

# NITRATES / NITRITES ASSAY KIT (méthode enzymatique / colorimétrique)

Référence : NITRATES-100C  
(version : 112023-9)

## Kit de dosage enzymatique des Nitrates/Nitrites - Méthode enzymatique / colorimétrique (540nm)

- Précision, Economie et Sécurité des analyses.
  - Kit de 100 tests manuels.
  - Standard nitrates inclus dans le kit.

Unités de nitrates	En Europe
Gamme de mesure	2-44 ppm nitrates

## PRÉSENTATION DU TEST

Ce kit de détermination des nitrates est basé sur la réduction des nitrates en nitrites par l'enzyme Nitrate Réductase (NaR), à l'aide du donneur d'électrons naturel NADH. Les nitrites réagissent avec des réactifs et en phase acide pour développer une couleur visible. La concentration en nitrates dans l'échantillon à analyser est déterminée en mesurant l'absorbance de l'échantillon à 540nm par rapport à une gamme standard nitrates.

Les nitrates peuvent être déterminés dans les échantillons aqueux, les extraits de tissus végétaux, dans le sol et dans les aliments. Dans le cas des eaux de mer et les eaux salées, une note d'application est disponible. Merci de contacter notre service technique.

Le test est conçu pour mesurer les nitrates dans la gamme de 2.0 à 44 ppm nitrates. La concentration de nitrates peut également être exprimée en  $\mu\text{M}$ , auquel cas la gamme est de 36 à 714  $\mu\text{M}$  nitrates, ou en nitrates-N, auquel cas la gamme est de 0,5 à 10 ppm nitrates-N.

Les nitrites peuvent être déterminés en omettant l'enzyme NaR et le NADH du test (voir page 5).

*If testing seawater, salt water or brackish water, follow the blue instructions.*

*Chloride is a mild inhibitor of Nitrate Reductase. The color development when analyzing seawater is not as intense as other types of samples. Nitrate Standards prepared in salt water solves the problem.*

## COMPOSITION DU KIT

- **Tampon** (28 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,025 mM EDTA ; pH 7,5) – 3 tubes de 50 mL.
- **Color reagent #1** (1% Sulfanilamide dans HCl 3N) en poudre – 1 flacon pour 60mL.
- **Color reagent #2** (0.02% N-Naphthylethylenediamine dans l'eau désionisée) – 1 flacon pour 60mL.
- **NADH** sous forme lyophilisée (environ 2 mM NADH par tube) – 4 tubes dans une pochette avec dessicant.
- **Nitrate Réductase (NaR)** sous forme lyophilisée (1 unité par tube) – 4 tubes dans une pochette avec dessicant.
- **Diluant enzyme** – 4 ampoules scellée en plastique de 1mL.
- **Standard Nitrate (440 ppm nitrates)** – sous forme liquide – 1 tube de 1,5 mL.
- **Tubes microcentrifuges** – 6 tubes pour la préparation de la gamme standard nitrates.
- **Salt Water** – one 20 mL tube, green cap, only if you are testing seawater (not included in the kit) - may contain 0.22 ppm nitrates, giving your blank a slight pink color.

## MATERIELS NON FOURNIS

- Éprouvette graduée de 100 mL.
- Micropipettes à volume variable (10 à 100 µL et 100 à 1000µL).
- Vortex.
- Colorimètre ou Spectrophotomètre avec filtre à 540nm ± 20 nm et cuvettes (volume environ 2 mL).
- 100 tubes à essai 13 x 100 mm (propres et exempts de nitrates).
- Chronomètre.
- Eau distillée ou désionisée sans nitrates pour éviter un bruit de fond élevé.
- 15 mL d'acide chlorhydrique (HCl) concentré.
- Glace et récipient à glace.

## PRÉPARATION DES REACTIFS

**Étape 1 Tampon** – prêt à l'emploi. Laisser le tampon atteindre la température ambiante. Si besoin, placer le tampon dans un bain-marie à 30°C.

**Étape 2** Préparer une solution d'HCl (3N) en mélangeant 15 mL HCl concentré avec 45 mL d'eau désionisée. Mélanger.

**Étape 3** Ajouter **60 mL de la solution HCl 3N** dans le flacon **Color reagent #1**. Bien mélanger par agitation.

**Étape 4** Ajouter **60 mL d'eau désionisée** dans le flacon **Color reagent #2**. Bien mélanger par agitation.

**Étape 5** Sortir un tube de **NADH** de la pochette, ajouter **1,5 mL d'eau distillée ou désionisée** et refermer le tube. Mélanger en retournant le tube plusieurs fois. Garder le tube dans la glace pendant l'utilisation.

**Étape 6** Sortir un tube de **Nitrate Réductase (NaR)** de la pochette et tapoter légèrement sur le fond du tube avant ouverture (afin que l'enzyme soit au fond du tube). Sortir l'ampoule de **diluant de l'enzyme** et tapoter légèrement sur le fond du tube avant ouverture, puis couper à la main l'ampoule et vider la entièrement dans le tube de **NaR**. Refermer le tube et mélanger par inversion plusieurs fois. Laisser reposer à température ambiante pendant au moins 10 minutes en le mélangeant par inversion à 5 et 10 minutes. Garder le tube dans la glace pendant l'utilisation.

