

Méthode colorimétrique pour env. 24 déterminations

 Usage *in vitro* uniquement
 Conservation +2 à +8°C

La méthode est recommandée entre autres par le MEBAK (Central European Commission for Brewing Technology)

Principe



Ref.: Beutler ; H.-O. & Beestingl, G. (1980) Bestimmung von L-Ascorbinsäure in Lebensmitteln, Deutsche Lebensmittel-Rundschau 76, p. 69-75.

Spécifications

Longueur d'onde :	578 nm (MTT-formazan) $\epsilon = 16,9 \text{ (l x mmol}^{-1} \text{ x cm}^{-1}\text{)}$
Cuvettes de mesure :	1,00 cm (verre; plastique)
Température :	+37°C
Volume réactionnel :	2,700 ml
Mesure :	contre l'air, l'eau ou un blanc échantillon
Solution d'essai :	0,5 à 20 µg d'acide L-ascorbique/cuvette (dans 0,1 à 1,600 ml d'échantillon)

Réactifs

- # 1: 2 flacons contenant chacun environ 26 ml de tampon sodium phosphate/citrate, pH 3,5, environ 80 mg de MTT (bromure de 3 - (4,5 dimethylthiazolyl-2) - 2,5 - diphenyltetrazolium) (voir péremption sur l'étiquette). *La solution est prête à l'emploi.* Afin de garantir la stabilité de la solution # 1, il est recommandé de prélever uniquement la quantité nécessaire et de ne chauffer que cette quantité à 37°C.
- # 2: Ce kit ne contient pas de spatules d'ascorbate oxydase (AAO); elles sont remplacées par un flacon contenant environ 600 U d'ascorbate oxydase (voir péremption sur l'étiquette). *Diluer le contenu du flacon #2 avec 0,5 ml d'eau distillée* (quantité suffisante pour 24 déterminations). La solution de travail est stable 4 semaines entre +2 et +8 °C.
- # 3: Environ 5,5 ml d'une solution de PMS, environ 25,3 mg de 5-methylphenazinium methylsulfate. *La solution est prête à l'emploi.*

Réactif supplémentaire (non contenu dans le coffret):

Standard acide L-ascorbique, ultrapure, 0,2 g/l, uniquement pour les contrôles.

Les réactifs pour le dosage de l'acide L-ascorbique 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	Test Standard ¹	Blanc Echantillon ^{2,3,4}	Test Echantillon ^{2,3,4}	Blanc avec standard interne ⁵	Test avec standard interne ⁵
Na phosphate, citrate, MTT flacon # 1	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml
Eau bi- distillée	1,480 ml	1,500 ml	1,480 ml	1,500 ml	1,480 ml	1,500 ml
Echantillon⁶ (0,02 à 0,2 g de L-ascorbate/l)	-	-	0,100 ml	0,100 ml	0,050 ml	0,050 ml
Standard ⁶ (ex. 0,2 g L-ascorbate/l)	0,100 ml	0,100 ml	-	-	0,050 ml	0,050 ml
AAO flacon # 2	0,020 ml	-	0,020 ml	-	0,020 ml	-
Mélanger vigoureusement le contenu de la cuvette⁷ (afin d'introduire suffisamment d'air dans la cuvette). Incuber à +37°C pendant 6 minutes. Mesurer la densité optique (absorbance A₁). Rajouter ensuite:						
PMS solution # 3	0,100 ml	0,100	0,100 ml	0,100 ml	0,100 ml	0,100 ml
Mélanger le contenu de la cuvette⁷ dans l'obscurité (car la réaction est sensible à la lumière après l'addition du PMS). Incuber à +37°C pendant 15 minutes. Mesurer la densité optique (absorbance A₂).						

Notes

- 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 (il s'agit en fait d'un contrôle qualité).
- 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. Faire les calculs avec les volumes respectifs.
- 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 1,600 ml (0,0003 à 0,01 g d'acide L-ascorbique par litre).
- Recouvrement = $[(2 \times \Delta A_{\text{échantillon}} + \text{standard} (= \text{test avec standard interne}) - \Delta A_{\text{échantillon}}) / \Delta A_{\text{standard}}] \times 100 [\%]$.
- 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.

