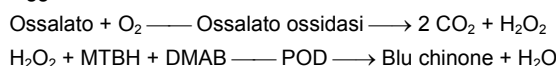


Metodo colorimetrico per vini, bevande e prodotti alimentari
1 x 20 ml (10 prove)

Reagenti per uso in laboratorio
Conservare tra +2 e +8°C

Principio

L'ossalato è ossidato ad ossido di carbonio e perossido d'idrogeno per azione dell'ossalato ossidasi. Il perossido reagisce con MBTH (3-metil-2-benzotiazolinone idrazone) e DMAB (Acido 3-dimetilamino benzoico) in presenza di perossidasi (POD), formando un chinone di colorazione blu. L'intensità del colore è proporzionale alla concentrazione di ossalato nel campione e si legge a 590 nm:



Specifiche

Lunghezza d'onda: 590 nm (570-620 nm)
Camino ottico: 1.00 cm (vetro; plastica)
Temperatura: 37°C
Metodo: punto finale
Tempo reazione: 15 minuti
Misura: contro aria o acqua
Linearità: fino a 90 mg/L
Campione/reagente: 1/20/2

Reagenti

- # 1: Reagente 1, tampone **1 x 20 ml** (tampone 20 mmol/L, pH 3.1 ± 0.1, MBTH 0.2 mmol/L, DMAB 0.9 mmol/L, attivatori, stabilizzatori). Il reagente 1 è liquido e pronto all'uso.
- # 2: Reagente 2, **una bottiglia di reagente liofilizzato** (Ossalato ossidasi estratta da orzo, 2 KU/L, POD 1000 U/L). Aggiungere 2 ml di acqua distillata, mescolare delicatamente fino a dissoluzione. Stabilità: 30 giorni a 2-8°C.
- # 3: Standard, **1 x 5 ml** (acido ossalico 45 mg/L = 0.5 mmol/L). Lo standard è liquido e pronto all'uso.

I reagenti 1 e 3 sono pronti all'uso. Sono stabili tra 2 e 8 °C fino alla data di scadenza indicata, a condizione che non siano stati contaminati durante il loro utilizzo.

Portare i reagenti a temperatura ambiente prima dell'utilizzo. Mescolare delicatamente prima dell'aggiunta. Chiudere immediatamente dopo l'utilizzo. I reagenti devono essere utilizzati in modo adeguato per evitare ogni contaminazione.

I reagenti non sono pericolosi per la salute. Utilizzare le buone pratiche di sicurezza vigenti in laboratorio chimico. Dopo l'impiego, i reagenti devono essere eliminati come rifiuti di laboratorio. Gli imballaggi possono essere riciclati.

Preparazione dei campioni

- Per i campioni che contengono **sostanze riducenti oppure ossidanti**, utilizzare il kit Enzytec Sample purifier (Art. E2250). Non utilizzarlo per lo standard.
- Utilizzare i campioni chiari e trasparenti (< pH7.0) non diluiti se la concentrazione di ossalato è < a 90 mg/L; altrimenti, diluire con acqua fino a raggiungere questo range di concentrazione.
- L'acido ossalico è stabile a pH basso (<3.3). Se il pH è superiore a 7,5, l'ossalato può essere convertito in CO₂ ed essere perso. L'aumento del pH permette di aumentare la solubilità dell'ossalato di calcio. Ci sono dunque due possibilità:
 - Per un dosaggio diretto, portare il pH a 2.9 – 3.1 con HCl o NaOH/KOH.
 - Se l'ossalato di calcio è presente e deve essere solubilizzato, regolare il pH tra 5.0 – 7.0.
- In alcuni casi, è necessario estrarre l'acido ossalico ed i suoi sali: portare il campione a pH 3.0 con HCl (1 M), e bollire a 100°C per 15-30 minuti.
- I campioni torbidi devono essere filtrati o centrifugati.

- I campioni che contengono anidride carbonica devono essere degasati.
- I succhi di spinaci o di rabarbaro devono essere diluiti 1:10 con acqua distillata. Portare il pH tra 2.9 - 3.1 come sopra.
- I campioni fortemente colorati devono essere pretrattati con PVPP (polivinilpolipirrolidone, esempio. 1 g/100 ml di campione).
- Deproteinizzare i campioni con l'acido tricloro-acetico (la chiarificazione di Carrez e l'acido perclorico non sono adatti al test dell'acido ossalico)
- Per i campioni che contengono grassi, sgrassare su ghiaccio

Procedura

Aggiungere nelle cuvette	Reagente Bianco (RB)	Standard	Campioni
Reagente 1 (tampone)	2000 µl	2000 µl	2000 µl
Acqua distillata	100 µl	-	-
Standard (bottiglia 3)	-	100 µl	-
Campione	-	-	100 µl
Mescolare delicatamente, incubare per 5 minuti a 37°C. Leggere l'assorbanza A ₁ , in seguito aggiungere:			
Reagente 2 (enzima)	200 µl	200 µl	200 µl
Mescolare delicatamente ed incubare a 37°C fino alla fine della reazione (approssimativamente 15 min). Leggere l'assorbanza A ₂ . Il colore è stabile per circa 60 min			

Calcolo dei risultati

$$\Delta A = (A_2 - df \times A_1)_{\text{campione}} - (A_2 - df \times A_1)_{\text{RB}}$$

Con df = fattore di diluizione delle densità ottiche in base ai volumi dei reattivi o del campione:

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

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

Poichè la concentrazione dello standard è fissata a 45 mg/L, il calcolo diventa il seguente:

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

Note

1. Un cambiamento proporzionale dei volumi di reazione non altera i risultati.
2. Consigliamo di non mescolare i reagenti che vengono da lotti diversi.
3. Per le concentrazioni superiori a 90 mg/L, diluire il campione con l'acqua distillata; ripetere la misura e moltiplicare il risultato per il fattore di diluizione.
4. Sensibilità: nella procedura manuale, il limite inferiore di rilevabilità è approssimativamente 1.5 mg/l ($\Delta A = 0.020$ e $v = 100 \mu\text{l}$)
5. Specificità: il test è specifico per l'acido ossalico.
6. L'acido ascorbico ed altre sostanze riducenti ad alte concentrazioni possono interferire nella prova.

Letteratura

- 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)