

Colorimetrischer Test für Wein, Getränke und Lebensmittel
1 x 20 ml (10 Tests)

Nur für den Laborgebrauch
Lagerung bei 2 - 8 °C

Testprinzip

Oxalat wird zu Kohlendioxyd und Wasserstoffperoxid durch Oxalatoxydase oxidiert. Wasserstoffperoxid reagiert bei Anwesenheit von Peroxidase (POD) mit MBTH (3-Methyl-2-Benzothiazolinon-Hydraton) und DMAB (3-Dimethyl-Amino-Benzoesäure) und bildet einen blauen Quinon-Komplex. Die Intensität der Farbe ist proportional zur Konzentration des Oxalats in der Probe, und wird bei 590 nm gemessen:



Test Spezifikationen

Wellenlänge: 590 nm (570-620 nm)
Schichtdicke: 1,00 cm (Glas; Plastik)
Temperatur: 37 °C
Methode: End-Punkt Messung
Inkubationszeit: 15 min.
Messung: gegen Luft oder Wasser
Linearität: bis 90 mg/l
Probe/Reagenzien: 1/20/2

Reagenzien

- # 1: Reagenz 1: Puffer **1 x 20 ml** (Puffer 20 mmol/l, pH 3,1 ± 0,1, MBTH 0,2 mmol/l, DMAB 0,9 mmol/l, Aktivatoren, Konservierungsmittel); Reagenz 1 ist flüssig und gebrauchsfertig
- # 2: Reagenz 2: **eine Flasche mit lyophilisiertem** Reagenz (Oxalat Oxidase aus Gerste 2 KU/l, POD 1000 U/l); mit 2 ml bidest. Wasser lösen; Stabilität: 30 Tage bei 2 - 8 °C;
- # 3: Standard: **1 x 5 ml** (Oxalsäure 45 mg/l = 0,5 mmol/l); der Standard ist flüssig und gebrauchsfertig

Reagenzien 1 und 3 sind gebrauchsfertig. Sie sind bei 2 - 8 °C bis zum Ende der Haltbarkeit stabil (siehe Etikett), wenn keine Kontamination während des Laboreinsatzes erfolgt.

Reagenzien vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur bringen. Vor dem Einsatz vorsichtig mischen. Nach dem Gebrauch sofort wieder verschließen. Die Reagenzien sorgfältig einsetzen, um Kontaminationen zu vermeiden.

Die Reagenzien sind nicht gefährlich. Trotzdem die allgemeinen Regeln beim Arbeiten in chemischen Laboratorien beachten. Nach Gebrauch die Reagenzien mit dem Laborabfall entsorgen. Das Verpackungsmaterial kann dem Recycling zugeführt werden.

Probenvorbereitung

- Für Proben mit **reduzierenden oder oxidierenden Substanzen**, den Enzytec Probenvorbereitungskit (Art. Nr. E2250) verwenden.
- Farblose und klare Proben (< pH 7,0) unverdünnt einsetzen, solange die Konzentration < 90 mg/l ist; ansonsten die Probe mit bidest. Wasser verdünnen bis dieser Konzentrationsbereich erreicht wird.
- Oxalsäure ist bei einem niedrigen pH-Wert stabil (pH < 3,3). Wenn der pH-Wert über 7,5 steigt, wird Oxalsäure in CO₂ umgewandelt und geht dadurch verloren. Aber eine Steigerung des pH-Wertes erhöht die Löslichkeit von Ca-Oxalat. Also gibt es zwei Möglichkeiten:
 - Für den direkten Einsatz, Probe bei pH 2,9 - 3,1 mit HCl oder NaOH/KOH einstellen.
 - Wenn Ca-Oxalat vorhanden ist und gelöst werden soll, Probe auf pH 5,0 - 7,0 einstellen.
- In einigen Fällen müssen Oxalsäure oder deren Salze herausgelöst werden: den pH-Wert der Probe auf 3,0 mit HCl (1 M) einstellen, und 15 - 30 min bei ca. 100 °C kochen.
- Trübe Lösungen filtrieren oder zentrifugieren.
- Kohlenstoff-haltige Proben entgasen.

