

Méthode UV pour env. 32 déterminations

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

Méthode décrite dans les textes législatifs allemands, néerlandais et suisses. Recommandée par l'AIJN et le MEBAK. Standardisée selon les normes DIN et NEN.

Principe

 Amidon + (n-1) H₂O ——— Amyloglucosidase (AGS) ———> n D-glucose

D-Glucose + ATP ——— Hexokinase ———> G-6-P + ADP

 G-6-P + NADP⁺ ——— G6P-DH ———> 6-PG + NADPH + H⁺

Réf.: Beutler, H.-O. (1984) in Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H.U., ed.) 3rd ed., vol. VI, pp. 2-10; Verlag Chemie Weinheim, Deerfield/Florida, Basel.

Spécifications

 Longueur d'onde: 340 nm (NADPH) ; ε = 6,3 l x mmol⁻¹ x cm⁻¹

Cuvettes de mesure: 1,00 cm (verre; plastique)

 Température: +55 à + 60°C (incubation)
 +20 à + 25°C (mesure)

Volume réactionnel: 2,320 ml

Mesure: contre l'air ou l'eau

Echantillons: 1,2 à 70 µg d'amidon dans 0,1 à 1ml de solution, respectivement 0,100 à 0,200 ml lorsqu'on utilise des solutions contenant du DMSO.

Réactifs

#AGS : Lyophilisat contenant du tampon citrate, pH 4,6 environ, 98 U d'amyloglucosidase (AGS) environ. Voir péremption sur l'étiquette. Dissoudre le contenu avec 7 ml d'eau bi-distillée. La solution est stable 6 semaines entre 2 et 8°C, ou 3 mois entre -15 et -25°C.

1: Lyophilisat : tampon triéthanolamine (TEA) à pH 7,6, contenant 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, ou 2 mois entre -15 et -25°C (congeler une seule fois).

2: Environ 0,7 ml d'une suspension enzymatique composée d'hexokinase (HK) et de glucose-6-phosphate deshydrogénase (G6-PDH) (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.

Réactif supplémentaire (non contenu dans le coffret):

Standard amidon (par exemple la référence FLUKA : amidon pour analyses, 100 g, code 33614).

Les réactifs pour le dosage de l'amidon 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 ^{1,2}	Test Standard ^{1,2}	Blanc échantillon ^{2,3}	Test échantillon ^{2,3}	Blanc réactif ⁴	Test échantillon ⁴
Tampon citrate AGS, flacon # AGS	-	0,200 ml	-	0,200 ml	0,200 ml	0,200 ml
Echantillon ⁵ (ex. 0,03 à 0,7 g amidon/l)	-	-	0,100 ml	0,100 ml	-	0,100 ml
Standard ⁵ (ex. 0,7 g amidon/l)	0,100 ml	0,100 ml	-	-	-	-
Mélanger⁶ le contenu de la cuvette. Incuber la cuvette fermée à +55 à +60°C pendant 15 min. Remettre la cuvette à t° ambiante pour continuer le test à 20-25°C. Rajouter ensuite:						
Tampon TEA, flacon # 1	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml
Eau bi-distillée	1,200 ml	1,000 ml	1,200 ml	1,000 ml	1,100 ml	1,000 ml
Mélanger⁶, et lire l'absorbance (A₁) après environ 3 min. Rajouter ensuite :						
HK / G6P-DH, flacon # 2	0,020 ml	0,020 ml	0,020 ml	0,020 ml	0,020 ml	0,020 ml
Mélanger⁶ le contenu de la cuvette. Après environ 10 à 15 min, mesurer l'absorbance du blanc et des autres réactions (A₂) immédiatement les unes derrière les autres. Répéter la mesure après 2 min⁷.						

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.
- Schéma de pipetage après solubilisation de l'amidon avec DMSO/HCl.
- Ce test, avec le 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. Calculer les concentrations en tenant compte des volumes respectifs. Lorsque les échantillons sont préparés avec du DMSO, le volume maximum de l'échantillon est de 0,200 ml.

- Schéma de pipetage lorsque l'échantillon a été préparé par la méthode de l'acide chloridrique (notamment en présence de maltose). Dans ce cas, le volume échantillon peut être augmenté jusqu'à 1 ml.
- 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 (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 jusqu'à ce que l'augmentation soit constante sur 2 min. Extrapoler les absorbances au temps de l'addition du mélange HK/G6P-DH (suspension # 2).

