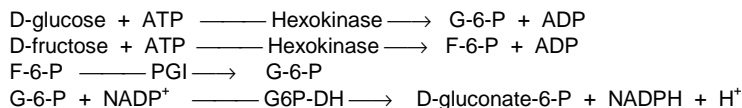


Méthode UV pour env. 32 déterminations de chaque

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.: Schmidt, F.H. (1961) Die enzymatische Bestimmung von Glucose und Fructose nebeneinander, Klinische Wochenschrift 39, 1244-1247

Spécifications

Longueur d'onde:	340 nm (NADPH) ; $\epsilon = 6,3 \text{ (l x mmol}^{-1} \text{ x cm}^{-1})$
Cuvettes de mesure:	1,00 cm (verre; plastique)
Température:	+20 à +25 °C
Volume réactionnel:	3,020 ml (D-glucose) 3,040 ml (D-fructose)
Mesure:	contre l'air ou l'eau
Échantillons	1 à 100 µg de D-glucose + D-fructose/cuvette (dans 0,1 à 2,0 ml d'échantillon)

Réactifs

- # 1: Mélange de poudre composé de tampon triéthanolamine (TEA), pH env. 7,6, env. 80 mg NADP, env. 190 mg ATP, sulfate de magnésium (voir péremption sur l'étiquette). *Diluer le contenu du flacon # 1 avec env. 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 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: Environ 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 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 D-glucose + 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	Standard ¹	Echantillon ²	Essais en double ³	Test avec standard interne ⁴	Test haute sensibilité ⁵
Tampon TEA, NADP, ATP, flacon # 1	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml
Echantillon⁶ (0,05 à 0,5 g D-glucose +D fructose/l)	-	-	0,100 ml	0,200 ml	0,100 ml	2,000 ml
Standard ⁶ (ex. 0,5 g D-gluc. ou D-fruct./l)	-	0,100 ml	-	-	0,100 ml	-
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 3 min. 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
Mélanger le contenu de la cuvette⁷. Après environ 10 à 15 min, mesurer l'absorbance (A₂). Répéter la mesure après 2 min⁸. Rajouter ensuite:						
PGI suspension # F	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 10 à 15 min, mesurer l'absorbance (A₃).						

Notes:

- 1 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 des résultats.
- 2 Ce test associé au blanc représente une simple détermination.
- 3 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.
- 4 Recouvrement = $[(\Delta A_{\text{échantillon}} + \text{standard}} - \Delta A_{\text{échantillon}}) / \Delta A_{\text{standard}}] \times 100$ [%].
- 5 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 2,000 ml (0,0004 à 0,05 g/l de D-glucose ou D-fructose, ou D-glucose + D-fructose).
- 6 Rincer la pipette ou l'embout de la pipette avec l'échantillon ou le standard avant le pipetage.
- 7 Par exemple avec une spatule en plastique ou en retournant la cuvette recouverte de Parafilm (marque déposée de American Can Co., Greenwich Ct., USA).
- 8 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).

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:

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

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

$C_{D\text{-Glucose/D-fructose}} = (V \times MW \times \Delta A) / (\epsilon \times d \times v \times 1000)$ [g D-glucose, resp. D-fructose / l d'échantillon].

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

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

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:

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

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 0,05 à 0,5 g de D-glucose + D-fructose par litre.
- 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 colorées comme le vin rosé ou rouge) avec du KOH ou NaOH à un pH de 7, incubé quelques minutes (sinon, la modification de pH lors de la réaction entraîne une modification de couleur et de densité optique). Si la solution est acide mais incolore, diluer sans ajustement de pH (voir point 1).
- Les solutions très colorées* qui ne sont pas diluées en raison de leur faible teneur en glucose sont à décolorer sur PVPP (polyvinyl-polypyrrolidone) ou sur polyamide (1g/100 ml). Mélanger, incubé quelques minutes et filtrer.
- 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.
- Pour 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 = hexacyanoferrate-II de potassium/100 ml), 5 ml de solution II de Carrez (7,2 g ZnSO₄ x 7 H₂O = sulfate de zinc hepta-hydrate/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.
- Déprotéiniser les *échantillons protéiques* avec de l'acide perchlorique, seulement en absence de sucrose et maltose.

Performances du test

- Spécificité** Spécifique pour le D-glucose et le D-fructose. Lors de l'analyse de D-glucose, de monohydrate de D-glucose et de D-fructose vendus dans le commerce, des résultats inférieurs à 100 % peuvent être obtenus car le matériaux absorbe l'humidité
- Sensibilité:** 0,2 mg/l D-glucose ou D-fructose
($\Delta A = 0,005$; $v = 2,000$ ml; $V = 3,020/3,040$ ml)
- Limite de détection:** 0,4 mg/l D-glucose ou D-fructose
($\Delta A = 0,010$; $v = 2,000$ ml; $V = 3,020/3,040$ ml)
- Linéarité:** de 1 µg D-glucose + D-fructose /test ($v = 2,000$ ml; $V = 3,020/3,040$ ml)
à 100 µg D-glucose + D-fructose /test ($v = 0,100$ ml; $V = 3,020/3,040$ ml)
- Précision:** $\Delta A = +/- 0,005$ unité d'absorbance
CV = environ 1 à 2 %
Jus de fruit: $r = 0,42 + 0,027 \times C_{D\text{-glucose in g/l}} \text{ [g/l]}$
 $r = 0,15 + 0,033 \times C_{D\text{-fructose in g/l}} \text{ [g/l]}$
 $R = 1,0 + 0,042 \times C_{D\text{-glucose in g/l}} \text{ [g/l]}$
 $R = 1,05 + 0,045 \times C_{D\text{-fructose in g/l}} \text{ [g/l]}$
Vin: $r = 0,056 \times C_{D\text{-glucose, resp. D-fructose in g/l}} \text{ [g/l]}$
- Interférences:** aucune connue
- Informations techniques:** Les réactifs peuvent également être utilisés pour la détermination du sucrose (avec l'addition de β-fructosidase)