

**ÉTHANOL
(LIQUID READY™)
CONSIGNES DU PRODUIT**

**SKU : 700007710
K-ETOHLQ**

08/25

(50 dosages manuels par kit) ou
(500 dosages en format automate par kit)

**Megazyme®
by NEOGEN®**

INTRODUCTION :

L'éthanol est omniprésent dans la nature, et sa détermination quantitative est donc non seulement importante dans la fabrication de vins, de bières et de spiritueux, mais aussi pour les boissons à faible teneur en alcool et non alcoolisées, les jus de fruits et une gamme d'autres denrées alimentaires, notamment les chocolats, les bonbons, la confiture, le miel, le vinaigre et les produits laitiers.

PRINCIPE :

L'alcool déshydrogénase (AIDH) catalyse l'oxydation de l'éthanol en acétaldehyde couplée à la réduction du nicotinamide-adénine dinucléotide (NAD^+).



La quantité de NADH formée dans cette voie réactionnelle est stoechiométrique avec la quantité d'éthanol. C'est le NADH qui se mesure par l'augmentation de l'absorbance à 340 nm.

SPÉCIFICITÉ, SENSIBILITÉ ET LINÉARITÉ :

- Le dosage est spécifique à l'éthanol.
- La limite de détection (LOD) est de 0,002 g/L et la limite de quantification (LOQ) est de 0,005 g/L avec un volume d'échantillon de 0,1 mL.
- La gamme linéaire recommandée se situe entre 0,01 et 0,3 g/L (avec un volume d'échantillon de 0,1 mL). Cela correspond à 1 - 30 µg d'éthanol par dosage.

INTERFÉRENCE :

Aucun composé interférent n'a été identifié.

SÉCURITÉ :

Les mesures générales de sécurité qui s'appliquent à toutes les substances chimiques doivent être respectées. Après utilisation, les réactifs peuvent être éliminés avec les déchets de laboratoire standard, conformément aux réglementations et directives locales.

REMARQUE : Pour plus d'informations concernant les performances de ce produit, veuillez vous référer au rapport de validation associé disponible sur le site Web de Megazyme. Pour plus d'informations concernant l'utilisation et la manipulation en toute sécurité de ce produit, veuillez vous référer à la FDS associée disponible sur le site Web de Megazyme.

CONTENU DU KIT :

Kit adapté aux formats manuels et automates. Les réactifs sont suffisants pour effectuer 50 dosages au format manuel ou 500 dosages au format automate. Le kit contient :

Réactif 1 (2 x 50 mL) :

Solution Tampon

Contient de l'azoture de sodium (0,02 % p/v) comme conservateur.

Prêt à l'emploi.

Conserver à 4 °C. Voir l'étiquette individuelle pour la date de péremption.

Réactif 2 (2 x 12,5 mL) :

NAD⁺, AIDH

Contient de l'azoture de sodium (0,02 % p/v) comme conservateur.

Prêt à l'emploi.

Conserver à 4 °C. Voir l'étiquette individuelle pour la date de péremption.

Étalon (5 mL) :

Étalon éthanol (0,3 g/L).

Contient de l'azoture de sodium (0,02 % p/v) comme conservateur.

Prêt à l'emploi.

Conserver à 4 °C. Voir l'étiquette individuelle pour la date de péremption.

REMARQUE : La solution étalon d'éthanol n'est dosée qu'en cas de doute concernant la précision du spectrophotomètre utilisé ou de suspicion selon laquelle l'inhibition est causée par des substances présentes dans l'échantillon. La concentration d'éthanol est déterminée directement à partir du coefficient d'extinction du NADH.

PRÉPARATION DES SOLUTIONS RÉACTIVES :

Porter tous les réactifs à température ambiante (20 - 25 °C) avant utilisation.

PROCÉDURE DE DOSAGE MANUEL :

Longueur d'onde : 340 nm

Cuvette : trajet de la lumière de 1 cm (verre ou plastique)

Température : 20 - 37 °C

Volume final : 2,60 mL

Concentration de l'échantillon : 0,01 g/L à 0,3 g/L (soit 1 à 30 µg d'éthanol par cuvette)

Lire contre l'air (sans cuvette dans le trajet de la lumière) ou contre l'eau

Pipeter dans des cuvettes	Blanc de reactif	Échantillon
Réactif 1	2,0 mL	2,0 mL
Échantillon	-	0,1 mL
Eau distillée	0,1 mL	-
Mélanger*, incuber pendant ~ 3 minutes à 20 - 37 °C, puis lire les absorbances (A_1)		
Ajouter le réactif 2 comme décrit ci-dessous :		
Réactif 2	0,5 mL	0,5 mL
Mélanger*, incuber pendant ~ 7 minutes à 20 -37 °C, puis lire les absorbances (A_2).**		

* Soit par aspiration avec l'embout de la pipette utilisé pour distribuer le liquide, soit par inversion douce après scellage de la cuvette avec un bouchon de cuvette ou du Parafilm®.

