

Méthode UV pour env. 3 x 8 déterminations

Usage *in vitro*
Conserver entre +2 et +8°C

La méthode est décrite dans les textes officiels allemands, italiens, suisses, et européens. Recommandée par l'IDF, l'IFU, l'AIJN, le MEBAK, l'OIV et le VDLUFA. Standardisée selon les normes DIN, EN, GOST, ISO, NEN, NF. Approuvée par l'AOAC.

Principe

- (1) Citrate $\xrightarrow{\text{CL}}$ Oxaloacétate + Acétate
- (2) Oxaloacétate + NADH + H⁺ $\xrightarrow{\text{L-MDH}}$ L - Malate + NAD⁺
(Oxaloacétate $\xrightarrow{\text{Ox-DC/metal ions}}$ Pyruvate + CO₂)
- (3) Pyruvate + NADH + H⁺ $\xrightarrow{\text{L-LDH}}$ L -Lactate + NAD⁺

Ref.: Möllering, H. & Gruber, W. (1966). Determination of citrate with citrate lyase, Anal. Biochem. 17 , 369-376.

Spécifications

Longueur d'onde:	340 nm (NADH)	$\epsilon = 6,3 \text{ l x mmol}^{-1} \text{ x cm}^{-1}$
Cuvettes de mesure:	1,00 cm (verre; plastique)	
Température:	+20 à +25°C	
Volume réactionnel:	3,020 ml	
Mesure:	contre l'air ou l'eau	
Echantillons:	1 à 80 µg d'acide citrique dans	0,200 à 2,000 ml d'échantillon en solution

Réactifs

- # 1: 3 flacons de tampon glycyglycine lyophilisé, pH 7,8, contenant environ 110 U de L-MDH, 220 U de L-LDH, 4 mg de NADH (voir péremption sur l'étiquette). *Diluer le contenu d'un flacon # 1 avec 9 ml d'eau distillée.* La solution de travail est stable 2 semaines entre +2 et +8°C, et 4 semaines entre -15 et -25°C. Laisser atteindre la température ambiante avant utilisation.
- # 2: 3 flacons de Citrate-Lyase lyophilisée, environ 10 U/flacon (voir péremption sur l'étiquette). *Diluer le contenu d'un flacon # 2 avec 0,20 ml d'eau distillée, et laisser reposer pendant 30 min. à température ambiante.* La solution de travail est stable une semaine entre +2 et +8°C, et 4 semaines entre -15 et -25°C.

Réactif supplémentaire (non contenu dans le coffret):

Standard acide citrique, monohydrate, ultra-pur 0,4 g/l, pour contrôles uniquement.

Les réactifs pour le dosage de l'acide citrique 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	Echantillon ²	Essai en double ³	Test avec standard interne ⁴	Test haute sensibilité ⁵
Tampon Glycyglycine (L-MDH, L-LDH, NADH) # 1	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml
Echantillon⁶ (ex 0,04 à 0,4 g de citrate/l)	-	-	0,200 ml	0,100 ml	0,100 ml	2,000 ml
Standard ⁶ (ex. 0,4 g de citrate/l)	-	0,200 ml	-	-	0,100 ml	-
Eau bi-distillée	2,000 ml	1,800 ml	1,800 ml	1,900 ml	1,800 ml	-
Mélanger⁷ le contenu de la cuvette. Mesurer la densité optique (absorbance A₁) après environ 5 min. Rajouter ensuite:						
CL solution # 2	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 la fin de la réaction (environ 5 à 10 min), mesurer l'absorbance (A₂) du blanc et des autres réactions immédiatement les unes derrière les autres.						

Notes

- 1 Utiliser la solution standard pour mettre en évidence des erreurs de manipulation lors de la procédure. Il n'est pas nécessaire de tester les standards pour calculer la concentration des échantillons.
- 2 Ce test associé au blanc représente une simple détermination.
- 3 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.
- 4 Recouvrement = $[(2 \times \Delta A_{\text{échantillon}} + \Delta A_{\text{standard}}) / \Delta A_{\text{standard}}] \times 100 [\%]$.
- 5 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 2,0 ml (0,0005 à 0,04 g de citrate par litre).
- 6 Rincer la pipette ou l'embout de la pipette avec l'échantillon ou le standard avant le pipetage.
- 7 Par exemple avec une spatule en plastique ou en retournant la cuvette recouverte de Parafilm (marque déposée de American Can Co., Greenwich Ct., USA).

