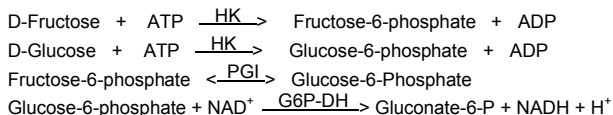


Réactif pour la mesure du D-Glucose par photométrie en UV, dans des échantillons alimentaires.

Méthode

Test enzymatique en UV utilisant l'Hexokinase (HK) et la Phosphoglucose-isomérase (PGI).

Principe



Stockage et stabilité des réactifs

Les réactifs sont stables jusqu'à la fin du mois de la date de péremption indiquée, à condition de les stocker entre 2 et 8 °C, et en évitant toute contamination. Ne pas congeler les réactifs!

Avertissements et précautions

1. Les réactifs contiennent de l'azide de sodium (0,95 g/l) comme conservateur. Ne pas avaler! Éviter tout contact avec la peau et les membranes muqueuses.
2. Prendre les précautions nécessaires à l'utilisation de réactifs de laboratoire.

Préparation des réactifs

Les réactifs ainsi que les standards sont prêts à l'emploi.

Matériel requis mais non fourni

Eau distillée (aseptique et sans métaux lourds) et équipement de laboratoire.

Contenu du coffret et concentration des réactifs

R1	4 x 20,8 ml	Tampon	pH 7,8
		ATP	1,7 mmol/l
		NAD	1,7 mmol/l
R2	4 x 5,5 ml	Tampon	pH 7,0
		Hexokinase (HK)	≥ 1,5 kU/l
		Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6P-DH)	≥ 1,5 kU/l
R3	4 x 5,0 ml	Tampon	pH 7,8
		Phosphoglucose Isomerase (PGI)	≥ 20 KU/l

Préparation des échantillons (le cas échéant)

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

- Utiliser des échantillons liquides clairs, transparents et pratiquement neutres. Si nécessaire diluer l'échantillon pour obtenir une concentration en D-Glucose et D-Fructose comprise entre 90 et 1000 mg/l.
- Filtrer ou centrifuger les solutions troubles.
- Eliminer le gaz carbonique contenu dans les échantillons.
- Ecraser ou homogénéiser les échantillons solides et semi-solides. Peser une quantité suffisante d'échantillon (en fonction de la concentration) dans une flasque volumétrique, extraire avec de l'eau. Filtrer, centrifuger ou utiliser une clarification Carrez si nécessaire.
- Pour les échantillons contenant des matières grasses, peser une quantité suffisante d'échantillon (en fonction de la concentration) dans une flasque volumétrique, extraire avec de l'eau chaude. Refroidir pour permettre la séparation des graisses, en plaçant la flasque dans un bac de glace pendant 15 minutes et filtrer. On peut aussi clarifier avec les réactifs de Carrez après l'extraction.
- Ajuster les échantillons acides en ajoutant du NaOH (ou KOH), les échantillons alcalins en ajoutant du HCl, jusqu'à obtenir un pH 8 env. Laisser reposer pendant env. 15 min.
- Traiter les échantillons très colorés avec du Polyvinyl Polypyrrolidon (PVPP, par exemple 1g/100ml d'échantillon), ou mesurer chaque échantillon avec un blanc échantillon au lieu d'un blanc réactif (si nécessaire ajuster à pH 8), en se reportant au mode opératoire.
- Clarification de Carrez : suivre le protocole habituel de la réaction de Carrez.