- Spinat und Rhabarbersaft mit bidest. Wasser 1:10 verdünnen; den pH-Wert wie oben beschrieben auf 2,9 - 3,1 einstellen.
- Stark gefärbte Proben mit PVPP (Polyvinylpolypyrrolidon z.B. 1 g/100 ml Probe) behandeln.
- Proteinhaltige Proben **mit Trichloressigsäure** klären (die Carrez-Klärung und die Perchlorsäure-Klärung können beim Einsatz des Oxalsäure Kits nicht verwendet werden).
- Fetthaltige Proben durch einen Entfettungsschritt auf Eis entfetten

Testdurchführung

In Küvetten pipetieren	Reagenzien Blank (RB)	Standard	Proben
Reagenz 1 (Puffer)	2000 µl	2000 µl	2000 µl
Bidest. Wasser	100 µl	-	-
Standard (Flasche 3)	-	100 µl	-
Probe	-	-	100 µl
Sorgfältig mischen, ca. 5 min bei 37 °C inkubieren; Extinktion E ₁ messen, dann hinzufügen:			
Reagenz 2 (Enzym)	200 µl	200 µl	200 µl
Sorgfältig mischen, bis zum Ende der Reaktion bei 37 °C inkubieren (ca. 15 min) und Extinktion E ₂ messen. Die Farbe ist 60 min stabil.			

Berechnung

$$\Delta E = (E_2 - df \times E_1)_{\text{Probe oder Standard}} - (E_2 - df \times E_1)_{\text{RB}}$$

mit df = Verdünnungsfaktor der Extinktionen durch das Reagenz-volumen:

$$df = (\text{Probenvolumen} + R1) / (\text{Probenvolumen} + R1 + R2) = 0,913$$

$$\text{und } C_{\text{Probe}} [\text{mg/l}] = \frac{C_{\text{Standard}} [\text{mg/l}]}{\Delta E_{\text{Standard}}} \times \Delta E_{\text{Probe}}$$

Weil die Konzentration des Standards auf 45 mg/l eingestellt ist, ergibt sich die nachstehende Berechnungsformel:

$$C_{\text{Probe}} [\text{mg/l}] = (\Delta E_{\text{Probe}} / \Delta E_{\text{Standard}}) \times 45$$

Hinweise

1. Eine proportionale Änderung der Reaktionsvolumina ändert die Ergebnisse nicht.
2. Es wird empfohlen, nur die Reagenzien aus dem Testkit bzw. der gleichen Charge zu verwenden und nicht gegen andere Chargen auszutauschen.
3. Für Konzentrationen höher als 90 mg/l, Probe mit bidest. Wasser bis in den angegebenen Konzentrationsbereich verdünnen, Messung wiederholen und mit dem Verdünnungsfaktor multiplizieren.
4. Sensitivität: in der manuellen Methode liegt die untere Nachweisgrenze bei ca. 1,5 mg/l (ΔA = 0,020 und v = 100 µl)
5. Spezifität: dieser Test ist spezifisch für Oxalsäure
6. Ascorbinsäure und andere reduzierende Substanzen können in hohen Konzentrationen Störungen verursachen.

Literatur

- Textbook of Clinical Chemistry, Ed. by N.W.TIETZ, W.B. SAUNDERS. CO, Philadelphia (1999)
- Methods of Enzymatic Analysis, Ed. by H.U.BERGMEYER, 2nd ed., ACAD. PRESS INC, New York (1974)
- KOHLBECKER, G et al., J.CLIN.CHEM.CLIN.BIOCHEM., 17 309 (1979)
- M.G. Li et al., CLIN.CHEM., 35 2330 (1989)