

Megazyme

D-FRUCTOSA Y D-GLUCOSA

PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

K-FRUGL 02/06

(110 Ensayos por Kit)

Este folleto se puede conseguir en
www.megazyme.com en los siguientes idiomas:
Inglés-Francés-Alemán-Italiano-Portugués

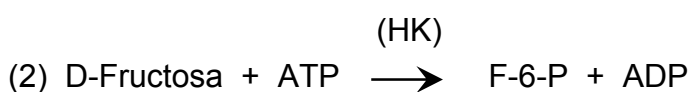
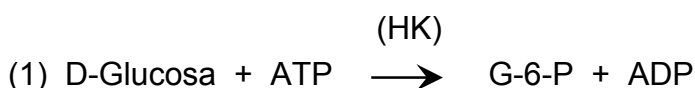


INTRODUCTION:

La D-glucosa y D-fructosa se encuentran en casi todos los productos de plantas. En los alimentos, están presentes en cantidades significativas en la miel, vino y cerveza, así como en una variedad de alimentos sólidos como el pan y los pasteles, chocolate y dulces. En la industria del vino, el contenido de D-fructosa y D-glucosa, en general conocidos como azúcares reductores, es uno de los parámetros más importantes para medir la calidad y se controla en cada una de las fases del proceso de elaboración del vino. Estos azúcares se pueden medir bien de forma independiente (véase página 5, "A"), o de forma simultánea si se considera más adecuado (véase página 8 "B"). El procedimiento de las aplicaciones autoanalizadoras se describen en la página 11 ("C").

PRINCIPIO:

La D-glucosa y la D-fructosa se fosforilatan mediante el enzima hexokinasa (HK) y adenosina-5'-trifosfato (ATP) a glucosa-6-fosfato (G-6-P) y fructosa-6-fosfato (F-6-P) con formaciones simultáneas de adenosina-5'-difosfato (ADP) (1), (2).

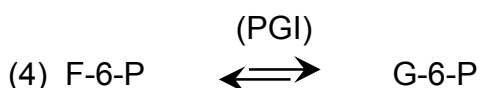


En presencia del enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6P-DH), G-6-P se oxida por el nicotinamida-adenina dinucleotido fosfato (NADP^+) en gluconato-6-fosfato con la formación de reducido nicotinamida-adenina dinucleotido fosfato (NADPH) (3).



La cantidad de NADPH que se forma en esta reacción es estequiométrica con la cantidad de glucosa D. Lo que se mide es el NADPH por el aumento de absorción a 340 nm.

Al completar la reacción (3), F-6-P se convierte en G-6-P by fosfoglucosa isomerasa (PGI) (4).



El G-6-P formado reacciona a su vez con NADP^+ formando gluconato-6-fosfato y NADPH , dando como resultado otro aumento en absorción que es estequiométrico con la cantidad de D-fructosa.

ESPECIFICIDAD, SENSIBILIDAD, LINEALIDAD Y PRECISIÓN:

Los ensayos son específicos para la D-glucosa y la D-fructosa.

El diferencial de absorción menor del ensayo es de 0,010 unidades. Esto corresponde a 0,332 mg/L de solución de muestra a un volumen máximo de muestra de 2 mL. El límite de detección es de 0,663 mg/L, que se deriva de un diferencial de absorción de 0,020 con un volumen máximo de muestra de 2 mL.

El ensayo es lineal a lo largo del intervalo de 4 a 80 μg de D-glucosa o D-fructosa por ensayo. En determinaciones dobles utilizando una solución de muestra, se puede producir una diferencia de absorción de 0,005 a 0,010. Con un volumen de muestra de 2 mL, esto corresponde a una concentración de glucosa D de aproximadamente entre 0,332 mg/L de solución de muestra. Si la muestra se diluye durante su preparación, el resultado se multiplica por el factor de dilución, F. Si en la preparación de la muestra, la muestra se pesa, por ejemplo, 10 g/L, cabe esperar una diferencia entre 0,02 a 0,05 g/100 g.

INTERFERENCIA:

Si la conversión de D-glucosa o D-fructosa se ha completado en el tiempo especificado en el ensayo, en general se puede concluir que no se ha producido ninguna interferencia. Sin embargo, se puede hacer otra comprobación añadiendo D-glucosa y/o D-fructosa (aprox. 25 μg en 0,05 mL) en la cubeta, cuando se complete la reacción. Se debería observar un aumento significativo de la absorción.

Las sustancias que interfieren en la muestra analizadas se pueden identificar incluyendo un estándar interno. Cabe esperar una recuperación cuantitativa de este estándar. Las pérdidas en la manipulación y extracción de la muestra se pueden identificar realizando experimentos de recuperación, es decir, añadiendo D-glucosa o D-fructosa a la muestra en las fases iniciales de la extracción.

