

GLUCOSE/FRUCTOSE

Méthode: enzymatique UV, 340 nm

Code produit: KHPE036065

Constitution: 5 x 20 ml

Conservation: 4 - 8 °C

Pour "utilisation in vitro" uniquement

Principe (Réf. 1)

Le glucose et le fructose sont phosphorylés par l'adénosine-5'-triphosphate (ATP) en glucose-6-phosphate (G-6-P) et fructose-6-phosphate (F-6-P) dans une réaction (1) et (2) catalysée par l'hexokinase (HK).



Le fructose-6-P, est converti (3) en Glucose-6-P par la phosphoglucose-isomérase (PGI).



En présence de glucose-6-phosphate-déshydrogénase (G6P-DH) le glucose-6-phosphate est oxydé par le nicotinamide-adénine-dinucléotide-phosphate (NADP) en gluconate-6-phosphate. Il se forme du nicotinamide-adénine-dinucléotide-phosphate réduit (NADPH) (4).



La quantité de NADPH formé au cours de la réaction est proportionnelle à la quantité de glucose contenue dans le vin. On la détermine par son absorption à 340 nm.

L'ajout de PVP au milieu réactionnel est nécessaire pour éviter les interférences dues aux composés phénoliques du vin.

Composition du kit

2 x 100 ml	Tampon "GOOD" R1 contient: tampon Good > 20 mM
5 x 20 ml	Lyophilisat "LIOFILO" R2 contient: NADP > 0,2 mM ATP > 2 mM
1 x 2,5 ml	Enzyme starter HK R3 contient: G6PDH > 5 U/l Hexokinase (HK) > 10 U/l
1 x 2,5 ml	Enzyme starter PGI R4 Contient: PGI > 50 U/l

Préparation et stabilité des solutions

- LIOFILO reconstitué avec le tampon R1: dissoudre le contenu d'un flacon de Liofilo avec 20 ml de tampon Good. Agiter délicatement jusqu'à complète dissolution. La solution est stable 1 semaine et se conserve à 4-8 °C.
- starter HK: La solution est prête à l'emploi et se conserve à 4-8 °C jusqu'à la date de péremption du kit.
- starter PGI: La solution est prête à l'emploi et se conserve à 4-8 °C jusqu'à la date de péremption du kit.

Méthode manuelle

Longueur d'onde:	340 nm
Cuvette:	1 cm
Température:	37°C
Méthode:	Point final
Réaction :	8-18 minutes
Linéarité :	30 - 1000 mg/L à 37°C en GF
Rapport échantillon /réactifs :	1/40/1/1

Laisser les réactifs revenir à température avant utilisation
R/B : Blanc réactif, S : Echantillon

Pipeter dans la cuvette	R/B	S
Réactif R2 reconstitué	1.000 µL	1.000 µL
H2O distillée	25 µL	
Echantillon		25 µL

Mélanger et attendre environ 3 minutes à 37°C.

Mesurer l'absorbance AS0 et AR/B0, pour le Glucose et ajouter successivement:

2. ENZIME R3 reconstituée	25 µL	25 µL
---------------------------	-------	-------

Mélanger et attendre environ 5-10 minutes à 37°C.

Mesurer l'absorbance AS1 et AR/B1, pour le Fructose et ajouter successivement:

2. ENZIME R4 reconstituée	25 µL	25 µL
---------------------------	-------	-------

Mélanger et attendre environ 5-15 minutes à 37°C.

Mesurer l'absorbance AS2 et AR/B2.

Calculer pour l'échantillon de Glucose : $ASG = (AS1 - AS0)$

Calculer pour le réactif/blanc Glucose : $AR/BG = (AR/B1 - AR/B0)$

Calculer la différence pour le Glucose $\Delta AG = ASG - AR/BG$

Calculer pour l'échantillon de Fructose : $ASF = (AS2 - AS1)$

Calculer pour le réactif/blanc Fructose : $AR/BF = (AR/B2 - AR/B1)$

Calculer la différence pour le Fructose $\Delta AF = ASF - AR/BF$

CALCUL POUR LE GLUCOSE :

[Glucose] = 1.201 x ΔAG

CALCUL POUR LE FRUCTOSE :

[Fructose] = 1.230 x ΔAF

Méthode sur automates:

En monoréactif:

20 ml de tampon R1 dans un flacon de lyophilisat R2. Rajouter successivement 0.5 ml de R3 et 0.5 ml de R4.

