

## METHODE UV

Pour la détermination du glycérol dans les aliments

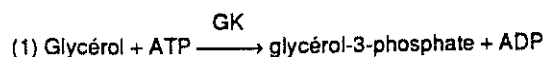
Réf. 148 270

Test-Combination

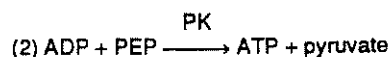
pour environ 3 x 10 déterminations.

## Principe (réf. 1)

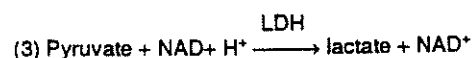
La glycérokinase (GK) catalyse la phosphorylation du glycérol en glycérol-3-phosphate par l'adénosine-5'-triphosphate (ATP) (1).



L'adénosine-5'-diphosphate (ADP) formé est à nouveau transformé en ATP par le phosphoénol-pyruvate (PEP) en présence de pyruvate-kinase (PK) avec formation de pyruvate (2).



Le pyruvate est réduit en lactate par le nicotinamide-adénine-dinucléotide réduit (NADH) en présence de lactate-déshydrogénase (LDH) (3).



La quantité de NAD<sup>+</sup> formé durant la réaction est proportionnelle à la quantité de glycérol. L'oxydation du NADH est mesurée par la diminution de son absorbance à la longueur d'onde de 334 nm, 340 nm ou 365 nm.

## Composition du coffret

- 3 flacons contenant chacun 2 g du mélange tampon/coenzyme composé de :  
 Tampon glycyglycine — pH 7,4  
 NADH — 7 mg  
 ATP — 22 mg  
 PEP — 11 mg  
 Sulfate de magnésium  
 Stabilisateurs.
- Flacon 2 contenant 0,4 ml de suspension enzymatique composée de :  
 Pyruvate-kinase — env. 240 U  
 Lactate-déshydrogénase — env. 220 U
- Flacon 3 contenant env. 0,4 ml de suspension de Glycérokinase :  
 — env. 34 U
- Flacon standard (4 ml).

## Préparation des solutions pour 10 dosages

- Dissoudre le contenu d'un flacon 1 dans 11 ml d'eau bidistillée. Laisser la solution env. 10 min. à température ambiante avant utilisation.
- Utiliser le contenu du flacon 2 sans diluer.

3. Utiliser le contenu du flacon 3 sans diluer.

4. Utiliser le contenu du flacon standard sans le diluer.

## Stabilité des solutions

La solution 1 se conserve au moins 2 semaines à + 4 °C.

Les suspensions des flacons 2 et 3 se conservent au moins un an à + 4 °C.

Le standard est stable jusqu'à la date indiquée sur le flacon.

## Mode opératoire

Longueur d'onde<sup>1</sup> : 340 nm, 365 nm (Hg) ou 334 nm (Hg).

Cuve de verre<sup>2</sup> : 1 cm d'épaisseur.

Température : 20 à 25 °C

Volume du test : 3,02 ml

Mesurer contre l'air (pas de cuve dans le trajet optique) contre l'eau ou contre le témoin<sup>3</sup>.

Solution d'essai : 3 à 40 µg de glycérol/cuve<sup>4</sup>.

Introduire dans les cuves	Témoin	Essai
Solution 1	1,00 ml	1,00 ml
Eau bidistillée	2,00 ml	1,90 ml
Essai <sup>4</sup>	—	0,10 ml
Suspension 2	0,01 ml	0,01 ml
Mélanger**, après env. 5 à 7 min. lire les absorbances des solutions (A <sub>1</sub> ). Déclencher la réaction par addition de :		
Suspension 3	0,01 ml	0,01 ml
Mélanger**, attendre la fin de la réaction (environ 5 à 10 min.) et lire les absorbances des solutions (A <sub>2</sub> ). Si la réaction n'est pas terminée après 15 min., continuer à lire les absorbances de 2 mn en 2 mn jusqu'à ce que la diminution de l'absorbance soit constante sur 2 mn.		

1) L'absorption maximale du NADH et NADPH est située à 340 nm. La mesure s'effectue à 340 nm avec un photomètre à spectre continu, et à 334 nm ou 365 nm avec un photomètre à spectre discontinu.

2) A la place des cuves de verre, on peut utiliser les cuves à usage unique du commerce.

3) Dans le cas de l'utilisation d'un spectrophotomètre à double faisceau.

4) Voir les recommandations pour la réalisation du test et la préparation des échantillons.