SEGURIDAD:

En general, los reagentes utilizados en la determinación de la D-glucosa y D-fructosa no son materiales peligrosos según el Reglamento de Sustancias Peligrosas. Sin embargo, el concentrado tampón contiene azida de sodio 0,02 % (w/v) como conservante. Es necesario observar todas las medidas generales de seguridad que se aplican a todas las sustancias químicas.

KITS:

Megazyme dispone de kits idóneos para realizar 110 determinaciones. Los kits contienen el método completo de ensayo además de:

- Botella 1:** Tampón de imidazol (25 mL, 2 M, pH 7,6) mas cloruro magnésico (100 mM) y azida de sodio 0,02 % (w/v) como conservante.
Estable durante > 2 años a 4°C.
- Botella 2:** NADP⁺ (250 mg) mas ATP (500 mg) y PVP (120 mg).
Estable durante > 5 años a -20°C.
- Botella 3:** Hexokinasa (425 U/mL) mas suspensión glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (212 U/mL), 2,25 mL..
Estable durante > 2 años a 4°C.
- Botella 4:** Suspensión de fosfoglucosa isomerasa (2,25 mL, 1000 U/mL).
Estable durante > 2 años a 4°C.
- Botella 5:** Solución estándar de D-Glucosa mas D-fructosa (5 mL, 0,2 mg/mL de cada azúcar).
Estable durante > 2 años a 4°C.

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES/SUSPENSIONES DE REAGENTES:

1. Use el contenido de la botella 1 según se suministra.
Estable durante > 2 años a 4°C.
2. Diluya el contenido de la botella 2 en 12 mL de agua destilada. Divídala en partes alícuotas del tamaño adecuado y guárdelas en tubos de polipropileno a -20°C entre uso y uso y fresca mientras lo está usando. Una vez diluido, el reagente es estable durante > 2 años a -20°C.
- 3 & 4. Use el contenido de la botella 3 y 4 según se suministra. Antes de abrirla por primera vez, agite la botella para eliminar cualquier enzima que se pueda haber quedado en el tapón de goma. **Agite bien la botella para que se mezcle el contenido antes de utilizarla.**
Estable durante > 2 años a 4°C.
5. Use el contenido de la botella 5 según se suministra.
Estable durante > 2 años a 4°C.

NOTA: La solución estándar de D-glucosa y D-fructosa solo se utiliza en el ensayo cuando existe alguna duda sobre la precisión del espectrofotómetro que se está utilizando o cuando se sospecha que las sustancias que intervienen en la muestra están produciendo una inhibición. Las concentraciones de D-glucosa y D-fructosa se determinan directamente del coeficiente de extinción de NADPH (página 6).

EQUIPO (RECOMENDADO):

1. Matraces aforados (50 mL, 100 mL y 500 mL).
2. Cubetas de plástico desechables (paso de luz de 1 cm, 3 mL).
3. Micropipetas, p. ej. Gilson Pipetman[®] (20 μ L y 100 μ L).
4. Pipeta de desplazamiento positivo p.ej. Eppendorf Multipette[®]
 - con 5 mL de Combitip[®] (para administrar partes alícuotas de 0,1 mL de tampón de imidazola y solución NADP⁺/ATP).
 - con 25 mL de Combitip[®] (para administrar partes alícuotas de 2 mL de agua destilada).
5. Balanza de precisión.
6. Espectrofotómetro a 340 nm.
7. Agitador vibrador de tubos Vortex (p.ej. Agitador de tubos de prueba IKA[®] Yellowline TTS2).
8. Cronómetro.
9. Papeles filtro Whatman No.1 (9 cm).

A. FORMATO MANUAL; D-FRUCTOSA Y D-GLUCOSA:

- Longitud de onda:** 340 nm
Cubeta: paso de luz de 1 cm (vidrio o plástico)
Temperatura: ~ 25°C
Volumen final: 2,32 mL (D-glucosa)
2,34 mL (D-fructosa)
Solución de muestra: 4-80 µg de glucosa D-glucose mas D-fructosa por cubeta
(en 0,10-2 mL de volumen de muestra)
Medir contra corriente de aire (sin cubeta en el paso de luz) o contra agua

| Pipeta en cubetas | Muestra sin tratar | Muestra |
|--|--------------------|---------|
| agua destilada (~ 25°C) | 2,10 mL | 2,00 mL |
| muestra: | - | 0,10 mL |
| solución 1 (tampón de imidazol) | 0,10 mL | 0,10 mL |
| solución 2 (NADP ⁺ /ATP) | 0,10 mL | 0,10 mL |
| Mezcle*, lea la absorción de las soluciones (A ₁) transcurridos aproximadamente 3 min e inicie las reacciones añadiendo: | | |
| suspensión 3 (HK/G6P-DH) | 0,02 mL | 0,02 mL |
| Mezcle*, lea las absorciones de las soluciones (A ₂) al final de la reacción (aprox. 5 min). Si la reacción no se ha detenido transcurridos 5 min, continúe leyendo las absorciones a intervalos de 2 min hasta que no cambien durante 2 min**. A continuación añada: | | |
| suspensión 4 (PGI) | 0,02 mL | 0,02 mL |
| Mezcle*, lea las absorciones de las soluciones (A ₃) al final de la reacción (aprox. 8-10 min). | | |

* por ejemplo con una espátula de plástico o dándole la vuelta con cuidado después de tapar la cubeta con tapa o Parafilm[®].

