

「F-キット D-グルコース/果糖」の概要

食品(果物、野菜、蜂蜜、アイスクリーム、ワインなど)、化粧品、医療品(輸液や注入液等)、紙、タバコ、生体試料(動物・植物組織、血液、尿など)中のグルコースと果糖の定量をします。また、試料の前処理や試薬の追加によりイヌリン、ラクチュロースも定量することができます。



F-キット D-グルコース/果糖 (製造番号 139106)

【キット内容】 各1ビン

- ビン 1: 乾燥粉末 約 5g
(トリエタノールアミンバッファー pH 7.6, NADP, ATP, 硫酸マグネシウムを含む)
- ビン 2: 酵素懸濁液 約 0.7 mL (200U の HK:ヘキソキナーゼ、100U の G6PDH: グルコース-6-リン酸脱水素酵素を含む)
- ビン 3: 酵素懸濁液 約 0.7 mL
(490U の PGI: グルコースリン酸イソメラーゼを含む)
- ビン 4: コントロール用グルコース標準液

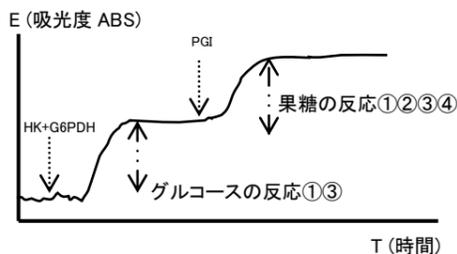
【測定原理】 酵素法 (G6PDH-HK 法)

- D-グルコース + ATP \xrightarrow{HK} グルコース-6-P + ADP
- 果糖 + ATP \xrightarrow{HK} フルクトース-6-P + ADP
- グルコース-6-P + NADP⁺ $\xrightarrow{G6PDH}$ グルコン酸-6-P + NADPH + H⁺
- フルクトース-6-P \xrightarrow{PGI} グルコース-6-P

グルコースの測定: ①と③によりグルコースと同モル量生成した NADPH を 340 nm の波長で吸光度測定します。(NADP は 340 nm で吸光度がないので測定されません)。

果糖の測定: ④の反応を追加し、増加吸光度を測定します。吸光度の測定は、グルコースと果糖それぞれの酵素反応が開始する前と終了した(吸光度が一定となった)後で行います。その吸光度差からサンプルの濃度を算出します。下記のタイムコースを参照下さい。

【F-キット D-グルコース/果糖のタイムコース】



(1) 試薬の調製

- メスシリンダーまたはピペットなどを用いて、ビン 1 に蒸留水 27mL を加えます。栓をして泡立たないように緩やかに溶解し、試薬が安定するまで約 15 分間静置します。
- ビン 2、ビン 3 の酵素懸濁液は泡立ないようにローリング(渦をまくよう慎重に回転)するなどして均一にしてください。希釈などはせず、そのまま使用します。

(2) ビベッティングと吸光度測定

- ステップ1**
- 試薬1 (ビン1溶解液=バッファー)各1.0 mL をブランク用キュベットとサンプル用(または標準液用)各キュベットにビペットで分注します。
 - サンプル液(または標準液)各0.1 mL をサンプル用キュベットにビペットで正確に加えます。

ステップ2

- 蒸留水をブランク用キュベットには 2.0 mL、サンプル用キュベットには各 1.9 mL をビペットやディスペンサー等で加えます。
- サンプル液の増量がある場合は、その増量分を蒸留水で減量し、反応液量は一定にしてください。

ステップ3

- 穏やかに混和し(パラフィルムでキュベットの口を覆い泡立ないように転倒混和、または攪拌棒[製品番号 19623]で穏やかにかき混ぜ)、約 3 分間静置します。
- 分光光度計で各キュベットの吸光度(E1)を測定します。

ステップ4

- 試薬2(酵素:HK/G6PDH 懸濁液、ビン2)を各 0.02 mL 加えます。

ステップ5

- ステップ3と同様に穏やかに混和し、20~25°C で約 10~15 分間インキュベート(酵素反応)します。
- 分光光度計で各キュベットの吸光度(E2)を測定します。