Si l'on observe pour A<sub>2</sub> des diminutions constantes d'absorbance, extrapoler l'absorbance au temps de l'addition de la suspension 3.

Déterminer les différences d'absorbances (A<sub>1</sub> — A<sub>2</sub>) du témoin et de l'essai.

Déduire la différence d'absorbance du témoin de celle de l'essai.

$$\Delta A = \Delta A_E - \Delta A_T$$

\* Rincer la pipette ou l'embout de pipette avec la solution échantillon avant le pipetage.

\*\* Par exemple avec une spatule en plastique ou en agitant doucement après avoir bouché les cuves avec du parafilm (marque déposée de American Can Company, Greenwich CT. USA).

## Calcul

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

$$c = \frac{V \times PM}{\epsilon \times d \times v \times 1000} \times \Delta E \text{ (g/l)}$$

**V** = volume du test (ml)  
**v** = volume de l'essai (ml)  
**PM** = poids moléculaire de la substance à doser  
**d** = épaisseur de la cuve (cm)  
 **$\epsilon$**  = coefficient d'absorption du NADH :  
 340 nm = 6,3 (l. mmole<sup>-1</sup> · cm<sup>-1</sup>)  
 Hg 365 nm = 3,4 (l. mmole<sup>-1</sup> · cm<sup>-1</sup>)  
 Hg 334 nm = 6,18 (l. mmole<sup>-1</sup> · cm<sup>-1</sup>)

On obtient pour le glycérol :

$$c = \frac{3,02 \times 92,1}{\epsilon \times 1 \times 0,1 \times 1000} \times \Delta A = 2,781 \times \frac{\Delta A}{\epsilon}$$

(g de glycérol/l de solution d'essai)

Si une dilution a été effectuée lors de la préparation de l'échantillon multiplier le résultat par le facteur de dilution F.

### Utilisation du standard

Comme contrôle des différentes opérations de la technique utiliser la solution standard. La concentration exacte est indiquée sur l'étiquette du flacon. Le standard est une solution aqueuse de glycérol stabilisé. Lors du pipetage on utilise 0,1 ml de standard à la place de la solution échantillon.

## Recommandations pour la réalisation du test

La quantité de glycérol dans la cuve doit être comprise entre 3 µg et 40 µg.

Diluer la solution d'essai de manière que la concentration en glycérol se situe entre 0,03 et 0,4 g/l.

## Tableau de dilution

Quantité estimée de glycérol par litre	Dilution avec de l'eau	Facteur de dilution F
< 0,4 g	-	1
0,4 à 4,0 g	1 + 9	10
4,0 à 40 g	1 + 99	100
> 40 g	1 + 999	1000

Si la différence d'absorbance mesurée ( $\Delta A$ ) est faible < 0,100, la solution échantillon doit être re préparée (augmenter la pesée de départ ou diluer moins) ou bien augmenter le volume de la prise d'essai (jusqu'à 2 ml). Dans ce cas, on réduit le volume de l'eau à ajouter afin que les volumes totaux soient les mêmes dans les deux cuves. Tenir compte du nouveau volume (v) pour le calcul.

## 1 - Préparation des échantillons

### 1.1 ALIMENTS LIQUIDES

#### Dosage du glycérol dans les jus de fruits

Diluer le jus jusqu'à ce que la concentration en glycérol soit inférieure à 0,4 g/l (voir tableau de dilution).

Filter les jus troubles. Utiliser pour le test la solution limpide ou légèrement colorée.

Décolorer les jus fortement colorés (p. ex. jus de griotte ou de raisin) de la façon suivante :

Mélanger 10 ml de jus avec env. 0,1 g de poudre de polyamide ou de polyvinylpyrrolidone, agiter env. 1 min. et filtrer. Utiliser pour le test la solution limpide ou légèrement colorée.

#### Dosage du glycérol dans le vin

- Diluer le vin selon sa teneur estimée en glycérol (dans le cas d'une teneur élevée en glycérol, introduire 1 ml de vin dans une fiole jaugée de 25 ml et compléter jusqu'au trait avec de l'eau). En général, il n'est pas nécessaire de décolorer les vins rouges.

#### Dosage du glycérol dans la bière

Agiter avec un agitateur en verre env. 5 à 10 ml de bière durant env. 1 min. pour éliminer le gaz carbonique.

Selon sa teneur en glycérol, diluer l'échantillon pratiquement exempt de CO<sub>2</sub>.

### 1.2 ALIMENTS SOLIDES

Réduire l'échantillon dans un mortier, un hachoir ou un homogénéisateur.

