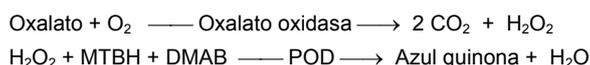


Método colorimétrico para los vinos, bebidas y alimentos
1 x 20 ml (10 pruebas)

Reactivos de laboratorio solamente
Conservar entre +2 y +8°C

Principio

El oxalato se oxida en óxido de carbono y peróxido de hidrógeno bajo la acción de la oxalato oxidasa. El peróxido reacciona con la MBTH (3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona) y el DMAB (3-dimetilamino ácido benzoico) en presencia de peroxidasa (POD), formando un compuesto azul quinona. La intensidad del color es proporcional a la concentración de oxalato de la muestra y se lee a 590 nm:



Especificaciones

Longitud de onda: 590 nm (570-620 nm)
Paso óptico: 1.00 cm (vidrio; plástico)
Temperatura: 37°C
Método: Punto final
Tiempo de reacción: 15 minutos
Medición: contra aire o agua
Linealidad: hasta 90 mg/L
Muestra/reactivo: 1/20/2

Reactivos

- # 1: Reactivo 1, tampón **1 x 20 ml** (tampón 20 mmol/L, pH 3.1 ± 0.1, MBTH 0.2 mmol/L, DMAB 0.9 mmol/L, activadores, conservadores). El reactivo 1 está líquido y listo para usar.
- # 2: Reactivo 2, **un frasco de reactivo liofilizado** (Oxalato oxidasa extraída de cebada 2 KU/L, POD 1000 U/L). Añadir 2 ml de agua Bi-destilada, mezclar suavemente hasta disolución. Estabilidad: 30 días a 2 - 8°C.
- # 3: Patrón, **1 x 5 ml** (ácido oxálico 45 mg/L = 0.5 mmol/L). El patrón es líquido y listo para usar.

Los reactivos 1 y 3 están listos para usar. Son estables entre 2 y 8°C hasta la fecha de caducidad indicada, si no se contaminan durante su utilización.

Llevar los reactivos a temperatura ambiente antes de su utilización. Mezclar suavemente antes de pipetear. Cerrar inmediatamente después de su utilización. Los reactivos deben utilizarse 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.

Preparación de las muestras

- Para las muestras que contienen **sustancias reductoras u oxidantes**, utilizar la caja Enzytec Sample purifier (n° E2250). No utilizarlo para el patrón.
- Utilizar muestras claras y transparente (< pH 7.0), no diluidas mientras la concentración sea < a 90 mg/L; si no, diluir con agua hasta esta gama de concentración
- El ácido oxálico es estable a pH bajo (< 3.3). Si el pH está sobre 7.5, el oxalato se transforma en CO₂ y se pierde. Pero el aumento del pH permite solubilizar el oxalato de Calcio. Hay pues dos posibilidades:
 - Para una dosificación directa, ajustar el pH a 2.9 - 3.1 con HCl o NaOH/KOH.
 - Si el oxalato de Ca está presente y debe solubilizarse, ajustar el pH a 5.0 - 7.0.
- En algunos casos, es necesario extraer el ácido oxálico y las sales que forma: ajustar la muestra a pH 3.0 con HCl (1 M), y hervir a 100°C durante 15-30 minutos.
- Las muestras turbias deben filtrarse o centrifugarse.
- Las muestras que contienen gas carbónico deben desgasificarse.

- Los zumos de espinaca o ruibarbo deben diluirse a 1:10 con agua Bi-destilada. Ajustar a pH 2.9 - 3.1 como anteriormente.
- Las muestras muy coloreadas deben pretratarse con PVPP (polivinil-polipirrolidona e.g. 1 g/100 ml).
- Desproteinizar las muestras con ácido Tricloroacético (la clarificación con Carrez y con ácido perclórico no pueden emplearse para la determinación de ácido oxálico)
- Para las muestras que contienen grasas, desgrasar por enfriando sobre baño de hielo

Procedimiento

Pipetear en las cubetas	Blanco reactivo (BR)	Patrón	Muestras
Reactivo 1 (tampón)	2000 µl	2000 µl	2000 µl
Agua destilada	100 µl	-	-
Patrón (frasco 3)	-	100 µl	-
Muestra	-	-	100 µl
Mezclar suavemente, incubar 5 minutos AT 37°C. Leer las absorbancias A ₁ , a continuación añadir:			
Reactivo 2 (enzima)	200 µl	200 µl	200 µl
Mezclar suavemente e incubar a 37°C hasta el final de la reacción (aproximadamente. 15 min.). Leer las absorbancias A ₂ . El color es estable durante aproximadamente. 60 min.			

Cálculo de los resultados

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

Con df = factor de dilución de las densidades ópticas a causa de los volúmenes de reactivos o muestra:

$$df = (\text{muestra} + R1) / (\text{muestra} + R1 + R2) = 0.913$$

$$y C_{\text{muestra}} [\text{mg/L}] = \frac{C_{\text{patrón}} [\text{mg/L}]}{\Delta A_{\text{patrón}}} \times \Delta A_{\text{muestra}}$$

Como la concentración del patrón es de 45 mg/L, se obtiene la siguiente fórmula:

$$C_{\text{muestra}} [\text{mg/L}] = (\Delta A_{\text{muestra}} / \Delta A_{\text{patrón}}) \times 45$$

Notas

1. Un cambio proporcional de los volúmenes de los reactivos no cambia los resultados
2. Aconsejamos no mezclar los reactivos que vienen de lotes diferentes.
3. Para concentraciones superiores a 90 mg/L, diluir la muestra con agua destilada; repetir la medida y multiplicar el resultado por el factor de dilución.
4. Sensibilidad: en el procedimiento manual, el límite inferior de detección es aproximadamente: 1.5 mg/l (ΔA = 0.020 y v = 100 µl)
5. Especificidad: la prueba es específica del ácido oxálico.
6. El ácido ascórbico y otras sustancias reductoras a alta concentración pueden interferir en la prueba.

Literatura

- 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)