

Dosage de l'éthanol d'une boisson annoncée à moins de 1,2 % (v/v) par méthode enzymatique au point final

Il est possible de doser l'éthanol par méthode enzymatique au point final de la réaction. La méthode est bien décrite dans la littérature.



La réaction est catalysée par l'éthanol déshydrogénase (ALDH), la spécificité pour l'éthanol est excellente (le butanol est un interférent notoire). On travaille en excès de NAD^+ . La réaction est rendue totale en travaillant à pH alcalin à 8,7 et en utilisant un réactif de l'éthanal dans le milieu, un semicarbazide¹. A complétude de la réaction, On mesure le NADH produit par absorptiométrie à 340 nm.

Travail à réaliser :

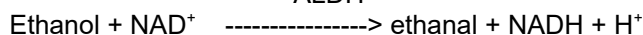
- Doser l'éthanol du « panaché » fourni ;
- Vérifier la limite de linéarité du dosage annoncée supérieure à 1g/L ;
- Vérifier la durée nécessaire pour la complétude de réaction (annoncée à 30 min. à température ambiante).

Documents de travail disponibles :

- annexe 1. Documentation technique générale sur la méthode de dosage ;
- annexe 2. Mode opératoire pour étudier la limite de linéarité ;
- annexe 3. Mode opératoire pour valider la durée nécessaire pour la complétude de réaction.

Annexe 1. Dosage de l'éthanol par méthode enzymatique au point final de réaction

ALDH



La réaction est catalysée par l'éthanol déshydrogénase (ALDH), la spécificité pour l'éthanol est suffisante pour la plupart des échantillons biologiques (le butanol est un interférent notoire). On travaille en excès de NAD^+ . La réaction est rendue totale en travaillant à pH alcalin à 8,7 et en utilisant un réactif de l'éthanal dans le milieu, un semicarbazide¹. A complétude de la réaction, On mesure le NADH produit par absorptiométrie à 340 nm.

Des kits commerciaux de dosage sont disponibles. Ces kits sont onéreux et on montre que si on réalise la solution de travail nécessaire à partir des produits chimiques poudres, on divise le prix par 8 ou 10.

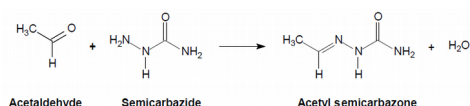
<p>On a fabriqué localement :</p> <ul style="list-style-type: none"> - tampon pyrophosphate 75 mM, glycine 22 mM, semicarbazide 75 mM, pH 8,7 25°C ; - solution de NAD^+ 25 mM (conservée à -20°C) ; - ALDH de levure à 300 U/mg (Sigma A7011), divisée en lots de 7 mg en microtubes, conservation à -20°C 	<p>La solution de travail pour les dosages s'obtient par : 42 mL de tampon final+ 3 mL solution NAD^+ + un lot de 7mg d'ALDH. Stable au moins la journée à 0-4°C.</p> <p>La concentration finale en NAD^+ est donc de 1,7 mM et celle en ALDH de >40 U/mL</p>
--	--

Le mode opératoire de dosage est le suivant :

	Témoin réactif	Etalon	Essai
Eau	20 µL		
Etalon 0,500 g/L		20 µL	
Echantillon			20 µL
Solution de travail	2000 µL	2000 µL	2000 µL
Mélanger. Incuber 10 min à 37°C, 15 min à 30°C, 30 min à température ambiante. Lire à 340 nm. 2 heures de stabilité.			

Linéarité au moins jusqu'à 1,1 g/L.

Certains essais peuvent demander la réalisation d'un témoin de compensation échantillon.



Annexe 2. Vérification de limite de linéarité du dosage annoncée supérieure à 1g/L

Des étalons préparés ce jour par pesée exacte d'éthanol absolu et stockés à 0-4 °C sont disponibles.

Mode opératoire :

	Témoin réactif	Etalon 0,250 g/L	Etalon 0,500 g/L	Etalon 1,000 g/L
Eau	20 µL			
Etalon		20 µL	20 µL	20 µL
Solution de travail	2000 µL	2000 µL	2000 µL	2000 µL
Mélanger. Incuber 10 min à 37°C, 15 min à 30°C, 30 min à température ambiante. Lire à 340 nm.				

Annexe 3. Vérification de durée pour atteindre la complétude de réaction

Mode opératoire :

	Essai
Etalon 0,500 g/L (ou 0,250 ou 1,000)	20 µL
Solution de travail	2000 µL

Suivre l'évolution de la réaction en continu à 340 nm immédiatement à la réalisation du mélange. Travailler à température ambiante et noter cette température.

Un suivi cinétique de témoin réactif peut aussi être réalisé.

Bibliographie

- *Determination of ethanol*. NINFA, ALEXANDER J., DAVID P. BALLOU, & MARILEE BENOIRE. *Fundamental Laboratory Approaches for Biochemistry and Biotechnology*. 2nd ed. Hoboken NJ: John Wiley & Sons, 2009, pp. 321–322 & 328–329.
- *Documentation technique d'un fabricant de kits de dosage*, Biolabo <http://www.biolabo.fr/biolabo/index.php/fr/biochimie> et <http://www.biolabo.fr/biolabo/pdfs/noticesFR/biochimieFR/FT-99029.pdf>