Peser l'échantillon bien homogénéisé, effectuer une extraction par l'eau. Si nécessaire, chauffer à 60 °C. Introduire quantitativement dans une fiole jaugée et compléter avec de l'eau jusqu'au trait. Filtrer et utiliser la solution limpide pour le test.

Si nécessaire, diluer selon la concentration en glycérol (voir tableau de dilution).

#### Dosage du glycérol dans le massépain

Peser exactement une quantité de l'ordre de 1 g de massépain (éliminer si c'est le cas l'enrobage de chocolat) dans un récipient en porcelaine, ajouter env. 2 g de sable marin, broyer correctement, mélanger avec 50 ml d'eau et chauffer à env. 60 °C durant 20 min. Transvaser le sumageant dans une fiole jaugée de 100 ml. Laver à deux reprises le résidu (sable marin) avec 10 ml d'eau à chaque fois et transvaser l'eau de lavage dans la fiole jaugée. Laisser refroidir à la température ambiante et compléter avec de l'eau jusqu'au trait. Laisser reposer env. 15 min. pour obtenir une séparation des graisses. Filtrer la solution ou centrifuger à 3000 tours/min. Utiliser pour le test la solution presque limpide, diluer si nécessaire (voir tableau de dilution).

#### Détermination du glycérol dans le tabac

Mélanger et broyer (taille maximale des particules 0,4 mm). Peser exactement environ 1 g dans une fiole jaugée de 100 ml. Après addition d'environ 70 ml d'eau distillée, agiter vigoureusement (sous agitation magnétique) durant 1 heure à température ambiante. Compléter jusqu'à la marque, mélanger et filtrer. Pipeter 25 ml de filtrat dans une fiole jaugée de 50 ml, ajouter successivement en agitant vigoureusement : 5 ml de solution I de Carrez [(3,60 K 4 [Fe (CN) 6] · 3 H 20/100 ml)] 5 ml de solution de Carrez II (7,20 g Zn (SO<sub>4</sub>) 7 H<sub>2</sub>O 100 ml) et 10 ml de NaOH 0,1 mol/l. Compléter jusqu'à la marque avec de l'eau, mélanger et filtrer. Utiliser le filtrat comme essai (0,1 - 0,5 ml).

## 2 - Dosage du glycérol des triglycérides après hydrolyse enzymatique

La détermination des graisses dans les produits laitiers tels que le lait, les yoghourts, peut se faire par le dosage du glycérol libéré après hydrolyse enzymatique des triglycérides.

Faire le dosage sans préparation préalable de l'échantillon, en particulier sans séparation des graisses de l'échantillon dilué. Cette méthode permet également la détermination précise d'une faible quantité de graisses dans l'échantillon. (Fiche technique disponible sur demande).

## 3 - Autres applications

La méthode peut être utilisée pour des dosages dans le papier (réf. 3) les cosmétiques (réf. 9) et en recherche pour l'analyse d'échantillons biologiques. Concernant la préparation des échantillons, leurs stabilités, consulter la référence (1).

### 3.1 DETERMINATION DU GLYCEROL DANS LE PLASMA ET LE SERUM (réf. 1, 2)

Mélanger 1,0 ml de plasma ou de sérum avec 4 ml d'eau bidistillée dans un tube de centrifugation et incubé dans un bain marie bouillant pendant 5 minutes, centrifuger. Utiliser 0,5 ml de surageant comme essai.

Le facteur de dilution F (dépendant de la préparation de l'échantillon) est obtenu à partir du volume d'échantillon (1,0 ml), le poids volumique (1,03 g/ml de plasma ou sérum) et de la fraction liquide (0,92 dans le cas du plasma ou sérum) :

$$F = \frac{(1,0 \times 1,03 \times 0,92) + 4,0}{1,0} = 4,95$$

Calcul

$$c = \frac{0,5563 \times \Delta A \times F}{\epsilon} \quad [\text{g glycérol/l d'échantillon}]$$

$$c = \frac{6,040 \times \Delta A \times F}{\epsilon} \quad [\text{mmol glycérol/l d'échantillon}]$$

Longueur d'onde	Hg 365 nm	340 nm	Hg 334
c [g/l]	0,8099 x ΔA	0,4371 x ΔA	0,4456 x ΔA
c [mmol/l]	8,794 x ΔA	4,746 x ΔA	4,838 x ΔA

### 3.2 DETERMINATION DU "GLYCEROL TOTAL" (LIBRE ET ESTERIFIE) DANS LE SERUM (réf. 10)

Mélanger 0,2 ml de sérum avec 0,5 ml de potasse ethanolique (0,5 mol/l ; exempte de glycérol) dans un tube à centrifuger. Couvrir le tube avec du parafilm® (marque déposée de American Can Co. ; Greenwich Ct. USA) et incubé pendant 30 minutes à 55° (ou 60 minutes à 37°) dans un bain marie. Ramener à la température ambiante, ajouter 1,0 ml d'une solution de sulfate de magnésium (0,15 mol/l exempte de glycérol), mélanger et centrifuger. Utiliser 0,5 ml du surageant pour essai.