Mode opératoire

Longueur d'onde: 340 nm, Hg 334 nm, Hg 365 nm
 Cuvette de mesure: 1 cm
 Température: 20 – 25°C / 37°C
 Mesure: contre l'air ou l'eau

	Blanc réactif (BR)	Échantillon	Blanc échantillon (BE, facultatif)
Échantillon/ standard	-	100 µl	100 µl
Eau distillée	100 µl	-	-
Réactif 1	2000 µl	2000 µl	2000 µl
Mélanger, incuber pendant 1 min. à 37 °C ou 3 min. à 20 – 25 °C, lire l'absorbance A1, et rajouter :			
Réactif 2	500 µl	500 µl	-
Eau distillée	-	-	500 µl
Mélanger, attendre la fin de la réaction (incubation d'environ 10 min. à 37°C ou 15 min. à 20 - 25°C), lire l'absorbance A2 et ajouter :			
Réactif 3	500 µl	500 µl	-
Eau distillée	-	-	500 µl
Mélanger, attendre la fin de la réaction (incubation d'environ 10 min. à 37°C ou 15 min. à 20 - 25°C), lire l'absorbance A3.			

Des fiches techniques pour automates de chimie sont disponibles sur demande.

Calcul des résultats

Glucose

Mesure avec blanc réactif (BR):

$$\Delta A = (A_2 - fd \times A_1)_{\text{échantillon}} - (A_2 - fd \times A_1)_{BR}$$

Mesure avec un blanc échantillon (BE):

$$\Delta A = (A_2 - fd \times A_1)_{\text{échantillon}} - (A_2 - fd \times A_1)_{BE}$$

Avec fd = facteur de dilution de la densité optique, du fait des volumes de réactifs rajoutés pendant le test :

$$fd = (\text{volume échantillon} + R1) / (\text{volume échantillon} + R1 + R2) = 0,808.$$

Formule de calcul:

$$C_{D\text{-glucose}} [\text{g/l d'échantillon}] = \frac{V \times MW \times \Delta A}{\epsilon \times d \times v \times 1000}$$

avec:

V (volume total)	= 2600 [µl]	
MW (masse moléculaire)	= 180,16 [g/mol]	
d (cuvette de mesure)	= 1,00 [cm]	
v (volume d'échantillon)	= 100 [µl]	
ε (coefficient d'absorption du NADH)	[l x mmol ⁻¹ x cm ⁻¹]	
340 nm = 6,3	334 nm = 6,18	365 nm = 3,4

Il en résulte pour les différentes longueurs d'onde:

340 nm:	C _{D-Glucose} [g/l]	= 0,744 x ΔA
334 nm		= 0,758 x ΔA
365 nm		= 1,378 x ΔA

Fructose

Mesure avec blanc réactif (BR):

$$\Delta A = (A_3 - fd \times A_2)_{\text{échantillon}} - (A_3 - fd \times A_2)_{BR}$$

Mesure avec un blanc échantillon (BE):

$$\Delta A = (A_3 - fd \times A_2)_{\text{échantillon}} - (A_3 - fd \times A_2)_{BE}$$

Avec fd = facteur de dilution de la densité optique, du fait des volumes de réactifs rajoutés pendant le test :

$$fd = (\text{volume échant.} + R1 + R2) / (\text{volume échant.} + R1 + R2 + R3) = 0,839.$$

Formule de calcul:

$$C_{D\text{-glucose}} [\text{g/l d'échantillon}] = \frac{V \times MW \times \Delta A}{\epsilon \times d \times v \times 1000}$$

avec:

V (volume total)	= 3100 [µl]
MW (masse moléculaire)	= 180,16 [g/mol]

Il en résulte pour les différentes longueurs d'onde:

340 nm:	C _{D-Glucose} [g/l]	= 0,887 x ΔA
334 nm		= 0,904 x ΔA
365 nm		= 1,643 x ΔA

Les formules doivent être recalculées lorsqu'un paramètre est modifié, par ex. le volume de l'échantillon.

Si l'échantillon a été dilué, multiplier la concentration trouvée par le facteur de dilution.

Échantillons solides:

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

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

Mode opératoire pour la détermination du Glucose + Fructose sans différenciation (sucres totaux)

Des fiches techniques pour automates de chimie sont disponibles sur demande.

