

D-Frutose/D-Glucose, método UV

Número de Catálogo	Apresentação
AK00041	110 testes (manual) / 1100 testes (microplaca)

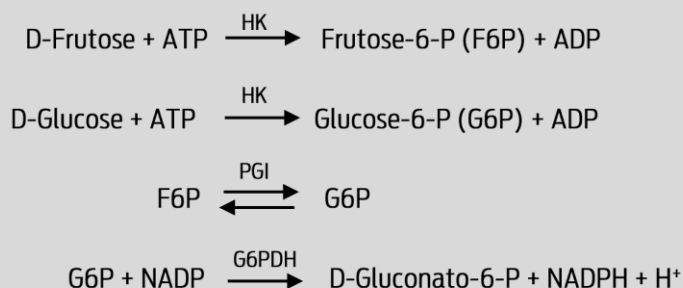
Aplicação

Este kit é indicado para a determinação simultânea de D-frutose e de D-glucose em alimentos, produtos farmacêuticos, produtos cosméticos e amostras biológicas. Com este kit, a análise destes açúcares pode ser efetuada individualmente. O seu fundamento baseia-se num método enzimático, rápido, simples e específico para os analitos em causa. O kit pode também ser utilizado para a determinação dos açúcares redutores totais (contacte a NZYtech caso necessite de informação adicional).

Introdução

A D-frutose e a D-glucose encontram-se amplamente difundidas nas plantas. Nos alimentos, estes açúcares ocorrem principalmente no mel, vinho e cerveja, bem como em alimentos sólidos tais como o pão e produtos de pastelaria. Na indústria vinícola, a concentração de D-frutose e D-glucose (açúcares redutores totais) é um indicador importante de qualidade, uma vez que representa a quantidade de açúcares disponível para fermentação.

Princípio



A quantidade de NADPH resultante da ação combinada da hexocinase (HK), fosfoglucose isomerase (PGI) e glucose-6-P desidrogenase (G6PDH), determinada a 340 nm, é estequiométrica com a quantidade de D-frutose e D-glucose no volume de amostra.

Especificidade

Este método é específico para a determinação da D-frutose e da D-glucose.

Sensibilidade e limite de deteção

A sensibilidade do ensaio é baseada em 0,010 AU num volume de amostra de 2,00 mL. Este valor corresponde a uma concentração de D-frutose e D-glucose de 0,33 mg/L na amostra, quando medido a 340 nm. O limite de deteção de 0,66 mg/L resulta de uma diferença de absorvência de 0,020 (340 nm) para um volume de amostra máximo de 2,00 mL.

Linearidade e precisão

A determinação apresenta linearidade entre 4 e 80 µg de D-frutose e D-glucose por ensaio (v = 2,00 mL). Num duplicado da mesma amostra, uma diferença de 0,005 a 0,010 unidades de absorvência pode ocorrer, o que corresponde a uma concentração aproximada de D-frutose e D-glucose entre 0,17 e 0,33 mg/L (v = 2,00 mL). O coeficiente de variação é de aproximadamente 1 a 2%.

Composição do kit

Solução 1. Tampão de imidazol (25 mL, 2 M, pH 7,6) com MgCl₂ (100 mM) e azida de sódio (0,02% w/v) como conservante. Armazenar entre 2 °C e 8 °C.

Solução 2. NADP⁺ (250 mg) com ATP (500 mg) e PVP (120 mg). Armazenar entre 2 °C e 8 °C (armazenamento prolongado: -30 °C a -15 °C)

Dissolver em 12 mL de água destilada, dividir em aliquotas de volume adequado e armazenar em tubos PP, de -30 °C a -15 °C, entre utilizações; manter frio durante a utilização.

Suspensão 3. Hexocinase (EC 2.7.1.1) e glucose-6-P desidrogenase (EC 1.1.1.49) em 3,2 M de sulfato de amónio (2,25 mL). Armazenar entre 2 °C e 8 °C. Agitar o frasco antes de usar.

Suspensão 4. Fosfoglucoase isomerase (EC 5.3.1.9) em 3,2 M sulfato de amónio (2,25 mL). Armazenar entre 2 °C e 8 °C. Agitar o frasco antes de usar.

