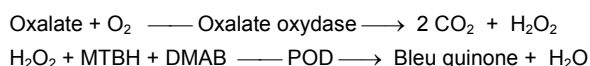


Méthode colorimétrique pour les vins, boissons et aliments
1 x 20 ml (10 tests)

Réactifs de laboratoire uniquement
Conserver entre +2 et +8°C

Principe

L'oxalate est oxydé en oxyde de carbone et peroxyde d'hydrogène sous l'action de l'oxalate oxydase. Le peroxyde réagit avec le MBTH (3-méthyl-2-benzothiazolinone hydrazone) et le DMAB (3-diméthylamino benzoic acid) en présence de peroxydase (POD), en formant un composé bleue quinone. L'intensité de couleur est proportionnelle à la concentration en oxalate de l'échantillon et se lit à 590 nm:



Spécifications

Longueur d'onde: 590 nm (570-620 nm)
Chemin optique: 1.00 cm (verre; plastique)
Température: 37°C
Méthode: Point final
Temps de réaction: 15 minutes
Mesure: contre l'air ou l'eau
Linéarité: jusqu'à 90 mg/L
Echantillon/réactif: 1/20/2

Réactifs

- # 1: Réactif 1, tampon 1 x 20 ml (tampon 20 mmol/L, pH 3.1 ± 0.1, MBTH 0.2 mmol/L, DMAB 0.9 mmol/L, activateurs, conservateurs). Le réactif 1 est liquide et prêt à l'emploi
- # 2: Réactif 2, un flacon de réactif lyophilise (Oxalate oxydase extraite de l'orge 2 KU/L, POD 1000 U/L). Ajouter 2 ml d'eau bi-distillée, mélanger doucement jusqu'à dissolution. Stabilité: 30 jours à 2-8°C.
- # 3: Standard, 1 x 5 ml (acide oxalique 45 mg/L = 0.5 mmol/L). Le standard est liquide et prêt à l'emploi.

Les réactifs 1 et 3 sont prêts à l'emploi. Ils sont stables entre 2 et 8 °C jusqu'à la date de péremption indiquée, à condition de ne pas être contaminés durant leur utilisation.

Amener les réactifs jusqu'à température ambiante avant utilisation. Mélanger doucement avant pipetage. Fermer immédiatement après utilisation. Les réactifs doivent être utilisés de manière adéquate pour éviter toute contamination.

Les réactifs ne sont pas dangereux pour la santé. Appliquer les précautions habituelles en vigueur dans le laboratoire. Après utilisation, les réactifs doivent être éliminés comme déchets de laboratoire. Les emballages peuvent être recyclés.

Préparation des échantillons

- Pour les échantillons contenant des **substances réductrices ou oxydantes**, utiliser le coffret Enzytec Sample purifier kit (réf. E2250).
- Utiliser des échantillons clairs et transparent (< pH 7.0), non dilués tant que la concentration est < à 90 mg/L; sinon, diluer avec de l'eau jusqu'à atteindre cette plage de concentration
- L'acide oxalique est stable à pH bas (<3.3). Si le pH est au-dessus de 7.5, l'oxalate se transforme en CO₂ et est perdu. Mais l'augmentation du pH permet de solubiliser l'oxalate de Calcium. Il y a donc deux possibilités:
 - Pour un dosage direct, ajuster le pH à 2.9 – 3.1 avec HCl ou NaOH/KOH.
 - Si de l'oxalate de Ca est présent et doit être solubilisé, ajuster le pH à 5.0 – 7.0.
- Dans certains cas, il est nécessaire d'extraire l'acide oxalique et les sels qu'il forme: ajuster l'échantillon à pH 3.0 avec HCl (1 M), et bouillir à 100°C pendant 15-30 minutes.
- Les échantillons troubles doivent être filtrés ou centrifugés.

- Les échantillons contenant du CO₂ doivent être dégazés.
- Les jus d'épinard ou de rhubarbe doivent être dilués au 1:10 avec de l'eau bi-distillée. Ajuster à pH 2.9 – 3.1.
- Les échantillons fortement colorés doivent être pré-traités avec du PVPP (polyvinylpyrrolidone e.g. 1 g/100 mL).
- Déprotéiniser les échantillons avec de l'acide Tri-chloro acétique (la clarification de Carrez et l'acide perchlorique ne sont pas adaptés au test acide oxalique)
- Pour les échantillons contenant des graisses, dégraisser sur en refroidissant sur bain de glace

Procédure

Pipette dans les cuvettes	Blanc réactif (BR)	Standard	Échantillons
Réactif 1 (tampon)	2000 µl	2000 µl	2000 µl
Eau distillée	100 µl	-	-
Standard (flacon 3)	-	100 µl	-
Échantillon	-	-	100 µl
Mélanger doucement, incubé 5 minutes à 37°C. Lire les absorbances A ₁ , ensuite ajouter:			
Réactif 2 (enzyme)	200 µl	200 µl	200 µl
Mélanger doucement et incubé à 37°C jusqu'à la fin de la réaction (env. 15 min). Lire les absorbances A ₂ . La couleur est stable pendant env. 60 min.			

Calcul des résultats

$$\Delta A = (A_2 - df \times A_1)_{\text{échantillon ou standard}} - (A_2 - df \times A_1)_{\text{BR}}$$

Avec df = facteur de dilution des densités optiques du fait des volumes réactifs ou échantillon:

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

$$\text{et } C_{\text{échantillon}} [\text{mg/L}] = \frac{C_{\text{standard}} [\text{mg/L}]}{\Delta A_{\text{standard}}} \times \Delta A_{\text{échantillon}}$$

Comme la concentration du standard est fixée à 45 mg/L, ceci donne le calcul suivant:

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

Notes

- Un changement proportionnel des volumes réactionnels ne change pas les résultats
- Nous conseillons de ne pas mélanger les réactifs venant de lots différents.
- Pour les concentrations supérieures à 90 mg/L, diluer l'échantillon avec de l'eau distillée; répéter la mesure et multiplier le résultat par le facteur de dilution.
- Sensibilité: dans la procédure manuelle, la limite inférieure de détection est à env. 1.5 mg/l ($\Delta A = 0.020$ et $v = 100 \mu\text{l}$)
- Spécificité: le test est spécifique de l'acide oxalique.
- L'acide ascorbique et d'autres substances réductrices à haute concentration peuvent interférer dans le test.

Littérature

- 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)