**Étape 7** Pour les tubes NADH et NaR non encore utilisés, répéter les étapes 5 et 6 au fur et à mesure des besoins.

## STABILITE DES REACTIFS

Les réactifs tels qu'ils sont fournis dans le kit sont stables **entre 2° et 8°C** jusqu'à la date de péremption inscrite sur le kit. Pour une plus longue conservation, l'enzyme NaR et le NADH peuvent être conservés au congélateur.

*Stabilité de l'enzyme NaR reconstituée :*

Les solutions d'enzyme NaR reconstituées avec le diluant enzyme, sont stables 7 jours entre 2° et 8°C (ou 6-12 mois à -20°C). Les étapes congélation/décongélation peuvent être répétées.

*Stabilité du NADH reconstitué :*

La solution NADH préparée est stable 7 jours entre 2° et 8°C. Pour une plus longue conservation (au-delà de 30 jours), la solution NADH peut être aliquotée et congelée.

## PRÉPARATION DE LA GAMME STANDARD

Transférer 1 mL du standard nitrates à 440 ppm dans un tube à essai contenant 9 mL d'eau distillée ou désionisée pour obtenir une solution à 44 ppm de nitrates. Utiliser les 6 microtubes (fournis dans le kit) pour préparer la gamme standard comme indiqué dans le tableau ci-dessous. Refermer les tubes et mélanger les par inversion avant utilisation.

**If you are testing seawater, use Salt Water (not provided) instead of deionized or distilled water to prepare standards.**

			Equivalence autres unités exprimées	
Volume à prélever du tube contenant 44 ppm nitrates (µL)	Volume d'eau distillée (µL)	Concentration (ppm nitrates)	Concentration (ppm nitrates-N)	Concentration (µM)
1000	0	44	10	712
750	250	33	7.5	534
500	500	22	5	356
250	750	11	2.5	178
100	900	4.4	1	71.2
50	950	2.2	0.5	35.6

## PROCÉDURE DU TEST

La procédure suivante est décrite pour des tests en simple. Pour une plus grande précision, des tests en double (duplicates) peuvent être réalisés.

### ÉLIMINATION DES DÉCHETS

Suivre les directives et la réglementation en vigueur. S'il n'y a aucune directive locale, verser et rincer abondamment la verrerie avec une grande quantité d'eau.

**Étape 1** Pipeter 50 µL d'eau distillée ou désionisée dans un tube réactionnel – « blanc réactif ». **If you are testing seawater, use Salt Water (not provided) instead of deionized or distilled water to prepare standards.**

**Étape 2** Pipeter 50 µL de chaque échantillons et standards dans des tubes réactionnels propres.

**Étape 3** Ajouter 900 µL de tampon dans chaque tube.

**Étape 4** Ajouter 50 µL de solution de NADH dans chaque tube. Boucher les tubes et mélanger bien.

**Étape 5** Pour démarrer la réaction, ajouter 40 µL de solution NaR dans chaque tube. Reboucher les tubes et bien mélanger.

**Étape 6** Laisser reposer les tubes ~20 minutes à température ambiante. (Remarque : le temps d'incubation n'est pas très critique mais il faudra au moins 20 minutes d'incubation pour que la réaction de réduction des nitrates soit complète).

**Étape 7** Ajouter 500 µL de la solution Color reagent #1 dans chaque tube. Bien mélanger au vortex.

**Étape 8** Ajouter 500 µL de la solution Color reagent #2 dans chaque tube. Bien mélanger au vortex.

**Étape 9** Laisser reposer les tubes ~10 minutes à température ambiante. Pour assurer une bonne homogénéité, mélanger le contenu des tubes brièvement au vortex.

**Étape 10** Faire l'auto-zéro du colorimètre ou spectrophotomètre à 540 nm ± 20 nm avec une cuvette remplie d'eau distillée ou désionisée. Puis, lire les absorbances de tous les tubes.

**Étape 11** Lire les absorbances des standards et des échantillons. (Remarque : pour une plus grande précision de résultats, lire les absorbances entre 10 et 30 minutes après la fin de la réaction de développement de couleur).