Le facteur de dilution F (dépendant de la préparation d'échantillon) est obtenu à partir du volume d'échantillon (0,2 ml) du volume de la potasse ethanolique (0,5 ml) le poids volumique de l'échantillon (1,03 g/ml pour le sérum) et de la fraction liquide (0,92 pour le sérum) :

$$F = \frac{0,2 \times 1,03 \times 0,92 + 0,5 + 1,0}{0,2} = 8,45$$

Calcul

$$c = \frac{0,5563 \times \Delta A \times F}{\epsilon} \quad [\text{g glycérol total/l d'échantillon}]$$

$$c = \frac{6,040 \times \Delta A \times F}{\epsilon} \quad [\text{mmol glycérol total/l d'échantillon}]$$

Longueur d'onde	Hg 365 nm	340 nm	Hg 334
c [g/l]	1,383 x ΔA	0,7462 x ΔA	0,7606 x ΔA
c [mmol/l]	15,01 x ΔA	8,101 x ΔA	8,259 x ΔA

### 3.3 DETERMINATION DU GLYCEROL DANS LES MILIEUX DE CULTURE ET DE FERMENTATION

Placer l'échantillon (après centrifugation si nécessaire) dans un bain marie à 80° pendant 15 minutes pour bloquer les réactions enzymatiques. Centrifuger et utiliser le surageant (diluer selon le tableau de dilution). Si nécessaire effectuer une déprotéinisation à l'aide d'acide perchlorique ou des réactifs de Carrez. Homogénéiser les milieux Agar avec de l'eau et traiter ensuite comme décrit.

## Bibliographie

1. Eggstein, M. & Kuhlmann, E. (1974) in *Methoden der enzymatischen Analyse* (Bergmeyer, H.U., Hrsg.) 3. Aufl., Bd. 2, S. 1871-1877, Verlag Chemie, Weinheim, and (1974) in *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, H.U., ed.) 2nd ed., vol. 4, p. 1825-1831 ; Verlag Chemie, Weinheim/Academic Press, Inc., New York and London.
2. Wieland, O.H. (1984) in *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, H.U. ed.) 3rd ed., vol. VI, pp. 504-510, Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach/Florida Basel.
3. *Untersuchung von Papieren, Kartons und Pappe für Lebensmittel-Verpackungen (gem. Empf. XXXVI der Kunststoffkommission des Bundesgesundheitsamtes) Kapitel 8 (Methoden), Pkt. 3.5.2. (März 1979).*
4. Gombocz, E., Hellwig, E., Vojir, F. & Patuely, F. (1981) *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* 77, 8.
5. Holbach, B. & Woller, R. (1976) *Über den Zusammenhang zwischen Botrytisbefall von Trauben und den Glycerin- sowie Gluconsäuregehalt von Wein*, *Weinwissenschaft* 31, 202-214.
6. Holbach, B. & Woller, R. (1977) *Vergleichende Glycerinbestimmung im Wein nach der Methode Rebelein und der enzymatischen Methode*, *Weinwissenschaft* 32, 212-218.
7. Wagner, K. & Kreuzer, P. (1978) *Beitrag zur Glycerinbestimmung in Wein, Likörwein und weinhaltigen Getränken*, *Weinwissenschaft* 33, 109-113.
8. Michal, G. (1976) *Enzymatische Analyse in der Pharmazie*, *Acta Pharmaceutica Technologica, Suppl. 1*, S. 151-162
9. Henniger, G. & Boos, H. (1978) *Anwendung der enzymatischen Analyse bei der Untersuchung Kosmetischer Präparate, dargestellt an einigen Beispielen ; Seifen - Öle - Fette - Wachse* 104, 159-164.
10. Schmidt, F. H. & von Dahl, K. (1968) *Zur Methode der enzymatischen Neutralfettbestimmung in biologischem Material*, *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.* 6, 156-159.