

Préparation et purification des échantillons pour tests enzymatiques
Pour 20 échantillons

Réactifs de laboratoire uniquement
Conserver entre +2 et +8°C

Principe

Le kit de préparation échantillons (E2250) **peut être** nécessaire comme étape pré-analytique, par exemple pour la détermination de l'acide oxalique, **mais n'est pas obligatoire**.

Le kit de préparation contient du charbon actif, lequel permet d'éliminer les odeurs, la couleur et toutes les substances réductrices (y compris l'acide ascorbique jusqu'à une certaine concentration). Il fonctionne selon deux modes d'action:

- chimique, par l'action oxydative de l'oxygène emprisonné dans les pores entre les atomes de carbone
- physico-chimique, en particulier en adsorbant et emprisonnant les substances organiques

Pour la réalisation du test Acide oxalique, suivre la fiche technique du coffret Enzytec™ Acide oxalique kit (réf. E2100).

Réactifs

Réactif 1: **Sample Purifier (purifiant échantillon)**, 20 tubes (poudre de charbon actif), prêts à l'emploi.

Réactif 2: **Sample Diluent (diluant échantillon)**, 1 x 10 ml (liquide, 5x conc.). Ajouter 40 ml d'eau distillée au diluant et mélanger doucement jusqu'à homogénéité complète. Stabilité: 3 mois à 2-8°C.

Les réactifs 1 et 2 sont prêts à l'emploi. Ils sont stables entre 2 et 8 °C jusqu'à la date de péremption indiquée, à condition de ne pas être contaminés durant leur utilisation. Après reconstitution, le réactif 2 est stable 3 mois à 2 – 8°C.

Amener les réactifs jusqu'à température ambiante avant utilisation. Mélanger doucement avant pipetage. Fermer immédiatement après utilisation. Les réactifs doivent être utilisés de manière adéquate pour éviter toute contamination.

Les réactifs ne sont pas dangereux pour la santé. Appliquer les précautions habituelles en vigueur dans le laboratoire. Après usage, les réactifs doivent être éliminés comme déchets de laboratoire. Les emballages peuvent être recyclés.

Collecte et conservation des échantillons

Ne pas utiliser le kit de préparation des échantillons avec le standard du coffret acide Oxalique (E2100), ni celui d'aucun autre coffret. Si un standard est utilisé avec le coffret E2250, il n'y a rien d'autre que l'analyte lui-même (par exemple l'acide oxalique) et une partie va être emprisonnée par le charbon actif, ce qui va donner des résultats trop bas.

a.) Échantillons alimentaires

- L'acide oxalique est stable à pH faible (<3,3). Si le pH est au-dessus de 7,5, l'oxalate se transforme en CO₂ et sera perdu. Mais l'augmentation du pH augmente la solubilité de l'oxalate de calcium. Ainsi la préparation des échantillons devra être effectuée entre pH 5,0 et 7,0, ce qui est assez haut pour garder le Ca-oxalate en solution, et assez bas pour protéger l'acide oxalique.
- S'il n'est pas nécessaire de solubiliser le Ca-oxalate, ajuster le pH de l'échantillon à 2,9 – 3,1.
- Dans certains cas, l'acide oxalique et ses sels doivent être libérés : ajuster l'échantillon à pH 3,0 avec HCl (1 M) et faire bouillir dans un bain-marie pendant 15-30 minutes. L'acide oxalique est stable à pH faible, et l'ébullition va forcer l'hydrolyse du Ca-Oxalate. Il n'est pas nécessaire de corriger le pH après ébullition, car le pH à 3,0 est parfaitement adapté aux conditions du test acide oxalique.

b.) Autres échantillons

- Collecter les échantillons (24 h) dans un flacon en verre ou en plastique contenant 10 mL d'acide chlorhydrique concentré. Enregistrer le volume en litres. Comme les échantillons sont acidifiés, l'acide oxalique est stable et les échantillons peuvent être stockés pendant **7 jours** au frigo ou congelés.
- Utiliser des échantillons frais dont la teneur en vitamine C est < 16 mmol/L (des concentrations supérieures à cette limite peuvent affecter les résultats).

Préparation des échantillons

1. Préparer le diluant échantillon (réactif 2) comme décrit plus haut.
2. Préparer une série de tubes vides pour les échantillons et les contrôles, et les identifier adéquatement.
3. Pipeter 5 ml d'échantillon/contrôle dans le tube correspondant (le volume peut être réduit si les 5 ml ne sont pas disponibles).
4. Ajouter dans les tubes 2,5 ml de diluant échantillon (réactif 2 dilué), puis 2,5 ml d'eau distillée, puis mélanger.
5. **NOTE IMPORTANTE POUR L'ACIDE OXALIQUE**
Le pH doit être ajusté entre 5,0 et 7,0 avec HCl/NaOH (1N):
 - le pH du réactif 2 est à env. 8,2 – 8,5
 - si l'échantillon a été stocké avec de l'acide chlorhydrique (voir plus haut), le pH après l'étape 4 sera de 5,0-7,0, et une correction ne sera normalement pas nécessaire
 - si l'échantillon a été préparé de manière différente (mais toujours avec pH < 7,0), ajuster le diluant échantillon à pH 5,0 – 7,0 avant de l'utiliser pour l'étape 4, de façon à ce que le pH ne dépasse jamais pH 7,0.
6. Préparer une série de tubes purifiants échantillons (réactif 1) pour les échantillons et les contrôles, et les identifier adéquatement.
7. Pipeter 4 ml d'échantillons et contrôles DILUÉS (voir points 4 et 5) dans les tubes purifiants échantillons (voir point 6.) et mélanger de temps en temps pendant 5 min. Nous conseillons d'utiliser un mélangeur rotatif.
8. Centrifuger les tubes pendant 10/15 minutes à 3500 tpm (2600 x g) ou filtrer sur papier filtre. Ou alors, placer 0,5 ml de solution dans un ultrafiltre (ex. Millipore Ultrafree-MC, UFC30HV00) et centrifuger pendant 3 min à 4000 t/min.
9. Prélever l'échantillon au milieu du surnageant, et non à la surface, et utiliser dans le test désiré (par ex. l'acide oxalique).
10. Penser à multiplier les résultats par le facteur de dilution 2 (si le volume échantillon sous le point 3 est inférieur à 5 ml, calculer le facteur de dilution correspondant).
11. **Le Standard du coffret Enzytec™ Acide Oxalique (E2100) ne doit pas suivre cette méthode de préparation, il est prêt à l'emploi pour la procédure analytique.**

Note:

Ce coffret peut être utilisé avec d'autres tests que le coffret Enzytec™ Acide Oxalique E2100. Dans ce cas, il est nécessaire d'adapter le protocole à l'échantillon d'une part, et au test utilisé d'autre part:

- ajuster le volume échantillon sous le point 3 selon la concentration de l'analyte dans l'échantillon
- ajuster le pH sous le point 5 selon le test enzymatique utilisé
- effectuer des tests d'ajout dosé et vérifier que le recouvrement = 95 - 105%.