COD 12800 120 mL
Sólo para uso in vitro en el laboratorio

D-GLUCOSE/D-FRUCTOSE

BioSystems

D-GLUCOSA/D-FRUCTOSA

HEXOQUINASA / FOSFOGLUCOSA ISOMERASA

USO PREVISTO

Reactivo para la medición de D-glucosa y D-fructosa en diversos tipos de muestra.

PRINCIPIO DEL MÉTODO

La D-fructosa y la D-glucosa presentes en la muestra generan, mediante la reacción descrita, NADPH que puede ser medido por espectrofotometría. La configuración de estos reactivos permite la determinación de D-glucosa/D-fructosa si se adiciona la enzima PGI o de D-glucosa si no se adiciona.

$$\text{D-fructosa} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{HK}} \text{Fructosa-6-fosfato} + \text{ADP}$$

$$\text{D-glucosa} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{HK}} \text{Glucosa-6-fosfato} + \text{ADP}$$

$$\text{Fructosa-6-fosfato} \xrightarrow{\text{PGI}} \text{Glucosa-6-fosfato}$$

$$\text{Glucosa-6-fosfato} + \text{NADP}^+ \xrightarrow{\text{G6P-DH}} \text{Gluconato-6-fosfato} + \text{NADPH} + \text{H}^+$$

CONTENIDO Y COMPOSICIÓN

A1. Reactivo. 2 x 40 mL. Tampón 70 mmol/L, Hexoquinasa >15 U/mL, NADP >1.5 mM, conservantes, pH 6,9.

A2. Reactivo. 2 x 10 mL. Tampón 70 mmol/L, fosfoglucosa isomerasa >50 U/mL, conservantes, pH 6,9.

B. Reactivo. 2 x 10 mL. Tampón 150 mmol/L, ATP >15 mmol/L, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa >10 U/mL, conservantes, pH 8,9.

S. Patrón multiazúcar: 1 x 5 mL. Los valores de concentración asignados para cada componente y su trazabilidad se muestran en las tablas adjuntas.

ATENCIÓN: H317: Puede provocar una reacción alérgica en la piel. P302+P352: EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con agua y jabón abundantes. P333+P313: En caso de irritación o erupción cutánea: Consultar a un médico.

CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

Conservar a 2-8ºC.

Los componentes son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del kit, siempre que se conserven bien cerrados y se evite la contaminación durante su uso.

Indicaciones de deterioro: Absorbancia del blanco superior al límite indicado en "Parámetros de la prueba".

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Ejerza las precauciones habituales requeridas para manipular todos los reactivos de laboratorio. Las fichas de seguridad están disponibles para el usuario bajo petición. La eliminación de todos los residuos debe ser conforme a las normativas locales. Cualquier incidente grave que pueda ocurrir en relación al dispositivo debe ser comunicado a BioSystems S.A.

EQUIPO ADICIONAL

Analizador, espectrofotómetro o fotómetro con cubeta termostatizable a 37ºC para lecturas a 340 nm.

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Para la determinación de D-glucosa/D-fructosa sin diferenciación: preparar un Reactivo A (RA) vaciando el contenido del Reactivo A2 en la botella del Reactivo A1. Agitar suavemente. Si se desea preparar otros volúmenes, mezclar en la proporción: 4 mL de Reactivo A1 + 1 mL de Reactivo A2. Estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, siempre que se conserve bien cerrado y se evite la contaminación durante su uso. El Reactivo B está listo para su uso.

Para la determinación de D-glucosa: los reactivos están listos para su uso.

Patrón ST1: listo para su uso.

Patrón ST2: diluir ¼ con agua destilada (1,00 g/L D-glucosa + D-fructosa / 0,75 g/L D-glucosa).

PROCEDIMIENTO

Procedimiento manual (Notas 1, 2, 3 y 4)

1. Precalentar los reactivos y el fotómetro a 37ºC.
2. Pipetear en una cubeta:

	D-glucosa/D-fructosa		D-glucosa	
	Blanco de reactivo (RB)	Patrón / Muestra	Blanco de reactivo (RB)	Patrón / Muestra
Patrón / Muestra (ST1/ST2)	-	10 µL/32 µL	-	10 µL/32 µL
Agua destilada (ST1/ST2)	10 µL/32 µL	-	10 µL/32 µL	-
Reactivo A (A1+A2)	800 µL	800 µL	-	-
Reactivo A1	-	-	800 µL	800 µL

3. Mezclar e incubar durante 1 minuto a temperatura ambiente (16-25ºC) o a 37°C. Leer la absorbancia (A1) a 340 nm.
4. Pipetear en una cubeta:

