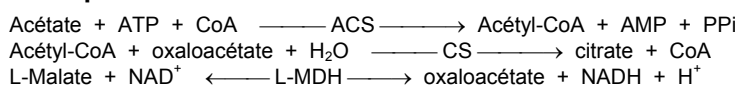


Méthode UV pour env. 32 déterminations

 Pour usage *in-vitro* uniquement
 Conservation entre +2 and +8°C

Méthode décrite dans les textes juridiques allemands et néerlandais. Recommandée par l'IFU, l'AIJN et le MEBAK. Standardisée selon les normes DIN et EN.

Principe



Ref.: Beutler, H.O. (1964) in Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H.U., ed.) 3rd ed., vol. VI, pp. 639-645, Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Berach/Florida, Basel.

Spécifications

Longueur d'onde: 340 nm (NADH)
 $\epsilon = 6,3 \text{ l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$
 Cuvettes mesure: 1,00 cm (verre; plastique)
 Température: +20 à +25°C
 Volume réactionnel: 3,230 ml
 Mesure: contre l'air ou l'eau
 Echantillons: 0,3 à 30 µg d'acide acétique dans 0,100 à 2,000 ml d'échantillon en solution

Réactifs

- # 1: Environ 32 ml de tampon triéthanolamine (TEA), pH 8,4 ; environ 134 mg d'acide L-malique ; environ 67 mg d'hexahydrate de sulfate de magnésium (voir péremption sur l'étiquette). *Le réactif est prêt à l'emploi.*
- # 2: Lyophilisat avec environ 175 mg ATP, env. 18 mg CoA et env. 86 mg NAD (voir péremption sur l'étiquette). *Diluer le contenu du flacon # 2 avec 7 ml d'eau distillée.* La solution de travail est stable 1 mois entre +2 et +8 °C, et 2 mois entre -15 et -25 °C.
- # 3: Environ 0,4 ml d'une suspension contenant du L-malate déshydrogénase / citrate synthase (L-MDH/CS) (1100 U/ 270 U) dans du sulfate d'ammonium (voir péremption sur l'étiquette). *Le réactif est prêt à l'emploi.* Agiter délicatement la suspension avant utilisation.
- # 4: Environ 0,7 ml d'une suspension contenant env. 16 U d'Acétyl-CoA-synthetase (ACS) dans du sulfate d'ammonium (voir péremption sur l'étiquette). *Le réactif est prêt à l'emploi.* Agiter délicatement la suspension avant utilisation.

Réactif supplémentaire (non contenu dans le coffret):

Standard acide acétique, 0,15 g/l, pour contrôles uniquement.

Les réactifs pour le dosage de l'acide acétique ne sont pas dangereux pour la santé. Appliquer les précautions habituelles en vigueur dans le laboratoire. Après usage, les réactifs doivent être éliminés comme déchets de laboratoire. Les emballages peuvent être recyclés.

Mode opératoire

Pipeter dans la cuvette	Blanc	Standard ¹	Echan- tillon ²	Essai en double ³	Test avec standard interne ⁴	Test haute sensibilité ⁵
Tampon TEA # 1	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml
ATP, CoA, NAD solution # 2	0,200 ml	0,200 ml	0,200 ml	0,200 ml	0,200 ml	0,200 ml
Echantillon⁶ (ex. 0,015 à 0,15 g d'acétate/l)	-	-	0,100 ml	0,200 ml	0,100 ml	2,000 ml
Standard ⁶ (ex. 0,15 g d'acétate/l)	-	0,100 ml	-	-	0,100 ml	-
Eau bi-distillée	2,000 ml	1,900 ml	1,900 ml	1,800 ml	1,800 ml	-
Mélanger⁷ le contenu de la cuvette. Mesurer la densité optique (absorbance A₀). Rajouter ensuite:						
L-MDH / CS suspension # 3	0,010 ml	0,010 ml	0,010 ml	0,010 ml	0,010 ml	0,010 ml
Mélanger⁷ le contenu de la cuvette. Mesurer la densité optique (absorbance A₁) après environ 3 minutes. Rajouter ensuite:						
ACS solution # 4	0,020 ml	0,020 ml	0,020 ml	0,020 ml	0,020 ml	0,020 ml
Mélanger⁷ le contenu de la cuvette. Après 10 à 15 minutes, mesurer l'absorbance (A₂) du blanc et des autres réactions immédiatement les unes derrière les autres. Répéter la mesure après 2 min⁸.						

