


<b>aoxlab</b>	Procedimiento para la determinación de frúctanos <b>AOXLAB S.A.S</b>	Identificación: <b>PROC-TC-167</b>
		Revisión: <b>2</b>
		Inicio de vigencia: <b>2024-09-10</b>

# Procedimiento para la determinación de frúctanos

**AOXLAB S.A.S.**

	<b>Procedimiento para la determinación de frúctanos</b> <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-167</b>
		<b>Revisión: 2</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2024-09-10</b>

## DOCUMENTO CONTROLADO


### PROC-TC-167 Procedimiento para la determinación de frúctanos

Copia controlada No.: 1

	Nombre	Puesto o función	Firma	Fecha
<b>Elaboró:</b>	[Mariana Toro Rúa	[Analista Laboratorio		[2024-09-05
<b>Revisó:</b>	[Angela P. Patiño Pérez	[Directora calidad		[2024-09-09
<b>Aprobó:</b>	[Jonatan Zárate Álvarez	[Director técnico		2024-09-10
<b>Localización del documento:</b>		Plataforma SGC		


### Control de Cambios

Estado	Fecha de Inicio de vigencia	Revisión	Descripción del cambio realizado	Realizó	Revisó	Aprobó
Obsoleto	2024-04-24	1	Ninguno (versión original).	MTR	APPP	LSGF
Vigente	2024-09-10	2	Se ajusta documento según kit K-FRUC	MTR	APPP	JOZA


	Procedimiento para la determinación de frúctanos <b>AOXLAB S.A.S</b>	Identificación: <b>PROC-TC-167</b>
		Revisión: <b>2</b>
		Inicio de vigencia: <b>2024-09-10</b>

## ÍNDICE

<b>1. OBJETIVO Y ALCANCE</b> .....	5
1.1 Objetivo.....	5
1.2 Alcance.....	5
<b>2. DEFINICIONES Y NOTACIONES</b> .....	5
2.1 Definiciones.....	5
2.1.1 Descripción del método.....	5
2.2 Notaciones.....	6
<b>3. REFERENCIAS</b> .....	7
<b>4. DESARROLLO</b> .....	8
4.1 Equipos de medición.....	8
4.2 Condiciones generales.....	8
4.2.1 Revisión general.....	8
4.2.2 Estabilización.....	8
4.3 Verificación de equipos.....	9
4.4 Manejo de la muestra.....	9
4.5 Medidas de seguridad.....	10
4.6 Reactivos y soluciones.....	10
4.6.1 Contenido del kit Megazyme.....	10
4.6.2 Preparación de las enzimas.....	10
4.6.3 Reactivos no incluidos en el kit.....	11
4.7 Extracción de fructanos.....	12
4.7.1 Eliminación de sacarosa, almidón y azúcares reductores.....	13
4.7.2 Hidrólisis y medición de frúctanos.....	13
4.8 Precauciones.....	14
4.9 Cálculos.....	14
4.10 Aseguramiento de calidad.....	15
4.11 Registros.....	16
4.12 Determinación del grado de subestimación del contenido de fructanos como consecuencia de la reducción de borohidruro de la inulina hidrolizada.....	17
4.13 Especificidad, sensibilidad, linealidad y precisión.....	17
<b>5. RESPONSABILIDADES</b> .....	18
5.1 Director técnico.....	18

	<b>Procedimiento para la determinación de frúctanos</b> <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-167</b>
		<b>Revisión: 2</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2024-09-10</b>

5.2	Director de Calidad.....	18
5.3	Líder de Laboratorio.....	18
5.4	Analista.....	19
6.	FORMATOS RELACIONADOS.....	19
7.	ANEXOS.....	20

	<b>Procedimiento para la determinación de frúctanos</b> <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-167</b>
		<b>Revisión: 2</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2024-09-10</b>

## 1. OBJETIVO Y ALCANCE.

### 1.1 Objetivo.

[Describir los pasos para realizar la determinación de fructanos en diferentes tipos de matrices según el procedimiento Fructan Assay Kit K-FRUC 11/22 Megazyme [4] y los requisitos establecidos por la norma ISO/IEC 17025:2017 [2]. ]

### 1.2 Alcance.

[Alimentos, piensos e ingredientes.

Límite de detección: 0,16 g/100 g]

## 2. DEFINICIONES Y NOTACIONES.

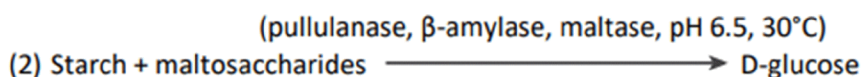
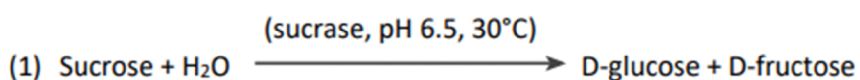
### 2.1 Definiciones.

[**Fructanos** [1]. Se definen como cualquier compuesto en el que uno o más enlaces fructosil-fructosa constituyen la mayoría de los enlaces. Se pueden clasificar en tres tipos principales: el grupo de la inulina, el grupo de levanos y el grupo ramificado.

