

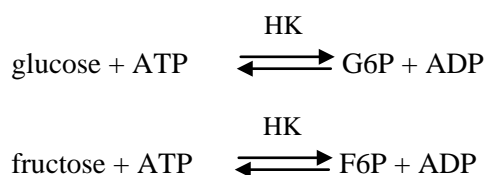
Glucose et fructose

1. Définition

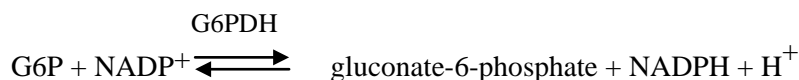
Le glucose et le fructose peuvent être dosés individuellement par une méthode enzymatique, en vue seulement du calcul du rapport glucose/fructose.

2. Principe

Le glucose et le fructose sont phosphorylés par l'adénosine triphosphate (ATP) au cours d'une réaction enzymatique catalysée par l'hexokinase (HK), et donnent du glucose-6-phosphate (G6P) et du fructose-6-phosphate (F6P) :

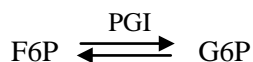


dans un premier temps le glucose-6-phosphate est oxydé en gluconate-6-phosphate par le nicotinamide-adénine-dinucléotide-phosphate (NADP) en présence de l'enzyme glucose-6-phosphate-déhydrogénase (G6PDH). La quantité de nicotinamide-adénine-dinucléotide-phosphate réduite (NADPH) qui prend naissance correspond à la quantité de glucose-6-phosphate et donc à celle de glucose.



C'est la nicotinamide-adénine-dinucléotide-phosphate réduit qui est dosé d'après son absorption à 340 nm.

Lorsque cette réaction est terminée, le fructose-6-phosphate est transformé sous l'action de la phosphoglucose-isomérase (PGI) en glucose-6-phosphate :



Le glucose-6-phosphate réagit à nouveau avec le nicotinamide-adénine-dinucléotide-phosphate pour donner du gluconate-6-phosphate et du nicotinamide-adénine-dinucléotide-phosphate réduit ; celui-ci sera dosé.

3. Appareillage

- Spectrophotomètre permettant d'effectuer la mesure à 340 nm, maximum d'absorption du NADPH. S'agissant de mesures absolues (pas de gamme d'étalonnage, mais référence au coefficient d'extinction du NADPH), les

échelles des longueurs d'onde et des absorbances de l'appareil doivent être contrôlées.

A défaut, utiliser un photomètre à spectre discontinu permettant d'effectuer les mesures à 334 nm ou à 365 nm.

- Cuves de verre de 1 cm de trajet optique ou cuves à usage unique.
- Pipettes pour test enzymatique de 0,02, 0,05, 0,1, 0,2 ml

4. Réactifs

Solution 1 : tampon (triéthanolamine 0,3 M, pH 7,6, Mg^{2+} $4 \cdot 10^{-3} M$): 11,2 g de chlorhydrate de triéthanolamine (C_2H_5HCl) et 0,2 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ sont dissous dans 150 ml d'eau bidistillée; ajouter environ 4 ml de solution 5M d'hydroxyde de sodium pour obtenir un pH égal à 7,6 et porter à 200 ml.

Cette solution tampon se conserve 4 semaines à +4°C.

Solution 2 : solution de nicotinamide-adénine-dinucléotide-phosphate (environ $11,5 \cdot 10^{-3} M$) : 50 mg de nicotinamide-adénine-dinucléotide-phosphate disodique sont dissous dans 5 ml d'eau bidistillée.

Cette solution se conserve 4 semaines à +4°C.

Solution 3 : solution d'adénosine-5'-triphosphate disodique et 250 mg d'hydrogénocarbonate de sodium sont dissous dans 5 ml d'eau bidistillée.

Cette solution se conserve 4 semaines à +4°C.

Solution 4 : hexokinase/glucose-6-phosphate-déshydrogénase: mélanger 0,5 ml d'hexokinase (2 mg de protéine/ml soit 280 U/ml) et 0,5 ml de glucose-6-phosphate-déshydrogénase (1 mg de protéine/ml).

Le mélange se conserve un an à +4°C.

Solution 5 : phosphoglucose-isomérase (2 mg de protéine/ml, soit 700 U/ml). La suspension est utilisée sans dilution.

Cette solution se conserve un an à +4°C.

Remarque: L'ensemble des réactifs nécessaires pour ce dosage est commercialisé.

