

Determinación enzimática de D-Glucosa y D-Fructosa en productos alimentarios
2 x 50 ml R1 + 2 x 12,5 ml R2 + 2 x 12,5 ml R3 (50 pruebas)

Para uso "in vitro" solamente
Conservar entre +2 y +8 °C

Principio

Ensayo enzimático con Hexoquinasa (HK), Fosfoglucosa Isomerasa (PGI) y Glucosa-6-fosfato Deshidrogenasa (G6P-DH). Se produce NADH que es medido a 340 nm:

D-Fructosa + ATP \xrightarrow{HK} Fructosa-6-Fosfato + ADP

D-Glucosa + ATP \xrightarrow{HK} Glucosa-6-Fosfato + ADP

Fructosa-6-Fosfato \xrightarrow{PGI} Glucosa-6-Fosfato (G6P)

G6P + NAD⁺ $\xrightarrow{G6P-DH}$ Gluconato-6-P + NADH + H⁺

Reactivos

Los reactivos están listos para usar:

#1: Reactivo 1, aprox. 50 ml x 2 frascos (NAD, tampón)

#2: Reactivo 2, aprox. 12,5 ml x 2 frascos (HK, G6P-DH)

#3: Reactivo 3, aprox. 12,5 ml x 2 frascos (PGI)

Los reactivos son estables hasta el final del mes indicado en la fecha de vencimiento, se deben almacenar a +2 - +8 °C. No se deben congelar los reactivos. Dejar que los reactivos alcancen la temperatura del laboratorio antes de su uso (20 - 25 °C).

Se deben seguir las normas habituales de trabajo del laboratorio. ¡No ingerir! Evitar el contacto con piel y mucosas.

Este kit puede contener otras sustancias peligrosas. Para informarse sobre las sustancias peligrosas contenidas, por favor consultar las hojas de seguridad de materiales (MSDS) de este producto, disponibles en línea en www.r-biopharm.com. Luego de su uso, los reactivos pueden eliminarse como residuos de laboratorio. Los embalajes pueden reciclarse.

Preparación de las muestras

- Usar muestras líquidas limpias, incoloras y con pH neutro directamente o después de una dilución en un rango de medida relevante (ver Rendimiento del ensayo)
- Las soluciones turbias deben filtrarse o centrifugarse
- Las muestras con dióxido de carbono deben degasificarse
- Las muestras con contenido graso o proteico deben clarificarse por el método de clarificación de Carrez
- Las muestras sólidas o semi-sólidas deben molerse y homogeneizarse. Luego extraer con agua, filtrar o centrifugar, o realizar una clarificación de Carrez si es necesario.
- Para muestras con contenido graso, se debe pesar la muestra en un frasco volumétrico (min. 50 ml) y extraer con agua caliente; enfriar para permitir la separación del contenido graso; llevar a volumen con agua, remover la capa grasa superior y filtrar la capa acuosa antes del ensayo
- Ajustar el pH a aprox. 8.0 mediante le agregado de KOH / NaOH para muestras ácidas o con HCl para muestras alcalinas

Método operatorio

Longitud de onda: 340 nm, Hg 334 nm, Hg 365 nm

Trayecto óptico: 1 cm

Temperatura: 20 - 25 °C / 37 °C

Medida: contra aire o agua

Muestras: 20 - 1500 mg/l

	Blanco reactivo (BR)	Muestras
Muestra/ standard	-	100 µl
Agua destilada	100 µl	-
Reactivo 1	2000 µl	2000 µl
Mezclar, incubar 1 min a 37 °C o 3 min a 20 - 25 °C. Leer la absorbancia A1, luego añadir:		
Reactivo 2	500 µl	500 µl
Mezclar, esperar el final de la reacción (10 min a 37 °C o 15 min a 20 - 25 °C). Leer la absorbancia A2, luego añadir:		
Reactivo 3	500 µl	500 µl
Mezclar, esperar el final de la reacción (10 min a 37 °C o 15 min a 20 - 25 °C). Leer la absorbancia A3.		

El blanco reactivo debe medirse una vez por cada serie, y debe sustraerse de cada muestra en el cálculo de los resultados.

