

Méthode UV pour env. 32 déterminations

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

Méthode acide D ou L-lactique décrite dans les textes officiels allemands, italiens, néerlandais, suisses et européens. Recommandée entre autres par l'IDF, l'IFU, l'AIJN, le MEBAK, l'OIV et le VDLUFA. Elle est standardisée selon les normes ISO, DIN, EN, GOST.

Principe

D-Lactate + NAD⁺ ——— D-LDH ———> pyruvate + NADH + H⁺

L-Lactate + NAD⁺ ——— L-LDH ———> pyruvate + NADH + H⁺

Pyruvate + L-glutamate ——— GPT ———> L-alanine + 2-oxoglutarate

Ref.: Gawehn, K. (1984) in Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H.U., ed.) 3rd. ed., vol. VI, pp. 588-592, Verlag Chemie, Weinheim, Basel.
Noll, F. (1966) Methode zur quantitativen Bestimmung von L(+)-Lactat mittels LDH und GPT, Biochem. Z. 346, 41-49.

Spécifications

Longueur d'onde: 340 nm (NADH), $\epsilon = 6,3 \text{ l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$
 Cuvettes de mesure: 1,00 cm (verre; plastique)
 Température: 20 à 25 °C
 Volume réactionnel: **2,240 ml** pour le premier test effectué (D-lactate dans notre exemple)
2,260 ml pour le second test effectué dans la même cuvette
 Mesure: contre l'air ou l'eau
 Solution d'essai: 0,3 à 30 µg d'acide D+L-lactique/cuvette (dans 0,1 à 1,0 ml d'échantillon)

Réactifs

- # 1: environ 34 ml de tampon glycyglycine, pH 10, environ 490 mg d'acide L-glutamique (voir péremption sur l'étiquette). La solution est prête à l'emploi.
- # 2: environ 250 mg de lyophilisat 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 0,7 ml d'une suspension enzymatique composée de glutamate-pyruvate transaminase (GPT, environ 1100 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-D: environ 0,7 ml d'une solution enzymatique composée de D-lactate déshydrogénase (D-LDH, environ 3800 U) dans du glycérol (voir péremption sur l'étiquette). *La solution est prête à l'emploi.*
- # 4-L: environ 0,7 ml d'une solution enzymatique composée de L-lactate déshydrogénase (L-LDH, environ 3800 U) dans du glycérol (voir péremption sur l'étiquette). *La solution est prête à l'emploi.*

Réactifs supplémentaires (non contenus dans le coffret):

Standards D-lactate ou L-lactate, dans sel de lithium ou de calcium, 0,15 g/l, uniquement pour les contrôles.

Les réactifs pour le dosage de l'acide D/L-lactique 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
GPT suspension # 3	0,020 ml	0,020 ml	0,020 ml	0,020 ml	0,020 ml	0,020 ml
Echantillon⁶ (ex. 0,02 à 0,15 g D+L-lactate/l)	-	-	0,100 ml	0,200 ml	0,100 ml	1,000 ml
Standard ⁶ (ex. 0,15 g D ou L-lactate/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	-
Mélanger le contenu de la cuvette ⁷ . Mesurer la densité optique (absorbance A ₁) après environ 5 min. Rajouter ensuite:						
D-LDH solution # 4-D	0,020 ml	0,020 ml	0,020 ml	0,020 ml	0,020 ml	0,020 ml
Mélanger le contenu de la cuvette ⁷ . Après environ 30 min, mesurer l'absorbance du blanc et des autres réactions (A ₂) immédiatement les unes derrière les autres. Rajouter ensuite:						
L-LDH solution # 4-L	0,020 ml	0,020 ml	0,020 ml	0,020 ml	0,020 ml	0,020 ml
Mélanger le contenu de la cuvette ⁷ . Après environ 30 min, mesurer l'absorbance du blanc et des autres réactions (A ₃) immédiatement les unes derrière les autres. Répéter la mesure après 2 min ⁸ .						

Voir notes page suivante

Calcul des résultats⁹

$$\Delta A_{\text{acide D-lactique}} = (A_2 - A_1)_{\text{échantillon ou standard}} - (A_2 - A_1)_{\text{blanc}}$$

$$\Delta A_{\text{acide L-lactique}} = (A_3 - A_2)_{\text{échantillon ou standard}} - (A_3 - A_2)_{\text{blanc}}$$

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

$$c = (2,240 \times 90,1 \times \Delta A) / (6,3 \times 1,00 \times 0,100 \times 1000) = \mathbf{0,3204 \times \Delta A \text{ [g/l d'acide D-lactique]}}$$

$$c = (2,260 \times 90,1 \times \Delta A) / (6,3 \times 1,00 \times 0,100 \times 1000) = \mathbf{0,3232 \times \Delta A \text{ [g/l d'acide L-lactique]}}$$

