

Méthode UV pour env. 32 déterminations

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

La méthode est décrite dans les textes de loi allemands, italiens, suisses, et européens. Elle est recommandée par ex. par l'IFU (International Federation of Fruit Juice Producers), l'AIJN (Association of the Industry of Juices and Nectars), le MEBAK (Mittleeuropäische Brautechnische Analysen-Kommission), l'OIV (Office International de la Vigne et du Vin). Standardisée selon les normes DIN (Allemagne), EN (Europe), GOST (Russie), NEN (Hollande), NF (France). Approuvée par l'AOAC (Association of Analytical Communities, USA).

Principe

(1) L-Malate + NAD⁺ $\xrightarrow{\text{L-MDH}}$ oxaloacétate + NADH + H⁺

(2) Oxaloacétate + L-glutamate $\xrightarrow{\text{GOT}}$ L - aspartate + 2-oxoglutarate

Ref.: Möllering, H. (1985) in Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H.U., ed.) 3rd ed., vol VII, pp. 39-47, Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach/Florida, Basel.

Spécifications

Longueur d'onde: 340 nm (NADH), $\epsilon = 6,3$ (l x mmol⁻¹ x cm⁻¹)
 Cuvettes de mesure: 1,00 cm (verre; plastique)
 Température: +20 à +25°C
 Volume réactionnel: 2,220 ml
 Mesure: contre l'air ou l'eau
 Echantillons: 0,5 à 30 µg d'acide L-malique dans 0,10 à 1,0 ml d'échantillon en solution

Réactifs

- # 1: Environ 34 ml de tampon glycyglycine, pH env. 10,0, contenant environ 490 mg d'acide L-glutamique (voir péremption sur l'étiquette). *Le réactif est prêt à l'emploi.*
- # 2: NAD, lyophilisat, environ 250 mg (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 de GOT (env. 160 U) dans du sulfate d'ammonium (voir péremption sur l'étiquette). *La suspension est prête à l'emploi.* Agiter délicatement la suspension avant utilisation.
- # 4: Environ 0,4 ml de solution de L-malate déshydrogénase (L-MDH, env. 2400 U) dans du glycérol (voir péremption sur l'étiquette). *La solution est prête à l'emploi.*

Réactif supplémentaire (non contenu dans le coffret):

Standard acide L-malique, 0.15 g /l, pour contrôles uniquement.

Les réactifs pour le dosage de l'acide L-malique 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 # 1	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml
NAD solution # 2	0,200 ml	0,200 ml	0,200 ml	0,200 ml	0,200 ml	0,200 ml
GOT suspension # 3	0,010 ml	0,010 ml	0,010 ml	0,010 ml	0,010 ml	0,010 ml
Echantillon⁶ (ex. 0,02 à 0,15g de L-malate/l)	-	-	0,100 ml	0,200 ml	0,100 ml	1,000 ml
Standard ⁶ (ex. 0,15g de L-malate/l)	-	0,100 ml	-	-	0,100 ml	-
Eau bi-distillée	1,000 ml	0,900 ml	0,900 ml	0,800 ml	0,800 ml	-
Mélanger⁷ le contenu de la cuvette. Mesurer la densité optique (absorbance A₁) après environ 3 min. Rajouter ensuite:						
L-MDH solution # 4	0,010 ml	0,010 ml	0,010 ml	0,010 ml	0,010 ml	0,010 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. Répéter la mesure après 2 min⁸.						

Notes

- 1 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.
- 2 Ce test associé au blanc constitue 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 = $[(\Delta A_{\text{échantillon}} + \text{standard} - \Delta A_{\text{échantillon}}) / \Delta A_{\text{standard}}] \times 100$ [%]
- 5 Lorsque le test est réalisé sur des échantillons ou l'analyte est à l'état de traces, augmenter le volume de l'échantillon jusqu'à 1,000 ml (0,0005 à 0,015 g de L-malate 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).
- 8 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 L-MDH (suspension # 4)
- 9 Les résultats d'une détermination de l'acide malique par acidimétrie (on mesure les protons H⁺) ne peuvent être comparés à une analyse enzymatique

