

Fig. 1. Rendement de la colorimétrie selon la concentration finale en  $H_2SO_4$ .

La Figure 2 montre la calibration de la colorimétrie dans les conditions définies ci-dessus.

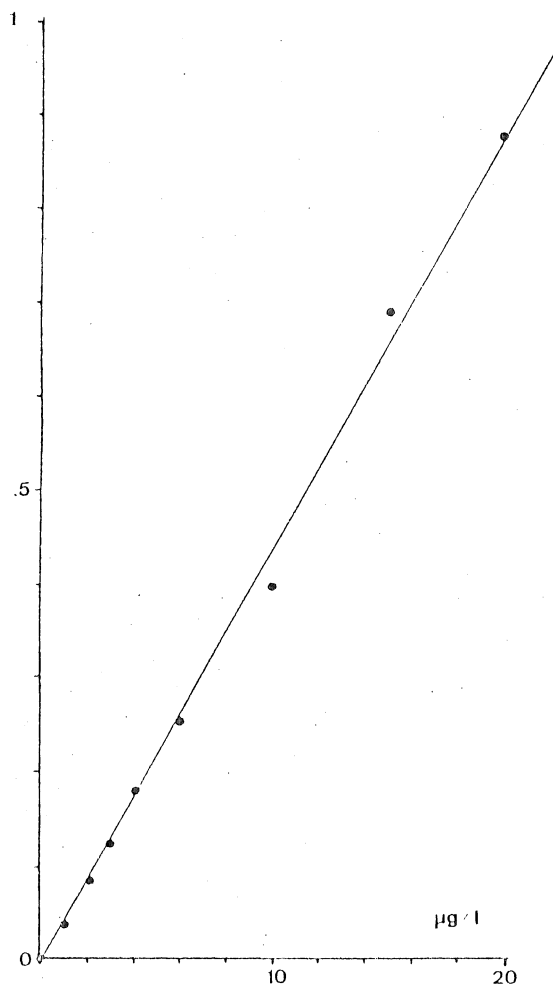


Fig. 2. Calibration de la colorimétrie.

#### b. extraction.

En faisant varier les quantités d'alumine mises en oeuvre pour l'extraction de l'acide glycolique, on a obtenu, selon le mode opératoire décrit ci-dessous, les résultats suivants:

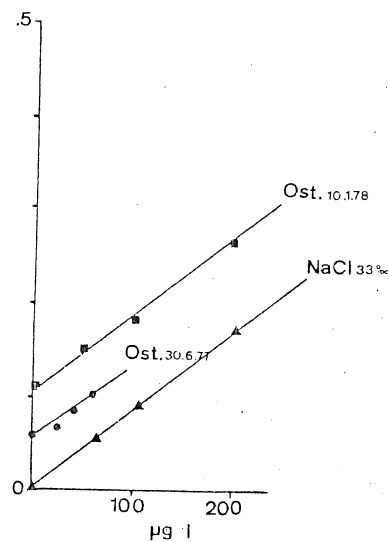


Fig. 3. Calibration du mode opératoire complet (sorption, désorption, colorimétrie).

500 ml d'eau de mer	+ 7g d'alumine	Abs.	.224
	+15g "		.274
	+30g "	(.284)	(corrigé pour les différences de volumes)

Dans le cas des 30 g d'alumine, il est nécessaire de désorber dans un volume d' $H_2SO_4$  de 50 % supérieur, ce qui introduit une dilution de l'échantillon qui réduit à néant le petit gain d'efficacité obtenu au niveau de l'adsorption.

La comparaison de la courbe de calibration de la colorimétrie seule (Fig. 2) avec des courbes de calibration relatives au mode opératoire complet effectué sur des eaux de mer diversément enrichies en glycolate (Fig. 3) montre que le rendement des étapes d'adsorption désorption est de l'ordre de 45 %, en accord avec le rendement trouvé par Shah et Fogg (1973).

### 3. Mode opératoire.

- Filtrer 2 l d'eau de mer sur fibre de verre (GFC Whatman); répartir dans 4 erlens de 500 cc chacun.
- Ajouter respectivement 0, 3, 6 et 10 cc d'une solution de glycolate à 10 mg/l de façon à réaliser les concentrations C, C + 60µg/l, C + 120 µg/l, C + 200 µg/l.
- Ajouter 15 g d'alumine prélavée à l'acide; agiter pendant au moins 20 min.
- Filtrer sur fibre de verre et transférer l'alumine dans un erlen de 100 cc.  
(La procédure peut être interrompue à ce stade, et l'alumine conservée au freezer jusqu'à retour au laboratoire)
- Ajouter 12 cc d' $H_2SO_4$  50%. Agiter pendant 20 min.
- Centrifuger une aliquote.
- Prélever 1 ml du surnageant et mélanger dans un tube avec 4 ml du réactif de Calkins (0.01% 2.7.dihydroxynaphtalène dans  $H_2SO_4$  conc., préparé au moins 12 h avant l'emploi).
- Chauffer 1 h à l'étuve à 100°C; laisser refroidir.
- Mesurer l'absorbance à 540 mµ
- Déterminer la concentration par extrapolation jusqu'au niveau d'un blanc réalisé par extraction à l'acide de 15 g d'alumine.