Longueur d'onde: 340 nm, Hg 334 nm, Hg 365 nm
 Cuvette de mesure: 1 cm
 Température: 20 – 25°C / 37°C
 Mesure: contre l'air ou l'eau

	Blanc réactif (BR)	Échantillon	Blanc échantillon (BE, facultatif)
Échantillon/ standard	-	100 µl	100 µl
Eau distillée	100 µl	-	-
Réactif 1	2000 µl	2000 µl	2000 µl
Mélanger, incuber pendant 1 min. à 37 °C ou 3 min. à 20 – 25 °C, lire l'absorbance A1, et rajouter :			
Réactif 2	500 µl	500 µl	-
Réactif 3	500 µl	500 µl	-
Eau distillée	-	-	500 µl
Mélanger, attendre la fin de la réaction (incubation d'environ 10 min. à 37°C ou 15 min. à 20 - 25°C), lire l'absorbance A2.			

Note:

R2 et R3 peuvent être pré-mélangés. Mélanger 1 volume de R2 avec 1 volume de R3 (par ex. : 5 ml R1 + 5 ml R2) et utiliser 1000 µl du mélange pour la détermination.
 La stabilité du mélange est d'une semaine entre 2 et 8°C. Ce mélange de réactifs doit être protégé de la lumière!

Calcul des résultats

Glucose + Fructose sans différenciation (sucres totaux)

Mesure avec blanc réactif (BR):

$$\Delta A = (A_2 - fd \times A_1)_{\text{échantillon}} - (A_2 - fd \times A_1)_{\text{BR}}$$

Mesure avec un blanc échantillon (BE):

$$\Delta A = (A_2 - fd \times A_1)_{\text{échantillon}} - (A_2 - fd \times A_1)_{\text{BE}}$$

Avec fd = facteur de dilution de la densité optique, du fait des volumes de réactifs rajoutés pendant le test :

$$fd = (\text{volume échant.} + R1) / (\text{volume échant.} + R1 + R2 + R3) = 0,677.$$

Formule de calcul:

$$C_{\text{sucres totaux}} [\text{g/l d'échantillon}] = \frac{V \times MW \times \Delta A}{\epsilon \times d \times v \times 1000}$$

avec:

V	(volume total)	= 3100 [µl]
MW	(masse moléculaire)	= 180,16 [g/mol]
d	(cuvette de mesure)	= 1,00 [cm]
v	(volume d'échantillon)	= 100 [µl]
ε	(coefficient d'absorption du NADH)	[l x mmol ⁻¹ x cm ⁻¹]
	340 nm = 6,3	334 nm = 6,18
		365 nm = 3,4

Il en résulte pour les différentes longueurs d'onde:

340 nm:	C _{sucres totaux} [g/l]	= 0,887 x ΔA
334 nm		= 0,904 x ΔA
365 nm		= 1,643 x ΔA

Calibration / contrôle de qualité

Pour calibrer le test sur des automates de biochimie, ou pour contrôler la qualité des résultats en utilisation manuelle, utiliser le kit Enzytec Fluid Sugar combination standard (Cat. No. 5440, 3 x 3 ml). Le standard est prêt à l'emploi.

Performances

Domaine de mesure

Le test a été développé pour déterminer la concentration en D-Glucose et D-Fructose dans un domaine de mesure compris entre 20 et 1000 mg/l (mesure à 340 nm). Lorsque les valeurs dépassent le domaine de mesure, les échantillons doivent être dilués avec de l'eau distillée dans un fourchette de 90 à 1000 mg/l. Multiplier le résultat obtenu par le facteur de dilution.

Spécificité

La détermination est spécifique pour le D-Glucose et le D-Fructose. Si le ratio D-Glucose/D-Fructose est supérieur à 10 :1, la précision de la mesure du D-fructose diminue.

Limite inférieure de détection

4,8 mg/l, mesurés à 340 nm.

La limite inférieure de détection correspond à la plus petite concentration statistiquement différente de la concentration zéro. Elle est calculée à partir de trois écarts types d'un échantillon zéro (sans D-glucose ni D-fructose) mesuré 20 fois de suite.

Gestion des déchets

Suivre les recommandations légales en vigueur

v23.06.2007