Cálculo de los resultados

D-Glucosa

$$\Delta A = (A_2 - df \times A_1)_{\text{muestra}} - (A_2 - df \times A_1)_{\text{RB}}$$

df (factor de dilución) = factor de dilución de la densidad óptica

$$df = (\text{muestra} + R1) / (\text{muestra} + R1 + R2) = 0,808.$$

$$c = (V \times MW \times \Delta A) / (\epsilon \times d \times v \times 1000) \quad [\text{en g/l de D-glucosa}]$$

$$c = (2,600 \times 180,16 \times \Delta A) / (\epsilon \times 1 \times 0,1 \times 1000)$$

Resulta para una determinación a 340 nm ($\epsilon = 6.3 \text{ l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$):

$$C_{\text{D-Glucosa}} [\text{g/l}] = 0,744 \times \Delta A$$

D-Fructosa

$$\Delta A = (A_3 - df \times A_2)_{\text{muestra}} - (A_3 - df \times A_2)_{\text{RB}}$$

df (factor de dilución) = factor de dilución de la densidad óptica

$$df = (\text{muestra} + R1 + R2) / (\text{muestra} + R1 + R2 + R3) = 0,839.$$

$$c = (V \times MW \times \Delta A) / (\epsilon \times d \times v \times 1000) \quad [\text{en g/l de D-glucosa}]$$

$$c = (3,100 \times 180,16 \times \Delta A) / (\epsilon \times 1 \times 0,1 \times 1000)$$

Resulta para una determinación a 340 nm ($\epsilon = 6.3 \text{ l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$):

$$C_{\text{D-Fructosa}} [\text{g/l}] = 0,887 \times \Delta A$$

D-Fructosa y D-Fructosa sin diferenciación

Añadir los reactivos 2 y 3 inmediatamente uno detrás del otro e incubar una única vez.

$$\Delta A = (A_2 - df \times A_1)_{\text{muestra}} - (A_2 - df \times A_1)_{\text{RB}}$$

$$df = (\text{muestra} + R1) / (\text{muestra} + R1 + R2 + R3) = 0,677.$$

$$c = (V \times MW \times \Delta A) / (\epsilon \times d \times v \times 1000) \quad [\text{en g/l de D-glucosa}]$$

$$c = (3,100 \times 180,16 \times \Delta A) / (\epsilon \times 1 \times 0,1 \times 1000)$$

Resulta para una determinación a 340 nm ($\epsilon = 6.3 \text{ l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$):

$$C_{\text{D-Glucosa/D-Fructosa}} [\text{g/l}] = 0,887 \times \Delta A$$

Muestras sólidas

$$\text{Contenido} [\text{g}/100 \text{ g}] = \frac{C_{\text{ensayo}} [\text{g/l}]}{\text{peso}_{\text{muestra}} [\text{g/l}]} \times 100$$

Rendimiento del ensayo

Especificidad

El ensayo es específico del D-Glucosa y D-Fructosa. Ninguna interferencia se observó para Galactosa, Lactosa, Maltosa, Manitol, Sorbitol y Sacarosa. La Manosa no muestra interferencias hasta 5 g/l, pero genera bajas recuperaciones a concentraciones más altas. Si el cociente D-Glucosa / D-Fructosa es superior a 10:1, la precisión del ensayo para el D-Fructosa disminuye.

Rango de medida

La prueba mide la concentración de D-Glucosa desde 20 a 1500 mg/l. Cuando los valores superan este rango, las muestras deben diluirse con agua destilada desde 100 a 1500 mg/l. Multiplicar el resultado obtenido por el factor de dilución.

Sensibilidad

El límite inferior de detección (LD) y el límite de cuantificación (LQ) se determinaron según la norma DIN 32645:2008 - 11:

- LD = 4.0 mg/l
- LQ = 10 mg/l

Automatización

Están disponibles aplicaciones para autoanalizadores a pedido.

Aviso

Los datos corresponden a nuestro estado actual de tecnología y proporciona información sobre nuestros productos y sus usos. R-Biopharm no ofrece garantías de ningún tipo, ya sea expresa o implícita, excepto que los materiales con los que están fabricados sus productos son de calidad estándar. Los productos defectuosos serán reemplazados. No hay ninguna garantía de comercialización de este producto, o de la idoneidad del producto para cualquier propósito. R-Biopharm no será responsable de ningún daño, incluyendo daño especial o consecuente, o gastos derivados directa o indirectamente del uso de este producto.