

Méthode UV pour env. 32 déterminations

 Usage *in vitro*
 Conserver entre +2 et +8°C

Méthode décrite dans les textes officiels allemands et suisses. Recommandée par exemple par l'ALVA. Standardisée selon les normes DIN et ISO.

Principe

- (1) D-Gluconate + ATP $\xrightarrow{\text{Gluconate kinase}}$ Gluconate-6-P (6-PG) + ADP
 (2) 6-PG + NADP⁺ $\xrightarrow{6\text{-PGDH}}$ ribulose-5-P + NADPH + H⁺ + CO₂
 (3) D-Glucono-δ-lactone $\xrightarrow{\text{pH10}}$ D-gluconate

Ref.: Möllering H. & Bergmeyer H.U (1967) Enzymatische Bestimmung von D-Gluconsäure in Lebensmittel, Z. lebensm. Unters. Forsch. 135, 198-204.

Spécifications

Longueur d'onde: 340 nm (NADPH)
 $\epsilon = 6,3 \text{ l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$
 Cuvettes de mesure: 1,00 cm (verre; plastique)
 Température: +20 à +25 °C
 Volume réactionnel: 3,040 ml
 Mesure: contre l'air ou l'eau
 Echantillons: 1 à 120 µg de D-gluconate par cuvette (dans 0,1 à 2,0 ml d'échantillon)

Réactifs

- # 1: Lyophilisat composé de tampon triéthanolamine (TEA) à pH 7,6, environ 80 mg NADP, environ 190 mg ATP, sulfate de magnésium (voir péremption *SUR* l'étiquette). *Diluer le contenu du flacon # 1 avec 31 ml d'eau distillée.* La solution de travail est stable 1 mois entre +2 et +8 °C, et 2 mois entre -15 et -25 °C.
 # 2: Environ 0,7 ml d'une suspension enzymatique composée de 6-phosphogluconate deshydrogénase (6-PGDH) (environ 160 U) dans du sulfate d'ammonium (voir péremption sur l'étiquette). *La suspension est prête à l'emploi.* Agiter délicatement la suspension avant utilisation.
 # 3: Environ 0,7 ml d'une suspension enzymatique composée de gluconate kinase (environ 18 U) dans du sulfate d'ammonium (voir péremption sur l'étiquette). *La suspension est prête à l'emploi.* Agiter délicatement la suspension avant utilisation.

Réactif supplémentaire (non contenu dans le coffret):

Standard D-gluconate de potassium ou gluconate de sodium, à 0,6 g/l, anhydre, ultra pur, uniquement pour les contrôles. Les réactifs pour le dosage du D-gluconate ne sont pas dangereux pour la santé. Appliquer les précautions habituelles en vigueur dans le laboratoire. Après usage, les réactifs doivent être éliminés comme déchets de laboratoire. Les emballages peuvent être recyclés.

Mode opératoire

Pipeter dans la cuvette	Blanc	Standard ¹	Echantillon ²	Essai en double ³	Test avec standard interne ⁴	Test haute sensibilité ⁵
Tampon triéthanolamine (TEA), NADP, ATP, flacon # 1	1,000ml	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml
Echantillon ⁶ (ex. 0,06 à 0,6 g D-gluconate/l)	-	-	0,100 ml	0,200 ml	0,100 ml	2,000 ml
Standard ⁶ (ex. 0,6 g D-gluconate/l)	-	0,100 ml	-	-	0,100 ml	-
6-PGDH, flacon # 2	0,020ml	0,020ml	0,020ml	0,020ml	0,020ml	0,020ml
Eau bi-distillée	2,000 ml	1,900 ml	1,900 ml	1,800 ml	1,800 ml	-
Mélanger le contenu de la cuvette⁷. Mesurer la densité optique (absorbance A₁) après environ 5 min. Rajouter ensuite:						
Gluconate kinase, flacon # 3	0,020 ml	0,020 ml	0,020 ml	0,020 ml	0,020 ml	0,020 ml
Mélanger le contenu de la cuvette⁷. Après environ 20 min, mesurer l'absorbance du blanc et des autres réactions (A₂) immédiatement les unes derrière les autres. Répéter la mesure après 2 min⁸.						

Notes

- Utiliser la solution standard pour mettre en évidence des erreurs de manipulation lors de la procédure. Il n'est pas nécessaire de tester les standards pour calculer la concentration des échantillons.
- Ce test associé au blanc représente une simple détermination.
- Dans le cas d'une double détermination, réaliser deux tests avec des volumes d'échantillon différents. Les différences d'absorbance mesurées doivent être proportionnelles aux volumes d'échantillons.
- Recouvrement = $[(\Delta A_{\text{échantillon}} + \text{standard} - \Delta A_{\text{échantillon}}) / \Delta A_{\text{standard}}] \times 100 [\%]$.
- Lorsque le test est réalisé sur des échantillons où l'analyte est à l'état de traces, augmenter le volume de l'échantillon jusqu'à 2,0 ml (0,0005 à 0,06 g de D-gluconate par litre).
- Rincer la pipette ou l'embout de la pipette avec l'échantillon ou le standard avant le pipetage.
- Par exemple avec une spatule en plastique ou en retournant la cuvette recouverte de Parafilm (marque déposée de American Can Co., Greenwich Ct., USA).
- La réaction est terminée lorsque l'absorbance est constante. Si la réaction n'est pas terminée, continuer à lire les absorbances jusqu'à ce que l'augmentation d'absorbance soit constante sur 2 min. Extrapoler les absorbances au temps de l'addition de la gluconate kinase (suspension # 3).