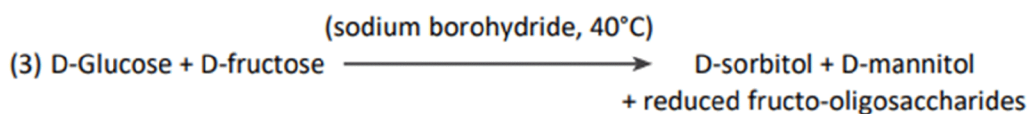
El método descrito en este folleto emplea enzimas recombinantes ultrapuras y mide específicamente los fructanos, incluidos los fructanos de tipo inulina de achicoria, dalia, alcachofa de Jerusalén; fructanos altamente ramificados de tallos y hojas de cebolla y trigo; y fructanos de tipo lévano de pastos como el pasto Timothy.


#### 2.1.1 Descripción del método.

La sacarosa es hidrolizada por una enzima sacarasa específica que no tiene acción sobre el menor grado de polimerización (DP) FOS como la 1-kestosa y 1,1-kestotetraosa. El almidón y las maltodextrinas se hidrolizan a maltosa y maltotriosa por pullulanasa y B-amilasa, y estos oligosacáridos luego se hidrolizan a D-glucosa mediante maltasa (1 & 2). Dado que la sacarasa es más estable a 30 ° C, esta es ahora la temperatura recomendada para este paso de incubación.

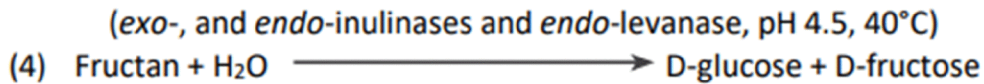


La D-glucosa y la D-fructosa se reducen mediante borohidruro de sodio a los correspondientes alcoholes de azúcar, D-sorbitol y D-manitol. En esta reacción, el residuo de D-fructosilo en el extremo reductor de los fructooligosacáridos en las preparaciones de inulina hidrolizada también se reduce al alcohol de azúcar. Fructanos nativos y FOS no reductores como Neosugars<sup>®</sup> no se ven afectados por esta reacción (3).

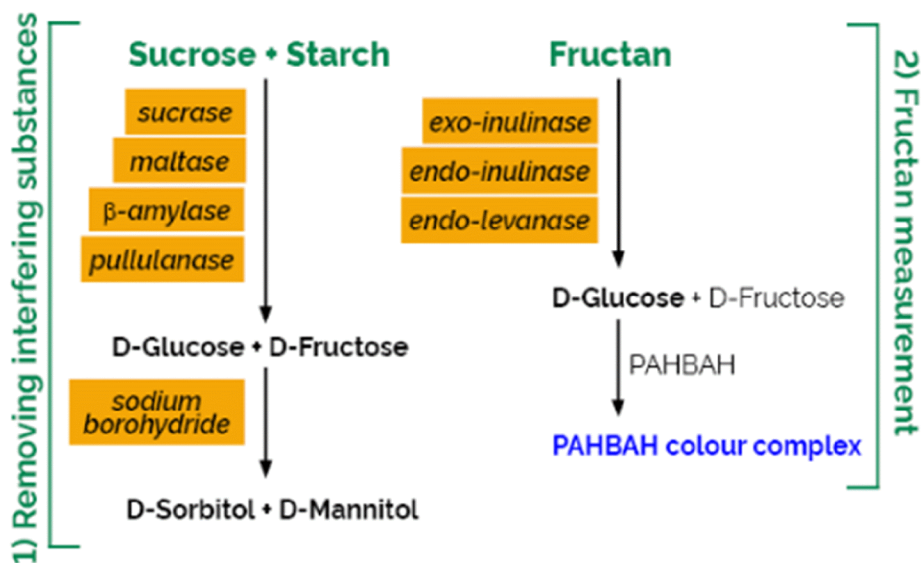
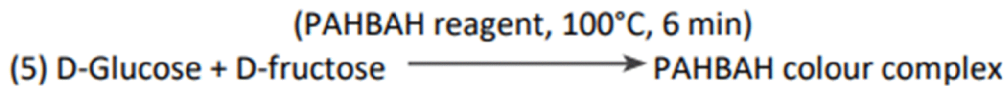


	Procedimiento para la determinación de frúctanos <b>AOXLAB S.A.S</b>	Identificación: <b>PROC-TC-167</b>
		Revisión: <b>2</b>
		Inicio de vigencia: <b>2024-09-10</b>

FOS, fructanos y FOS reducidos en borohidruro son específicamente hidrolizados por exo- y endo- inulinasa y endo- levanasa a D-glucosa y Dfructosa (4).



La D-fructosa y la D-glucosa derivada del fructano se miden utilizando el método del azúcar reductor PAHBAH. Este método es fácil de usar y la respuesta de color para D-fructosa y D-glucosa es la misma (5).



Figura

1. Explicación de la metodología de ensayo empleada.


## 2.2 Notaciones.

Para propósitos de este documento, se hacen las siguientes consideraciones:

“Laboratorio”: se refiere al laboratorio AOXLAB S.A.S.


“Servicios”: para referir a los servicios de ensayo que el Laboratorio ofrece.