** si la absorción continua aumentando, puede ser debido a los efectos de los compuestos de color o los enzimas en la muestra. Estas sustancias que interfieren en el proceso se pueden eliminar durante la preparación de la muestra.

CALCULO:

Calcule las diferencias de absorción (A_2-A_1) de la muestra sin tratar y la muestra. Reste la diferencia de absorción de la muestra sin tratar de la diferencia de absorción de la muestra, obteniendo con ello $\Delta A_{D\text{-glucosa}}$.

Calcule las diferencias de absorción (A_3-A_2) de la muestra sin tratar y la muestra. Reste la diferencia de absorción de la muestra sin tratar de la diferencia de absorción de la muestra, obteniendo con ello $\Delta A_{D\text{-fructosa}}$.

Los valores de $\Delta A_{D\text{-glucosa}}$ y $\Delta A_{D\text{-fructosa}}$ por regla general deberían ser de 0,100 unidades de absorción para conseguir resultados suficientemente precisos.

La concentración de D-glucosa y D-fructosa se puede calcular de la siguiente forma:

$$c = \frac{V \times MW}{\varepsilon \times d \times v} \times \Delta A \quad [\text{g/L}]$$

Donde:

V = volumen final [mL]

MW = peso molecular de D-glucosa o D-fructosa [g/mol]

ε = coeficiente de extinción de NADPH a 340 nm
= 6300 [$\text{l} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$]

d = paso de luz [cm]

v = volumen de muestra [mL]

Sigue para D-glucosa:

$$c = \frac{2,32 \times 180,16}{6300 \times 1,0 \times 0,10} \times \Delta A_{D\text{-glucosa}} \quad [\text{g/L}]$$

$$= 0,6634 \times \Delta A_{D\text{-glucosa}} \quad [\text{g/L}]$$

Sigue para D-fructosa:

$$c = \frac{2,34 \times 180,16}{6300 \times 1,0 \times 0,10} \times \Delta A_{D\text{-fructosa}} \quad [\text{g/L}]$$

$$= 0,6692 \times \Delta A_{D\text{-fructosa}} \quad [\text{g/L}]$$

Si la muestra se ha diluido durante la preparación, el resultado se debe multiplicar por el factor de dilución, F.

Cuando se analicen muestras sólidas o semisólidas que se pesan para preparar la muestra, el contenido (g/100 g) se calcula a partir de la cantidad pesada de la siguiente forma:

Contenido de D-glucosa

$$= \frac{C_{D\text{-glucosa}} [\text{g/L solución de muestra}]}{\text{peso}_{\text{muestra}} [\text{g/L solución de muestra}]} \times 100 \quad [\text{g/100 g}]$$

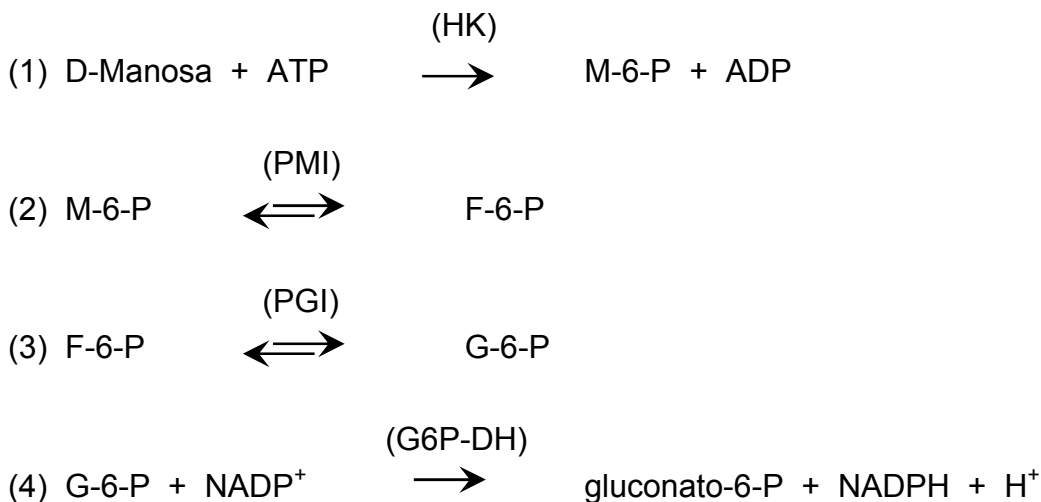
Contenido D-fructosa

$$= \frac{C_{D\text{-fructosa}} [\text{g/L solución de muestra}]}{\text{peso}_{\text{muestra}} [\text{g/L solución de muestra}]} \times 100 \quad [\text{g/100 g}]$$

NOTA: Estos cálculos se pueden simplificar utilizando la aplicación **Mega-Calc™** de Megazyme, que se puede descargar desde la página web donde aparece el producto (www.megazyme.com).