Reactivo B	160 µL	160 µL	200 µL	200 µL

5. Mezclar e incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente (16-25ºC) o 10 minutos a 37ºC. Leer la absorbancia (A2) del blanco de reactivo, del patrón y de la muestra a 340 nm. El color es estable durante al menos 30 minutos.
6. Calcular la concentración en la muestra (C) usando las siguientes fórmulas:

$$\frac{(A2 - 0{,}84 \times A1)_{Muestra} - (A2 - 0{,}84 \times A1)_{RB}}{(A2 - 0{,}84 \times A1)_{Patrón} - (A2 - 0{,}84 \times A1)_{RB}} \times C_{Patrón\ (D\text{-}gluc/D\text{-}fruc)}\ [g/L] = C_{Muestra\ (D\text{-}gluc/D\text{-}fruc)}\ [g/L]$$

$$\frac{(A2 - 0{,}80 \times A1)_{Muestra} - (A2 - 0{,}80 \times A1)_{RB}}{(A2 - 0{,}80 \times A1)_{Patrón} - (A2 - 0{,}80 \times A1)_{RB}} \times C_{Patrón\ (D\text{-}glucosa)}\ [g/L] = C_{Muestra\ (D\text{-}glucosa)}\ [g/L]$$

CALIBRACIÓN

Debe realizarse un blanco de reactivo cada día y calibrar después de un cambio de lote de reactivo o cuando lo requieran los procedimientos de control de calidad.

CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio debe establecer su propio programa de control de calidad interno, así como procedimientos de corrección en el caso de que los resultados de los controles no se encuentren entre los límites de aceptación.

CARACTERÍSTICAS METROLÓGICAS[1-2]

Las características metrológicas descritas se han obtenido utilizando un analizador Y15. Los detalles sobre los datos de evaluación están disponibles bajo solicitud.

- Límite de detección: D-glucosa: 0,03 g/L; D-glucosa/D-fructosa: 0,02 g/L (ST1) / D-glucosa: 0,003 g/L; D-glucosa/D-fructosa: 0,002 g/L (ST2).
- Límite de linealidad: D-glucosa: 8,00 g/L; D-glucosa/D-fructosa: 8,00 g/L (ST1) / D-glucosa: 2,40 g/L; D-glucosa/D-fructosa: 2,40 g/L (ST2).
- Precisión:

Concentración media de D-glucosa (ST1)	Repetibilidad (CV)	Imprecisión total (CV)
0,51 g/L	2,1 %	3,4 %
2,02 g/L	1,0 %	2,8 %

Concentración media D-glucosa/D-fructosa (ST1)	Repetibilidad (CV)	Imprecisión total (CV)
1,04 g/L	1,4 %	2,4 %
4,10 g/L	0,7 %	2,8 %

Concentración media de D-glucosa (ST2)	Repetibilidad (CV)	Imprecisión total (CV)
0,22 g/L	0,5 %	1,7 %
0,43 g/L	0,4 %	1,5 %

Concentración media D-glucosa/D-fructosa (ST2)	Repetibilidad (CV)	Imprecisión total (CV)
0,23 g/L	0,4 %	0,6 %
0,45 g/L	0,4 %	0,7 %

- Veracidad: Los resultados obtenidos con estos reactivos no muestran diferencias sistemáticas significativas al ser comparados con un procedimiento de referencia. Los detalles del estudio comparativo están disponibles bajo solicitud.

NOTAS

1. Los volúmenes propuestos son para el uso de una cuveta semi-micro. Puede utilizarse otros volúmenes si se mantiene la relación entre los reactivos y la muestra.
2. Aunque se recomienda la calibración de cada serie de medidas usando el patrón, también puede calcularse la concentración en la muestra (C) usando el siguiente factor:

   $[(A2 - 0{,}84 \times A1)_{Muestra} - (A2 - 0{,}84 \times A1)_{RB}] \times F = C_{Muestra\ (D\text{-}gluc/D\text{-}fruc)}\ [g/L]$ (F = 2,77 (ST1) / 0,89 (ST2))