Calcul des résultats

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

$$C = (V \times MW \times \Delta A) / (\epsilon \times d \times v \times 1000) \text{ [g/l d'amidon]}$$

$$c = (2,320 \times 162,1 \times \Delta A) / (6,3 \times 1,00 \times 0,100 \times 1000) = \mathbf{0,5969 \times \Delta A \text{ [g/l d'amidon]}}$$

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 rapporté à la quantité pesée:

$$\text{Contenu}_{\text{amidon}} = \frac{C_{\text{amidon}} \text{ [g/l échantillon]}}{\text{poids}_{\text{échantillon}} \text{ [en g/l échantillon]}} \times 100 \text{ [g/100 g]}$$

Préparation des échantillons

1. *Solubiliser l'amidon avec du DMSO et de l'acide chloridrique (HCl)* Peser précisément 100 mg à 1 g de l'échantillon homogénéisé (contenant env. 70 g d'amidon) dans une fiole Erlenmeyer de 100 ml, ajouter 20 ml de DMSO et 5 ml d'HCl (8 M) dans le cas d'échantillons contenant des matières grasses, resp. 5 ml HCl (8 M) et 20 ml de DMSO dans le cas d'échantillons sans graisse; fermer le flacon et incuber dans un bain-marie agitant à 55-60°C pendant 30 (no magement) à 60 min (dans le cas de matériaux «très durs»), ou sous agitateur magnétique chauffant; refroidir à t° ambiante puis ajouter env. 50 ml d'eau distillée; ajuster le pH à 4 à 5 (pas plus!) par addition de NaOH (5 M); transférer quantitativement dans une fiole jaugée de 100 ml (rincer à l'eau), remplir jusqu'à la marque et mélanger; laisser reposer pendant quelques minutes; prendre la solution d'échantillon en haut de la solution au moyen d'une pipette à piston.

2. *Solubiliser l'amidon partiellement avec HCl:* Peser précisément 100 mg à 1 g de l'échantillon homogénéisé (contenant environ 70 mg d'amidon) dans un tube de centrifugation; laver 3 fois avec un mélange éthanol / eau (par exemple 40% v/v): remuer à température ambiante pendant env. 20 min, centrifuger, éliminer le surnageant. Ajouter 10 ml d'HCl (environ 10% m/m), agiter à +60°C au bain-marie pendant 60 min. Transférer quantitativement dans un bécher de 100 ml, rincer le tube avec de l'eau distillée et transférer à nouveau dans le bécher (100% de l'échantillon doit être transféré). Ajuster le pH à 4-5 (pas plus!) par addition de NaOH (5 M). Transférer la matière quantitativement dans une fiole jaugée de 100 ml (rincer le bécher avec de l'eau et transférer à nouveau), remplir jusqu'à la marque. Mélanger et laisser reposer pendant quelques minutes et prendre la solution de l'échantillon sur le surnageant.

Note: Les échantillons contenant de l'eau sont traités avec de l'éthanol: ajouter 10 ml d'éthanol (96% v/v) à env. 1 g d'échantillon, mélanger et centrifuger; décanter l'éthanol et continuer comme décrit ci-dessus.

3. *Détermination dans le "sirop de glucose", par ex. dans les jus de fruits:* Peser précisément 100 mg à 1 g de l'échantillon homogénéisé (contenant environ 100 mg de D-glucose + "sirop de glucose") dans une fiole jaugée; remplir jusqu'à la marque avec de l'eau distillée, homogénéiser et filtrer. Effectuer l'analyse avec dosage de l'échantillon et du blanc échantillon (incuber pendant 30 min à 20 à 25°C).

4. *Détermination des dextrines dans la bière:* Utiliser directement l'échantillon pour le dosage: effectuer des analyses avec dosage de l'échantillon et du blanc échantillon.

Performances du test

1. *Spécificité* L'AGS hydrolyze les liaisons α -1,4 et α -1,6 glycosyliques, indépendamment du poids moléculaire (amylose, amylopectine, glycogène, dextrine, maltose, maltotriose, etc.). Une différenciation limitée peut être obtenue dans la préparation des échantillons en lavant avec un mélange éthanol/eau. Dans l'analyse d'amidon pur, on doit retrouver un recouvrement de 99% basé sur la matière sèche.
2. *Sensibilité:* 3 mg amidon/l ($\Delta A = 0,010$; $v = 0,200$ ml ; $V = 2,320$ ml)
3. *Limite: de détection* 6 mg amidon/l ($\Delta A = 0,020$; $v = 0,200$ ml; $V = 2,320$ ml)
4. *Linéarité:* 1,2 $\mu\text{g/test}$ ($v = 0,200$ ml; $V = 2,320$ ml)
à 70 $\mu\text{g/test}$ ($v = 0,100$ ml; $V = 2,320$ ml)
5. *Précision:* $\Delta A = \pm 0,010$ à $0,015$ unité d'absorbance
CV = environ 1 à 2 %
6. *Informations techniques:*
 - 6.1 Le D-Glucose ne peut être déterminé à partir du blanc échantillon, car il contient non seulement le D-glucose libre éventuellement présent, mais aussi le glucose libéré lors de la préparation acide et provenant de l'hydrolyse partielle du sucrose, maltose, lactose.
 - 6.2 Si l'échantillon contient du maltose, il faut l'éliminer par un lavage éthanol 40% (voir méthode HCl sans DMSO). Sinon, une partie du maltose sera retrouvée dans le blanc échantillon (le maltose est partiellement hydrolysé lors du traitement acide), le reste sera retrouvé dans le test amidon (le maltose est hydrolysé par l'AGS).