DETERMINACIÓN DE D-MANOSA:

La D-Manosa se puede determinar de la siguiente forma:



Dado que la fosfomanosa isomerasa (PMI) actúa lentamente en el tampón de imidazol (según se utiliza en el formato de ensayo descrito anteriormente) recomendamos utilizar el tampón TEA, según se describe en el folleto de Megazyme “Kit de ensayo de D-Manosa/ D-Fructosa/D-Glucosa” (K-MANGL a www.megazyme.com).

B. FORMATO MANUAL; TOTAL AZÚCARES REDUCTORES:

En la industria del vino la suma de D-glucosa más D-fructosa es un parámetro clave para determinar la calidad, ya que representa la cantidad de azúcar disponible en la levadura para convertir en etanol. En la gran mayoría de los casos no es necesario diferenciar entre estos monosacáridos, y se les cuantifica juntos utilizando un formato de ensayo más rápido y conveniente, como el siguiente:

Paso adicional de preparación:

Agite suavemente las botellas 3 y 4 para eliminar cualquier enzima que se hubiera quedado en el tapón de goma. Utilizando una pipeta, transfiera todo el contenido de la botella 4 (PGI) a la botella 3 (HK/G6P-DH). Después de sustituir el tapón de goma, mezcle los enzimas agitando suavemente. La mezcla HK/G6P-DH/PGI está lista para utilizarse. *Después de realizar este paso, la D-glucosa y D-fructosa no se puede medir individualmente con este reagente.*

PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

- Longitud de onda:** 340 nm
Cubeta: paso de luz de 1 cm (vidrio o plástico)
Temperatura: ~ 25°C
Volumen final: 2,34 mL (D-glucosa más D-fructosa)
Solución de muestra: 4-80 µg de glucosa D-glucose mas D-fructosa por cubeta (en 0,10 - 2 mL de volumen de muestra)
Medir contra corriente de aire (sin cubeta en el paso de luz) o contra agua

| Pipeta en cubetas | Muestra sin tratar | Muestra |
|---|--------------------|---------|
| agua destilada (~ 25°C) | 2,10 mL | 2,00 mL |
| solución muestra: | - | 0,10 mL |
| solución 1 (tampón de imidazol) | 0,10 mL | 0,10 mL |
| solución 2 (NADP ⁺ /ATP) | 0,10 mL | 0,10 mL |
| Mezcle*, lea la absorción de las soluciones (A_1) transcurridos aproximadamente 3 min e inicie las reacciones añadiendo: | | |
| suspensión 3 (HK/G6P-DH/PGI) | 0,04 mL | 0,04 mL |
| Mezcle*, lea las absorciones de las soluciones (A_{total}) al final de la reacción (aprox. 10 min). Si la reacción no se ha detenido transcurridos 10 min, continúe leyendo las absorciones a intervalos de 2 min hasta que no cambien durante 2 min**. | | |

* por ejemplo con una espátula de plástico o dándole la vuelta con cuidado después de tapar la cubeta con tapa o Parafilm®.

** si la absorción continua aumentando, puede ser debido a los efectos de los compuestos de color o los enzimas en la muestra. Estas sustancias que interfieren se pueden eliminar durante la preparación de la muestra.

CALCULO:

Calcule las diferencias de absorción ($A_{\text{total}} - A_1$) de la muestra sin tratar y la muestra. Reste la diferencia de absorción de la muestra sin tratar de la diferencia de absorción de la muestra, obteniendo con ello $\Delta A_{\text{D-glucosa} + \text{D-fructosa}}$.

Los valores de $\Delta A_{\text{D-glucosa} + \text{D-fructosa}}$ por regla general deberían ser de 0,100 unidades de absorción para conseguir resultados suficientemente precisos.

La concentración de D-glucosa y D-fructosa se puede calcular de la siguiente forma:

$$c = \frac{V \times MW}{\epsilon \times d \times v} \times \Delta A \quad [\text{g/L}]$$

Donde:

V = volumen final [mL]

MW = peso molecular de D-glucosa o D-fructosa [g/mol]

ϵ = coeficiente de extinción de NADPH a 340 nm
= 6300 [l x mol⁻¹ x cm⁻¹]

d = paso de luz [cm]

v = volumen muestra [mL]

Sigue para D-glucosa + D-fructosa:

$$c = \frac{2,34 \times 180,16}{6300 \times 1,0 \times 0,10} \times \Delta A_{\text{D-glucosa} + \text{D-fructosa}} \quad [\text{g/L}]$$

$$= 0,6692 \times \Delta A_{\text{D-glucosa} + \text{D-fructosa}} \quad [\text{g/L}]$$

Si la muestra se ha diluido durante la preparación, el resultado se debe multiplicar por el factor de dilución, F.