Calcul des résultats

Calculer les différences d'absorbance du témoin (blanc) et de l'essai (échantillon). Déduire la différence d'absorbance du témoin de celle de l'essai:

$$\Delta A = (A_2 - A_1)_{\text{échantillon ou standard}} - (A_2 - A_1)_{\text{blanc}}$$

Afin d'obtenir des résultats exacts et valables, la différence d'absorbance doit être au moins de 0,100.

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

$$c = (V \times MW \times \Delta A) / (\epsilon \times d \times v \times 1000)$$

$$c = (3,040 \times 196,1 \times \Delta A) / (6,3 \times 1,00 \times 0,100 \times 1000) = \mathbf{0,9463 \times \Delta A} \quad \text{[g D-gluconate / litre d'échantillon]}$$

$$c = (3,040 \times 178,1 \times \Delta A) / (6,3 \times 1,00 \times 0,100 \times 1000) = \mathbf{0,8594 \times \Delta A} \quad \text{[g D-glucono-δ-lactone / litre d'échantillon]}$$

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

Dans le cas de l'analyse d'échantillons solides ou semi-solides, le résultat doit être rapporté à la quantité pesée:

$$\text{Contenu}_{\text{D-gluconate/D-glucono-}\delta\text{-lactone}} = \frac{C_{\text{D-gluconate/D-glucono-}\delta\text{-lactone}} \text{ [g/l échantillon]}}{\text{poids échantillon [en g/l échantillon]}} \times 100 \text{ [g/100 g]}$$

Préparation des échantillons

- Diluer *les échantillons liquides, transparents, clairs et pratiquement neutres* pour obtenir une solution contenant 0,06 à 0,6 g de D-gluconate par litre (dans un volume v= 0,100 ml).
- Filter ou centrifuger *les solutions troubles*. Diluer le surnageant (voir point 1).
- Eliminer le gaz carbonique *des échantillons gazeux* par agitation et filtration ou en ajoutant du NaHCO₃ jusqu'à obtenir une solution légèrement alcaline. Diluer (voir point 1).
- Neutraliser *les solutions acides* (spécialement les solutions légèrement colorées) avec du KOH ou NaOH à un pH de 8, incubé quelques minutes. Diluer les solutions acides mais incolores sans ajustement de pH (voir point 1).
- Les solutions très colorées* doivent être mises à pH 8 et mesurées contre un blanc.
- Broyer et homogénéiser *les aliments solides* (taille des grains < 0,3 mm), homogénéiser *les aliments pâteux*. Après extraction à l'eau ou dissolution dans l'eau, filtrer et diluer (voir point 1) si nécessaire.
- Extraire les échantillons *riches en matières grasses* avec de l'eau chaude à une température supérieure au point de fusion des graisses, par exemple dans une fiole jaugée de 100 ml. Ajuster à +20°C, compléter avec de l'eau jusqu'à la marque. Conserver le flacon sur de la glace ou au réfrigérateur de 15 à 30 minutes, filtrer.
- Hydrolyser le D-Glucono-δ-lactone avec du KOH (2M) à un pH 10 à 11 (5-10 min à 20-25°C).
- Déprotéiniser les échantillons avec de l'acide perchlorique selon l'une des 3 méthodes connues.
 - Homogénéiser une quantité (g) d'échantillon (contenu en eau w en g/100 g) avec un volume b (ml) d'acide perchlorique (1 M), filtrer. Neutraliser un volume c (ml) de filtrat avec un volume d (ml) de KOH (5 M). Conserver à 4°C pendant 15 minutes, filtrer.
 - Homogénéiser une quantité (g) d'échantillon avec un volume b (ml) d'acide perchlorique (1 M). Neutraliser avec du KOH (5 M). Transférer dans une fiole jaugée de 100 ml, compléter jusqu'à la marque avec de l'eau distillée (la couche huileuse est située au-dessus de la marque). Conserver à 4°C pendant 15 min, filtrer.
 - Homogénéiser une quantité (g) d'échantillon (contenu en eau w en g/100 g) avec un volume b (ml) d'acide perchlorique (1 M), filtrer. Neutraliser avec un volume d (ml) de KOH (5 M). Conserver à 4°C pendant 15 min, filtrer.

Performances du test

- Spécificité:** Spécifique de l'acide D-gluconique (le D-Glucono-δ-lactone est hydrolysé dans le test en 50 min). Lors de l'analyse de D-gluconates achetés dans le commerce, il est normal d'avoir un résultat si le sel contient de l'acide libre alors que la pesée est calculée avec le poids moléculaire du sel en question
- Sensibilité:** 0.25 mg/l (Δ A = 0.005; v = 2.000 ml; V = 3.040 ml)
- Limite de détection:** 0.5 mg/l (Δ A = 0.010; v = 2.000 ml; V = 3.040 ml)
- Linéarité** 1 µg/test (v = 2.000 ml; V = 3.040 ml)
to 120 µg/test (v = 0.100 ml; V = 3.040 ml)
- Précision:** Δ A = +/- 0.005 à 0.010 absorbances
CV = env. 1 à 2 %
Saucisse (porc): r = 0.12 g/100 g, s_(r) = +/- 0.004 g/100 g
R = 0.014 g/100 g, s_(R) = +/- 0.005 g/100 g
Lait: x = 0.362 g/100 g, r = 0.02 g/100 g, R = 0.08 g/100 g
Fromage Feta: x = 2.57 g/100 g, r = 0.15 g/100 g, R = 0.26 g/100 g