“Ítem”: se refiere a los objetos o materiales bajo ensayo. ]

	<p>Procedimiento para la determinación de frúctanos</p> <p>AOXLAB S.A.S</p>	<p>Identificación: PROC-TC-167</p>
		<p>Revisión: 2</p>
		<p>Inicio de vigencia: 2024-09-10</p>

### 3. REFERENCIAS.

- [1] ISO/IEC 17025:2017 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories / Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración.
- [2] ISO 9001 :2015 Quality management systems — Requirements Systemes de management de la qualité — Exigences.
- [3] ISO 9000:2015 Quality management systems — Fundamentals and vocabulary.
- [4] Megazyme. Fructan Assay Kit. Assay protocol. K-FRUC 11/22 ]

	<b>Procedimiento para la determinación de frúctanos</b> <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-167</b>
		<b>Revisión: 2</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2024-09-10</b>

#### 4. DESARROLLO.

##### 4.1 Equipos de medición.

- Tubos de ensayo de 15 mL
- Micropipetas (100 µL- 200 µL-1000 µL).
- Pipeta de 5,0 ml (para dispensar alícuotas de 5,0 ml de reactivo de trabajo PAHBAH).
- Balanza analítica.
- Espectrofluorimetro ajustado a 410 nm.
- Vortex.
- Baño de agua termostatizados (ajustados a 30 ° C y 40 ° C).
- Baño de agua hirviendo.
- Centrifuga. Tubos de centrifuga de polipropileno desechables de 15 mL y 50 mL.
- Cronómetro.

##### 4.2 Condiciones generales.

###### 4.2.1 Revisión general.


Al recibirse la muestra en el Laboratorio, esta es inspeccionada con el fin de verificar que las condiciones de cantidad, empaque y preservación se mantienen, conforme lo indicado en el procedimiento PROC-TC-008 "Procedimiento de aseguramiento de integridad de los ítems bajo servicio".

Antes de iniciar el análisis, se debe verificar que se cuenta con mínimo 10 gramos de muestra para realizar este análisis. En caso de que la muestra no presente alguna de estas condiciones, realizar la observación en el "Formato para el registro de datos primarios del ensayo de Frúctanos" FOR-TC-158 e informar de inmediato al líder comercial a través del Líder de laboratorio.

###### 4.2.2 Estabilización.

Los ítems de ensayo, patrones y controles de calidad deben atemperarse con suficiente antelación de tal manera que se encuentren en equilibrio térmico con el ambiente en el cual se ejecutarán los ensayos.

La balanza analítica y otros equipos electrónicos que realicen mediciones de alguna magnitud correspondiente a condiciones de influencia en la ejecución del ensayo deben encenderse por lo menos media hora antes de su uso. Así mismo, deben verificarse los equipos, de acuerdo con lo establecido en el numeral 4.3.

	<b>Procedimiento para la determinación de frúctanos</b> <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-167</b>
		<b>Revisión: 2</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2024-09-10</b>

Verificar que el espectrofluorímetro EL072 se encuentre encendido y en óptimas condiciones para su uso, además, verificar el diagnóstico del equipo arrojado por el software.

#### 4.3 Verificación de equipos.

Antes de iniciar el ensayo, debe verificarse que el estado de funcionamiento de los equipos sea adecuado. Esto puede llevarse a cabo revisando que cuenten con la etiqueta de mantenimiento vigente y que estos no tengan alguna etiqueta que lo identifique como "Fuera de servicio". Además, en el caso en el cual se lleve el control de uso, deben registrarse los últimos registros consignados en el formato FOR-TC-017, con el propósito de verificar que no se han registrado fallas en el funcionamiento. Si algún equipo es utilizado para la medición de alguna magnitud de influencia en el ensayo, este debe estar calibrado. Por tanto, se debe verificar la etiqueta de calibración adherida a este, y comprobar que se encuentre vigente.

Así mismo, debe verificarse que se haya realizado y registrado la verificación diaria de la balanza analítica en el formato FOR-TC-005

Además de lo anterior, debe verificarse la fecha de expiración de los patrones, materiales de referencia y controles de calidad empleados en el ensayo con el fin de evitar el uso de materiales vencidos.


#### 4.4 Manejo de la muestra.

Para la identificación, manejo, transporte, almacenamiento y descarte de la muestra, se siguen las instrucciones dadas en el procedimiento PROC-TC-008 Procedimiento de aseguramiento de integridad de las muestras bajo servicio.

Al tomar de la porción de análisis, la muestra debe estar a temperatura ambiente y correctamente homogeneizada. Si es líquida, mezclar hasta homogeneidad aparente mediante agitación magnética, y con la ayuda de un gotero o una pipeta tomar la cantidad necesaria de muestra, mientras se continúa con la agitación.

Si la muestra es sólida, moler o triturar en su totalidad hasta homogeneidad aparente, y realizar un cuarteo atendiendo los siguientes pasos:

- Colocar la muestra previamente homogeneizada sobre una superficie lisa, limpia y seca, donde no existan corrientes de aire fuertes.
- Limpiar los instrumentos a utilizar (espátula o cuchara).
- Mezclar la muestra echando repetidas veces el material de los bordes hacia el centro.
- Juntar todo el material dándole forma circular con espesor uniforme.
- Dividir el material en cuatro sectores iguales.