5. Mode opératoire

5.1. Préparation de l'échantillon

En fonction de la quantité estimée de glucose + fructose par litre (g/l) effectuer les dilutions suivantes :

Mesure à 340 et 344 nm (g/l)	Mesure à 365 nm (g/l)	Dilution avec l'eau	Facteur F de dilution
Jusqu'à 0,4	0,8	-	-
4,0	8,0	1 + 9	10
10,0	20,0	1 + 24	25
20,0	40,0	1 + 49	50
40,0	80,0	1 + 99	100
au-dessus de 40,0	80,0	1 + 999	1000

5.2. Dosage

Le spectrophotomètre étant réglé sur la longueur d'onde 340 nm, effectuer les mesures par rapport à l'air (pas de cuve dans le trajet optique) ou par rapport à l'eau.

Température 20 à 25°C.

Dans 2 cuves de 1 cm de trajet optique, introduire :

	<u>Témoin</u>	<u>Dosage</u>
Solution 1 (ramenée à 20°C)	2,50 ml	2,50 ml
Solution 2	0,10 ml	0,10 ml
Solution 3	0,10 ml	0,10 ml
Echantillon à doser		0,20 ml
Eau bidistillée	0,20 ml	

Mélanger et après environ 3 minutes, lire l'absorbance des solutions (A₁). déclencher la réaction en ajoutant :

Solution 4	0,02 ml	0,02 ml
------------------	---------	---------

Mélanger; attendre 1(minutes; effectuer la mesure de l'absorbance et vérifier l'arrêt de la réaction après 2 min. (A₂).

Ajouter immédiatement :

Solution 5	0,02 ml	0,02 ml
------------------	---------	---------

Mélanger; effectuer la lecture au bout de 10 min ; vérifier l'arrête de la réaction après 2 min. (A₃).

Déterminer les différences d'absorbance :

A₂ – A₁ correspondant au glucose,

A₃ – A₂ correspondant au fructose,

Pour le témoin et pour le dosage.

Déduire la différence d'absorbance du témoin (ΔA_T) de celle du dosage (ΔA_D) et établir :

$$\text{pour le glucose: } \Delta A_G = \Delta A_D - \Delta A_T$$

$$\text{pour le fructose: } \Delta A_F = \Delta A_D - \Delta A_T$$

Remarque: Le temps nécessaire à l'action des enzymes peut varier d'un lot à l'autre. Il n'est donné ci-dessus qu'à titre indicatif. Il est recommandé de le déterminer pour chaque lot.

5.3. Expression des résultats

5.3.1 Calcul

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

$$C = \frac{V \times PM}{\varepsilon \times d \times v \times 1000} \Delta A \text{ (g/l)}$$

V = volume du test (ml)

v = volume de l'échantillon (ml)

PM = masse moléculaire de la substance à doser

d = trajet optique de la cuve (cm)

ε = coefficient d'absorption du NADPH à 340 nm = 6,3
(mmole⁻¹ x l x cm⁻¹)

V = 2,92 ml pour le dosage du glucose

V = 2,94 ml pour le dosage du fructose

v = 0,20 ml

PM = 180

d = 1

On obtient :

$$\text{Pour le glucose : } C(\text{g/l}) = 0,417 \times \Delta A_G$$

$$\text{Pour le fructose : } C(\text{g/l}) = 0,420 \times \Delta A_F$$

Si une dilution a été effectuée lors de la préparation de l'échantillon, multiplier le résultat par le facteur F.

Remarque: si les mesures ont été faites aux longueurs d'onde 334 ou 365 nm, on obtient :

- mesure à 334 nm : $\varepsilon = 6,2$ (mmole⁻¹ x l x cm⁻¹)

- pour le glucose : $C(\text{g/l}) = 0,425 \times \Delta A_G$

- pour le fructose : $C(\text{g/l}) = 0,428 \times \Delta A_F$

- mesure à 365 nm : $\varepsilon = 3,4$ (mmole⁻¹ x l x cm⁻¹)

- pour le glucose : $C(\text{g/l}) = 0,773 \times \Delta A_G$

pour le fructose : $C(\text{g/l}) = 0,778 \times \Delta A_F$

5.3.2 Répétabilité (r):

$$r = 0,056 x_i$$

x_i = concentration en g/l de l'échantillon.

5.3.3 Reproductibilité (R):

$$R = 0,12 + 0,076 x_i$$

x_i = concentration en g/l de l'échantillon.

BIBLIOGRAPHIE

BERGMEYER H.U., BERNT E., SCHMIDT F. and STORK H., *Méthodes d'analyse enzymatique* by BERGMEYER H.U., 2e éd., p. 1163, Verlag-Chemie Weinheim/Bergstraße, 1970.

BOEHRINGER Mannheim, *Méthodes d'analyse enzymatique en chimie alimentaire*, documentation technique.

JUNGE Ch., *F.V., O.I.V.*, 1973, No 438.