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:

$$\text{Contenu}_{\text{ac. D ou L-lactique}} = \frac{C_{\text{ac. D ou L-lactique}} \text{ [g/l échantillon]}}{\text{poids}_{\text{échantillon}} \text{ [en g/l échantillon]}} \times 100 \text{ [g/100 g]}$$

Préparation des échantillons

Si les échantillons présentent l'une ou l'autre des caractéristiques ci-dessous, qui perturbent le test, suivre les instructions correspondantes :

1. Diluer *les échantillons liquides transparents, clairs et pratiquement neutres* pour obtenir une solution contenant 0,02 à 0,15 g d'acide L-lactique par litre (dans un volume v = 0,100 ml).
2. Filtrer ou centrifuger *les solutions troubles*. Diluer le surnageant (voir point 1).
3. Eliminer le gaz carbonique *des échantillons gazeux* par exemple par agitation et filtration ou en ajoutant du NaHCO₃ jusqu'à obtenir une solution légèrement alcaline.
4. Neutraliser *les solutions acides* (spécialement les solutions colorées comme le vin rosé ou rouge) avec du KOH ou NaOH à un pH de 7, incuber quelques minutes (sinon, la modification de pH lors de la réaction entraîne une modification de couleur et de DO). 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 Lactate sont à décolorer sur PVPP (Polyvinyl Polypyrrolidon) ou sur polyamide (1g/100 ml). Mélanger, incuber quelques minutes et filtrer.
7. Broyer et homogénéiser *les aliments solides* (taille des grains < 0,3 mm), homogénéiser *les aliments pâteux*. Après extraction à l'eau ou dissolution dans l'eau, filtrer et diluer (voir point 1) si nécessaire.
8. Extraire les échantillons *riches en matières grasses* avec de l'eau chaude à une température supérieure au point de fusion des graisses, dans une fiole graduée de 100 ml. Ajuster à +20 °C, compléter avec de l'eau jusqu'à la marque. Conserver le flacon sur de la glace ou au réfrigérateur de 15 à 30 minutes, filtrer. On peut aussi clarifier ces échantillons avec les réactifs de Carrez.
9. 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 K₄[Fe(CN)₆] x 3H₂O = hexacyanoferrate-II de potassium/100 ml), 5 ml de solution II de Carrez (7,2 g ZnSO₄·7 H₂O = 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.

10. Déprotéiniser les échantillons avec de l'acide perchlorique.

Performances du test

1. **Spécificité** Spécifique pour l'acide D-Lactique ou L-lactique (les ions D-Lactate et L-lactate réagissent). Lors de l'analyse d'acide D-lactique (L-lactique) vendu dans le commerce, des résultats de l'ordre de 99 % (98 %) sont attendus. L'acide L-Lactique libre ne peut pas être utilisé comme standard car le lactyl-lactate partiellement formé ne peut pas réagir.
2. **Sensibilité:** 0,15 mg/l (ΔA = 0,005; v = 1,000 ml ; V = 2,240 / 2,260 ml)
3. **Limite de détection:** 0,30 mg/l (ΔA = 0,010; v = 1,000 ml; V = 2,240 / 2,260 ml)
4. **Linéarité:** 0,30 µg/test (v = 1,000 ml; V = 2,240 / 2,260 ml)
à 30 µg/test (v = 0,100 ml; V = 2,240 / 2,260 ml)
5. **Précision:** ΔA = +/- 0,005 à 0,010 unités d'absorbance
CV = environ 2 à 3 %
Yogourt: r = 0,03 g d'acide D-lactique / 100g resp. 0,05 g d'acide L-lactique /100g
R = 0,05 g d'acide D-lactique / 100g resp. 0,07 g d'acide L-lactique /100g
Wine: r = 0,02 + 0,07 x C_{acide L-lactique} [g/l]
R = 0,05 + 0,125 x C_{acide L-lactique} [g/l]
6. **Interférences:** Il peut y avoir une réaction résiduelle après la conversion du lactate 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.
7. **Informations** La transpiration des mains contient du L-lactate.

Notes

- 1 Utiliser la solution standard pour mettre en évidence des erreurs de manipulation lors de la procédure. La présence du standard n'est pas nécessaire pour le calcul des concentrations.
- 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 = [(ΔA_{échant.} + standard - ΔA_{échant.}) / ΔA_{standard}] x 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 1,0 ml (0,0003 à 0,015 g d'acide D+L-lactique 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.
- 8 La réaction est terminée lorsque l'absorbance est constante. Si la réaction n'est pas terminée, continuer à lire absorbances jusqu'à ce que l'augmentation soit constante sur 2 min. Extrapoler les absorbances au temps de l'addition de D-LDH (solution # 4-D) ou L-LDH (solution # 4-L).
- 9 Les résultats mesurés par acidimétrie « totale » (mesure des protons) et exprimés en acide lactique ne peuvent être comparés à la méthode enzymatique.