** Il peut être nécessaire de vérifier si la réaction est terminée en continuant à lire les absorbances à des intervalles de 1 minute. Si la réaction n'est pas terminée, continuer à mesurer les absorbances jusqu'à ce que les valeurs mesurées restent identiques ou augmentent constamment pendant 1 min. Si cette vitesse de « reptation » est plus élevée pour l'échantillon que pour le blanc, extrapoler les absorbances (échantillon et blanc) au moment de l'ajout du réactif 2.

REMARQUE : La valeur blanc du réactif doit être déterminée une fois pour chaque série et soustraite de chaque résultat d'échantillon.

CALCUL :

REMARQUE : Ces calculs peuvent être simplifiés en utilisant l'outil *MegaCalc™*, feuille de calculs téléchargeable sur la page du produit.

1. Calcul du coefficient de dilution (df)

Déterminer le facteur de dilution (df) en fonction des rapports des composantes :

$$df = \frac{\text{Volume de l'échantillon [mL] + volume R1 [mL]}}{\text{Volume total de réaction [mL]}}$$

Cette formule s'applique à la procédure de dosage manuel de l'éthanol :

$$df = \frac{0,1 + 2,0}{2,6} = 0,808$$

2. Calcul de la différence Δd'absorbance AÉthanol

$$\Delta A_{\text{Éthanol}} = (A_2 - df \times A_1)_{\text{échantillon}} - (A_2 - df \times A_1)_{\text{blanc}}$$

Cette formule s'applique à la procédure de dosage manuel de l'éthanol :

$$\Delta A_{\text{Éthanol}} = (A_2 - 0,808 \times A_1)_{\text{échantillon}} - (A_2 - 0,808 \times A_1)_{\text{blanc}}$$

REMARQUE : L'augmentation ou la diminution du volume de l'échantillon avec des volumes de réactif inchangés nécessite un nouveau calcul du facteur de dilution ; si les volumes sont modifiés, le système et les performances peuvent être affectés.

3. Calcul de la teneur en éthanol en g/L

La concentration d'éthanol peut être calculée comme suit :

$$c = \frac{V \times MW}{\varepsilon \times d \times v} \times \Delta A_{\text{Éthanol}} \quad [\text{g/L}]$$

où :

V = volume final [mL]

MW = poids moléculaire de l'éthanol [g/mol]

ε = coefficient d'extinction du NADH à 340 nm [$\text{l} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$]

d = trajet de la lumière [cm]

v = volume de l'échantillon [mL]

Cette formule s'applique à la procédure de dosage manuel de l'éthanol :

$$c = \frac{2,6 \times 46,07}{6300 \times 1,0 \times 0,1} \times \Delta A_{\text{Éthanol}} \quad [\text{g/L}]$$

$$= 0,1901 \times \Delta A_{\text{Éthanol}} \quad [\text{g/L}]$$

4. Calcul de la teneur en éthanol en % (v/v) :

Pour calculer le pourcentage d'alcool volumique (v/v) pour l'éthanol :

$$c = \frac{2,6 \times 46,07}{6300 \times 1,0 \times 0,1} \times 0,1266 \times \Delta A_{\text{Éthanol}} \quad [\% \text{ v/v}]$$

$$= 0,0241 \times \Delta A_{\text{Éthanol}} \quad [\% \text{ v/v}]$$

où :

0,1266 = facteur de conversion de g/L en % (v/v), en prenant la masse volumique de l'éthanol pur à 0,79 g/mL

Si l'échantillon a été dilué pendant la préparation, le résultat doit être multiplié par le facteur de dilution de l'échantillon, F.

5. Calcul de la teneur en éthanol dans des échantillons solides ou semi-solides :

Lors de l'analyse d'échantillons solides et semi-solides qui sont pesés pour la préparation des échantillons, la teneur (g/100 g) est calculée à partir de la quantité pesée comme suit :

$$\frac{C_{\text{Éthanol}} \text{ [g/L de solution d'échantillon]}}{\text{poids}_{\text{échantillon}} \text{ [solution d'échantillon g/L]}} \times 100 \quad [\text{g/100 g}]$$

PROCÉDURE DE DOSAGE DE FORMAT AUTOMATE :

Ce kit a été conçu pour les analyseurs automatiques biochimiques et peut être adapté à la plupart des instruments. Un exemple de méthode est présenté ci-dessous (validé sur l'analyseur Awareness ChemWell-T®).

