**EnzytecTM Liquid D-Glucose/D-Fructose**

Art. No. E8160 (17.03.2017)

Ферментативный анализ в пищевых продуктах и других образцах

2 x 50 мл R1 и 2 x 12,5 мл R2 и 2 x 12,5 мл R3 (50 анализов)

Только дляиспользования *in vitro*

Хранить при температуре +2 - +8°C

**Принцип**

Ферментативный тест с гексокиназой (HK), фосфоглюкозоизомеразой (PGI) и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназой (G6P-DH). В ходе реакции образуется НАДН, концентрацию которого можно определить при длине волны 340 нм:

D-фруктоза + АТФ ⎯⎯ HK → Фруктоза-6-фосфат + АДФ

D-глюкоза + АТФ ⎯⎯ HK → глюкозо-6-фосфат + АДФ

Фруктозо-6-фосфат ⎯⎯ PGI → Глюкозо-6-фосфат

Глюкозо-6-фосфат + NAD+ ⎯⎯ G6P-DH → Глюконат-6-P + NADH+

**Реактивы**

Реагенты готовы к использованию.

Реагент 1: два флакона ≥ 50 мл (буфер, НАД)

Реагент 2: два флакона ≥ 12,5 мл (HK, G6P-DH)

Реагент 3: два флакона ≥ 12,5 мл (PGI)

Реагенты стабильны до конца месяца, указанного в дате срока хранения. Температура хранения 2-8 °C. Не замораживайте реагенты. Реагенты перед использованием должны быть комнатной температуры (20-25 ° C).

Должны соблюдаться общие правила безопасности при работе в химических лабораториях. Реагенты не глотать! Избегайте контакта реагентов с кожей и слизистыми оболочками. Набор может содержать опасные вещества. После использования реагенты можно утилизировать вместе с лабораторными отходами. Упаковочные материалы могут быть переработаны.

**Пробоподготовка:**

1. Разбавьте жидкие, прозрачные, бесцветные, нейтральные образцы, чтобы получить растворы проб с концентрацией релевантной диапазону измерения набора.

2. Профильтруйте или центрифугируйте пробы, если они мутные.

3. Пробы, содержащие диоксид углерода, дегазируйте.

4. Осветлите образцы содержащие жир или протеины реактивом Карреза.

5. Измельчите или гомогенизируйте твердые или полутвердые (пастообразные) образцы, экстрагируйте водой, профильтруйте, разбавьте и осветлите реактивом Карреза, если необходимо.

6. Образцы, содержащие жир, взвешивают в мерной колбе (минимум 50 мл) и экстрагируют горячей водой; остужают, чтобы жир отделился; доводят водой до отметки, удаляют сверху жировую прослойку и отфильтровывают водную часть.

7. Отрегулируйте pH до прибл. 8.0 путем добавления KOH / NaOH к кислым образцам или путем добавления HCl к щелочным образцам.

**Измерение:**

Длина волны: 340 нм, Hg 334 nm, Hg 365 nm

Световой путь: 1,00 см.

Температура: от 20 – 25 / 37 °C.

Измерение: против воздуха или воды.

Раствор образца: 20 – 1500 мг/л.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Пипетировать в кюветы | Бланк (холостая проба) | Образец |
| Образец/Стандарт | - | 100 мкл |
| Дист.вода | 100 мкл | - |
| Реагент 1 | 2000 мкл | 2000 мкл |
| **Перемешать, инкубировать 1 мин при 37 ° C или 3 мин при 20-25 ° С, считайте оптическую плотность A1, затем добавьте:** |
| Реагент 2 | 500 мкл | 500 мкл |
| **Перемешать, дождаться окончания реакции (инкубация ок. 10 мин при 37 ° C или прибл. 15 мин при 20-25 ° С). Считайте оптическую плотность A2.** |
| Реагент 3 | 500 мкл | 500 мкл |
| **Перемешать, дождаться окончания реакции (инкубация ок. 10 мин при 37 ° C или прибл. 15 мин при 20-25 ° С). Считайте оптическую плотность A3.** |

Бланк реагента необходимо выполнять один раз для каждой серии анализов. Оптическая плотность бланка вычитается из каждого результата, полученного в одной серии измерений во время расчета результатов.

**Расчет**

*D-Глюкоза*

∆A = (A2 - df x A1)образец - (A2 - df x A1)бланк

df = коэффициент разбавления:

df = (объем образца + R1) / (объем образца + R1 + R2) = 0,808

c = (V x MW x Δ A) / (ε x d x v x 1000) [г/л D-глюкоза]

c = (2,600 x 180,16 x Δ A) / (ε x 1 x 0,1 x 1000)

Результаты определения при 340 нм (= 6,3 л x ммоль-1 x см-1):

c D-глюкоза [г / л] = 0,744 x ΔA

*D-Фруктоза*

∆A = (A2 - df x A1)образец - (A2 - df x A1)бланк

df = коэффициент разбавления:

df = (объем образца + R1) / (объем образца + R1 + R2 + R3) = 0,839

c = (V x MW x Δ A) / (ε x d x v x 1000) [г/л D-фруктоза]

c = (3,100 x 180,16 x Δ A) / (ε x 1 x 0,1 x 1000)

Результаты определения при 340 нм (= 6,3 л x ммоль-1 x см-1):

c D-глюкоза [г / л] = 0,887 x ΔA

*D-Глюкоза и D-Фруктоза без дифференцировки*

Добавить реагент 2 и реагент 3 одновременно и инкубировать только один раз

∆A = (A2 - df x A1)образец - (A2 - df x A1)бланк

df = коэффициент разбавления:

df = (объем образца + R1) / (объем образца + R1 + R2 + R3) = 0,677

c = (V x MW x Δ A) / (ε x d x v x 1000) [г/л D-Глюкоза/D-фруктоза]

c = (3,100 x 180,16 x Δ A) / (ε x 1 x 0,1 x 1000)

Результаты определения при 340 нм (= 6,3 л x ммоль-1 x см-1):

c D-глюкоза [г / л] = 0,887 x ΔA

Расчет содержания в твердых образцах

$$С \left[\frac{г}{100 г}\right]=\frac{C\_{D-глюк/D-фрукт}\left[г/л\right]}{Вес образца \left[г/л\right]}×100$$

**Производительность теста**

***Специфичность***

Тест специфичен для D-глюкозы и D-фруктозы. Галактоза, лактоза, мальтоза, маннит, сорбит и сахароза не оказывают влияния на результаты теста. Манноза не влияет на анализ в концентрации до 5 г/л, но приводит к низким значениям извлечения при более высоких концентрациях. Если соотношение D-глюкоза / D-фруктоза выше 10:1, точность определения D-фруктозы уменьшается.

***Диапазон измерения***

Рекомендуемый диапазон измерений составляет от 20 до 1500 мг/л (общий для двух сахаров). Когда значения превышают этот диапазон, образцы необходимо развести в пределах 100 – 1500 мг/л дистиллированной водой. Разбавление коэффициент необходимо учитывать при расчетах.

***Чувствительность***

Предел обнаружения (LoD) и предел количественной оценки (LoQ):

- LoD = 4,0 мг/л.

- LoQ = 10 мг/л.

**Возможна автоматизация теста.**

|  |  |
| --- | --- |
|  |  |
| Техническая поддержка и прием заявок: |
| +375 (17) 336-50-54, +7 (499) 704-05-50, +7 (499) 649-02-01 |
| info@komprod.com, support@komprod.com, info@neo-test.ru |