Solução 5. Solução padrão de D-frutose/D-glucose (5 mL, 0,20 mg/mL de cada açúcar). Esta solução padrão pode ser utilizada quando existirem dúvidas sobre a exatidão do método. Armazenar entre 2 °C e 8 °C.

Protocolo (análise a ponto final)

Comprimento de onda: 340 nm

Cuvete: 1 cm meio ótico (vidro ou plástico)

Temperatura: ~25 °C

Volume final: 2,32 mL (D-glucose); 2,34 mL (D-frutose)

Amostra: 4-80 µg de D-glucose e D-frutose por cuvete (num volume de 0,10-2,00 mL)

Ler as absorvências contra o ar (sem cuvete no percurso ótico) ou contra a água

PIPETAR PARA CUVETES (mL)	BRANCO	AMOSTRA
Água destilada (~25 °C)	2,10	2,00
Amostra	-	0,10
Solução 1 (tampão imidazole)	0,10	0,10
Solução 2 (NADP ⁺ +ATP)	0,10	0,10
Misturar, medir a absorvência das soluções acima (A1) após aprox. 3 min e iniciar a reação através da adição de		
Suspensão 3 (HK+G6PDH)	0,02	0,02
Misturar*, medir a absorvência das soluções acima (A2) no final da reação (aprox. 5 min)		
Suspensão 4 (PGI)	0,02	0,02
Misturar*, medir a absorvência das soluções acima (A3) no final da reação (aprox. 8-10 min)		

Homogeneizar com uma espátula plástica ou por inversão cuidadosa após vedar a cuvete com a tampa ou Parafilm®.

* Se necessário, continuar a ler as absorvências em intervalos de 2 min até que a reação termine.

Cálculos

Determinar as diferenças de absorvência para os ensaios do branco e da amostra (A2-A1). Subtrair a diferença de absorvência do branco à diferença de absorvência da amostra de modo a obter $\Delta A_{D\text{-glucose}}$. Determinar a diferença de absorvências para os ensaios do branco e da amostra (A3-A2). Subtrair a diferença de absorvência do branco à diferença de absorvência da amostra de modo a obter $\Delta A_{D\text{-frutose}}$. As concentrações de D-frutose (g/L) e D-glucose (g/L), baseadas no ϵ do NADH a 340 nm ($6300 \text{ L}\times\text{mol}^{-1}\times\text{cm}^{-1}$), são calculadas do seguinte modo:

$$C(\text{D-Frutose}) = 0.6692 \times \Delta A_{D\text{-Frutose}} \text{ g/L}$$

$$C(\text{D-Glucose}) = 0.6634 \times \Delta A_{D\text{-Glucose}} \text{ g/L}$$

No caso da amostra ter sido diluída ou de se ter usado um volume de amostra diferente, o resultado final deve ser multiplicado pelo correspondente fator de diluição/concentração.

Procedimentos alternativos (micro-volumes)

Apesar do kit ter sido desenvolvido para uso em cuvete, o mesmo pode ser facilmente adaptado para o uso em microplacas de 96 poços ou em autoanalisadores. Basicamente, os volumes de ensaio do presente protocolo (formato cuvete) devem ser reduzidos cerca de 10 vezes para adaptação ao formato microplaca ou autoanalisador. No entanto, na utilização destes formatos de micro-volume deve ter-se em atenção que a espessura do meio ótico é geralmente inferior à espessura do meio ótico de referência (1 cm). Deste modo, para calcular o teor de analito nas amostras deve seguir uma das três estratégias possíveis descritas em "Alternative Procedures", disponível em www.nzytech.com.

Interferências

Se a conversão de D-frutose e D-glucose se completar dentro do período especificado para o ensaio (aprox. 10 min), não é de admitir a existência de interferências. Caso se suspeite da presença de substâncias interferentes, deve-se usar um padrão interno na análise. Neste caso, deve obter-se uma recuperação quantitativa do padrão interno. A identificação de perdas no processamento da amostra pode ser identificada através de ensaios de recuperação, baseados na adição de D-frutose e D-glucose à amostra nos passos iniciais da extração.