C. FORMATO AUTO-ANALIZADOR; TOTAL AZÚCARES REDUCTIVOS:

Este kit se puede utilizar para preparar 254,1 mL de reagente (equivalente a 1155 reacciones de 0,22 mL). La preparación del reagente se realiza de la siguiente forma:

Preparación de R1:

| Componente | Volumen |
|-------------------------------------|---|
| Botella 1 (tampón) | 1,0 mL |
| Botella 2 (NADP ⁺ / ATP) | 1,0 mL (después de añadir 12 mL de H ₂ O a la botella 2) |
| Botella 4 (PGI) | 0,2 mL (remover antes de utilizar) |
| PVP (10 g/L) | 1,0 mL (o sustituir con H ₂ O) |
| H ₂ O | 18,0 mL |
| Volumen total | 21,2 mL |

Preparación de R2:

| Componente | Volumen |
|-----------------------|------------------------------------|
| Botella 3 (HK/G6P-DH) | 0,2 mL (mezclar antes de utilizar) |
| H ₂ O | 1,9 mL |
| Volumen total | 2,1 mL |

MÉTODO DEL EJEMPLO

R1: 0,200 mL

Muestra: ~ 0,002 mL

R2: 0,020 mL

Tiempo de reacción: 10 min a 25°C o 5 min a 37°C

Longitud de onda: 340 nm

Estabilidad del reagente preparado: > 7 días en frigorífico

Cálculo: punto final

Dirección reacción: aumento

Linealidad: hasta 108 µg/mL de D-glucosa + D-fructosa en mezcla de reacción final

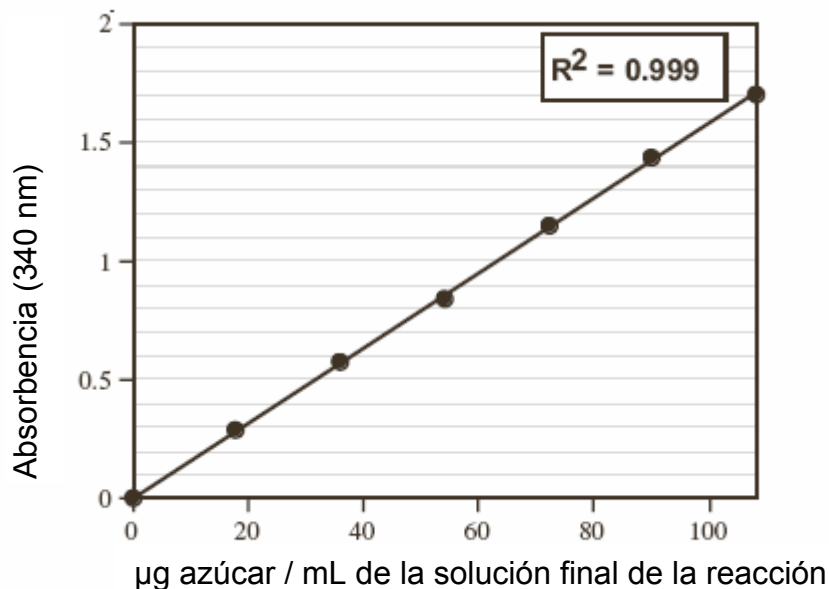


Figura 1. Curva de calibración que demuestra la linealidad del reagente preparado a partir de K-FRUGL. Las reacciones utilizadas para generar esta calibración se prepararon a 25° C durante 10 min, utilizando una cubeta con paso de luz de 4,6 mm.

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA: (Formatos A y B)

1. Dilución de la muestra.

La cantidad de azúcar (D-glucosa más D-fructosa) presente en la cubeta (es decir, en los 0,1 mL de muestra que se está analizando) deberá situarse entre 4 y 80 µg. La solución de muestra por tanto se debe diluir lo suficiente como para conseguir una concentración entre 0,04 y 0,8 g/L.

Tabla de dilución

| Concentración estimada de D-glucosa y D-fructosa (g/L) | Dilución con agua | Factor de dilución (F) |
|--|--------------------------|------------------------|
| < 0,8 | No es necesaria dilución | 1 |
| 0,80-8,0 | 1 + 9 | 10 |
| 8,0-80 | 1 + 99 | 100 |
| > 80 | 1 + 999 | 1000 |

Si el valor de $\Delta A_{D\text{-glucosa}} \text{ o } D\text{-fructosa}$ es demasiado bajo (p.ej. < 0,100), pese más muestra o diluya con menos fuerza. Como alternativa, la muestra que se debe verter en la cubeta se puede aumentar a 2,0 mL, asegurándose de que los componentes

de la muestra y el agua destilada en la reacción sumen 2,10 mL, utilizando el nuevo volumen de muestra en la ecuación.

Si la cantidad calculada de D-glucosa en la muestra es mucho mayor que la de la D-fructosa (p.ej. 10 veces más), no se habrá calculado con precisión la cantidad de D-fructosa. En tal caso, reduzca el contenido de D-glucosa utilizando el reagente glucosa oxidasa/catalasa en presencia del oxígeno de la atmósfera (véase página 16).

