}$  (mesure à 340 ou 334 nm). Diluer la solution à doser de manière à ce que la concentration en sucre soit comprise entre 0,05 et 1,5 g/l ou entre 0,05 et 0,8 g/l.

	<b>DOSAGE DES SUCRES METHODE PAR HPLC</b>	<b>Fiche : N° 10</b>  <b>Date : Mars 1995</b>  <b>Mise à jour : Indice a</b>
---	---	--

## 1 - PRINCIPE :

Détermination des mono et disaccharides dans les liquides de couverture de certains légumes par chromatographie liquide haute performance (HPLC) et détection réfractométrique. L'identification des sucres repose sur le temps de rétention et l'analyse quantitative sur un étalonnage externe utilisant la surface ou la hauteur des pics.

## 2 - REACTIFS :

Pendant l'analyse, sauf spécifications contraires, n'utiliser que des réactifs de teneur analytique connue et de l'eau ayant une classe de pureté de minimum 3, conformément à la norme ISO 3696.

### 2.1 - Acetonitrile pour analyse HPLC

### 2.2 - Solutions étalons de sucres

#### 2.2.1 - Solution étalon de glucose et de fructose

Peser au milligramme près dans le même becher environ 500 mg de fructose et 500 mg de glucose. Les dissoudre dans de l'eau. Transvaser quantitativement dans une fiole jaugée de 100 ml. Ajuster le volume à 100 ml. La solution se conserve 10 jours au maximum à + 4°C environ.

#### 2.2.2 - Solution étalon de saccharose

Peser au milligramme près dans un becher environ 500 mg de saccharose. Le dissoudre dans de l'eau. Transvaser dans une fiole de 100 ml, ajuster le volume à 100 ml. La solution se conserve 10 j au maximum à + 4°C environ.

### **③ - APPAREILLAGE :**

#### **Appareillage courant de laboratoire et en particulier :**

**3.1** - Système de filtration permettant de filtrer le jus ou le liquide de couverture avec un filtre de 0,45  $\mu\text{m}$  de porosité. Par exemple il pourra être utilisé un système de filtre à monter sur seringue.

**3.2** - Filtre à membrane compatible avec la solution d'élution de pore  $\leq 0,45 \mu\text{m}$

**3.3** - Ensemble de chromatographie liquide, comprenant une pompe, un injecteur d'échantillon, un détecteur réfractométrique.

**3.4** - Colonne de séparation : colonne de silice greffée  $\text{NH}_2$

### **④ - MODE OPERATOIRE :**

#### **4.1 - Préparation de l'échantillon :**

Peser à 1 mg près 10 g environ de jus ou de liquide de couverture. Transvaser cette prise d'échantillon dans une fiole jaugée de 100 ml. Diluer et compléter à 100 ml avec de l'eau.

Filtrer la solution obtenue sur le filtre 3.2.

#### **4.2 - Dosage :**

Injecter la solution filtrée (4.1) dans le système chromatographique.

Conditions chromatographiques :

- Phase mobile : Acétonitrile/eau (80/20 V/V)
- Débit 1,2 ml/min.
- Température de la colonne : environ 30°C
- Détecteur réfractomètre
- Colonne (3.4)

Le dosage est effectué par la méthode d'étalonnage externe.

Intégrer les surfaces des pics ou déterminer leur hauteur et déterminer les concentrations en sucre par rapport aux étalons.

Une autre méthode consiste à faire une courbe d'étalonnage.

## 5 - MODE DE CALCUL :

Calculer en grammes pour 100 g d'échantillon, la concentration en fructose, glucose, saccharose à partir de l'équation suivante :

$$p \% = \frac{A_1 V_1 m_1}{A_2 V_2 m_0} \times 100$$

ou  $A_1$  est la surface ou la hauteur du pic pour le fructose, le glucose ou le saccharose de la solution pour essai (4.1) exprimée en unité de surface ou de longueur.

$A_2$  est la surface ou la hauteur du pic pour le fructose, le glucose ou le saccharose de la solution étalon (2.2) exprimée en unité de surface ou de longueur.

$V_1$  est le volume total exprimé en millilitre de la solution (4,1) pour essai.

$V_2$  est le volume total exprimé en millilitre de la solution étalon 2.2.

$m_1$  est la masse exprimée en grammes respectivement de fructose, de glucose et de saccharose contenues dans  $V_2$ .

$m_0$  est la masse initiale de l'échantillon exprimée en gramme