

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 :

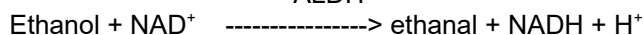
- Doser l'éthanol du « panaché » fourni ;
- Vérifier la limite de linéarité du dosage annoncée supérieure à 1g/L ;
- Vérifier la durée nécessaire pour la complétude de réaction (annoncée à 30 min. à température ambiante).

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.

On conditionne localement :	La solution de travail pour les dosages s'obtient par :
- R1 : tampon pyrophosphate 75 mM, glycine 22 mM, semicarbazide 75 mM, NaOH pH 8,7 25°C ;	<i>Exemple. 45 mL de tampon R1 + NAD^+ (75 μmol) par exemple en reprise avec 2 à 3 mL de R1 et retour dans le flacon + un lot de 7mg d'ALDH par exemple en reprise avec 1,5 mL de R1 et retour dans le flacon.</i>
- R2 : NAD^+ trihydrate (717,47 g/mol) pesée en petit tube hémolyse à reprendre extemporanément à la reconstitution du kit. Selon les exemples à côté : (75 μmol) 54 mg ou (150 μmol) 108 mg ou (225 μmol) 161,5 mg.	<i>Exemple. 90 mL de tampon R1 + NAD^+ (150 μmol) + 2 lots de 7mg d'ALDH</i>
- R3 : ALDH de levure à 300 U/mg (Sigma A7011), divisée en lots de 7 mg en microtubes eppendorf de 2 mL à reprendre extemporanément à la reconstitution du kit.	Dans la solution de travail, la concentration finale en NAD^+ est de 1,7 mM et celle en ALDH de >40 U/mL .

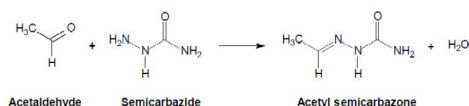
Le mode opératoire de dosage est le suivant :

	Témoin réactif	Etalon	Essai
Eau	10 μL		
Etalon 0,500 g/L		10 μL	
Echantillon			10 μL
Solution de travail	1000 μL	1000 μL	1000 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.

Note : Si on lit contre un zéro spectro. H_2O , le témoin réactif a une absorbance vers 0,200-0,250 ; un étalon 0,5 g/L lu contre le témoin vers 0,676 (soit vers 0,876 – 0,926 contre de l'eau) , une étalon 1 g/L lu contre le témoin vers 1,350 (soit vers 1,550 – 1,600 contre de l'eau) On peut évidemment prévoir des témoins de compensation échantillons.

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	10 µL			
Etalon		10 µL	10 µL	10 µL
Solution de travail	1000 µL	1000 µL	1000 µL	1000 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)	10 µL
Solution de travail	1000 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.

Annexe 4. Données concernant l'éthanol

Ethanol :

masse molaire 46,0684 g/mol ;

masse volumique 0,7893 g/mL à 20°C ;

volatil (ébullition 79°C).

Bibliographie

- *Determination of ethanol*. NINFA, ALEXANDER J., DAVID P. BALLOU, & MARILEE BENORE. *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>