2. Clarificación de la muestra.

a. Soluciones:

Solución Carrez I. Disuelva 3,60 g de hexacianoferrato de potasio (II) $\{K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O\}$ (Sigma cat. no. P-9387) en 100 mL de agua destilada. Guárdelo a temperatura ambiente.

Solución Carrez II. Disuelva 7,20 g de sulfato de cinc ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) (Sigma cat. no. Z-4750) en 100 mL de agua destilada. Guárdelo a temperatura ambiente.

Hidróxido sódico (NaOH, 100 mM). Disuelva 4 g de NaOH en 1 L de agua destilada. Guárdelo a temperatura ambiente.

b. Procedimiento:

Vierta la muestra líquida en un matraz de 100 mL que contenga aproximadamente 60 mL de agua destilada, o pese suficiente cantidad de muestra en un matraz de 100 mL y añada 60 mL de agua destilada. Añada con cuidado 5 mL de solución Carrez I, 5 mL de solución Carrez II y 10 mL de solución de NaOH (100 mM). Mezcle cada vez que añada un componente. Llene el matraz hasta la marca, mezcle y filtre.

3. Consideraciones generales.

(a) Muestras líquidas: muestras claras, ligeramente coloreadas y aproximadamente neutras se pueden utilizar directamente en el ensayo.

(b) Muestras ácidas: Si se va a analizar más de 0,1 mL de muestra ácida sin diluir (como vino o zumo de fruta), el pH de la solución se debe aumentar a 7,6 aproximadamente, utilizando 2 M NaOH, y la solución incubada a temperatura ambiente durante 30 min.

(c) Dióxido de carbono: las muestras que contengan cantidades importantes de dióxido de carbono, como la cerveza, se deben desgasificar aumentando el pH a 7,6 aproximadamente con 2 M NaOH y agitando suavemente o removiéndolo con una varilla de vidrio.

(d) Muestras coloreadas: puede que sea necesario una muestra adicional sin tratar, es decir, una muestra sin HK/G6P-DH, en caso de muestras coloreadas.

(e) Muestras muy coloreadas: Si se utilizan sin diluir, las muestras muy coloreadas se deben tratar añadiendo 0,2 g de PVPP/10 mL de muestra. Agite durante 5 minutos y a continuación filtre en papel Whatman No. 1.

(f) Muestras sólidas: homogeneizar o triturar muestras sólidas en agua destilada y filtrar si fuera necesario.

(g) Muestras que contengan grasas: extraiga dichas muestras con agua caliente a una temperatura por encima del punto de fusión de la grasa, p.ej. 100 mL en matraz volumétrico. Ajuste a temperatura ambiente y rellene el matraz hasta la marca con agua destilada. Guárdelo en hielo o en un frigorífico durante 15-30 min y a continuación fíltrelo. Tire los primeros mL de lo que filtre, y utilice el sobrenadante claro (que puede estar ligeramente opalescente) para el ensayo. Otra alternativa es clarificar con reagentes Carrez.

(h) Muestras que contengan proteína: desproteíne las muestras con proteínas con reagentes Carrez.

EJEMPLOS PARA PREPARAR LAS MUESTRAS:

(a) Determinación de la D-glucosa y la D-fructosa en uvas.

Añada 200 mL de agua destilada en un cilindro volumétrico de 500 mL. Añada un número representativo de uvas para aumentar el volumen hasta los 400 mL. Añada agua destilada adicional en un volumen equivalente al volumen anterior de 400 mL (por ejemplo, si el volumen medido es de 420 mL, añade otros 20 mL de agua destilada). De esta forma se consigue una disolución doble del volumen de uvas. Ponga el agua y las uvas en una batidora normal, por ejemplo de cocina, y homogeneice durante 3 minutos aproximadamente. Filtre una parte alícuota de esta solución con un filtro Whatman No. 1 (15 cm de diámetro). Tire los primeros mL y guarde los 20-30 mL restantes. Diluya lo filtrado según sea necesario. *Normalmente, una dilución de 1:1000 y un volumen de muestra de 0,1 mL es satisfactorio (es decir, una dilución total de muestra de 2000 veces).*

(b) Determinación de la glucosa D y fructosa D en el zumo de uva.

Se puede determinar sin tratar la muestra (salvo mediante dilución, según la tabla de dilución). *Normalmente una disolución de 1:2000 y un volumen de muestra de 0,1 mL es adecuado.*

(c) Determinación de la glucosa D y fructosa D en los vinos tinto y blanco.

Se puede determinar sin tratar la muestra (salvo mediante dilución, según la tabla de dilución). Si hay que descolorar el vino tinto, realice la descoloración según se describe en “muestras de mucho color” en la página 14 [Consideraciones generales

(e)]. Normalmente una disolución de 1:10 y un volumen de muestra de 0,1 mL es adecuado.

(d) Determinación de la glucosa D y fructosa D en conservas, frutas y verduras.