   $[(A2 - 0{,}80 \times A1)_{Muestra} - (A2 - 0{,}80 \times A1)_{RB}] \times F = C_{Muestra\ (D\text{-}glucosa)}\ [g/L]$ (F = 2,89 (ST1) / 0,92 (ST2))
3. El procedimiento y los parámetros de la prueba pueden variar en función del tipo de muestra (Sample Type: ST).
4. Al analizar muestras sólidas y semisólidas que se pesan para su preparación, el contenido (g/100 g) (CT) se calcula a partir de la cantidad de muestra pesada (W), el volumen en el que se prepara muestra pesada (V), la concentración obtenida en la muestra (C) y el factor de dilución (df) si es necesario, según se describe a continuación:

$$\frac{C_{Muestra}\ (g/L) \times V\ (L)}{W_{Muestra}\ (g)} \times 100 \times df = CT_{Muestra}\ [g/100\ g]$$

BIBLIOGRAFÍA

1. Association of Official Analytical Chemists (AOAC): Guidelines for standard method performance requirements, 2016.
2. International organization of vine and wine (OIV), Compendium of international methods of wine and must analysis Vol. 1 & 2, 2016.
3. International Fruit and Vegetable Juice Association. Methods of analysis (https://ifu-fruitjuice.com/).
4. Zoecklein BW, Fugelsang KC, Gump BH, Nury FS, Wine analysis and production. Van Nostrand Reinhold; 1 edition (December 31, 1990).

5. EBC Analysis Comitee. Analytica-EBC. Verlag Hans Carl; 7th edition (2010).
6. A.O.A.C 17th Ed., 2000 Official method 920.180 Honey (liquid, strained or comb), preparation of test sample.

MUESTRAS

Procedimientos de preparación

- Filtrar o centrifugar las soluciones turbias.
- Desgasificar las muestras con dióxido de carbono en un baño de ultrasonidos o agitar la muestra en un vaso de precipitados durante aproximadamente 1 minuto.
- Decolorar las muestras muy coloreadas con polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) (e.g. 1 g PVPP/100 mL muestra), agitar durante 1 minuto y filtrar o centrifugar para eliminar el PVPP.
- Muestras con concentraciones superiores al límite de linealidad especificado deben ser diluidas adecuadamente con agua destilada. Multiplicar la concentración obtenida por el factor de dilución.
- Triturar y/o homogenizar muestras sólidas.
- Clarificar y/o desproteinizar con reactivo Carrez (BioSystems ref. 12837) adicionando 5 mL de Carrez-I y 5 mL de Carrez-II al extracto líquido de la muestra en un matraz aforado de 100 mL. Ajustar a pH 7.5 - 8.5 con hidróxido de sodio. Mezclar después de cada adición, adicionar agua destilada hasta la marca del matraz y filtrar.
- Extraer las muestras que contengan grasa con agua caliente a una temperatura por encima del punto de fusión de la grasa. Dejar reposar a temperatura ambiente y llenar el matraz hasta la marca con agua destilada. Almacenar en hielo o en el refrigerador durante 15-30 minutos y luego filtrar. Utilice el sobrenadante transparente o ligeramente opalescente para el ensayo. También es posible clarificar con reactivo Carrez.

Zumos de frutas y bebidas similares[3] (ST1): Filtrar, clarificar, decolorar y/o diluir el zumo si es necesario como se describe en "Procedimientos de Preparación".

La dilución recomendada de la muestra para D-glucosa es 1/10 y para D-glucosa/D-fructosa es 1/20 aunque se puede modificar en función de las necesidades del usuario. Se deberá incluir el factor de dilución (df) de la fórmula de cálculo, en caso de realizar el procedimiento manual, o del campo "Factor predilución", en caso de realizar el procedimiento automatizado. La modificación de la predilución afectará las características metrológicas.

Vino tinto y blanco[2,4] (ST1): Filtrar, clarificar, decolorar y/o diluir el vino si es necesario como se describe en "Procedimientos de Preparación".

Se recomienda utilizar el Vino Control (Tinto) (BioSystems ref. 12822) y Vino Control (Blanco) (BioSystems ref. 12821) para verificar el funcionamiento del procedimiento de medida.

Cerveza[5] (ST1): Desgasificar como se describe en "Procedimientos de Preparación".

Conservas y otros productos derivados de frutas y verduras (ST1): Pesar con precisión aproximadamente 0,5 g de la muestra homogenizada en un matraz aforado de 100 mL y llenarlo hasta la marca con agua destilada, mezclar y filtrar. Diluir la muestra si es necesario.

Postres y helados (ST1): Pesar con precisión aproximadamente 3 g de muestra en un matraz aforado de 100 mL. Añadir 60 mL de agua e incubar durante 15 minutos a aproximadamente 70°C agitando de vez en cuando. Dejar reposar a temperatura ambiente, llenar hasta la marca con agua, mezclar y filtrar. Clarificar y/o diluir la muestra si es necesario como se describe en "Procedimientos de Preparación".

