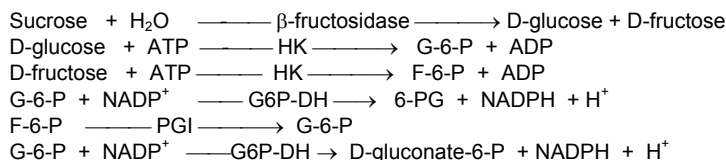


Méthode UV pour env. 16 déterminations de chaque

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

Méthode décrite dans les textes officiels autrichiens, allemands, italiens, suisses, et européens. Recommandée par l'IFU, l'AIJN, le MEBAK, l'OICC et l'OIV. Standardisée selon les normes DIN, EN, GOST, NEN, NF. Approuvée par l'AOAC.

Principe


 Ref.: Bergmeyer, H.U. & Bernt, E. (1974) in *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, H.U., ed.) 2nd ed., vol. 3, pp. 1176-1179; Schmidt, F.H. (1961) Die enzymatische Bestimmung von Glucose und Fructose nebeneinander, *Klinische Wochenschrift* **39**, 1244-1247

Spécifications

Longueur d'onde: 340 nm (NADPH); $\varepsilon = 6.3 \text{ l x mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$
 Cuvettes mesure: 1,00 cm (verre; plastique)
 Température: +20 à +25°C
 Volume réactionnel: 3,020 ml (sucrose, D-glucose); 3,040 ml (D-fructose)
 Mesure: contre l'air ou l'eau
 Échantillon: 4 à 150 µg de sucrose + D-glucose + D-fructose dans 0,1 à 1,8 ml (sucrose) ou 2,0 ml (D-glucose, D-fructose) d'échantillon

Réactifs

- # S: Lyophilisat composé de tampon citrate, pH 4,6, env. 510 U β-fructosidase (voir péremption sur l'étiquette). *Diluer le contenu du flacon # S avec 7 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.
- # 1: Lyophilisat composé de tampon triéthanolamine (TEA), 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: Env. 0,7 ml d'une suspension enzymatique composée d'hexokinase (HK) / glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6P-DH) (environ 200 U / 100 U) dans du sulfate d'ammonium (voir péremption sur l'étiquette). *La suspension est prête à l'emploi.* Agiter délicatement la suspension avant utilisation.
- # F: env. 0,7 ml d'une suspension de phosphoglucose isomérase (PGI) (environ 490 U) dans du sulfate d'ammonium (voir péremption sur l'étiquette). *La suspension est prête à l'emploi.* Agiter délicatement la suspension avant utilisation.

Réactifs supplémentaires (non contenus dans le coffret):

Standard sucrose, ultra pur, 0,8 g/l, uniquement pour les contrôles
 Standard D-glucose, anhydre, ultra pur, 0,5 g/l, uniquement pour les contrôles.
 Standard D-fructose, ultra pur, 0,5 g/l, uniquement pour les contrôles.

Les réactifs pour le dosage du sucrose, D-glucose et D-fructose 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 sucrose	Standard sucrose ¹	Echant. sucrose ²	Blanc D-glucose D-fructose	Echant. D-glucose D-fructose	Test avec standard interne ³
Tampon citrate, β-fructosidase, flacon # S	0,200 ml	0,200 ml	0,200 ml	-	-	0,200 ml
Echantillon⁴ (de 0,08 à 0,8 g sucrose/l)	-	-	0,100 ml	-	0,100 ml	0,100 ml
Standard ⁴ (ex 0,8 g sucrose/l)	-	0,100 ml	-	-	-	0,100 ml
Mélanger le contenu de la cuvette. Incuber de +20 à +25 °C (+37 °C) pendant 15 min (5 min). Rajouter ensuite:						
Tampon TEA, NADP, ATP solution # 1	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml
Eau bi-distillée	1,800 ml	1,700 ml	1,700 ml	2,000 ml	1,900 ml	1,600 ml
Mélanger⁵, après environ 3 min, mesurer l'absorbance (A₁). Rajouter ensuite:						
HK/G6P-DH suspension # 2	0,020 ml	0,020 ml	0,020 ml	0,020 ml	0,020 ml	0,020 ml
Mélanger⁵, après environ 10 à 15 min, mesurer l'absorbance (A₂). Répéter la mesure après 2 min⁶. Rajouter ensuite:						
PGI suspension # F	-	-	-	0,020 ml	0,020 ml	0,020 ml
Mélanger⁵, après environ 10 à 15 min, mesurer l'absorbance (A₃)						

Voir notes page suivante

Calcul des résultats

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

$$\Delta A_{D\text{-fructose}} = (A_3 - A_2)_{\text{échantillon ou standard}} - (A_3 - A_2)_{\text{blanc}}$$

$$\Delta A_{\text{Sucrose}} = [(A_2 - A_1)_{\text{échantillon ou standard sucrose}} - (A_2 - A_1)_{\text{blanc sucrose}}] - [(A_2 - A_1)_{\text{échantillon ou standard D-glucose}} - (A_2 - A_1)_{\text{blanc D-glucose}}]$$

$$c = (V \times MW \times \Delta A) / (\varepsilon \times d \times v \times 1000) \quad [\text{g D-glucose, D-fructose ou sucrose par litre d'échantillon}]$$

$$c = (3,020 \times 180,16 \times \Delta A) / (6,3 \times 1,00 \times 0,100 \times 1000) = \mathbf{0,8636 \times \Delta A} \quad [\text{g D-glucose / litre d'échantillon}]$$

$$c = (3,040 \times 180,16 \times \Delta A) / (6,3 \times 1,00 \times 0,100 \times 1000) = \mathbf{0,8693 \times \Delta A} \quad [\text{g D-fructose / litre d'échantillon}]$$

$$c = (3,020 \times 342,3 \times \Delta A) / (6,3 \times 1,00 \times 0,100 \times 1000) = \mathbf{1,641 \times \Delta A} \quad [\text{g sucrose / litre d'échantillon}]$$