Homogéinice aproximadamente 10 g de mermelada en un mezclador. Pese con precisión aproximadamente 0,5 g de muestra en un matraz de 100 mL, mezcle con 50 mL de agua destilada para diluir, hasta la marca, mezcle y filtre. Tire los primeros 5 mL de la solución que ha filtrado. Utilice la solución que ha filtrado en el ensayo. Normalmente, no se requiere dilución y un volumen de muestra de 0,1-2,0 mL es adecuado.

(e) Determinación de la D-glucosa y D-fructosa en postres y helados.

Pese aproximadamente 1 g de muestra en un matraz de 100 mL, añada 60 mL de agua destilada e incube durante 15 min a 50°C aproximadamente, agitando de vez en cuando. Para la precipitación de la proteína, añada las siguientes soluciones y mezcle cada vez que añada un componente: 5 mL de solución Carrez I, 5 mL de solución Carrez II y 10 mL de solución de NaOH (100 mM). Rellene hasta la marca con agua destilada, mezcle y filtre. Utilice la solución clara, o posiblemente ligeramente opalescente, en el ensayo, diluyendo según la tabla de dilución. Normalmente, no se requiere dilución y un volumen de muestra de 0,1-2,0 mL es adecuado.

(f) Determinación de la D-glucosa y D-fructosa en alimentos sólidos.

Mill plant materials to pass a 0.5 mm screen. Homogéinice los alimentos sólidos como el pan, pasteles, chocolates o caramelos en un mezclador, trituradora de carne o mortero. Pese una muestra representativa y extraiga con agua (calentándola a 60°C si fuera necesario). Traspase cuantitativamente a un matraz y diluya hasta la marca con agua destilada. Mezcle y filtre y utilice la solución clara para el ensayo, diluyendo según la tabla de dilución, si fuera necesario. Normalmente, no se requiere dilución y un volumen de muestra de 0,1-2,0 mL es adecuado.

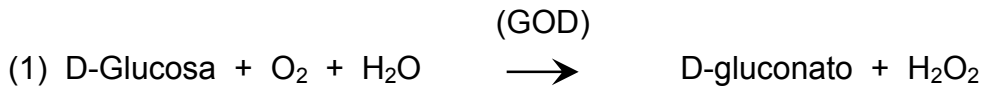
(g) Determinación de la D-glucosa y D-fructosa en la miel.

Remueva la miel bien con una espátula. Ponga aproximadamente 5-10 g de miel viscosa o cristalina en un vaso de ensayo y caliente durante 5 min aproximadamente a 60° C, removiendo de vez en cuando con la espátula (no es necesario que la miel quede líquida). Deje enfriar. Vierta 1 g aproximadamente de muestra líquida, pesada con precisión, en un matraz de 100 mL, disuelva al principio con un pequeño volumen de agua destilada y después rellene con agua hasta la marca y mezcle. Normalmente una dilución de 1:10 y un volumen de muestra de 0,1 mL es adecuado.

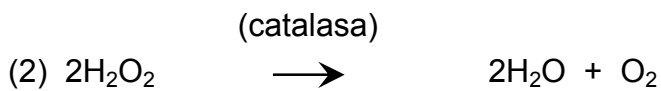
PREPARACIÓN DE MUESTRAS ESPECIALES PARA LA DETERMINACIÓN DE LA D-FRUCTOSA EN PRESENCIA DE UN EXCESO DE D-GLUCOSA:

La preparación de la muestra supone la eliminación de glucosa D en exceso utilizando la mezcla glucosa oxidasa/catalasa de Megazyme (Megazyme cat. no. E-GOXCA). El proceso se realiza de la siguiente forma:

La glucosa D se oxida y forma gluconato D en presencia de glucosa oxidasa (GOD) y oxígeno del aire (1).



El peróxido de hidrógeno se descompone por la catalasa (2).



Reagentes.

1. Tampón de fosfato de sodio (300 mM, pH 7,6) mas 5 mM MgCl₂.

Añada 53,4 g de disodio hidrógeno fosfato deshidrato (Na₂HPO₄·2H₂O) a 900 mL de agua destilada y disuelva removiendo. Añada 1,11 g de MgCl₂·7H₂O y disuelva. Ajuste el pH a 7,6 con 1 M NaOH (40 g/L) y ajuste el volumen a 1 L con agua destilada. Guárdelo a 4°C en una botella Duran[®] cerrada. Para evitar la contaminación por microbios cuando la solución se guarda durante mucho tiempo, añada 2 gotas de tolueno.