Alimentos sólidos (ST1): Triturar y/o homogenizar las muestras sólidas. Pesar una muestra representativa, extraer con agua (calentar a 60°C, si es necesario) y filtrar. Clarificar y/o diluir la muestra si es necesario como se describe en "Procedimientos de Preparación".

Miel[6] (ST1): Para muestras viscosas o cristalizadas, transferir de 5 a 10 g de miel a un vaso de precipitados y calentar durante 5 minutos a aproximadamente 60°C (no es necesario calentar la miel líquida), agitando con la espátula. Dejar enfriar. Pesar con precisión 3 g de la muestra líquida y disolver con 60 mL de agua en un matraz aforado de 100 mL. A continuación, llenar hasta la marca y mezclar. Preparar una dilución 1/10 de la solución de miel al 3%.

Muestras de fermentación y medios de cultivo celular (ST1): Centrifugar la muestra a 5000 g durante 5 minutos, filtrar el sobrenadante y utilizar el filtrado en el ensayo, diluido si es necesario. Se recomienda inactivar las reacciones enzimáticas poniendo la muestra en un baño de agua a 80ºC durante 15 minutos. También es posible desproteinizar la muestra como se describe en "Procedimientos de Preparación".

Patatas crudas (ST2): Pesar con precisión aproximadamente 15 g de muestra homogeneizada y mezclarlos con 30 mL de agua destilada. Triturar hasta que la muestra esté suspendida de manera homogénea. Filtrar y enrasar a 100 mL en un matraz aforado con agua destilada.

Otras aplicaciones: El método también se puede usar con otros tipos de muestras. Póngase en contacto con su proveedor para obtener más información.

PARÁMETROS DE LA PRUEBA (Notas 3 y 4)

Estos reactivos pueden utilizarse también en otros analizadores automáticos. Solicite información a su distribuidor.

BioSystems Y15

Reactivo 1: Utilizar el Reactivo A (A1+ A2) para el análisis de D-glucosa/D-fructosa o Reactivo A1 para el análisis de D-glucosa.

Reactivo 2: Utilizar el Reactivo B.

GENERAL		
Técnica	**GLUCOSE-FRUCTOSE**	**GLUCOSE**
Modo de análisis	diferencial bireactivo	diferencial bireactivo
Tipo de muestra	ST1 / ST2	ST1 / ST2
Unidades	g/L	g/L
Tipo de reacción	creciente	creciente
Decimales	2	2
PROCEDIMIENTO		
Lectura	monocromático	monocromático
Muestra	3 / 10	3 / 10
Reactivo 1	250	240
Reactivo 2	50	60
Lavado	1,2	1,2
Factor predilución	-	-
Filtro Principal	340	340
Filtro Referencia	-	-
Lectura 1	72 s	72 s
Lectura 2	600 s	600 s
Reactivo 2	96 s	96 s
CALIBRACIÓN		
Tipo de calibración	múltiple / específico	múltiple / específico
Curva de calibración	-	-
OPCIONES		
Límite absorbancia blanco	0,300	0,300
Límite blanco cinético	-	-
Límite de linealidad	8,00 / 2,40	8,00 / 2,40

BioSystems Y25

Reactivo 1: Utilizar el Reactivo A (A1+ A2) para el análisis de D-glucosa/D-fructosa o Reactivo A1 para el análisis de D-glucosa.

Reactivo 2: Utilizar el Reactivo B.

GENERAL		
Técnica	**GLUCOSE-FRUCTOSE**	**GLUCOSE**
Modo de análisis	diferencial bireactivo	diferencial bireactivo
Tipo de muestra	ST1 / ST2	ST1 / ST2
Unidades	g/L	g/L
Tipo de reacción	creciente	creciente
Decimales	2	2
PROCEDIMIENTO		
Lectura	monocromático	monocromático
Muestra	3 / 10	3 / 10
Reactivo 1	250	240
Reactivo 2	50	60
Lavado	1.2	1.2
Factor predilución	-	-
Filtro Principal	340	340
Filtro Referencia	-	-
Lectura 1	75 s	75 s
Lectura 2	600 s	600 s
Reactivo 2	90 s	90 s
CALIBRACIÓN		
Tipo de calibración	múltiple / específico	múltiple / específico
Curva de calibración	-	-
OPCIONES		
Límite absorbancia blanco	0,300	0,300
Límite blanco cinético	-	-
Límite de linealidad	8,00 / 2,40	8,00 / 2,40

BioSystems S.A. Costa Brava, 30. 08030 Barcelona (Spain)
www.biosystems.global