REMARQUE : Pour chaque lot d'échantillons appliqué à la détermination de l'éthanol, une courbe d'étalonnage doit être effectuée simultanément avec le même lot de réactifs.

Paramètre	Détails								
Longueur d'onde	340/405 nm (primaire/secondaire)								
Température	20 - 37 °C								
Analyse	<p>La sequence de l'analyse est la suivante :</p> <ul style="list-style-type: none">- Ajouter le réactif 1 [0,2 mL]- Ajouter un échantillon ou l'étoffon [0,01 mL]- Pré-incuber pendant 1-3 minutes [20 - 37 °C]- Mesurer A₁ à 340/405 nm- Ajouter le réactif 2 [0,05 mL]- Incuber pendant 7 minutes à [20 - 37 °C]- Mesurer A₂ à 340/405 nm- Calculer A₂ – A₁ par rapport à la courbe d'étalonnage								
Étalonnage	<p>Étalonner à l'aide de 2 à 4 concentrations d'étoffon compris entre 0 et 0,3 g/L. La courbe d'étalonnage est linéaire.</p> <p>Ci-dessous se trouve un exemple d'utilisation de l'étoffon fourni avec le kit pour créer une courbe d'étalonnage :</p> <table><tbody><tr><td>Etalon 1</td><td>0 g/L (utiliser de l'eau distillée)</td></tr><tr><td>Etalon 2</td><td>0,03 g/L (diluer l'étoffon 10 fois)</td></tr><tr><td>Etalon 3</td><td>0,15 g/L (diluer l'étoffon 2 fois)</td></tr><tr><td>Etalon 4</td><td>0,3 g/L (utiliser l'étoffon tel quel)</td></tr></tbody></table> <p><i>Effectuer toutes les dilutions avec de l'eau distillée.</i></p>	Etalon 1	0 g/L (utiliser de l'eau distillée)	Etalon 2	0,03 g/L (diluer l'étoffon 10 fois)	Etalon 3	0,15 g/L (diluer l'étoffon 2 fois)	Etalon 4	0,3 g/L (utiliser l'étoffon tel quel)
Etalon 1	0 g/L (utiliser de l'eau distillée)								
Etalon 2	0,03 g/L (diluer l'étoffon 10 fois)								
Etalon 3	0,15 g/L (diluer l'étoffon 2 fois)								
Etalon 4	0,3 g/L (utiliser l'étoffon tel quel)								

PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON :

1. Dilution de l'échantillon

La quantité d'éthanol présente dans l'échantillon doit être comprise entre 0,01 g/L et 0,3 g/L. Si la valeur de $\Delta A_{\text{éthanol}}$ est trop faible (par ex., < 0,1), peser une plus grande quantité d'échantillon ou diminuer la dilution. Si la valeur $\Delta A_{\text{éthanol}}$ est trop élevée (par exemple, > 2,0), augmenter la dilution dans l'eau distillée.

Tableau de dilution de l'échantillon

Concentration estimée d'éthanol (g/L)	Dilution avec de l'eau	Facteur de dilution de l'échantillon (F)
< 0,3	Aucune dilution requise	1
0,3 – 3	1 mL d'échantillon + 9 mL d'eau	10
3 -30	1 mL d'échantillon + 99 mL d'eau	100

2. Guide général de préparation des échantillons

- Les échantillons liquides clairs, légèrement colorés et approximativement neutres à une concentration pouvant atteindre 0,3 g/L peuvent être utilisés directement dans le dosage.
- Les échantillons turbides doivent être filtrés ou centrifugés.
- Les échantillons acides ($\text{pH} < 3,0$) doivent être neutralisés à un pH d'environ 8,0.
- Les échantillons contenant du gaz carbonique doivent être dégazés par agitation douce ou à l'aide d'une baguette de verre.
- Les échantillons solides doivent être homogénéisés, extraits dans l'eau et filtrés ou centrifugés si nécessaire.
- Les échantillons fortement colorés doivent être traités par l'ajout de 0,2 g de polyvinylpolypyrrrolidone (PVPP) par 10 mL d'échantillon dans un tube. Agiter vigoureusement le tube pendant 5 minutes, puis le filtrer à travers du papier filtre.
- Déprotéiniser les échantillons à l'aide du kit de clarification Carrez (700004270, K-CARREZ).
- Enlever la graisse à l'aide du kit de clarification Carrez (700004270, K-CARREZ).

