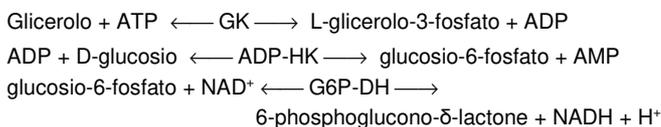


Determinazione enzimatica del glicerolo in alimenti ed altre matrici
2 x 50 ml R1 and 2 x 12.5 ml R2 – 50 test (manuale) / ≥ 500 test (analizzatore automatico)

Solo per uso *in vitro*
Conservare tra +2 - +8 °C

Principio

Test enzimatico con glicero-chinasi (GK), esochinasi ADP-dipendente (ADP-HK) e glucosio-6-fosfato deidrogenasi (G6P-DH). Il glicerolo viene fosforilato dalla glicero-chinasi e ATP in L-glicerolo-3-fosfato più ADP. Il D-glucosio viene poi fosforilato dall'enzima ADP-HK in glucosio-6-fosfato. In presenza di G6P-DH, il glucosio-6-fosfato è ossidato con la produzione di NADH:



La quantità di NADH formato è equivalente alla quantità iniziale di glicerolo e viene misurata a 340 nm.

Reagenti

- I reagenti sono pronti all'uso
- Reagente 1: 2 x 50 ml (Buffer / NAD)
- Reagente 2: 2 x 12.5 ml (GK, ADP-HK, G6P-DH)

Tutti i reagenti sono stabili fino alla fine del mese di scadenza indicato, anche dopo ripetute aperture se non contaminati durante l'utilizzo, e se conservati a temperatura compresa tra 2 e 8°C. Non congelare i reagenti. Portare i reagenti a temperatura ambiente (20-25°C) prima dell'utilizzo.

Applicare le comuni norme di sicurezza necessarie in un laboratorio chimico. Non ingerire. Evitare il contatto con la pelle e le mucose. Questo kit può contenere sostanze pericolose. Per informazioni sul rischio delle sostanze contenute, fare riferimento alla scheda di sicurezza (MSDS) di questo prodotto, disponibile on line sul sito www.r-biopharm.com. Dopo l'impiego, i reattivi devono essere eliminati come rifiuti di laboratorio. Gli imballaggi possono essere riciclati.

Preparazione dei campioni

- I campioni liquidi e limpidi possono essere analizzati tal quali, o dopo diluizione nell'intervallo di concentrazione opportuno (vedi sezione Performance del test)
- Filtrare o centrifugare le soluzioni torbide
- Degassare i campioni contenenti anidride carbonica
- Chiarificare i campioni contenenti proteine con il reattivo di Carrez
- Macinare ed omogeneizzare i campioni solidi o semi-solidi ed estrarli in acqua (es. 30 min a 60-70°C). Filtrare o centrifugare, o chiarificare con reattivo di Carrez se necessario
- Per campioni contenenti grassi, estrarre in acqua calda, raffreddare per permettere la separazione del grasso (in frigorifero o congelatore), rimuovere la linea di grasso dalla superficie e filtrare la soluzione acquosa

Procedure operative

Lunghezza d'onda: 340 nm
Cammino ottico: 1 cm
Temperatura: 37 °C / 20 - 25 °C
Misurazione: contro acqua distillata

	Bianco Reagente (RB)	Campioni / Controlli
Reagente 1	2000 µl	2000 µl
Campione/Controllo	-	100 µl
Acqua distillata	100 µl	-
Mescolare, incubare a 37°C per 1 min oppure a 20-25°C per 3 min. Leggere l'assorbanza A ₁ , quindi aggiungere:		
Reagente 2	500 µl	500 µl
Mescolare, incubare a 37°C per 5 min oppure a 20-25°C per 10 min. Leggere l'assorbanza A ₂		

Il bianco reagente va ripetuto ad ogni sessione analitica e sottratto ad ogni campione.

Calcolo dei risultati

Calcolo nella soluzione campione:

$$\Delta A = (A_2 - df \times A_1)_{\text{campione}} - (A_2 - df \times A_1)_{\text{RB}}$$

df: Fattore di diluizione
RB: Bianco reagente

$$df = \frac{(\text{volume campione} + R1)}{(\text{volume campione} + R1 + R2)} = 0.808$$

$$C_{\text{Glicerolo}} [\text{g/l}] = \frac{(V \times MW \times \Delta A)}{(\epsilon \times d \times v \times 1000)}$$

V: Volume totale [ml] = 2.600
MW: Peso molecolare [g/mol] = 92.10
d: Cammino ottico [cm] = 1.00
v: Volume di soluzione campione [ml] = 0.100
ε: Coefficiente di estinzione molare NADH [l/mmol x cm] = 6.3 (a 340 nm)

Per una determinazione a 340 nm:

$$C_{\text{Glicerolo}} [\text{g/l}] = 0.3801 \times \Delta A$$

Calcolo per campioni solidi:

$$\text{Contenuto Glicerolo} [\text{g/100 g}] = \frac{C_{\text{Glicerolo}} [\text{g/l}]}{\text{peso}_{\text{campione}} [\text{g/l}]} \times 100$$

Performance del test

Specificità

La determinazione è specifica per il glicerolo. Il di-idrossiacetone (< 0.3 g/l) e il D-glucosio/D-fruttosio o saccarosio (< 50 g/L) non danno interferenze significative nella determinazione del risultato.

Linearità ed intervallo di misura

Il test è lineare fino a 1 g/l di glicerolo. L'intervallo di misura raccomandato è tra 8 e 800 mg/l. Per concentrazioni di glicerolo superiori, diluire il campione con acqua distillata per riportarlo nel range di misura. Il fattore di diluizione deve essere considerato nel calcolo dei risultati.

Sensibilità

Il Limite di Rilevabilità (LoD) ed il Limite di Quantificazione (LoQ) è stato determinato in accordo con la norma DIN 32645:2008-11 in soluzione tampone:

- LoD = 4.0 mg/l
- LoQ = 8.0 mg/l

Automazione

Su richiesta, sono disponibili applicazioni su analizzatori automatici.

Dichiarazione liberatoria

I dati corrispondono al nostro attuale stato di tecnologia e forniscono informazioni sui nostri prodotti e sul loro uso. R-Biopharm non fornisce alcuna garanzia, esplicita o implicita, oltre a quella relativa alla qualità standard dei materiali di cui sono costituiti i suoi prodotti. Nel caso tali materiali risultassero difettosi, R-Biopharm si impegna a fornire prodotti sostitutivi. Non esiste garanzia di commerciabilità o di idoneità del prodotto per uno scopo particolare. R-Biopharm non è da ritenersi responsabile per danni, ivi compresi danni speciali o indiretti, o spese derivanti direttamente o indirettamente dall'utilizzo del prodotto.