Préparation des échantillons

1. Diluer les échantillons liquides, transparents, clairs et pratiquement neutres pour obtenir une solution entre 0,02 et 0,15 g d'acide L-malique par litre.
2. Filtrer ou centrifuger les solutions troubles, diluer (voir point 1).
3. Dégazer les échantillons contenant du dioxyde de carbone, par exemple par filtration, ou ajouter NaHCO₃ jusqu'à ce que la solution soit légèrement alcaline, puis les diluer (voir point 1).
4. Ajuster les solutions acides (spécialement les solutions colorées comme le vin rosé ou rouge) avec du KOH ou NaOH à un pH de 8 à 10, incubé quelques minutes (sinon, la modification de pH lors de la réaction entraîne une modification de couleur et de densité optique). Si la solution est acide mais incolore, diluer sans ajustement de pH (voir point 1).
5. Mesurer les échantillons colorés (ajustés à un pH 8) contre un blanc échantillon.
6. Les solutions très colorées qui ne sont pas diluées en raison de leur faible teneur en malate sont à décolorer sur PVPP (polyvinyl polypyrrolidone) ou sur polyamide (1g/100 ml). Mélanger, incubé quelques minutes et filtrer.
7. Broyer (grains <0,3 nm) ou homogénéiser les échantillons solides ou semi-solides, les extraire, les diluer ou les dissoudre dans de l'eau, filtrer et diluer si nécessaire (point 1).
8. Extraire les échantillons contenant des matières grasses avec de l'eau à une température suffisante pour faire fondre la graisse, par exemple dans une bouteille de 100 ml. Laisser la température baisser jusqu'à +20 °C, puis stocker dans un réfrigérateur pendant environ 30 min, et filtrer.
9. Pour ce test de l'acide malique, il n'est pas recommandé d'utiliser la réaction de Carrez ou la déprotéinisation avec l'acide perchlorique, car les recouvrements obtenus sont trop bas.

Calcul des résultats⁹

Calculer les différences d'absorbance du témoin (blanc) et de l'essai (échantillon). Déduire la différence d'absorbance du témoin de celle de l'essai:

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

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

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

$$C_{\text{acide L-malique}} = (V \times MW \times \Delta A) / (\epsilon \times d \times v \times 1000) \text{ [g d'acide L-malique / l d'échantillon]}$$

On obtient donc pour l'acide L-malique (à 340 nm, et pour une prise d'essai de 0,100 ml):

$$c = (2,220 \times 134,09 \times \Delta A) / (6,3 \times 1,00 \times 0,100 \times 1000) = \mathbf{0,4725 \times \Delta A} \quad \text{[g acide L-malique / litre échant.]}$$

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:

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

Performances du test

1. Spécificité: Test spécifique de l'acide L-malique (ion L-malate). Lors de l'analyse de L-malate vendu dans le commerce, il faut s'attendre à des résultats de l'ordre de 99%.
2. Sensibilité: 0,25 mg/l ($\Delta A = 0,005$; $v = 1,000$ ml ; $V = 2,220$ ml)
3. Limite de détection: 0,5 mg/l ($\Delta A = 0,010$; $v = 1,000$ ml; $V = 2,220$ ml)
4. Linéarité: 0,5 µg/test ($v = 1,000$ ml; $V = 2,220$ ml)
à 30 µg/test ($v = 0,100$ ml; $V = 2,220$ ml)
5. Précision: $\Delta A = \pm 0,005$ à 0,010 unités d'absorbance
CV = environ 1 à 2 %

Fruit juice: $r = 0,014 + 0,030 \times C_{\text{L-malic acid in g/l}} \text{ [g/l]}$
 $R = 0,032 + 0,070 \times C_{\text{L-malic acid in g/l}} \text{ [g/l]}$

Wine: $r = 0,03 + 0,034 \times C_{\text{L-malic acid in g/l}} \text{ [g/l]}$
 $R = 0,05 + 0,071 \times C_{\text{L-malic acid in g/l}} \text{ [g/l]}$
6. Interférences: Il peut y avoir une réaction résiduelle après la conversion du L-malate au point A₂. Il n'est pas nécessaire d'extrapoler la valeur de mesure si les absorbances du témoin et de l'échantillon sont mesurées immédiatement l'une après l'autre.