

Purificazione dei campioni per il test dell'acido ossalico  
Per 20 campioni

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

## Principio

Il kit di purificazione dei campioni (E2250) **può essere** necessario come tappa pre-analitica, ad esempio per la determinazione dell'acido ossalico nella birra, **ma non è obbligatorio**.

Il kit di purificazione contiene carbone attivo che permette di eliminare gli odori, il colore e tutte le sostanze riducenti (compreso l'acido ascorbico fino ad una certa concentrazione). Funziona secondo due modalità d'azione:

- chimico, con l'azione ossidativa dell'ossigeno imprigionato nei pori tra gli atomi di carbonio
- fisico-chimico, in particolare adsorbendo ed imprigionando le sostanze organiche

Per l'analisi dell'Ossalato, seguire la procedura indicata nelle istruzioni del kit Enzytec™ Acido ossalico (Art. E2100)

## Reagenti

**Reagente 1:** **Chiarificante**, 20 provette (polvere di carbone attivo). Il reagente è pronto per l'uso.

**Reagente 2:** **Diluente**,  
1 x 10 ml (liquido, concentrato 5x). Aggiungere 40 ml di acqua distillata al diluente e mescolare delicatamente fino a completa omogeneità. Stabilità: 3 mesi a 2 - 8°C.

I reagenti 1 e 2 sono stabili a 2 - 8°C fino alla data di scadenza indicata sulla confezione, a condizione che non siano stati contaminati durante il loro utilizzo. Dopo la ricostituzione, il reagente 2 è stabile per 3 mesi a 2 - 8°C.

Portare i reagenti a temperatura ambiente e mescolarli delicatamente prima dell'uso. Chiudere immediatamente dopo l'utilizzo. I reattivi 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.

## Raccolta e conservazione dei campioni

Non utilizzare il kit di purificazione dei campioni con lo standard contenuto nel kit per la determinazione dell'acido ossalico (E2100), né con quello di nessuna altra scatola. Se uno standard viene utilizzato con il kit E2250, non vi sarà in soluzione altro che l'analita stesso (ad esempio l'acido ossalico) e dunque una parte di esso verrà adsorbita dal carbone attivo, portando a valori di recupero molto bassi.

### a.) Campioni alimentari

- L'acido ossalico è stabile a pH basso (<3,3). Se il pH è superiore a 7,5, l'ossalato si converte in CO<sub>2</sub> e andrà perso. Con l'aumento del pH aumenta anche la solubilità dell'ossalato di calcio. Pertanto la preparazione dei campioni dovrà essere eseguita tra pH 5,0 e pH 7,0, ovvero a pH abbastanza alto da mantenere l'ossalato di calcio in soluzione ed abbastanza basso per proteggere l'acido ossalico.
- Se non è necessario solubilizzare l'ossalato di calcio, portare il pH del campione a 2,9 - 3,1.
- In alcuni casi, l'acido ossalico ed i suoi sali devono essere estratti: portare il campione a pH 3,0 con HCl (1M), e fare bollire in un bagno d'acqua per circa 15-30 minuti. L'acido ossalico è stabile a pH basso e l'ebollizione forzerà l'idrolisi dell'ossalato di calcio. Non è necessario correggere il pH dopo l'ebollizione, poiché il pH a 3,0 è perfettamente adatto alle condizioni di analisi dell'acido ossalico.

### b.) Altri campioni

- Raccogliere i campioni (24 h) in una bottiglia in vetro o in plastica contenete 10 ml di acido cloridrico concentrato. Registrare il volume in litri. Poiché i campioni sono acidificati, l'acido ossalico è stabile ed i campioni possono essere conservati fino a **7 giorni** in frigorifero o congelati.
- Utilizzare freschi i campioni in cui il contenuto di vitamina C è < 16 mmol/L (concentrazioni superiori a questo limite possono alterare i risultati).

## Preparazione dei campioni

1. Preparare il diluente del campione (reagente 2) come descritto sopra.
2. Preparare una serie di provette vuote per i campioni ed i controlli, ed identificarle adeguatamente.
3. Aggiungere 5 ml di campione/controllo nella provetta corrispondente (il volume può essere ridotto se i 5 ml non sono disponibili).
4. Aggiungere nella provetta 2,5 ml di diluente del campione (reagente 2 diluito), quindi 2,5 ml di acqua distillata e mescolare.
5. **NOTA IMPORTANTE PER L'ACIDO OSSALICO**  
Il pH deve essere regolato tra 5,0 e 7,0 con HCl (1N) oppure NaOH (1N):
  - il pH del reagente 2 è circa 8,2 - 8,5
  - se il campione è stato conservato con l'acido cloridrico (come precedentemente indicato), dopo il passaggio 4 il pH sarà compreso tra 5,0-7,0, ed non sarà generalmente necessaria una correzione
  - se il campione è stato preparato in modo diverso (ma sempre con pH < 7,0), regolare il diluente del campione a pH 5,0 - 7,0 prima di utilizzarlo nel passaggio 4, in modo che il pH non superi mai 7,0.
6. Preparare una serie di provette per la purificazione dei campioni (reagente 1), per i campioni ed i controlli, ed identificarli adeguatamente.
7. Pipettare 4 ml di ciascun campione e controllo diluito (vedere punti 4 e 5) nelle provette per la purificazione dei campioni (vedere punto 6) e mescolare di tanto in tanto per 5 min. Si consiglia l'utilizzo di un miscelatore rotante.
8. Centrifugare le provette per 10/15 minuti a 3500 rpm (2600 g) o filtrare su carta da filtro. In alternativa, introdurre 0,5 ml di soluzione in un tubo per ultrafiltrazione (Millipore Ultrafree-MC, UFC30HV00) e centrifugare per 3 min a 4000 rpm.
9. Determinare la concentrazione di ossalato prelevando il campione nel surnatante, e non sulla superficie, ed aggiungerlo nella idonea provetta (ad es. l'acido ossalico).
10. Moltiplicare i risultati con il fattore di diluizione 2 (se il volume del campione al punto 3 è inferiore a 5 ml, calcolare il fattore di diluizione corrispondente).
11. **Lo standard contenuto nel kit dell'Acido Ossalico (E2100) non richiede questo metodo di preparazione; è pronto all'uso per la procedura analitica.**

### Nota:

Questo kit può essere utilizzato con altri test oltre a quello dell'acido ossalico (E2100). In questo caso, è necessario adattare il protocollo sia al campione che al test utilizzato:

- regolare il volume del campione indicato al punto 3 in base alla concentrazione dell'analita nel campione
- regolare il pH indicato al punto 5 in base al test enzimatico utilizzato
- effettuare prove di arricchimento e verificare che il recupero sia di circa 95 - 105%.