(Note : faire le zéro du colorimètre avec de l'eau distillée ; rincer la cuvette de lecture à l'eau distillée entre les mesures)

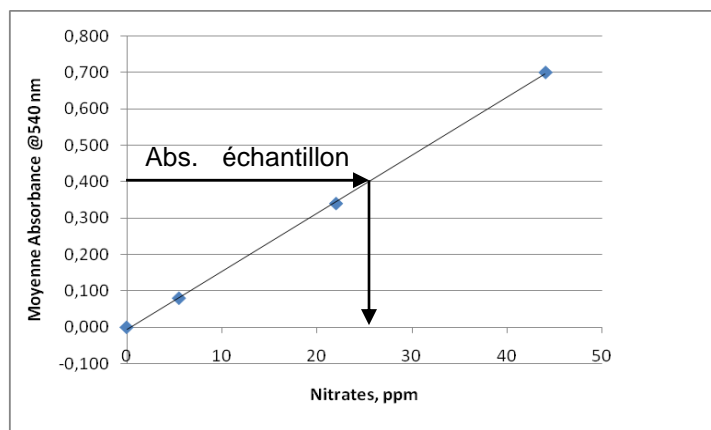
## CALCULS

**Étape 1** Corriger les absorbances de chaque standard et échantillon : Soustraire la moyenne des absorbances du blanc réactif de la moyenne des absorbances de chaque standard et échantillon.

(Moyenne absorbances corrigées) éch ou std = (moyenne absorbances) éch ou std – (moyenne absorbances) blanc réactif

**Étape 2** Générer une courbe d'étalonnage (linéaire) avec les standards nitrates (voir exemple ci-dessous) (ppm nitrates sur l'axe des x et la moyenne des absorbances corrigées pour chaque standard nitrates sur l'axe des y).

**Étape 3** En se reportant sur la courbe d'étalonnage, déterminer la concentration en ppm nitrates de chaque échantillon.



## ÉCHANTILLONS A HAUTE TENEUR EN NITRATES

Ce kit de dosage permet de déterminer la concentration en nitrates jusqu'à 44 ppm de nitrates (équivalent à 10ppm Nitrate-N ou 714  $\mu$ M nitrates). Si un des échantillons à tester dépasse les 44 ppm en nitrates, l'échantillon peut être dilué au 1/10<sup>ème</sup>. Par exemple, prendre 100  $\mu$ L de l'échantillon et ajouter 900  $\mu$ L d'eau désionisée (dilution au 1/10<sup>ème</sup>), puis doser 50  $\mu$ L de l'échantillon dilué. Enfin, multiplier la concentration obtenue par 10 (facteur de dilution).

Remarque : Maintenir le volume de l'échantillon constant en le diluant, plutôt que d'utiliser un plus petit volume de l'échantillon lors du dosage.

## PREPARATION DES ÉCHANTILLONS ALIMENTAIRES

Avant de démarrer la procédure de dosage des nitrates, préparer vos échantillons alimentaires en suivant votre méthode standard.

## DETERMINATION DES NITRATES DANS LES EXTRAITS DE FEUILLES DE PLANTES

Pour déterminer la quantité de nitrates dans 1 gramme de feuilles, broyer les dans 10 mL d'eau distillée ou désionisée et mesurer le volume total de l'extrait après filtration des particules solides. Prélever 50  $\mu$ L d'extrait pour réaliser le dosage et calculer la quantité de nitrates présents en nmoles. Déterminer le montant total de nitrates dans l'extrait [= (volume total de l'extrait) x (nmoles Nitrates/50  $\mu$ L d'extrait)]. Diviser ce montant total de nitrates par le poids pour calculer la quantité de nitrates par gramme de feuilles. La couleur verte ou brune de l'extrait de feuilles n'interfère pas significativement avec les déterminations de nitrates car l'extrait est dilué 20 fois lors du dosage. L'analyse la plus quantitative de la teneur en nitrates dans les feuilles est obtenue lorsque les feuilles sont chauffées pendant 20 minutes. Après ébullition, laisser refroidir dans la glace, puis filtrer l'échantillon pour récupérer l'extrait. Afin de compenser l'eau perdue lors de l'ébullition, compléter le volume d'extrait jusqu'à 10 mL.

Contactez notre service technique pour obtenir un protocole d'extraction détaillé, à partir de feuilles des plantes fraîches ou séchées.

## **DETERMINATION DES NITRITES**

Les nitrites présents dans les échantillons peuvent être déterminés en omettant d'ajouter l'enzyme NaR et le NADH dans les échantillons. (C'est-à-dire en éliminant les étapes 4, 5 et 6, page 3). Toujours préparer les standards nitrates comme décrit dans la procédure normale du test (c'est-à-dire en ajoutant les NaR et NADH) et utiliser cette courbe d'étalonnage pour estimer la teneur en nitrites des échantillons.

## **APPLICATION AUTOMATES (ANALYSEURS) DE BIOCHIMIE**

Pour adapter ce kit sur les automates de biochimie, merci de nous contacter afin de vous transmettre les protocoles ou de vous aider à automatiser l'analyse des nitrates.

## **ASSISTANCE TECHNIQUE**

Pour plus de renseignements, veuillez vous mettre en contact avec :

**LIBIOS**, 83 Rue Edmond Michelet, 69490 Vindry-sur-Turdine, FRANCE  
Tél. : +33 (0)4 74 13 03 02 - E-mail : [info@libios.fr](mailto:info@libios.fr) - Web : [www.libios.fr](http://www.libios.fr)