

Glycérol Assay

Procédure No. R51065

Réactifs pour la mesure du glycérol par photométrie en UV, dans des échantillons alimentaires.

Méthode UV pour environ 3 x 8 tests
Usage *in vitro* uniquement
Conserver entre +2 et +8 °C

Méthode

Test enzymatique en UV utilisant la Glycerokinase, l'héxokinase ADPdépendante et la Glucose-6-phosphate-Déshydrogénase.

Principe

Glycérol + ATP $\xrightarrow{\text{GK}}$ L-Glycérol-3-phosphate + ADP
ADP + D-Glucose $\xrightarrow{\text{ADP-HK}}$ D-Glucose-6-phosphate + AMP
D-Glucose-6-phosphate + NAD $\xrightarrow{\text{G6P-DH}}$ Gluconate- δ -lacton-6-phosphate + NADH + H⁺

Stockage et stabilité des réactifs

Les réactifs sont stables jusqu'à la fin du mois de la date de péremption indiquée, à condition de les stocker entre 2 et 8 °C, et en évitant toute contamination. Ne pas congeler les réactifs!

Avertissements et précautions

- Les réactifs contiennent de l'azide de sodium (0,95 g/l) comme conservateur. Ne pas avaler! Éviter tout contact avec la peau et des membranes muqueuses.
- Prendre les précautions nécessaires à l'utilisation de réactifs de laboratoire.

Préparation des réactifs

Les réactifs ainsi que les standards sont prêts à l'emploi.

Matériel requis mais non fourni

Eau distillée (aseptique et sans métaux lourds) et équipement général de laboratoire.

Contenu du coffret

R1 (4 x 20.8 ml) Tampon pH 7,5
D-Glucose 10 mmol/l
GK \geq 500 U/l
ADP-HK \geq 500 U/l
G6P-DH \geq 5000 U/l
R2 (4 x 5.5 ml) Tampon pH 6,0
NAD \geq 20 mmol/l
ATP \geq 1 mmol/l

Préparation des échantillons

Si l'échantillon présente l'une des caractéristiques suivantes, lesquelles perturbent le test, suivre la méthode de préparation correspondante.

- Utiliser des échantillons liquides claires, transparents et pratiquement neutres. Si nécessaire diluer l'échantillon pour une concentration en Glycérol comprise entre 40 et 260 mg/l.
- Filtrer ou centrifuger les solutions troubles.
- Éliminer le gaz carbonique contenu dans l'échantillon.
- Ecraser ou homogénéiser les échantillons solides et semi-solides. Peser la quantité suffisante d'échantillon dans une flasque volumétrique (attention au domaine de mesure), extraire avec de l'eau et filtrer, centrifuger ou utiliser une clarification CARREZ si nécessaire.

- Peser une quantité suffisante d'échantillon contenant des matières grasses dans une flasque volumétrique (attention au domaine de mesure), extraire avec de l'eau chaude. Refroidir pour permettre la séparation des graisses, placer la flasque dans de l'eau glacée pendant 15 min et filtrer. On peut aussi clarifier avec les réactifs de Carrez après l'extraction.
- Ajuster les échantillons acides à un pH de 8-9, en ajoutant de l'hydroxyde de potassium ou de sodium, et laisser incubé pendant environ 15 min.
- Traiter les échantillons très colorés avec du Polyvinyl Polypyrrolidon (PVPP, par exemple 1g/100ml d'échantillon) ou mesurer chaque échantillon avec un blanc échantillon au lieu d'un blanc réactif (si nécessaire ajuster à un pH de 9). Se reporter au mode opératoire ci-dessous.
- Pour les échantillons protéiques, utiliser la clarification de Carrez

Mode opératoire

Longueur d'onde: 340 nm, Hg 334 nm, Hg 365 nm
Chemin optique: 1 cm
Température: 20 – 25 °C / 37 °C
Mesure: Contre l'air ou l'eau

La mesure se fait toujours avec un blanc réactif (un pour chaque série). Le blanc échantillon est facultatif, il n'est utilisé que pour les échantillons pouvant conduire à une réaction parasite.