	<b>Procedimiento para la determinación de frúctanos</b> <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-167</b>
		<b>Revisión: 2</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2024-09-10</b>

- Eliminar los sectores opuestos quedando la masa del material reducida a la mitad.
- Mezclar los dos sectores restantes echando repetidas veces el material de los bordes hacia el centro.

Las muestras secas se muelen para pasar un tamiz de 0,5 mm. Las muestras grasas sólidas (por ejemplo, chocolate) se cortan en finas virutas con un cuchillo afilado; Los productos alimenticios blandos (por ejemplo, pastas para untar) se analizan sin más preparación. Todas las muestras deben estar a temperatura ambiente antes de pesarlas.

#### 4.5 Medidas de seguridad.

Durante el análisis tener en cuenta que se debe seguir el procedimiento aquí descrito sin modificar ningún parámetro.


Tener en cuenta las instrucciones dadas en el reglamento interno de trabajo PROC-GC-015 Reglamento Interno AOXLAB S.A.S, capítulo XIII.

#### 4.6 Reactivos y soluciones.

##### 4.6.1 Contenido del kit Megazyme.

- **Botella 1.** Sacarasa  $\beta$ -amilasa, pululanasa y maltasa. Polvo seco congelado. Estable durante aproximadamente 5 años por debajo de  $-10^{\circ}\text{C}$ .
- **Botella 2.** Fructanasa. Recombinante exo- y endo- inulinasas y recombinante endo- levanasa en polvo liofilizado. Estable durante aproximadamente 5 años por debajo de  $-10^{\circ}\text{C}$ .
- **Botella 3.** Harina de inulina para el control. Inulina liofilizada en presencia de  $\alpha$ -celulosa. Estable durante aproximadamente 5 años almacenado en seco a temperatura ambiente.
- **Botella 4.** Harina de Levan para el control. (Timothy Grass) levan liofilizado en la presencia de  $\alpha$ -celulosa. Estable durante aproximadamente 5 años almacenado en seco a temperatura ambiente.
- **Botella 5.** Harina de control de sacarosa. Sacarosa liofilizada en la presencia de  $\alpha$ -celulosa. Estable durante aproximadamente 5 años almacenado en seco a temperatura ambiente.
- **Botella 6.** Solución estándar de D-fructosa (1,5 mg/ml) en 0,2% (p/v) ácido benzoico. Estable por aproximadamente 5 años; Almacenar sellado a temperatura ambiente.

##### 4.6.2 Preparación de las enzimas.

	<p>Procedimiento para la determinación de frúctanos</p> <p><b>AOXLAB S.A.S</b></p>	<p>Identificación: <b>PROC-TC-167</b></p>
		<p>Revisión: <b>2</b></p>
		<p>Inicio de vigencia: <b>2024-09-10</b></p>

- **Disuelva el contenido de la botella 1 en 22 mL de Buffer 1 [maleato de sodio (100 mM, pH 6,5 más albúmina de suero bovino (0,5 mg / mL)] (Solución enzimática A).**  
Divida en alícuotas de volumen apropiado y almacenar en tubos de polipropileno. Estable durante aproximadamente 5 años por debajo de -10 ° C.
- **Disuelva el contenido de la botella 2 en 11 mL de Buffer 2 [acetato de sodio (100 mM, pH 4,5)] (Solución enzimática B).**  
Dividir en alícuotas de volumen apropiado y almacenar en tubos de polipropileno. Estable durante aproximadamente 4 meses por debajo de -10 ° C. Se envían 2 frascos de la enzima usar la segunda botella en caso de ser necesario.

#### 4.6.3 Reactivos no incluidos en el kit.

- **Reactivo de ensayo de azúcar reductor PAHBAH.**

**Solución A.** Añada 10 g de p-hidrazida de ácido hidroxibenzoico (PAHBAH) a 60 ml de agua destilada en un vaso de precipitados de 250 ml en un agitador magnético. Revuelva la suspensión y agregue 10 mL de ácido clorhídrico concentrado. Ajustar el volumen de la solución a 200 mL con agua destilada. Estable durante aproximadamente 2 años a temperatura ambiente.

**Solución B.** Añadir 24,9 g de citrato trisódico dihidrato (PM=294.1) a 500 mL de agua destilada y revuelva para disolver. Añadir 2,2 g de cloruro de calcio dihidratado (PM=147,01) y disolver. Agregar 40,0 g de hidróxido de sodio y disolver con agitación (la solución puede ser lechosa, pero se aclarará cuando se diluya a 2 L). Ajuste el volumen a 2L. Estable durante aproximadamente 2 años a temperatura ambiente. **Reactivo de trabajo PAHBAH.**


Inmediatamente antes de usar, agregue 20 mL de Solución A, a 180 mL de Solución B y mezcle bien. La solución mezclada es estable durante aproximadamente 4 h en hielo.

- **Hidróxido de sodio (50 mM).**

Disuelva 2.0 g de hidróxido de sodio en 900 mL de agua destilada. Ajuste el volumen a 1 L. Estable durante aproximadamente 4 años a temperatura ambiente.

- **Borohidruro alcalino (10 mg/ml de borohidruro de sodio en hidróxido de sodio 50 mM).**

Pesar con precisión aproximadamente 50 mg de borohidruro de sodio en recipientes de polipropileno (volumen de 15 ml con tapón de rosca).