ステップ6

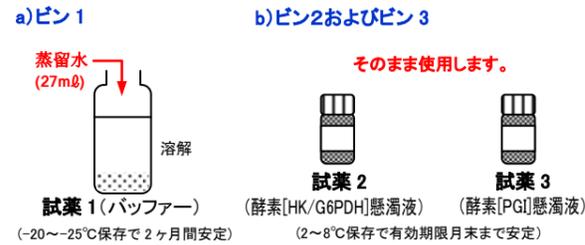
- 試薬3(酵素:PGI 懸濁液、ビン3)各 0.02 mL を加えます。

ステップ7

- ステップ3と同様に穏やかに混和します。混和後 20~25°C で約 10~15 分間インキュベート(酵素反応)します。分光光度計で各キュベットの吸光度(E3)を測定します。

D-グルコースと果糖の定量操作方法

【操作簡略図】



【参考写真】

試薬の調製



ステップ1(試薬1の分注)



ステップ2(蒸留水の分注)



ステップ3、ステップ5、ステップ7(吸光度の測定)



ステップ4、ステップ6(酵素懸濁液[試薬2または試薬3]の添加と混和)



【特異性】

ヘキソキナーゼ(HK)とグルコース-6-リン酸脱水素酵素(G6PDH)、グルコースリン酸イソメラーゼ(PGI)を使用した本法は、D-グルコースと果糖のみを定量(特異的に反応)します。

【測定範囲】

340 nm で測定した場合の良好な測定範囲は 0.08~0.5 g/L です。

【直線性】

1 回の測定において、D-グルコース+果糖約 1 μg(0.4 mg/L; サンプル液量 2.0 mL で測定)~100 μg(1.0 g/L; サンプル液量 0.1 mL で測定)の間にあります。

【感度と測定限界】

測定感度: 最小吸光度差 0.005 です。試料 2.0 mL を 340 nm で測定した場合の D-グルコースまたは果糖濃度 0.2 mg/L(サンプル溶液中)に相当します。
測定限界: 下限値は 0.4 mg/L です。最大試料量 2.0 mL を 340nm で測定した場合の吸光度変化量 0.010 から算出されています。高濃度の試料は蒸留水で希釈して使用して下さい。

【正確性】

サンプルの二重測定をした場合、0.005~0.010 の吸光度差が生じることがあります(定量操作誤差によるものです)。標準偏差は指定濃度範囲内で約 1~2% です。

血液中のグルコース	CV = 1.2~1.8%
チョコレート中の果糖	CV = 1.5%
低カロリービール中のグルコース	x = 1.0 g / 100 mL r = 0.030 g / 100 mL S(r) = ±0.011g / 100 mL
全卵(液状)中の果糖	x = 6.72 g / 100 g r = 0.587g / 100 g S(r) = ±0.207g / 100 g R = 0.748g / 100 g S(R) = ±0.264g / 100 g

測定サンプルの濃度算出

【吸光度変化量(ΔE)】

グルコースまたは果糖が反応して、同モル量の NADPH が生成したことによる吸光度増加分を求めます。

$$\Delta E(\text{グルコース}) = \text{サンプルの}(E2 - E1) - \text{ブランクの}(E2 - E1)$$

$$\Delta E(\text{果糖}) = \text{サンプルの}(E3 - E2) - \text{ブランクの}(E3 - E2)$$

【分子吸光係数を用いた濃度計算】

吸光度とモル濃度が比例関係にあり、NADPH の分子吸光係数が既知であるため、標準物質を用いず濃度算出できます。

$$C = \frac{V \times MW}{\epsilon \times d \times v \times 1000} \times \Delta E$$

C : 濃度 (g/L) ε : ミリモル分子吸光係数 (L × mmol⁻¹ × cm⁻¹)
V : 反応液量 (mL) v : サンプル量 (mL)
MW : 分子量 d : 光路長 (cm)

試料を希釈した場合は、濃度に希釈率(F)を乗じます。
C(g/L) = F × ΔE