	Blanc réactif (BR)	Échantillon	Blanc échantillon (BE, facultatif)
Échantillon / Standard	-	100 μ l	100 μ l
Eau bi-distillée	100 μ l	-	-
Réactif 1	2000 μ l	2000 μ l	2000 μ l
Mélanger, incubé pendant 1 min. à 37 °C ou 3 min. à 20 - 25 °C, lire l'absorbance A1, et rajouter :			
Réactif 2	500 μ l	500 μ l	-
Eau bi-distillée	-	-	500 μ l

Mélanger, attendre la fin de la réaction (incubation d'environ 5 min. à 37°C ou 15 min. à 20 - 25°C) et lire l'absorbance A2

Calcul des résultats

Mesure avec un blanc réactif (BR):
 $\Delta A = (A_2 - fd \times A_1)_{\text{échantillon}} - (A_2 - fd \times A_1)_{\text{BR}}$

Mesure avec un blanc échantillon (BE):
 $\Delta A = (A_2 - fd \times A_1)_{\text{échantillon}} - (A_2 - fd \times A_1)_{\text{BE}}$

Avec fd = facteur de dilution de la densité optique, du fait des volumes de réactifs rajoutés pendant le test :

$fd = (\text{vol. échant.} + R1) / (\text{vol. échant.} + R1 + R2) = 0,808$.

Formule de calcul:

$c = (V \times PM \times \Delta A) / (\epsilon \times d \times v \times 1000)$ [g/l de glycérol]
avec:

V (volume total) = 2600 [μ l]
MW (masse moléculaire) = 92,1 [g/mol]
d (cuvette de mesure) = 1,00 [cm]
v (volume échantillon) = 100 [μ l]
 ϵ (coefficient d'extinction du NADH) [l x mmol⁻¹ x cm⁻¹]:
340 nm = 6,3 334 nm = 6,18 365 nm = 3,4

Pour les différentes longueurs d'onde, la formule est donc:

340 nm: $c_{\text{Glycérol}} [\text{g/l}] = 0,380 \times \Delta A$

334 nm = $0,388 \times \Delta A$

365 nm = $0,704 \times \Delta A$

La formule doit être recalculée lorsqu'un paramètre est modifié, par ex. le volume de l'échantillon.

Si l'échantillon a été dilué, multiplier la concentration calculée par le facteur de dilution.

Échantillons solides:

$\text{Conc}_{\text{Glycérol}} [\text{g}/100 \text{ g}] = \frac{\text{C}_{\text{Glycérol}} [\text{g}/\text{échantillon}]}{\text{poids}_{\text{échantillon}} [\text{en g}/\text{échantillon}]}$

Calibration / contrôle de qualité

Pour calibrer le test sur des automates de biochimie, ou pour contrôler la qualité des résultats en utilisation manuelle, utiliser le kit Enzytec Fluid Standard Glycérol (réf. 5480, 3 x 3 ml). Le standard est prêt à l'emploi.

Performances et caractéristiques du test

Domaine de mesure:

Le test a été développé pour déterminer la concentration en Glycérol dans un domaine de mesure entre 10 et 250 mg/l (mesuré à 340 nm). Lorsque les valeurs dépassent le domaine de mesure, les échantillons doivent être dilués avec de l'eau distillée pour rentrer dans ce domaine de mesure. Multiplier le résultat obtenu par le facteur de dilution.

Spécificité:

Le test est spécifique du Glycérol. Grâce à la faible activité de la GK, la Dihydroxyacétone n'est pas mesurée.

Sensibilité:

1,0 mg/l, mesurés à 340 nm.
La sensibilité correspond à la plus petite concentration statistiquement différente de la concentration zéro. Elle est calculée à partir de trois écarts types d'un échantillon zéro (sans glycérol) mesuré 20 fois de suite.

Gestion des déchets

Suivre les recommandations légales en vigueur.

For any information (technical service call, ordering,...), please contact Interchim 213 av. JF Kennedy, BP 1140 – 03 103 Montluçon (France)
Phone: +33 4 70 03 73 06 (hot line) ; Fax +33 4 70 03 82 60
e-mail: interbiotech@interchim.com ; web : <http://www.interchim.com>

Rev.H09E