	<b>Procedimiento para la determinación de frúctanos</b> <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-167</b>
		<b>Revisión: 2</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2024-09-10</b>

Registre el peso exacto de los tubos (aproximadamente 10 por conveniencia), selle los tubos y guárdelos en un desecador para uso futuro. Estable por aproximadamente 2 años a temperatura ambiente. Inmediatamente antes de su uso, disuelva el borohidruro de sodio (a 10 mg/mL) en hidróxido de sodio 50 mM. **Esta solución es estable durante 4-5 horas a temperatura ambiente.**

- **Ácido acético (200 mM).**

Agregue 11,6 mL de ácido acético glacial a 600 mL de agua destilada y ajuste el volumen a 1 L. Estable durante aproximadamente 4 años a temperatura ambiente.

- **Maleato de sodio (100 mM, pH 6,5, Buffer 1).**

Disolver ácido maleico (11,6 g) en 900 ml de agua destilada y ajustar el pH a 6,5 con una solución de hidróxido de sodio (2 M). Ajuste el volumen a 1 L. Estable por aproximadamente 3 meses a 4 °C. A 100 mL de este Buffer agregue 50 mg de albúmina de suero bovino para dar una concentración de 0,5 mg/mL.


**Este Buffer se utiliza para disolver el contenido de la botella 1 (preparación de sacarasa). El Buffer debe almacenarse por debajo de -10 °C.**

- **Buffer de acetato de sodio (100 mM, pH 4,5, Buffer 2).**

Agregue ácido acético glacial (5,8 mL) a 900 mL de agua destilada. Ajustar a pH 4.5 usando hidróxido de sodio 1M. Ajuste el volumen a 1 L. Estable por aproximadamente 3 meses a 4 °C.

#### 4.7 Extracción de fructanos.

- **Muestras que contienen entre 0-10% (p/p) de fructano.** Pesar con precisión aprox. 400 mg de la muestra en un tubo de ensayo y agregar 25 mL de agua destilada. Tape el tubo sin apretar. Coloque el tubo en un baño de agua hirviendo y caliente durante un total de 10 min. Después de 5 min, apriete la tapa del tubo y mezcle vigorosamente el contenido invirtiendo y agitando el tubo. Regrese el tubo al baño de agua hirviendo. Después de otros 5 min, retire el tubo del baño de agua hirviendo y vuelva a mezclar el contenido invirtiéndolo y agitando.
- **Muestras que contienen entre 10-40% (p/p) de fructano.** Pesar con precisión aprox. 100 mg de la muestra en un tubo de ensayo y agregar 25 mL de agua destilada. Tape el tubo sin apretar. Coloque el tubo en un baño de agua hirviendo y caliente durante un total de 10 min. Después de 5 min, apriete la tapa del tubo y mezcle vigorosamente el contenido invirtiéndolo y agitando. Regrese el tubo al

	<b>Procedimiento para la determinación de frúctanos</b> <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-167</b>
		<b>Revisión: 2</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2024-09-10</b>

baño de agua hirviendo. Después de otros 5 min, retire el tubo del baño de agua hirviendo y vuelva a mezclar el contenido invirtiéndolo y agitando.

En cada caso, deje que el contenido del tubo se enfríe a temperatura ambiente y luego transfiera aproximadamente 2,0 ml a tubos de microcentrífuga de 2,0 ml y centrifugue a 3500 rpm durante 5 min.

**NOTA:** Para muestras que contienen 40-100% (p/p) de fructano, agregue 1 mL de extracto centrifugado a 2 mL de agua y continúe con el ensayo.

#### 4.7.1 Eliminación de sacarosa, almidón y azúcares reductores.


- Dispense con precisión una alícuota de 0,2 ml de la solución a analizar (que contiene aproximadamente 0,1-1,0 mg/ml de fructano) en el fondo de un tubo de ensayo.
- Agregue 0,2 mL de solución diluida de sacarasa/amilasa (solución enzimática A) e incubar el tubo a 30 ° C durante 30 min.

**NOTA:** Si las muestras contienen niveles muy altos de sacarosa y maltodextrinas (por ejemplo, formulaciones de leche para bebés), aumente este tiempo de incubación a 60 minutos para asegurar la hidrólisis completa de estos oligosacáridos.

- Agregue 0,2 mL de Reactivo 3 (solución alcalina de borohidruro) al tubo, revuelva vigorosamente y cubra los tubos con Parafilm®. Incubar los tubos a 40 ° C durante 30 min para efectuar la reducción completa de azúcares reductores a alcoholes de azúcar.
- Agregue 0,5 mL del Reactivo 4 (ácido acético 200 mM) al tubo con agitación vigorosa en un mezclador de vórtice. **Debe observarse una vigorosa efervescencia** (este tratamiento elimina el exceso de borohidruro y ajusta el pH a aproximadamente 4,5). Esto se denomina **Solución S**.

#### 4.7.2 Hidrólisis y medición de frúctanos.

- Transfiera con precisión y cuidado alícuotas de 0,2 ml de Solución S. En el fondo de 2 tubos de ensayo.
- Agregue 0.1 mL de solución de fructanasa (Solución enzimática B) a 1 de estos tubos (muestras) y 0,1 ml de Buffer de acetato de sodio 100 mM al tercer (blanco).