Notes:

- Utiliser une solution de standard pour mettre en évidence des erreurs de manipulations lors de la procédure. La présence de ce standard n'est pas nécessaire pour le calcul des résultats.
- Ce test associé au blanc constitue une simple détermination.
- Dans le cas d'une double détermination, réaliser deux tests avec des volumes d'échantillon différents. Les différences d'absorbance mesurées doivent être proportionnelles aux volumes d'échantillons.
- Recouvrement = $[(\Delta A_{\text{échantillon} + \text{standard}} - \Delta A_{\text{échantillon}}) / \Delta A_{\text{standard}}] \times 100 \%$
- Lorsque le test est réalisé sur des échantillons où l'analyte est à l'état de traces, augmenter le volume de l'échantillon jusqu'à 2,000 ml (0,0015 à 0,015 g d'acide acétique par litre).
- Rincer la pipette ou l'embout de la pipette avec l'échantillon ou le standard avant le pipetage.
- Par exemple avec une spatule en plastique ou en retournant la cuvette recouverte de Parafilm (marque déposée de American Can Co., Greenwich Ct., USA).
- La réaction est terminée lorsque l'absorbance est constante. Si la réaction n'est pas terminée, continuer à lire les absorbances jusqu'à ce que leur augmentation soit constante sur 2 min. Extrapoler les absorbances au temps de l'addition de ACS (solution # 4).

Calcul des résultats

Déterminer les différences d'absorbances ($A_1 - A_0$) et ($A_2 - A_0$) du témoin (blanc) et de l'essai. Lorsque la réaction indicatrice précède la réaction proprement dite, on n'observe pas de proportionnalité directe entre les différentes d'absorbances et la quantité de substrat présente dans l'échantillon. La formule est la suivante:

$$\Delta A_{\text{acetic acid}} = \left[(A_2 - A_0)_{\text{sample}} - \frac{(A_1 - A_0)_{\text{sample}}^2}{(A_2 - A_0)_{\text{sample}}} \right] - \left[(A_2 - A_0)_{\text{blank}} - \frac{(A_1 - A_0)_{\text{blank}}^2}{(A_2 - A_0)_{\text{blank}}} \right]$$

$$c = (V \times MW \times \Delta A) / (\epsilon \times dx \times 1000) \quad [\text{g d'acide acétique/l}]$$

$$c = (3,230 \times 60,05 \times \Delta A) / (6,3 \times 1,00 \times 0,100 \times 1000) = \mathbf{0,3079 \times \Delta A} \quad [\text{g acide acétique / litre échantillon}]$$

Afin d'obtenir des résultats exacts et valables, la différence d'absorbance doit être au moins de 0,100.

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

Dans le cas de l'analyse d'échantillons solides ou semi-solides, pesés lors de la préparation d'échantillons, le résultat doit être rapporté à la quantité pesée:

$$\text{Contenu}_{\text{acide acétique}} = \frac{C_{\text{acide acétique}} [\text{g/l échantillon}]}{\text{poids}_{\text{échantillon}} [\text{en g/l échantillon}]} \times 100 [\text{g/100 g}]$$