Calcul des résultats⁸

$$\Delta A = (A_1 - A_2)_{\text{échantillon ou standard}} - (A_1 - A_2)_{\text{blanc}}$$

Afin d'obtenir des résultats exacts et valables, la différence d'absorbance ΔA doit être comprise entre = 0,100 et 1,000.

$$c = (V \times MW \times \Delta A) / (\epsilon \times d \times v \times 1000) \text{ [g/l acide citrique]}$$

$$c = (3,020 \times 192,1 (210,1) \times \Delta A) / (6,3 \times 1,00 \times 0,200 \times 1000) = \mathbf{0,460 (0,504) \times \Delta A \text{ [g acide citrique (monohydrate) / litre échant.]}}$$

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 :

$$\text{Contenu}_{\text{citrate}} \text{ [g/100g]} = \frac{\text{concentration}_{\text{citrate}} \text{ [g/l échantillon]}}{\text{poids}_{\text{échantillon}} \text{ [en g/l échantillon]}} \times 100$$

Préparation des échantillons

- Diluer les échantillons liquides, transparents, clairs et pratiquement neutres pour obtenir une solution entre 0,04 et 0,4 g d'acide citrique par litre.
- Filter 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, incuber 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), par exemple à 1 g/100 ml. Mélanger, incuber quelques minutes et filtrer.
- Broyer ou homogénéiser les échantillons solides ou semi-solides, les extraire, les diluer ou les dissoudre dans de l'eau, filtrer et diluer si nécessaire (point1).
- Extraire les échantillons contenant des matières grasses avec de l'eau à une température suffisante pour faire fondre la graisse, par exemple dans une fiole jaugée de 100 ml. Laisser la température baisser jusqu'à 20°C, puis stocker dans un réfrigérateur pendant environ 30 min, et filtrer.
- Déprotéiniser les échantillons avec l'acide perchlorique (choisir l'une des 3 méthodes ci-dessous) :
 - Homogénéiser une quantité (g) d'échantillon (contenu en eau w en g/100 g) avec un volume b (ml) d'acide perchlorique (1 M), filtrer. Neutraliser un volume c (ml) de filtrat avec un volume d (ml) de KOH (5 M). Conserver à 4°C pendant 15 minutes, filtrer.
 - Homogénéiser une quantité (g) d'échantillon avec un volume b (ml) d'acide perchlorique (1 M). Neutraliser avec du KOH (5 M). Transférer dans une fiole jaugée de 100 ml, compléter jusqu'à la marque avec de l'eau distillée (la couche huileuse est située au-dessus de la marque). Conserver à 4°C pendant 15 min, filtrer.
 - Homogénéiser une quantité (g) d'échantillon (contenu en eau w en g/100 g) avec un volume b (ml) d'acide perchlorique (1 M), filtrer. Neutraliser avec un volume d (ml) de KOH (5 M). Conserver à 4°C pendant 15 min, filtrer.
- La clarification de Carrez ne peut pas être utilisée pour la préparation des échantillons, la quantité d'acide citrique récupérée étant trop faible.

Performances du test

- Spécificité:** Test spécifique de l'acide citrique. Lors de l'analyse de monohydrate de citrate vendu dans le commerce, il faut s'attendre à des résultats > à 100 % si l'eau cristalline s'évapore durant la conservation, et que les résultats sont calculés en monohydrate de citrate.
- Sensibilité:** 0,25 mg/l ($\Delta A = 0,005$; v = 2,000 ml ; V = 3,020 ml)
- Limite de détection:** 0,5 mg/l ($\Delta A = 0,010$; v=2,000 ml; V= 3,020 ml)
- Linéarité:** 1 µg/test (v = 2,000 ml; V = 3,020 ml)
à 80 µg/test (v = 0,200 ml; V = 3,020 ml)
- Précision:** $\Delta A = \pm 0,005$ à 0,010 unités d'absorbance
CV = environ 1 à 3 %
- Interférences:** Aucune connue pour l'analyse des aliments. Si nécessaire, éliminer les composés phénoliques lors de la préparation des échantillons.
- Informations techniques :** Lors des calculs, les résultats peuvent être donnés en citrate (recommandé) ou en citrate-monohydrate.

Notes

- ⁸ Les résultats d'une détermination de l'acide citrique par acidimétrie (les protons sont mesurés) ne peuvent être comparés à l'analyse enzymatique (le citrate est mesuré)