	Procedimiento para la determinación de frúctanos <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-167</b>
		<b>Revisión:</b> 2
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2024-09-10</b>

- Incubar los tubos a 40 °C durante 30 min para efectuar la hidrólisis completa de fructano a D-fructosa y D-glucosa. Selle los tubos con Parafilm<sup>®</sup> durante la incubación.
- Añada 5,0 ml del reactivo de trabajo PAHBAH a todos los tubos, muestras, blanco, el estándar de D-fructosa (ver numeral 4.8), blanco de reactivo y el extracto de la inulina/celulosa control y el control de levanas/celulosa] e incubar en un baño de agua hirviendo durante **exactamente 6 min.**
- Retire los tubos del baño de agua hirviendo y colóquelos inmediatamente en agua fría (18-20 °C) durante aprox. 5 minutos.
- Mida la absorbancia de todas las soluciones a 410 nm frente al blanco de reactivo. Mida los valores de absorbancia lo antes posible después de enfriar los tubos.

**NOTA:** El complejo de color PAHBAH se desvanece con el tiempo.

#### 4.8 Precauciones.

- El tiempo de incubación a 100 °C (agua hirviendo) con el reactivo PAHBAH es crítico y debe cronometrarse con un cronómetro.
- Si la muestra que se analiza contiene oligosacáridos de galactosilsacarosa, Estos pueden eliminarse mediante incubación con *A. niger*  $\alpha$ -galactosidasa.


#### 4.9 Cálculos.

Para el cálculo de los fructanos presentes en la muestra, se hace uso de la plantilla de cálculo MEGACALC FRUCTANOS, la cual es proporcionada en el sitio web de megazyme. Además, se lleva un orden de trazabilidad en el SOFT-TC-127 Cuadro de mando para el ensayo de Fructanos.

A continuación, se expresan los cálculos realizados en la plantilla MEGACALC FRUCTANOS

$$\begin{aligned}
 &= \Delta A \times F \times 25 \times \frac{1.1}{0.2} \times \frac{100}{W} \times \frac{100}{W} \times \frac{1}{1000} \times \frac{162}{180} \times D \\
 &= \Delta A \times \frac{F}{W} \times 61.9 \times D
 \end{aligned}$$

Donde,

	<b>Procedimiento para la determinación de frúctanos</b> <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-167</b>
		<b>Revisión: 2</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2024-09-10</b>

- $\Delta A$ : absorbancia de la muestra - absorbancia del blanco de la muestra (ambos se leen contra el blanco de reactivo).
- F: factor para convertir los valores de absorbancia a  $\mu\text{g}$  de D-fructosa =  $(54,5 \mu\text{g D-fructosa}) / (\text{absorbancia para } 54,5 \mu\text{g D-fructosa})$ .
- 5 factor para convertir de 0,2 mL como se ensayó a 1,0 mL.
- 25 volumen (mL) de extracto usado-
- (1,1/0,2): 0,2 ml se tomaron de 1,1 ml de digestión enzimática para el análisis.
- W: Peso (mg) de la muestra extraída (es decir, 100 o 200 mg)
- (100/W): Factor para expresar fructanos como porcentaje del peso de la muestra
- (1/1000): Factor a partir del cual convertir  $\mu\text{g}$  a mg
- (162/180): Factor para convertir de D-fructosa libre, según se determine, a anhidra fructosa (y anhidra glucosa), como ocurre en el fructano.
- D: dilución adicional del extracto de muestra.


#### 4.10 Aseguramiento de calidad

Para asegurar y controlar la validez de los resultados se preparan y ensayan los siguientes controles en cada lote de análisis:

- Con cada conjunto de determinaciones, los reactivos en blanco y los controles de D-fructosa deben incluirse y analizarse al mismo tiempo.
- El blanco de reactivo consta de 0,3 ml de Buffer de acetato de sodio 100 mM (Buffer 2) más 5,0 ml de reactivo de trabajo PAHBAH.
- Los controles de D-fructosa se preparan añadiendo 0,2 ml de solución estándar de D-fructosa (1,5 mg / ml) a 0,9 ml de acetato de sodio 100 mM (pH 4,5) (Buffer 2) con una mezcla completa. Dispense alícuotas (0,2 mL) de esta solución (que contiene 54,5  $\mu\text{g}$  de D-fructosa), por cuadruplicado, en tubos de ensayo. Agregue 0,1 mL de Buffer 2 a cada tubo más 5,0 ml de reactivo de trabajo PAHBAH (inmediatamente antes de la incubación en el baño de agua hirviendo).
- Con cada conjunto de determinaciones se incluye un polvo de control de inulina/celulosa o con un polvo de control de levina/celulosa. En el SOFT-TC-127 Cuadro de mando para el ensayo de Fructanos se encuentran los límites establecidos por medio de cartas control.

**El contenido de fructano de estos polvos se indica en la etiqueta del vial.**

- Al polvo de control de sacarosa/celulosa debe ser analizado con cada nuevo lote de reactivos. Si el paso del tratamiento con sacarasa es completamente efectivo, el valor de fructano determinado debe ser de aproximadamente 0,2% (p/p).

