

Purificación de muestras para la determinación de ácido oxálico  
Para 20 muestras

Sólo para uso *in vitro*  
Conservar entre +2 y +8°C

## Principio

El kit de preparación de muestras (E2250) **puede ser** necesario como etapa preanalítica, por ejemplo, para la determinación de ácido oxálico, **pero no es obligatorio**.

El kit de purificación contiene carbón activado, que permite eliminar los olores, el color y los agentes reductores (incluido el ácido ascórbico hasta una determinada concentración). Funciona según dos mecanismos de acción:

- químico: por la acción oxidativa del oxígeno atrapado en los poros entre los átomos de carbono
- físico-químico: en particular adsorbiendo y atrapando las sustancias que presentan características orgánicas (basadas en átomos de carbono).

Para el análisis de ácido oxálico, seguir las instrucciones de la ficha técnica del kit Enzytec™ Oxalic Acid (Ref. E2100).

## Reactivos

- # 1: **Sample Purifier (purificador de muestra)**, 20 tubos (carbón activado en polvo), listos para su uso.
- # 2: **Sample Diluent (diluyente de muestra)**, 1 x 10 ml (líquido, 5x conc.). Añadir 40 ml de agua destilada al diluyente y mezclar suavemente hasta conseguir una homogeneidad completa. Estabilidad: 3 meses a 2 - 8°C.

Los reactivos 1 y 2 son estables a 2-8°C hasta la fecha de caducidad indicada en el embalaje, si no se contaminan durante su utilización. Tras la reconstitución, el reactivo 2 es estable 3 meses a 2 - 8°C.

Llevar los reactivos a temperatura ambiente y mezclar suavemente antes de su utilización. Cerrar inmediatamente después de su utilización. Los reactivos deben manipularse de manera adecuada para evitar toda contaminación.

Los reactivos no son peligrosos para la salud. Seguir las precauciones habituales del laboratorio. Tras uso, los reactivos deben eliminarse como residuos de laboratorio. Los embalajes pueden reciclarse.

## Recolección y conservación de las muestras

No utilizar el kit de purificación de muestras con el patrón de ácido oxálico incluido en el kit Enzytec™ Oxalic Acid (E2100) o de cualquier otro kit. Si se usara el patrón con el kit de purificación, por ser una sustancia pura, parte del ácido oxálico quedaría atrapado por el carbón activado lo que resultaría en recuperaciones bajas.

### a.) Muestras alimentarias

- El ácido oxálico es estable a pH bajo (<3,3). Si el pH está por encima de 7,5, el oxalato se transforma en CO<sub>2</sub> y se perderá. Sin embargo, el aumento del pH incrementa la solubilidad del oxalato de calcio. Por ello la preparación de las muestras deberá efectuarse a un pH entre 5,0 y 7,0, suficiente para solubilizar el oxalato de calcio a la vez que se evita la pérdida de ácido oxálico en forma de CO<sub>2</sub>.
- Ajustar el pH de la muestra a 2,9 - 3,1 si no es necesario solubilizar el Ca-Oxalato.
- En algunos casos, el ácido oxálico y sus sales deben ser extraídas: ajustar la muestra a pH 3,0 con HCl (1M), y hervir en un baño María durante aproximadamente. 15-30 minutos. El ácido oxálico es estable a pH bajo, y la ebullición favorece la hidrólisis del oxalato de calcio. No es necesario ajustar el pH después de la ebullición, porque el pH 3,0 se adapta perfectamente a las condiciones del análisis de ácido oxálico.

### b.) Otras muestras

- Recolectar las muestras (24 h) en un frasco de vidrio o plástico que contenga 10 ml de ácido clorhídrico concentrado. Registrar el volumen en litros. Como las muestras se acidifican, el ácido oxálico es estable y estas pueden almacenarse durante **7 días** refrigeradas o congeladas.
- Utilizar muestras frescas cuyo contenido en vitamina C sea < 16 mmol/L (las concentraciones superiores a este nivel pueden afectar a los resultados).

## Preparación de las muestras

1. Preparar el diluyente de muestra (reactivo 2) como se describe más arriba.
2. Preparar una serie de tubos vacíos para las muestras y los controles, y etiquetar adecuadamente.
3. Pipetear 5 ml de muestra/control en el tubo correspondiente (el volumen puede reducirse en caso de no disponer de 5 ml).
4. Añadir en los tubos 2,5 ml del diluyente de la muestra (reactivo 2 diluido), 2,5 ml de agua destilada y mezclar.
5. **NOTA IMPORTANTE PARA EL ÁCIDO OXÁLICO**  
El pH debe ajustarse entre 5,0 y 7,0 con HCl/NaOH (1N):
  - el pH del reactivo 2 es a aproximadamente. 8,2 - 8,5
  - si la muestra ha sido almacenada con ácido clorhídrico (véase más arriba), el pH después de la etapa 4 será de 5,0-7,0 y, generalmente, no será necesario ajustarlo.
  - si la muestra ha sido preparada de otra manera (pero siempre con pH < 7,0), ajustar el diluyente de la muestra a pH 5,0 - 7,0 antes de su utilización en la etapa 4, de modo que el pH no supere nunca 7,0.
6. Preparar una serie de tubos de purificación de muestra (reactivo 1) para las muestras y los controles, y etiquetar adecuadamente.
7. Pipetear 4 ml de cada muestra/control diluido (véase apartados 4 y 5) en los tubos de purificación de muestra (véase apartado 6.) y mezclar de vez en cuando durante 5 minutos. Se aconseja la utilización de un mezclador rotatorio.
8. Centrifugar los tubos durante 10/15 minutos a 3500 rpm (2600 xg) o filtrar con papel de filtro. O también, colocar 0,5 ml de la solución en un filtro de ultrafiltración (ej. Millipore Ultrafree-MC, UFC30HV00) y centrifugar durante 3 minutos a 4000 rpm.
9. Tomar la muestra en la fase media del sobrenadante (nunca de la superficie) y utilizar para el ensayo.
10. Tener en cuenta en los resultados el factor de dilución de 2 (si el volumen de muestra en el apartado 3 es inferior a 5 ml, calcular el factor de dilución correspondiente).
11. **El patrón incluido en el kit Enzytec™ Oxalic Acid (E2100) no debe seguir este método de preparación, está listo para su uso.**

### Nota:

Este kit puede utilizarse conjuntamente con otras pruebas. En ese caso, es necesario adaptar el protocolo a la muestra utilizada y al kit con el que se vaya a trabajar:

- ajustar el volumen de muestra indicado en el apartado 3 según la concentración del analito en la muestra.
- ajustar el pH indicado en el apartado 5 de acuerdo con la prueba enzimática que vaya a ser utilizada.
- realizar experimentos de fortificación y comprobar que la recuperación sea de 95 - 105%.