Ajouter au réactif, 10 % de son volume, en solution mère de PVP si nécessaire.

En Bi-réactifs R1 & R2, dans la programmation de votre analyseur
R1: 20 ml de tampon R1 dans un tube de lyophilisat R2.

Ajouter au réactif, 10 % de son volume, en solution mère de PVP si nécessaire.

R2: 0.5 ml de R3 et 0.5 ml de R4.

Spécificité (Réf.1)

Cette méthode est spécifique du Glucose-Fructose.

Linéarité

Pour un volume d'échantillon initial de 3 μ l et un volume final après réaction de 212 μ l, la méthode est linéaire jusqu'à environ 10 g/l de sucres fermentescibles

Précision (Réf.2)

Dans une double détermination, en utilisant 0.100 ml d'un même échantillon et un volume final après réaction de 2.200 ml, on peut obtenir une différence d'absorbance (Abs) qui varie de 0.005 à 0.010 unités, cela correspond à une concentration en glucose fructose d'environ 0.003 - 0,006 g/l.

Les valeurs suivantes proviennent de la littérature:

CV = 0.5% solution de glucose fructose

CV = 1.0% vin blanc

CV = 1.2% vin rouge

Réactifs, précautions d'usage

Ce kit a été fabriqué pour déterminer le glucose fructose dans les aliments et les boissons.

Les réactifs employés ne sont pas considérés comme des substances dangereuses selon la norme communautaire 67/548/ECC et ses modifications ultérieures.

Toutefois il sera opportun de se conformer aux mesures générales de sûreté prévues pour la manipulation des substances chimiques.

Après l'utilisation, les réactifs doivent être stockés en accord avec la réglementation en vigueur. Le matériel présent dans ce kit, pourra être mis dans des poubelles destinées au recyclage.

Préparation de l'échantillon

Généralement non prévisible. *:Pour tous les vins structurés (Polyphénols totaux > 2,5 g/l), les décolorer avec du charbon actif ou une solution de PVP. Ajouter au réactif, 10 % de son volume, en solution mère de PVP.

Solution mère de PVP : 40g/l

Pour 100ml de solution peser 4g de PVP et compléter à 100ml d'eau distillée.

Bibliographie

(Réf.1) - Ministero dell'Agricoltura e Foreste (1986) *Approvazione dei "Metodi Ufficiali di analisi per i mosti, i vini, gli agri di vino (aceti) e i sottoprodotti della vinificazione". Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana, n. 161 del 14 luglio 1986.*

- Bergmeyer, H.U. & Mollering, H (1974) in *Methoden der enzymatischen Analyse 2nd ed., vol 3 p. 1520-1528, Verlag Chemie, Weinheim Academic Press, Inc. New York and London.*

- Rimmer J.G. - *Automated Analysis for Quality Control in the Soft Drinks Industry.- Technicon England Symposium 1971, 307-312.*

(Réf.2) - Beutler, H.-O. (1984) in *Methods of Enzymatic Analysis, 3rd ed., vol. VI, pp 639-645, Verlag Chemie, Weinheim, Deefield Beach/Florida, Basel.*

- Henniger, G. & Mascaro, L. (1985) *Enzymatic-Ultraviolet Determination of Glucose and Fructose in*

Règlement général

Les réactifs sont prévus pour une utilisation exclusive en laboratoire. On retiendra donc que les personnes, habilitées à la manipulation de substances chimiques, par leur formation et par leur culture, auront prises toutes les précautions d'usage même sans indication explicite sur l'emballage.

Par exemple: toujours porter des lunettes de protection et si possible des gants de protection, éviter le contact avec la peau et les muqueuses, ne pas boire, manger ou fumer dans le laboratoire.

Significations des pictogrammes imprimés



Réactifs pour diagnostic in vitro uniquement



Numérot de Lot



Voir fiche d'information d'utilisation



Fabricant



Distributeur



Date de péremption



Valeurs limites basses et hautes de température de conservation du kit.