2. Glucosa oxidasa (12000 U) más catalasa (300000 U) (Megazyme cat. no. E-GOXCA).

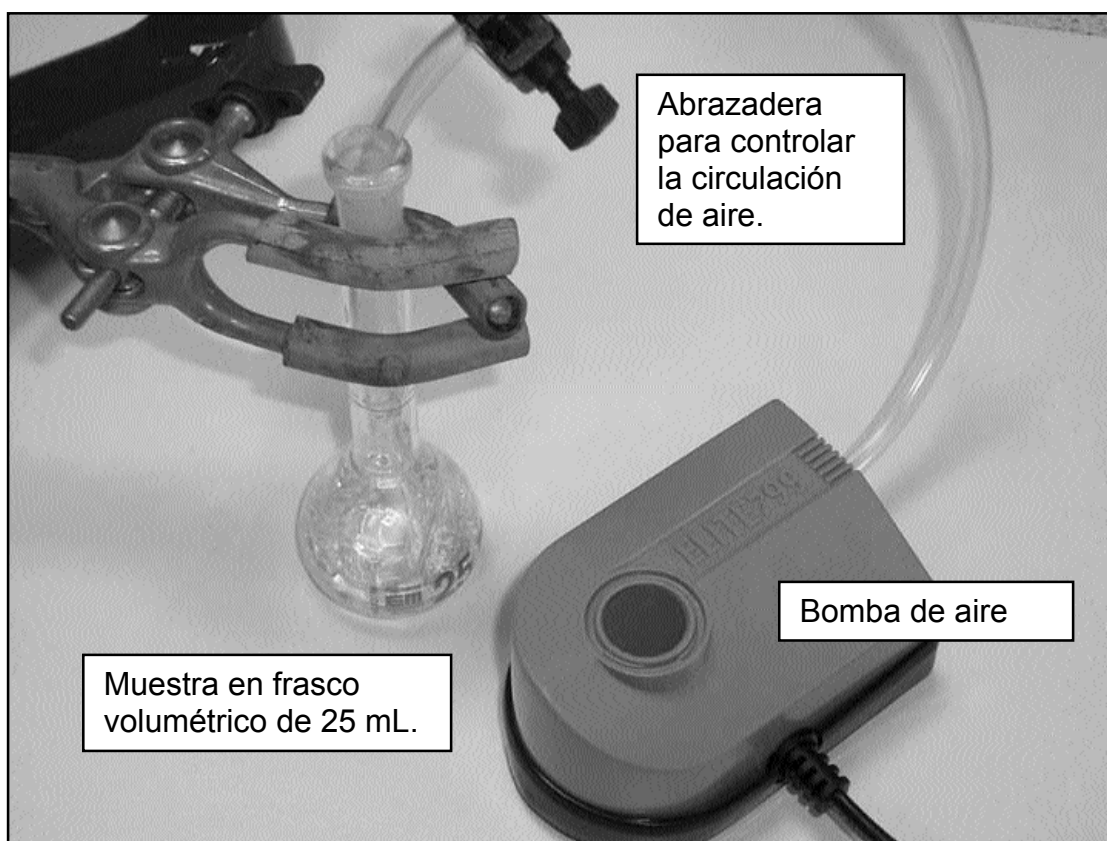
Disuelva el contenido de 1 vial en 20 mL de 300 mM de tampón de fosfato de sodio (pH 7,6) mas 5 mM MgCl₂·7H₂O. Divida esta solución en partes alícuotas de 2 mL. Estable durante > 3 años a -20°C.

Procedimiento para la oxidación de la D-glucosa

| Vierta con pipeta en un matraz aforado de 25 mL | Volumen |
|---|---------|
| 300 mM de solución tampón de fosfato sódico | 5,0 mL |
| Solución muestra (aprox. 5 mg/mL D-glucosa) | 5,0 mL |
| Solución de enzima | 0,2 mL |

Incube el matraz a ~ 25°C y deje pasar una corriente de aire (O₂) a través de la mezcla durante 1 h (véase Figura 1). Aunque esta reacción de oxidación en teoría podría provocar una disminución del pH, no se han observado cambios significativos en las soluciones que contienen D-glucosa a concentraciones de hasta 5 mg/mL (debido a la capacidad de tampón del fosfato sódico que se utiliza).

Después de la reacción, para inactivar la glucosa oxidasa más catalasa, incube el matraz en un baño de agua hirviendo durante 10 min, dejándolo enfriar a la temperatura ambiente y siluyendo el contenido hasta la marca con agua destilada. Mezcle y filtre. Use 0,5 mL de solución clara para la determinación de la D-fructosa. Determine el residual de D-glucosa como de costumbre.



Figur 2. Disposición para la oxidación de la D-glucosa por glucosa / Oxidasa más catalasa en presencia de corriente de aire.

NOTAS:



**Megazyme International Ireland Ltd.,
Bray Business Park, Bray,
Co. Wicklow,
IRLANDA**

Teléfono: (353.1) 286 1220

Fax: (353.1) 286 1264

Página Web: www.megazyme.com

Correo electrónico: info@megazyme.com

SIN GARANTÍA

La información contenida en este librete está, al mejor de nuestro conocimiento, verdad y exacto, pero puesto que las condiciones del uso están más allá de nuestro control, de ninguna garantía se da o se implica por lo que se refiere a cualquier recomendación o sugerencia que puedan ser hechas o que ningún uso no infringirá ninguna patentes.