## II. DOSAGES ENZYMATIQUES; REMARQUES GENERALES.

### 1. Principe général.

Par un système de réactions enzymatiques bien choisi, on tente de faire apparaître (ou disparaître) le coenzyme NADH (ou NADPH) en quantité stoechiométriquement reliable à la quantité mise en oeuvre de la substance à doser.

NADH (ou NADPH) peut être facilement dosé, même en présence d'un excès de  $\text{NAD}^+$  (ou de  $\text{NADP}^+$ )

- par spectrophotométrie: à 340 m $\mu$  (où  $\text{NAD}^+$  n'absorbe pas)  
dans la gamme de concentration de 20 à 200  $\mu\text{M}$

- par fluorimétrie: excitation à 365 m $\mu$   
émission à 460 m $\mu$  (Fig. 4)  
dans la gamme 0.5 à 50  $\mu\text{M}$

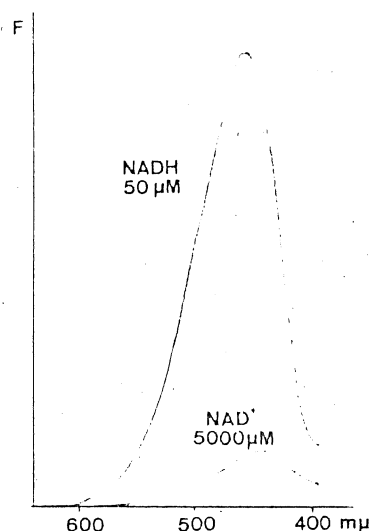
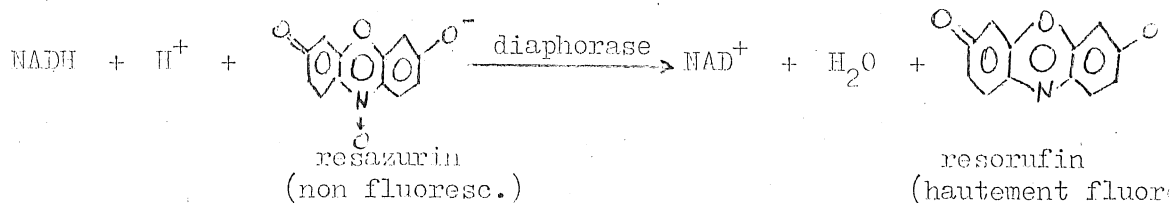


Fig. 4. Spectre de fluorescence de NADH et de  $\text{NAD}^+$  sous excitation à 365 m $\mu$ .

- par fluorimétrie de la resorufin formée à partir de NADH et de resazurin par la diaphorase (Guilbault & Kramer, 1964):



Cette dernière méthode, qui devrait permettre de descendre en dessous de 0.1  $\mu\text{M}$ , sera testée prochainement.

2. Effet de la température et de la concentration en oxygène sur la mesure de la fluorescence de NADH.

Une augmentation de température diminue l'intensité de la fluorescence de NADH de façon non négligeable (Fig. 5). Il faut donc se prémunir des variations thermiques pendant les mesures de fluorescence.

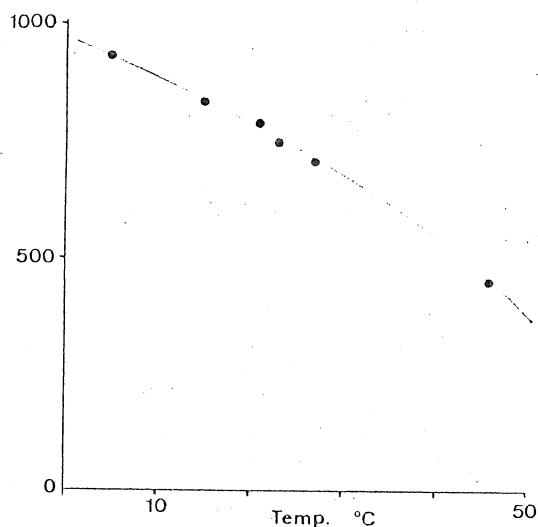
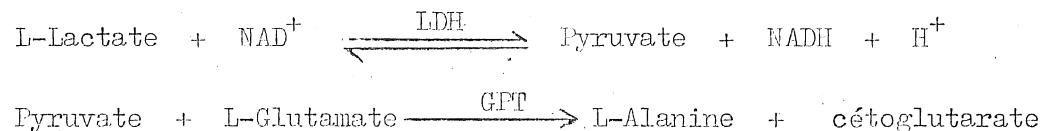


Fig. 5. Effet de la température sur la fluorescence de NADH.

L'élimination de l'oxygène dissous n'a pas d'effet sur la fluorescence de NADH.

