

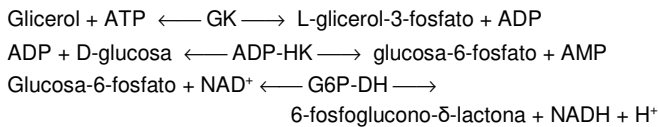
$$\Delta A = (A_2 - df \times A_1)_{\text{sample}} - (A_2 - df \times A_1)_{\text{RB}}$$

Ensayo enzimático para la determinación de glicerol en alimentos y otras muestras
2 x 50 ml R1 y 2 x 12.5 ml R2 – 50 ensayos (manual) / ≥ 500 ensayos (auto analizador)

Para uso sólo *in vitro*
Almacenar entre 2 - 8 °C

Principio

Ensayo enzimático UV con glicerolkinasa (GK), hexoquinasa ADP dependiente (ADP-HK) y Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6P-DH). El glicerol es fosforilado por ATP y glicerolkinasa a L-glicerol-3-fosfato más ADP. La D-glucosa es luego fosforilada por ADP-HK a glucosa-6-fosfato. En presencia de G6P-DH, la glucosa-6-fosfato es oxidada con producción de NADH:



La cantidad de NADH formada es equivalente a la cantidad inicial de glicerol y es medida a 340 nm.

Reactivos

Los reactivos están listos para usar.

- Reactivo 1: 2 x 50 ml (Buffer / NAD)
- Reactivo 2: 2 x 12.5 ml (GK, ADP-HK, G6P-DH)

Los reactivos son estables hasta fin del mes de vencimiento, si se almacenan a 2 - 8 °C, aún luego de aperturas repetidas (si no se contaminan durante la manipulación). No congelar los reactivos. Dejar que los reactivos alcancen la temperatura de laboratorio antes de usar (20 - 25 °C).

Deben aplicarse las normas generales de seguridad para el trabajo en laboratorios químicos. No ingerir!. Evitar contacto con la piel y membranas mucosas.

El kit contiene sustancias peligrosas. Para las notas de seguridad de las sustancias contenidas, por favor refiérase a las hojas de seguridad del material apropiadas para este producto (MSDS) disponible en línea en www.r-biopharm.com. Luego de su uso, los reactivos pueden desecharse con el desecho del laboratorio. El material de empaque puede reciclarse.

Preparación de muestra

- Usar muestras líquidas y claras directamente o luego de diluirlas dentro del rango de medición (ver funcionamiento del ensayo)
- Filtrar o centrifugar soluciones turbias
- Degasificar muestras conteniendo dióxido de carbono
- Clarificar muestras conteniendo proteínas con clarificación de Carrez
- Moler y homogeneizar muestras sólidas o semisólidas y extraer con agua (ej. 30 min a 60 - 70°C). Filtrar o centrifugar, o aplicar clarificación de Carrez si es necesario
- Para muestras conteniendo grasa, extraer con agua caliente, enfriar para separar la grasa (refrigerador o hielo), remover la capa grasa y filtrar la capa acuosa

Procedimiento del ensayo

Longitud de onda: 340 nm
Paso óptico: 1 cm
Temperatura: 37 °C / 20 - 25 °C
Medición: Contra aire o contra aire

	Blanco de reactivo	Muestras / Controles
Reactivo 1	2000 µl	2000 µl
Muestra / Control	-	100 µl
Agua destilada	100 µl	-
Mezclar, incubar por 1 min a 37 °C o 3 min a 20 - 25 °C. Leer absorbancia A ₁ , luego agregar:		
Reactivo 2	500 µl	500 µl
Mezclar, incubar por 5 min a 37°C o 10 min a 20 - 25 °C. Leer absorbancia A ₂ .		

El blanco de reactivo debe realizarse una vez en cada corrida y debe sustraerse del resultado de cada muestra.

Cálculo de resultados

Cálculo de las soluciones de muestra:

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

df: factor de dilución
RB: Blanco de reactivo

$$df = \frac{(\text{volumen de muestra} + R1)}{(\text{volumen de muestra} + R1 + R2)} = 0.808$$

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

V: Volumen total [ml] = 2.600
MW: Peso molecular [g/mol] = 92.10
d: Paso óptico [cm] = 1.00
v: Volumen de muestra [ml] = 0.100
ε: Coeficiente de extinción NADH [l/mmol x cm] = 6.3 (a 340 nm)

Para la determinación a 340 nm esto resulta en:

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

Cálculo de muestras sólidas:

$$\text{Contenido}_{\text{Glicerol}} [\text{g}/100 \text{ g}] = \frac{C_{\text{Glicerol}} [\text{g/l}]}{\text{peso}_{\text{muestra}} [\text{g/l}]} \times 100$$

Funcionamiento del ensayo

Especificidad

El ensayo es específico para glicerol. La Dihidroxiacetona (< 0.3 g/l) y D-glucosa/D-fructosa o sacarosa (< 50 g/L) no tiene influencia significativa en la medición del resultado.

Linealidad & Rango de Medición

La linealidad es hasta 1 g/l glicerol. El rango de medición recomendado es entre 8 y 800 mg/l glicerol.

Si se excede el rango, las muestras deberán diluirse con agua destilada hasta una concentración de glicerol dentro del rango de medición. Debe tomarse en cuenta el factor de dilución en el cálculo.

Sensibilidad

El Límite de Dilución (LoD) y el Límite de Cuantificación (LoQ) fueron determinados de acuerdo al método DIN 32645:2008-11 en solución acuosa bufferada:

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

Automatización

Están disponibles por pedido las Notas de Aplicación para sistemas automatizados.

Descargo de responsabilidad

Los datos corresponden a nuestro estado actual de tecnología y proporcionan información sobre nuestros productos y sus usos. R-Biopharm no ofrece garantía de ningún tipo, ya sea expresa o implícita, excepto que los materiales con los que están hechos sus productos son de calidad estándar. Los productos defectuosos serán reemplazados. No hay garantía de comerciabilidad de este producto o de la idoneidad del producto para cualquier propósito. R-Biopharm no será responsable de ningún daño, incluidos los daños especiales o consecuentes, o los gastos que surjan directa o indirectamente del uso de este producto.