	<b>Procedimiento para la determinación de frúctanos</b> <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-167</b>
		<b>Revisión: 2</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2024-09-10</b>

Si la sacarasa no es eficaz, el valor determinado reflejará el contenido de sacarosa del polvo de sacarosa/celulosa de control aproximadamente 10% (p/p).

- El estándar D-fructosa (cuadruplicado) y blanco de reactivo se procesan con cada lote de muestras y se incuban en el baño de agua hirviendo al mismo tiempo que las muestras.
- La efectividad de la reducción de borohidruro se puede verificar usando una solución estándar de D-fructosa (0.2 mL, 1.5 mg / mL) y partiendo del numeral 4.7.1 ítem a del procedimiento de ensayo. Tratamiento con enzima fructanasa (numeral 4.7.2 ítem e) se reemplaza con la adición de buffer acetato (0,1 ml a 0,1 M a un pH 4,5). La solución debe ser incolora después de la incubación con el reactivo de trabajo PAHBAH.
- Las absorbancias de las muestras analizadas no deben ser superiores a las obtenidas para las muestras de control de D-fructosa. Si la absorbancia de la muestra supera los valores de control, diluir más la muestra para conseguir una absorbancia adecuada.

#### 4.11 Registros

Los resultados se registran de la siguiente manera:

Los datos serán registrados en el formato FOR-TC-158 "Formato para el registro de determinación de Fructanos".

Los resultados serán guardados en la carpeta L:\LABORATORIO\REGISTROS\REGISTROS RT\Cuadros de Mando\Cuadros de Mando AÑO\ANTIOXIDANTES\FRUCTANOS y en cada carpeta guardar el archivo según se requiera, así:


- Carpeta "Datos primarios MegaCal Fructanos": guardar archivo generado por el archivo proporcionado en el sitio web de Megazyme con el siguiente nombre **"MEGACALC ES-año-167-mes-día-LX"**.
- Carpeta "Registros espectrofluorímetro": guardar el archivo de lectura de absorbancias generado por el Gen 5 en el formato Gen5 Experiment (.xpt) con el siguiente nombre **"ES-año-167-mes-día-LX"**.
- Carpeta "Reportes Gen 5": guardar archivo de las absorbancias en formato PDF con el siguiente nombre **"ES-año-167-mes-día-LX"**.

ES: espectrofluorímetro

Año: los dos últimos dígitos del año en curso

Mes: número del mes en que se realizó el análisis

Día: día en que se realizó el análisis

	<b>Procedimiento para la determinación de frúctanos</b> <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-167</b>
		<b>Revisión: 2</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2024-09-10</b>

X: número de análisis realizado en el día

#### 4.12 Determinación del grado de subestimación del contenido de fructanos como consecuencia de la reducción de borohidruro de la inulina hidrolizada.


- Pesar con precisión aprox. 40 mg de FOS o fructano puro en un tubo de ensayo y agregue 40 ml de agua destilada. Tape el tubo sin apretar. Calentar el tubo en un baño de agua hirviendo durante 10 minutos para disolver el fructano y agitar el contenido del tubo en un mezclador vórtex después de 5 y 10 minutos.
- Deje que la solución se enfríe a temperatura ambiente y luego mezcle bien el contenido del tubo.
- Dispense con precisión una alícuota de 0,2 ml de la solución en el fondo de un tubo de ensayo y agregue 0,2 ml de buffer acetato de sodio 100 mM, pH 4,5 (buffer 2) y mezcle bien.
- Continúe con el procedimiento estándar de Fructano desde el paso 4.7.2 y mida la absorbancia contra el tubo que no tuvo incubación con fructanasa. Esto da la absorbancia para la muestra de fructano reducido en borohidruro (BRF).
- En un experimento paralelo, transfiera 0,2 ml de solución del paso 3 y agregue 0,9 ml de buffer de acetato de sodio 100 mM, pH 4,5 (buffer 2) al tubo con agitación vigorosa.
- Transfiera con precisión y cuidado alícuotas de 0,2 ml de esta solución al fondo de tres tubos de ensayo de vidrio (16x100 mm) y proceda con la hidrólisis de fructano de acuerdo con el procedimiento estándar de Fructano. Esto da la absorbancia para la muestra de fructano reducido sin borohidruro (NBRF).
- Calcular el porcentaje de recuperación de fructano en el estándar procedimiento siguiente a la reducción de borohidruro como:

$$\text{Porcentaje de recuperación} = \text{absorbancia BRF} / \text{absorbancia NBRF} \times 100$$

#### 4.13 Especificidad, sensibilidad, linealidad y precisión

El ensayo es específico para todos los tipos de fructanos, incluidos; los que contienen mayoritaria o exclusivamente (2→1) enlaces fructosil-fructosa (inulina); aquellos conambos (2→1) y (2→6) enlaces fructosil-fructosa en cantidades significativas (por ejemplo, los de cebolla, Gramíneas y Agave); y los que contienen principal o exclusivamente (2-6) enlaces fructosil-fructosa (levan). Los FOS reducidos con borohidruro se hidrolizan liberando D-manitol del extremo del "extremo reductor".

