

Determinazione enzimatica del D-Glucosio / D-Fruuttosio in prodotti alimentari ed altri
2 x 50 ml R1 + 2 x 12,5 ml R2 + 2 x 12,5 ml R3 (50 prove)

Solo per uso *in vitro*
Conservare tra +2 e +8 °C

Principio

Test enzimatico con Esocinasasi (HK), Fosfoglucosio Isomerasi (PGI) e Glucosio-6-Fosfato Deidrogenasi (G6P-DH). Il NADH prodotto viene misurato a 340 nm:

D-Fruuttosio + ATP — HK —> Fruuttosio -6-Fosfato + ADP

D-Glucosio + ATP — HK —> Glucosio -6- Fosfato + ADP

Fruuttosio -6-Fosfato — PGI —> Glucosio -6- Fosfato

G-6-P + NAD⁺ — G6P-DH —> Gluconato-6-P + NADH + H⁺

Reagenti

I reagenti sono pronti all'uso:

#1: Reagente 1, ca. 50 ml x 2 flaconi (NAD, tampone)

#2: Reagente 2, ca. 12,5 ml x 2 flaconi (HK, G6P-DH)

#3: Reagente 3, ca. 12,5 ml x 2 flaconi (PGI)

Tutti i reagenti sono stabili fino alla fine del mese di scadenza indicato, se conservati a temperatura compresa tra 2 e 8°C. Non congelare i reagenti. Portare i reagenti a temperatura ambiente (20-25°C) prima dell'utilizzo.

Applicare le comuni norme di sicurezza necessarie in un laboratorio chimico. Non ingerire. Evitare il contatto con la pelle e le mucose.

Questo kit può contenere sostanze pericolose. Per informazioni sul rischio delle sostanze contenute, fare riferimento alla scheda di sicurezza di questo prodotto, disponibile on line sul sito www.r-biopharm.com. Dopo l'impiego, i reattivi devono essere eliminati come rifiuti di laboratorio. Gli imballaggi possono essere riciclati.

Preparazione dei campioni

- I campioni liquidi limpidi e non colorati, a pH neutro possono essere utilizzati tal quali o dopo diluizione in un intervallo di concentrazione opportuno (vedere sezione Performance del kit)
- Filtrare o centrifugare le soluzioni torbide
- Degassare i campioni contenenti anidride carbonica
- Chiarificare i campioni contenenti proteine o grassi con il reattivo di Carrez
- Macinare ed omogeneizzare i campioni solidi o semi-solidi ed estrarli in acqua. Filtrare o centrifugare, o utilizzare la chiarificazione di Carrez se necessario
- Per campioni contenenti grassi, pesare il campione in un provettone (da almeno 50 ml) ed estrarre con acqua calda; raffreddare consentendo al grasso di separarsi (ad esempio in un bagno di ghiaccio per 15 min); portare a volume con acqua, rimuovere lo strato di grasso sulla superficie e filtrare la fase acquosa prima dell'analisi
- Portare a pH di circa 8 aggiungendo KOH/NaOH a campioni acidi e HCl a soluzioni alcaline.

Procedura operativa

Lunghezza d'onda: 340 nm, Hg 334 nm, Hg 365 nm

Cammino ottico: 1 cm

Temperatura: 20 – 25 °C / 37 °C

Misura: contro aria o acqua

Campioni: 20 – 1500 mg/l

	Bianco reagente (BR)	Campioni
Campione / Standard	-	100 µl
Acqua distillata	100 µl	-
Reagente 1	2000 µl	2000 µl
Mescolare, incubare 1 min a 37 °C o 3 min a 20 - 25 °C. Leggere l'assorbanza A1, poi aggiungere:		
Reagente 2	500 µl	500 µl
Mescolare, attendere la fine della reazione (circa 10 min a 37°C o 15 min a 20 - 25°C). Leggere l'assorbanza A2, poi aggiungere:		
Reagente 3	500 µl	500 µl
Mescolare, attendere la fine della reazione (circa 10 min a 37°C o 15 min a 20 - 25°C). Leggere l'assorbanza A3.		

Il bianco reattivo deve essere misurato una volta ad ogni serie, e sottratto ad ogni campione nel calcolo dei risultati.

Calcolo dei risultati

D-Glucosio

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

df (fattore di diluizione) = fattore di diluizione della densità ottica

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

$c = (V \times MW \times \Delta A) / (\epsilon \times d \times v \times 1000)$ [in g/l di D-Glucosio] con:

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

Ne risulta per una determinazione a 340 nm ($\epsilon = 6,3 \text{ l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$):

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

D-Fruuttosio

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

df (fattore di diluizione) = fattore di diluizione della densità ottica

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

$c = (V \times MW \times \Delta A) / (\epsilon \times d \times v \times 1000)$ [in g/l di D-Fruuttosio] con:

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

Ne risulta per una determinazione a 340 nm ($\epsilon = 6,3 \text{ l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$):

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

Somma di D-Glucosio e D-Fruuttosio senza differenziazione

Aggiungere reagente 2 e reagente 3 immediatamente uno dopo l'altro, ed incubare una sola volta.

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

df (fattore di diluizione) = fattore di diluizione della densità ottica

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

$c = (V \times MW \times \Delta A) / (\epsilon \times d \times v \times 1000)$ [g/l di D-Glucosio/D-Fruuttosio]

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

Ne risulta per una determinazione a 340 nm ($\epsilon = 6,3 \text{ l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$):

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

Campioni solidi

Contenuto [g/100 g] = $\frac{C_{\text{D-Glucosio/D-Fruuttosio}} [\text{g/l}]}{\text{Peso campione} [\text{g/l}]} \times 100$

Performance del test

Specificità

Il test è specifico per il D-Glucosio e D-Fruuttosio. Nessuna interferenza è stata osservata per il galattosio, lattosio, maltosio, mannitolo, sorbitolo e saccarosio. Il mannosio non mostra interferenze fino a 5 g/l, ma comporta recuperi troppo deboli a più alte concentrazioni. Se il rapporto D-glucosio / D-fruttosio è superiore a 10:1, la precisione del test per il D-fruttosio diminuisce.

Intervallo di misurazione

Il test misura la concentrazione in D-Glucosio / D-Fruuttosio da 20 a 1500 mg/l (totale). Quando i valori superano questo range di misura, i campioni devono essere diluiti con acqua distillata tra 100 e 1500 mg/l. Moltiplicare il risultato ottenuto per il fattore di diluizione.

Sensibilità

Il limite inferiore di rivelazione (Ld) ed il limite di quantificazione (Lq) sono stati determinati secondo la norma DIN 32645:2008 - 11:

- Ld = 4,0 mg/l

- Lq = 10 mg/l

Automazione

Applicazioni per sistemi automatici sono disponibili su richiesta.

Dichiarazione liberatoria

I dati corrispondono al nostro attuale stato di tecnologia e forniscono informazioni sui nostri prodotti e sul loro uso.

R-Biopharm non fornisce alcuna garanzia, esplicita o implicita, oltre a quella relativa alla qualità standard dei materiali di cui sono costituiti i suoi prodotti. Nel caso tali materiali risultassero difettosi, R-Biopharm si impegna a fornire prodotti sostitutivi. Non esiste garanzia di commerciabilità o di idoneità del prodotto per uno scopo particolare. R-Biopharm non è da ritenersi responsabile per danni, ivi compresi danni speciali o indiretti, o spese derivanti direttamente o indirettamente dall'utilizzo del prodotto.