Préparation des échantillons

- Diluer les échantillons liquides, transparents, clairs et pratiquement neutres pour obtenir une solution entre 0,015 et 0,15 g d'acide acétique par litre.
- Filtrer ou centrifuger les solutions troubles, diluer (voir point 1).
- Dégazer les échantillons contenant du dioxyde de carbone, par exemple par filtration, ou ajouter du NaHCO_3 jusqu'à ce que la solution soit légèrement alcaline, puis les diluer (voir point 1).
- Ajuster les solutions acides (surtout si elles sont colorées) avec du KOH ou NaOH à un pH de 8 à 9, incubé quelques minutes; si la solution est transparente, diluer sans ajuster le pH.
- Traiter les solutions fortement colorées et non diluées avec du PVPP (Polyvinyl Polypyrrolidon), du charbon activé ou du polyamide, par exemple 1 g/100 ml. Mélanger, incubé quelques minutes et filtrer.
- Broyer (taille des grains < 0,3 mm) ou homogénéiser les échantillons solides ou semi-solides, les extraire, ou les dissoudre dans de l'eau, filtrer et diluer si nécessaire (point 1).
- Extraire les échantillons contenant des matières grasses avec de l'eau chaude pour faire fondre la graisse, par exemple dans une fiole de 100 ml. Laisser la température baisser jusqu'à +20 °C, ajuster le volume à 100 ml puis stocker dans un réfrigérateur pendant environ 15 à 30 min, et filtrer. Une autre méthode recommandée est de clarifier avec les réactifs de Carrez.
- Clarifier les échantillons contenant des protéines avec les réactifs de Carrez:
Peser une quantité suffisante d'échantillons solides ou pâteux dans une fiole jaugée de 100 ml et ajouter environ 60 ml d'eau. Ou pipeter l'échantillon liquide dans une fiole jaugée de 100 ml contenant environ 60 ml d'eau. Ajouter, et mélanger après chaque addition, 5 ml de solution I de Carrez (3,6 g $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \times 3\text{H}_2\text{O}$ = hexacyanoferrate-II de potassium/100 ml), 5 ml de solution II de Carrez (7,2 g $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ = sulfate de zinc heptahydrate /100 ml). Ajuster à un pH de 7,5 à 8,5 en ajoutant par exemple 10 ml de NaOH (0,1 M). Compléter jusqu'à la marque, mélanger et filtrer.
- Déprotéiniser les échantillons contenant des protéines avec de l'acide perchlorique.

Performances du test

- Spécificité:** Spécifique de l'acide acétique. Lors de l'analyse d'acide acétique glacial, on observe des résultats < 100 %, et dans l'analyse d'acétate de sodium anhydre on obtient aussi des résultats < 100% car cet échantillon absorbe l'humidité.
- Sensibilité:** 0,1 mg d'acide acétique/l ($\Delta A = 0,005$; $v = 2,000$ ml; $V = 3,230$ ml)
- Limite de détection:** 0,15 mg d'acide acétique/l ($\Delta A = 0,010$; $v = 2,000$ ml; $V = 3,230$ ml)
- Linéarité:** 0,3 µg d'acide acétique ($v = 2,000$ ml; $V = 3,230$ ml)
à 30 µg d'acide acétique /test ($v = 0,100$ ml; $V = 3,230$ ml)
- Précision:** $\Delta A = \pm 0,005$ to $0,010$ d'absorbance
CV = env. 1 à 3 %

Saucisse de porc: $x = 0,3$ g/100 g	$r = 0,017$ g/100 g $R = 0,023$ g/100 g	$s(r) = \pm 0,006$ g/100 g $s(R) = \pm 0,008$ g/100 g
Ketchup:	$r = 0,05$ g/100 g $R = 0,07$ g/100 g	$s(r) = \pm 0,02$ g/100 g $s(R) = \pm 0,02$ g/100 g
Pain: $x = 131,89$ mg/100 g	$r = 7,53$ mg/100 g $R = 21,12$ mg/100 g	$s(r) = \pm 2,66$ mg/100 g $s(R) = \pm 7,46$ mg/100 g
Pain: $x = 204,55$ mg/100 g	$r = 7,41$ mg/100 g $R = 19,35$ mg/100 g	$s(r) = \pm 2,62$ mg/100 g $s(R) = \pm 6,84$ mg/100 g
- Interférences:** Les Esters d'acide acétique (par ex. dans le vin) sont lentement saponifiés dans les conditions du test, ce qui provoque une réaction parasite laquelle doit être soustraite par extrapolation au moment du pipetage de l'échantillon.
- Information technique:** L'acide acétique est volatile. Ceci doit être pris en considération, par ex. lors de la préparation des échantillons.