Los niveles de trazas de fructano en el grano de cereal se pueden medir sin contribución a la reducción del nivel de azúcar por hidrólisis parcial de enlaces mixtos. B- glucano. Si es probable que la muestra contenga oligosacáridos de galactosil-sacarosa (p. Ej. Rafinosa), estos deben eliminarse mediante hidrólisis con  $\alpha$ - galactosidasa.

	<b>Procedimiento para la determinación de frúctanos</b> <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-167</b>
		<b>Revisión: 2</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2024-09-10</b>

La absorbancia de diferenciación más pequeña para el ensayo es de 0,010 unidades de absorbancia. Esto corresponde a 12,8 µg/mL de D-glucosa más D-fructosa en el extracto de muestra que se analiza. El límite de detección es 25,6 µg de D-fructosa o D-glucosa por ml de extracto de muestra, que se deriva de una diferencia de absorbancia en el ensayo de 0,02.

El ensayo es lineal en el rango de 2,3 a 55 µg de D-fructosa o D-glucosa por ensayo. En determinaciones duplicadas usando una solución de muestra, puede ocurrir una diferencia de absorbancia de 0.005 a 0.010, esto corresponde a un nivel de D-fructosa o D-glucosa de 0,023-0,046 µg por ensayo.

**INTERFERENCIA:** Las sustancias que interfieren en la muestra que se analiza se pueden identificar mediante la inclusión de un patrón interno de inulina o levano. Se esperaría una recuperación cuantitativa de este estándar. Las pérdidas en la manipulación y extracción de muestras se identifican mediante la realización de experimentos de recuperación, es decir, añadiendo inulina o levano a la muestra en los pasos iniciales de extracción. ]

## 5. RESPONSABILIDADES.


### 5.1 Director técnico.

- Asegurar la aplicación del presente documento y tomar decisiones en casos especiales no contemplados.
- Revisar y aprobar los informes técnicos una vez han sido revisados por el Líder de Laboratorio.
- Asesorar y orientar los analistas en la resolución de dudas e inconvenientes surgidos durante el desarrollo de los ensayos.
- Realizar o revisar las investigaciones pertinentes a los trabajos no conformes derivados de la ejecución del método y autorizar las indicaciones a seguir.
- Establecer los casos en los cuales se realiza la retención de muestras.
- Aprobar los informes técnicos una vez han sido revisados por el Líder de Laboratorio.

### 5.2 Director de Calidad.

- Asegurar la aplicación del presente documento y tomar decisiones en casos especiales no contemplados.
- Realizar y registrar las investigaciones pertinentes a los trabajos no conformes derivados de la ejecución del método.
- Archivar los registros técnicos relacionados con los ensayos.

### 5.3 Líder de Laboratorio.

	<b>Procedimiento para la determinación de frúctanos</b> <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-167</b>
		<b>Revisión: 2</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2024-09-10</b>

- Asegurar la aplicación del presente documento por el personal subordinado o supervisado.
- Revisar los resultados ingresados por el analista, haciendo seguimiento de la trazabilidad del análisis (Cuadros de mando, formato de solicitud de servicio y salvaguardia de muestras, formatos de datos primarios) antes de enviar el informe final al director técnico.
- Realizar la revisión de resultados teniendo en cuenta la normativa vigente si esta aplica.
- Informar al director técnico las desviaciones que se den durante el desarrollo del método.
- Reportar y registrar los trabajos no conformes derivados del análisis al líder de calidad y al director técnico.
- Informar los casos en los que se deben de retener las muestras.
- Supervisar el cumplimiento de las actividades de aseguramiento de calidad.

#### 5.4 Analista.

- Seguir todas las instrucciones establecidas en este procedimiento y en el reglamento del laboratorio
- Ingresar y entregar todos los resultados en los tiempos pactados.
- Entregar formatos de datos primarios completamente diligenciados al líder del laboratorio.
- Realizar revisión de datos primarios y cálculos realizados en los cuadros de mandos, informar al líder del laboratorio en caso de observar alguna desviación en los resultados obtenidos teniendo en cuenta las cartas control.
- Registrar los resultados de los ensayos de control de calidad y hacer el análisis de tendencias de estos.
- Realizar la revisión de resultados teniendo en cuenta la normativa vigente si esta aplica.
- Informar al líder de laboratorio las desviaciones que se den durante el desarrollo del método.
- Reportar y registrar los trabajos no conformes derivados del análisis al líder del laboratorio.
- Informar cualquier incidente que suceda durante la realización del método. ]

#### 6. FORMATOS RELACIONADOS.

- [FOR-TC-158 "Formato para el registro de determinación de Fructanos".
- SOFT-TC-127 "Cuadro de mando para el ensayo de Fructanos".

]

<b>aoxlab</b>	Procedimiento para la determinación de frúctanos <b>AOXLAB S.A.S</b>	Identificación: <b>PROC-TC-167</b>
		Revisión: <b>2</b>
		Inicio de vigencia: <b>2024-09-10</b>

7. ANEXOS.

[https://www.megazyme.com/documents/Assay\\_Protocol/K-FRUC\\_DATA.pdf](https://www.megazyme.com/documents/Assay_Protocol/K-FRUC_DATA.pdf)  
[FRUC\\_CALC.xlsx \(live.com\)](#)