

Réactif pour la mesure du Sucrose (Glucose total) par photométrie en UV, dans des échantillons alimentaires.

Méthode

Test enzymatique en UV utilisant la β-fructosidase (invertase), l'Hexokinase (HK) et la Glucose-6-phosphate-dehydrogénase (G6P-DH).

Principe

Sucrose + H₂O $\xrightarrow{\beta\text{-Fructosidase}}$ D-Glucose + D-Fructose

D-Glucose + ATP $\xrightarrow{\text{HK}}$ Glucose-6-phosphate + ADP

Glucose-6-phosphate + NAD⁺ $\xrightarrow{\text{G6P-DH}}$ Gluconate-6-P + NADH + H⁺

Le test s'effectue avec inversion enzymatique (action de la β-fructosidase), et donne donc la somme du glucose issu du sucrose et du glucose libre. Pour obtenir la valeur du sucrose seul, il faut effectuer le test D-glucose en parallèle (ref. 5140), ce qui par différence donnera la valeur du sucrose.

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 général de laboratoire. Pour la différenciation du sucrose et du glucose libre, le coffret D-Glucose (ref. 5140) est nécessaire.

Contenu du coffret et concentration des réactifs

R1	4 x 20,8 ml	Tampon β-fructosidase	pH 7,8 ≥ 25 KU/l
R2	4 x 20,8 ml	Tampon ATP NAD	pH 7,8 1,7 mmol/l 1,7 mmol/l
R3	4 x 5,5 ml	Hexokinase (HK) Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6P-DH)	≥ 1,5 KU/l ≥ 1,5 KU/l

Préparation des échantillons (le cas échéant)

- Utiliser des échantillons liquides clairs, transparents et pratiquement neutres. Si nécessaire diluer l'échantillon pour obtenir une concentration en D-Glucose comprise entre 100 et 1000 mg/l.
- Filtrer ou centrifuger les solutions troubles.
- Éliminer le gaz carbonique contenu dans l'échantillon.
- 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 en ajoutant HCl, jusqu'à obtenir 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 au préalable). Se reporter au mode opératoire ci-dessous.
- 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

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

	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 5 min. à 37 °C ou 15 min. à 20 - 25 °C, lire l'absorbance A1, et rajouter :			
Réactif 2	500 µl	500 µl	500 µl
Réactif 3	500 µl	500 µl	-
Eau distillée	-	-	500 µl
Mélanger, attendre la fin de la réaction (incubation d'environ 5 min. à 37°C ou 15 min. à 20 - 25°C) et lire l'absorbance A2.			

Note:

R2 et R3 peuvent être pré-mélangés. Mélanger 1 unité de R2 avec 1 unité de R3 (par ex. : 5,5 ml R1 + 5,5 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 total (saccharose et glucose libre)

Mesure avec un 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:

$$C_{\text{Glucose total}} [\text{g/l d'échantillon}] = \frac{V \times MW \times \Delta A}{\varepsilon \times d \times v \times 1000}$$

avec:

V	(volume total)	= 3100 [µl]
MW	(masse moléculaire)	= 342,3 [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 _{Glucose total} [g/l]	= 1,684 x ΔA
334 nm		= 3,121 x ΔA
365 nm		= 1,717 x ΔA

La formule doit être recalculée lorsqu'un paramètre est modifié, par ex. le volume de l'échantillon.

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

Échantillons solides:

$$\text{Contenu}_{\text{Glucose total}} [\text{g}/100 \text{ g}] = \frac{C_{\text{Glucose total}} [\text{g/l}]}{\text{poids échantillon} [\text{g/l solution}]} \times 100$$

Sucrose

Le test décrit ci-dessus s'effectue avec inversion enzymatique (action de la β-fructosidase), et donne donc la somme du glucose issu du sucrose, et du glucose libre. Pour obtenir la valeur du sucrose seul, il faut effectuer le test D-glucose en parallèle (ref. 5140), ce qui par différence donnera la valeur du sucrose. Tenir compte de la différence de poids moléculaire entre les deux analytes :

$$\text{Poids moléculaire Sucrose/glucose} = 342,3 / 180,16 = 1,90$$

Exemple :

Test 1 : Glucose total 1500 mg/l
Test 2 : Glucose 400 mg/l
Sucrose = 1500 mg/l – 1,90 x 400 mg/l = 740 mg/l.

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.

Performance**Domaine de mesure**

Le test a été développé pour déterminer la concentration en Glucose total dans un domaine de mesure entre 18 et 1000 mg/l (mesuré 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 100 à 1000 mg/l. Multiplier le résultat obtenu par le facteur de dilution.

Spécificité

La β -fructosidase hydrolyse les liaisons β -fructosidiques dans le sucrose et d'autres oligo-saccharides. Si l'échantillon ne contient que du sucrose, il est mesuré de façon spécifique grâce à l'hexokinase plus G6P-DH.

Les oligosaccharides de type raffinose sont hydrolysés, mais plus lentement que le sucrose.

Si le ratio Glucose/sucrose est supérieur à 10:1, la précision du test sucrose est diminuée.

Sensibilité (limite inférieure de détection)

6,5 mg/l, mesurés à 340 nm.

La sensibilité 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 sucrose ni glucose) mesuré 20 fois de suite.

Gestion des déchets

Suivre les recommandations légales en vigueur

Fabricant

DiaSys Diagnostic Systems GmbH
Alte Straße 9
65558 Holzheim
mail@diasys.de

v15.09.2005