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, pesés lors de la préparation d'échantillons, le résultat doit être calculé à partir de la quantité pesée:

$$\text{Contenu}_{\text{sucrose/D-glucose/D-fructose}} = \frac{C_{\text{sucrose/D-glucose/D-fructose}} [\text{g/l échantillon}]}{\text{poids}_{\text{échantillon}} [\text{en g/l échantillon}]} \times 100 [\text{g/100 g}]$$

Préparation des échantillons

Si les échantillons présentent l'une ou l'autre des caractéristiques détaillées ci-dessous, lesquelles perturbent le test, suivre les instructions correspondantes.

- Diluer les échantillons liquides transparents, clairs et pratiquement neutres pour obtenir une solution contenant 0,08 à 0,8 g de sucrose + D-glucose + D-fructose par litre.
- Filtrer ou centrifuger les solutions troubles. Diluer le surnageant (voir point 1).
- Éliminer le gaz carbonique des échantillons gazeux par agitation/filtration ou en ajoutant du NaHCO₃. Diluer (voir point 1).
- 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 inférieure 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. On peut aussi clarifier ces échantillons avec les réactifs de Carrez.
- Clarifier les échantillons contenant des protéines avec les réactifs de Carrez :
Peser une quantité suffisante d'échantillons solides ou pâteux dans une fiole jaugée de 100 ml et ajouter environ 60 ml d'eau. Ou pipeter l'échantillon liquide dans une fiole jaugée de 100 ml contenant environ 60 ml d'eau. Ajouter, et mélanger après chaque addition, 5 ml de solution I de Carrez (3,6 g K₄[Fe(CN)₆] x 3H₂O par 100 ml), 5 ml de solution II de Carrez (7,2 g ZnSO₄ x 7 H₂O par 100 ml). Ajuster à un pH de 7,5 à 8,5 en ajoutant par exemple 10 ml de NaOH (0,1 M). Compléter jusqu'à la marque, mélanger et filtrer.
- Ne pas déprotéiniser les échantillons à l'acide perchlorique car le sucrose serait hydrolysé lors de ce traitement.

Performances du test

- Spécificité:** Spécifique pour le D-glucose et D-fructose. Relativement spécifique pour le sucrose en l'absence de 2-β-fructosanes. (les 2-β-fructosanes, si présents dans l'échantillon, réagissent plus lentement que le sucrose). Lors de l'analyse de sucrose acheté dans le commerce, on obtient un recouvrement de 100%. Lors de l'analyse de D-glucose, D-glucose monohydrate et D-fructose, des résultats inférieurs à 100 % sont attendus, car ces matériaux absorbent l'humidité.
- Sensibilité:** 0,2 mg D-glucose/l ou D-fructose/l (ΔA = 0,005; v = 2,000 ml; V = 3,020 / 3,040 ml)
1 mg sucrose/l (ΔA = 0,010; v = 1,800 ml; V = 3,020 ml)
- Limite de détection:** 0,4 mg D-glucose/l ou D-fructose/l (ΔA = 0,010; v = 2,000 ml; V = 3,020 / 3,040 ml)
2 mg sucrose/l (ΔA = 0,020; v = 1,800 ml; V = 3,020 ml)
- Linéarité:** de 4 μg sucrose + D-glucose + D-fructose /test (v = 1,800 ml; V = 3,020 / 3,040 ml)
à 150 μg sucrose + D-glucose + D-fructose /test (v = 0,100 ml; V = 3,020 / 3,040 ml)
- Précision:** ΔA = +/- 0,005 absorbance (D-glucose, D-fructose)
ΔA = +/- 0,010 absorbance (sucrose)
CV = env. 1 à 2 % (D-glucose, D-fructose)
CV = env. 1 à 3 % (sucrose)
Jus de fruit:
r = 1,9 + 0,033 x C_{sucrose} [g/l]
R = 3,3 + 0,061 x C_{sucrose} [g/l]
r = 0,42 + 0,027 x C_{D-glucose} [g/l]
R = 1,0 + 0,042 x C_{D-glucose} [g/l]
r = 0,15 + 0,033 x C_{D-fructose} [g/l]
R = 1,05 + 0,045 x C_{D-fructose} [g/l]
- Interférences:** aucune connue

Notes

- Utiliser la solution standard pour mettre en évidence des erreurs de manipulation lors de la procédure. La présence du standard n'est pas nécessaire pour le calcul de la concentration.
- Ce test associé au blanc constitue 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 = $[(\Delta A_{\text{échantillon}} + \text{standard}} - \Delta A_{\text{échantillon}}) / \Delta A_{\text{standard}}] \times 100 [\%]$
- 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 HK/G6P-DH (suspension # 2).