Calcul des résultats

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

La différence d'absorbance doit être au moins de 0,100.

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

$$c = (2,700 \times 176,13 \times \Delta A) / (16,9 \times 1,00 \times 0,100 \times 1000) = \mathbf{0,2814 \times \Delta A \text{ [g acide L-ascorbique / litre d'échantillon]}}$$

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:

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

Préparation des échantillons

- Diluer les échantillons liquides transparents, clairs et colorés avec de l'acide méta-phosphorique, 1,5 % (w/v), pH 3,5 pour obtenir une solution contenant 0,02 à 0,2 g d'acide L-ascorbique par litre (dans un volume v = 0,100 ml).
- Filtrer ou centrifuger les solutions troubles. Diluer le surnageant (voir point 1).
- Éliminer le gaz carbonique des échantillons gazeux par filtration. Diluer (voir point 1).
- Les solutions très colorées qui ne sont pas diluées sont à décolorer sur PVPP (Polyvinyl Polypyrrolidon) (1g/100 ml). Mélanger, incubé quelques minutes et filtrer.
- Broyer et homogénéiser les aliments solides (taille des grains < 0,3 mm), homogénéiser les aliments pâteux. Après extraction avec de l'acide méta-phosphorique ou dissolution dans l'eau, filtrer et diluer (voir point 1) si nécessaire.
- Extraire les échantillons riches en matières grasses avec de l'eau chaude à une température supérieure au point de fusion des graisses, par exemple dans une fiole jaugée 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.
- Déprotéiniser les échantillons avec de l'acide méta-phosphorique, 15 % (w/v), ajuster à pH 3,5 à 4,0 avec du KOH (2M), diluer avec de l'eau distillée pour obtenir une concentration de 1,5 % (w/v) d'acide méta-phosphorique.

Note : la clarification avec les réactifs de Carrez ne peut pas être utilisée pour la préparation des échantillons car elle fausse les résultats à la baisse (l'acide ascorbique est instable à pH alcalin).

Performances du test

- Spécificité :** Spécifique pour l'acide L-ascorbique (l'acide Iso-ascorbique réagit à une vitesse réduite : 20 minutes de réaction contre 6 minutes pour l'acide L-ascorbique). Lors de l'analyse d'acide L-ascorbique vendu dans le commerce, des résultats inférieurs à 100 % sont attendus en fonction de l'ancienneté du matériel et des conditions de conservation.
- Sensibilité :** 0,1 mg/l ($\Delta A = 0,005$; v = 1,600 ml ; V = 2,700 ml)
- Limite de détection :** 0,3 mg/l ($\Delta A = 0,015$; v = 1,600 ml; V = 2,700 ml)
- Linéarité :** 0,5 µg/test (v = 1,600 ml; V = 2,700 ml)
à 20 µg/test (v = 0,100 ml; V = 2,700 ml)
- Précision :** $\Delta A = \pm 0,005$ à 0,010 unités d'absorbance
CV = environ 1 à 3 %
- Interférences :** Des quantités de D-sorbitol supérieures à 20 mg /test et d'éthanol supérieures à 100 mg/test inhibent l'AAO. Des quantités de sulfite supérieures à 50 µg/test réagissent avec le MTT/PMS dans une réaction rampante (d'où une DO A₂ instable). Les sulfites dans le vin doivent être éliminés par l'addition de formaldéhyde.
- Informations techniques :**
 - Les réactions avec le MTT et spécialement avec le PMS sont sensibles à la lumière.
 - Mélanger vigoureusement après l'addition de l'AAO afin de remplacer l'oxygène consommé par l'AAO par l'oxygène de l'air.
 - Utiliser de l'acide méta-phosphorique (par exemple de Merck, Darmstadt, cat. No. 546), 1,5 % (w/v), ajusté à un pH de 3,5 - 4,0 par l'addition de KOH (10 M).