3. Exemples suggérés de préparation d'échantillons

- (a) Dosage de l'éthanol dans le vin.** Passer à travers un filtre à seringue de 0,2 micron pour clarifier. Il est également possible de centrifuger une aliquote de vin pendant 5 minutes à 15 000 g. *En règle générale, une dilution de 1 000 fois dans l'eau distillée est requise pour le vin.*

- (b) Dosage de l'éthanol dans les bières « sans alcool » :** Eliminer la gazéification en remuant un échantillon dans un bécher et en augmentant le pH à environ pH 9 à l'aide d'hydroxyde de sodium 2 M. Passer à travers un filtre à seringue de 0,2 micron et utiliser le filtrat transparent dans le dosage. *En règle générale, une dilution de 20 fois est requise.*
- (c) Dosage de l'éthanol dans les spiritueux « sans alcool » (ex : gin sans alcool) :** La concentration en éthanol des spiritueux sans alcool peut généralement être déterminée sans aucun traitement d'échantillon (sauf dilution selon le tableau de dilution). *En règle générale, une dilution de 10 fois dans l'eau distillée est requise*
- (d) Dosage de l'éthanol dans le kombucha brut non pasteurisé.** Eliminer la gazéification en remuant un échantillon dans un bécher et en augmentant le pH à environ pH 9 à l'aide d'hydroxyde de sodium 2 M. Passer à travers un filtre à seringue de 0,2 micron et utiliser le filtrat transparent dans le dosage. *En règle générale, une dilution de 10 fois est requise.*
- (e) Dosage de l'éthanol dans les jus de fruits (par exemple, le jus de tomate) :** Passer à travers un filtre à seringue de 0,2 micron pour clarifier. L'autre solution consiste à centrifuger une aliquote de vin pendant 5 minutes à 15 000 g. *En règle générale, une dilution de 2 fois est requise.*

REMARQUE IMPORTANTE : Ce qui précède n'est qu'un exemple suggéré de préparation d'échantillons. Si vous avez des questions sur ces matrices ou sur d'autres, veuillez contacter votre représentant commercial local pour obtenir de l'aide.

SERVICES ET ASSISTANCE TECHNIQUE

Veuillez contacter votre représentant commercial local si vous avez besoin d'aide, en particulier en ce qui concerne :

Dépannage
Analyse des données
Tests matriciels supplémentaires
Support applicatif en relation avec les analyseurs automatisés

Les documents justificatifs se trouvent sur la page du produit :

Guide de référence rapide
MegaCalc™
Fiches de données de sécurité (FDS)
Certificat d'analyse (CA)
Rapport de validation



Contactez-nous pour obtenir plus d'informations : neogen.com/contact

Sans garantie

Les informations contenues dans ce protocole d'essai sont, à notre connaissance, véridiques et exactes, mais comme les conditions d'utilisation échappent à notre contrôle, aucune garantie n'est donnée ou n'est implicite à l'égard de toute recommandation ou suggestion qui pourrait être faite ou que toute utilisation ne violera aucun brevet.

Responsabilité de l'utilisateur :

- Les utilisateurs sont tenus de se familiariser avec les instructions et les informations sur les produits. Visitez notre site Web à l'adresse neogen.com ou contactez votre représentant ou votre distributeur agréé Neogen® local pour plus d'informations.
- Lors du choix d'une méthode de test, il est important d'admettre que des facteurs externes tels que les méthodes d'échantillonnage, les protocoles de test, la préparation et la manipulation des échantillons, les techniques de laboratoire et l'échantillon proprement dit peuvent influer sur les résultats.
- Lors du choix de tout produit ou méthode de test, il est de la responsabilité de l'utilisateur d'évaluer un nombre suffisant d'échantillons avec les matrices et les défis appropriés pour vérifier que la méthode de test choisie répond à ses critères.
- Il est également de la responsabilité de l'utilisateur de déterminer si les méthodes de test et les résultats répondent aux exigences de ses clients et fournisseurs.
- Comme pour toute méthode de test, les résultats obtenus ne constituent pas une garantie de la qualité des matrices ou des procédés testés.

Conditions générales :

Les conditions générales complètes de Neogen sont disponibles [en ligne](#).