### III. DOSAGE DU LACTATE.

#### 1. Principe.



La quantité de NADH formé est stoechiométrique par rapport à la quantité de lactate mise en œuvre.

#### 2. Mode opératoire.

(adapté de Boehringer-Mannheim GmbH, methods of food analysis).

Mélanger, directement dans la cellule du fluorimètre:

1 ml	Tampon	Glycylglycine	0.6 M
		L-Glutamate	0.1 M
		ajusté à pH 10 par NaOH	
0.05 ml	NAD	50mM	
0.05 ml	Glutamate pyruvate transaminase (GPT) sol 2mg/ml		
1.5 ml	échantillon		

Mélanger, lire la fluorescence initiale (excitation 365mu, émission 460 mu)

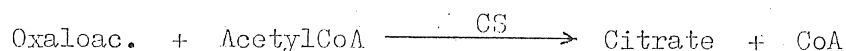
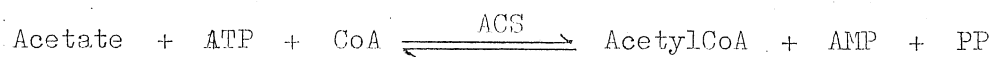
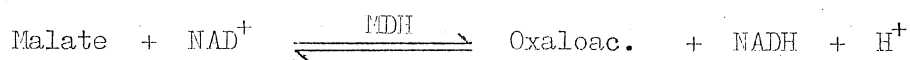
0.02 ml L-Lactate déshydrogénase (LDH) 10mg/ml dans le Glycerol

Mélanger, lire la fluorescence jusqu'à sa stabilisation (10min à 1/4 h.)

#### 3. Remarques.

La calibration se fait par ajouts successifs de 0.02 ml d'une solution de L-lactate 150  $\mu\text{M}$  (ajouts de 2 $\mu\text{M}$ ) directement dans la cellule où l'on vient d'effectuer la mesure précédente.

Les réactifs utilisés, même supra-purs, présentent un certain degré de contamination en lactate (env. 2 $\mu\text{M}$ ). Il est donc important de définir le blanc sur un échantillon d'eau distillée et désionisée. Le traitement de cette eau aux UV a permis de s'assurer qu'elle ne contient aucune contamination mesurable en lactate.

IV. DOSAGE DE L'ACETATE.1. Principe.

avant l'addition d'ACS:  $(\text{NADH})_1 (\text{Oxaloac})_1 = K$  (les conc. en malate et en NAD, présents tous deux en large excès peuvent être considérées comme constantes)

$$\text{avec } (\text{NADH})_1 = (\text{Oxaloac})_1 \quad (\text{stoechiométrie})$$

après l'addition de ACS:  $(\text{NADH})_2 (\text{Oxaloac})_2 = K$

$$\text{avec } (\text{Oxaloac})_2 = (\text{Oxaloac})_1 - (\text{Acétate}) + (\text{NADH}_2 - \text{NADH}_1)$$

$$\text{de sorte que } (\text{Acétate}) = (\text{NADH})_2 - \frac{(\text{NADH})_1^2}{(\text{NADH})_2}$$

2. Mode opératoire.

(adapté de Boehringer-Mannheim GmbH, Methods of food analysis)

Mélanger, directement dans la cellule du fluorimètre:

1 ml Tampon	Triéthanolamine	7.5 g
	Ac. Malique	42 mg
	MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	210 mg / 100 ml
	ajusté à pH 8.4 par NaOH	

0.2 ml NAD/CoA	NAD	10 mg
	CoA	15 mg / 6 ml

0.1 ml ATP	ATP Na <sub>2</sub> H <sub>2</sub>	300 mg
	NaHCO <sub>3</sub>	300 mg / 6ml

1.5 ml échantillon

Mélanger, mesurer la fluorescence ( $F_0$ )

0.02 ml MDH/CS    1ml CS (2mg/ml) + 0.5 ml MDH (5mg/ml)

Mesurer la fluorescence ( $F_1$ )

0.01 ml ACS    15 mg ACS dans 0.5 ml (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 13.2g/100cc  
pH 7.3

Mesurer la fluorescence ( $F_2$ ).

$$\text{Calculer } (F_2 - F_1) - \frac{(F_1 - F_0)}{(F_2 - F_0)}$$

3. Remarques. cf. dosage du lactate.

#### REFERENCES.

- Calkins, V.P., 1943. Microdetermination of Glycolic and Oxalic acids. Ind. Eng. Chem. 15, 762-763.
- Guilbault, G.G. & Kramer, D.N., 1964. New direct fluorometric method for measuring dehydrogenase activity. Anal. Chem. 36, 2497-2498.
- Shah, N.M. & Fogg, G.E., 1973. The determination of Glycollic acid in sea water. J. Mar. Biol. Ass. UK. 53, 321-324.
- Shah, N.M. & Wright, R.T., 1974. The occurrence of Glycolic Acid in coastal Sea Water. Mar. Biol. 24, 121-124.