Informação geral sobre a preparação das amostras

A quantidade total de D-frutose e D-glucose na cuvete deve situar-se entre 4 e 80 µg. Deste modo, se se usar um volume de amostra de 0,10 mL, a amostra deve ser diluída para concentrações de açúcar entre 40 e 800 mg/L. No entanto, o volume de amostra pode variar entre 0,10 e 2,00 mL, através da substituição da água (analitos variam entre 2 e 800 mg/L).

Para realizar este ensaio, usar amostras líquidas transparentes e praticamente neutras, diretamente ou após diluição das mesmas; filtrar as soluções turvas; desgaseificar as amostras que contenham dióxido de carbono (e.g. filtração); ajustar o pH das amostras ácidas a pH 8 através da adição de solução de hidróxido de sódio ou potássio; ajustar amostras ácidas e ligeiramente coradas a pH 8 e incubar aproximadamente 15 minutos; medir as amostras "coradas" (se necessário ajustadas a pH 8) contra o ensaio em branco; tratar as amostras "fortemente coradas" que forem usadas não diluídas ou com um volume de amostra elevado com PVPP; esmagar ou homogeneizar as amostras sólidas ou semi-sólidas, e extrair com água ou dissolvê-las; extrair as amostras com teores elevados de gordura com água quente.

Exemplos de preparação das amostras

Determinação da D-frutose e D-glucose nos vinhos tinto e branco

A determinação da concentração de D-frutose e D-glucose nos vinhos tinto e branco pode ser geralmente realizada sem qualquer tratamento prévio da amostra, com exceção de uma eventual diluição da mesma. Se um vinho tinto necessitar de descoloração, proceder como descrito acima. Uma diluição de 1:10 e um volume de amostra de 0,1 mL são geralmente satisfatórios.

Determinação da D-glucose e D-frutose no mel

Transferir aprox. 5-10 g do material viscoso ou cristalino para um copo graduado, após agitação prolongada da amostra de mel com uma espátula (não há necessidade de agitar o mel líquido), e aquecer durante 5 min a aprox. 60 °C. Após arrefecimento, retire uma alíquota com aprox. 1 g da amostra líquida pesada com precisão, para um balão volumétrico de 100 ml. Dissolver inicialmente com uma pequena quantidade de água destilada e depois diluir até à marca do balão e agitar. Uma diluição de 1:10 e um volume de amostra de 0,1 mL são geralmente satisfatórios.

Determinação da D-glucose e D-frutose em alimentos sólidos

As amostras vegetais devem ser moídas de modo a passarem um crivo de 0,5 mm. Homogeneizar os géneros alimentícios sólidos, tais como o pão e os produtos de pastelaria, num homogeneizador adequado para o efeito. Uma amostra representativa deve ser pesada e extraída com água (aquecida a 60 °C, se necessário). Transferir quantitativamente para um balão volumétrico e diluir. Misturar, filtrar e usar a solução limpa na diluição adequada para o ensaio.

Referências

Kunst, A., Draeger, B. & Ziegenhorn, J. (1988). D-Glucose. In: Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H. U., ed.), 3rd ed., Vol.VI, pp. 163-172, VCH Publishers (UK) Ltd., Cambridge, UK.

Recomendações

Este método é recomendado/aprovado por:

- Regulamento da Comissão Europeia (análise de vinho);
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC) (análise de vinho);
- Padrões Europeus, Holandês, Francês, Alemão e Russo (EN, NEN, NF, DIN, GOST);
- International Wine Office (OIV), International Federation of Fruit Juice Producers (IFU), Association of the Industry of Juices and Nectars from Fruits and Vegetables of the European Economic Community (A.I.J.N.), e Mitteleuropäische Brautechnische Analysenkommission (MEBAK) (Central European Commission for Brewing Technology).

Contacte info@nzytech.com para obter qualquer informação adicional sobre este kit, incluindo outras aplicações específicas.

For life science research only. Not for use in diagnostic procedures.