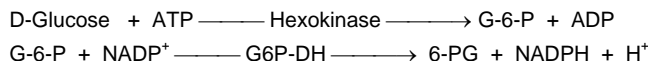


Méthode UV pour env. 32 déterminations

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

La méthode est décrite dans les textes officiels allemands, italiens, suisses, et européens. Elle est recommandée par l'AOAC, l'IFU, l'AIJN, le MEBAK et l'OIV. Elle est standardisée selon les normes DIN, EN, GOST, NEN et NF.

### Principe



Le D-glucose est phosphorylé en glucose-6-phosphate (G-6-P) en présence d'hexokinase et d'ATP (adénosine-5'-triphosphate). En présence de G6P-DH (glucose-6-phosphate déshydrogénase), le glucose-6-phosphate est oxydé par le NADP (nicotinamide-adénine-dinucléotide phosphate) en 6-PG (gluconate-6-phosphate). Il se forme du NADP réduit (NADPH). La quantité de NADPH formée au cours de la réaction est proportionnelle à la quantité de D-glucose. On la mesure par l'augmentation de l'absorption à 340 nm.

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

### Spécifications

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

### Réactifs

- # 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 °C 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.

#### Réactif supplémentaire (non contenu dans le coffret):

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

Les réactifs pour le dosage du D-glucose 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 <sup>1</sup> | Echantillon <sup>2</sup> | Essai en double <sup>3</sup> | Test avec standard interne <sup>4</sup> | Test haute sensibilité <sup>5</sup> |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|-----------------------|--------------------------|------------------------------|-----------------------------------------|-------------------------------------|
| Tampon triéthanolamine (TEA), NADP, ATP # 1                                                                                                                                                                                                   | 1,000 ml | 1,000 ml              | 1,000 ml                 | 1,000 ml                     | 1,000 ml                                | 1,000 ml                            |
| <b>Echantillon<sup>6</sup> (ex. 0,05 à 0,5 g D-glucose/l)</b>                                                                                                                                                                                 | -        | -                     | <b>0,100 ml</b>          | <b>0,200 ml</b>              | <b>0,100 ml</b>                         | <b>2,000 ml</b>                     |
| Standard <sup>6</sup> (ex. 0,5 g D-glucose/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                                | -                                   |
| <b>Mélanger le contenu de la cuvette<sup>7</sup>. Mesurer la densité optique (absorbance A<sub>1</sub>) après environ 3 min. Rajouter ensuite:</b>                                                                                            |          |                       |                          |                              |                                         |                                     |
| HK/G6P-DH suspension # 2                                                                                                                                                                                                                      | 0,020 ml | 0,020 ml              | 0,020 ml                 | 0,020 ml                     | 0,020 ml                                | 0,020 ml                            |
| <b>Mélanger le contenu de la cuvette<sup>7</sup>. Après environ 10 à 15 min, mesurer l'absorbance du blanc et des autres réactions (A<sub>2</sub>) immédiatement les unes derrière les autres. Répéter la mesure après 2 min<sup>8</sup>.</b> |          |                       |                          |                              |                                         |                                     |

### 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.
- Ce test associé au blanc représente 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 =  $[(\Delta A_{\text{échantillon}} + \text{standard} - \Delta A_{\text{échantillon}}) / \Delta A_{\text{standard}}] \times 100 [\%]$ .
- 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 2,0 ml (0,0004 à 0,05 g de D-glucose par litre).
- 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).

**Calcul des résultats**

a.) 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:

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

Afin d'obtenir des résultats exacts et valables, la différence d'absorbance doit être au moins de 0,100.

b.) La formule générale pour le calcul des concentrations est la suivante:

$$c = \frac{V \times PM}{\epsilon \times d \times v \times 1000} \times \Delta A \quad [\text{g/l}]$$

V = volume du test (ml)  
 v = volume de l'échantillon (ml)  
 PM = poids moléculaire de la substance à doser  
 d = épaisseur de la cuvette (cm)  
 $\epsilon$  = coefficient d'absorption du NADPH:  
 à 340 nm = 6,3 (l x mmole<sup>-1</sup> x cm<sup>-1</sup>)

On obtient donc pour le glucose (à 340 nm, et pour une prise d'essai de 0,1ml):

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

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 rapporté à la quantité pesée:

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

**Préparation des échantillons**

1. Diluer les échantillons liquides transparents, clairs et pratiquement neutres pour obtenir une solution contenant 0,05 à 0,5 g de D-glucose par litre (dans un volume v= 0,100 ml).
2. Filtrer ou centrifuger *les solutions troubles*. Diluer le surnageant (voir point 1).
3. Eliminer le gaz carbonique *des échantillons gazeux* par agitation et filtration ou en ajoutant du NaHCO<sub>3</sub> jusqu'à obtenir une solution légèrement alcaline. Diluer (voir point 1).
4. Neutraliser *les solutions acides* (spécialement les solutions légèrement colorées) avec du KOH ou NaOH à un pH de 7, incuber quelques minutes. Diluer les solutions incolores sans ajustement de pH (voir point 1).
5. *Les solutions très colorées* qui ne sont pas diluées en raison de leur faible teneur en glucose sont à décolorer sur PVPP (Polyvinyl Polypyrolidon) ou sur polyamide (1g/100 ml). Mélanger, incuber quelques minutes et filtrer.
6. 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.
7. Extraire les échantillons *riches en matières grasses* avec de l'eau chaude à une température supérieure 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.
8. Pour clarifier les échantillons *contenant des protéines*, utiliser la réaction 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 K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] x 3H<sub>2</sub>O = hexacyanoferrate-II de potassium/100 ml), 5 ml de solution II de Carrez (7,2 g ZnSO<sub>4</sub> - 7 H<sub>2</sub>O = sulfate de zinc heptahydrate /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.
9. *Déprotéiniser les échantillons* avec de l'acide perchlorique, seulement en absence de sucrose et maltose.

**Performances du test**

1. *Spécificité:* Spécifique pour le D-glucose. Lors de l'analyse de D-glucose ou de monohydrate de D-glucose vendu dans le commerce, des résultats inférieurs à 100 % peuvent être obtenus car le matériel absorbe l'humidité
2. *Sensibilité:* 0,2 mg/l (ΔA = 0,005; v = 2,000 ml ; V = 3,020 ml)
3. *Limite de détection:* 0,4 mg/l (ΔA = 0,010; v = 2,000 ml; V = 3,020 ml)
4. *Linéarité:* 1 µg/test (v = 2,000 ml; V = 3,020 ml)  
à 100 µg/test (v = 0,100 ml; V = 3,020 ml)
5. *Précision:* +/- 0,005 unité d'absorbance  
CV = environ 1 à 2 %
6. *Interférences:* aucune connue
7. *Informations techniques :* Les réactifs peuvent également être utilisés pour la détermination du D-fructose (avec l'addition de PGI) et du sucrose (avec l'addition de β-fructosidase).