

Determinazione enzimatica dei solfiti (come SO₂ totale) in alimenti ed altre matrici
30 ml tampone / 0.4 ml NADH-POD / 1.6 ml SUOX (30 prove)

Solo per uso *in vitro*
Conservare tra +2 - +8 °C

Principio

Metodo enzimatico che sfrutta l'enzima NADH-perossidasi (NADH-POD) e solfito-ossidasi (SUOX). Il consumo di NADH è misurato a 340 nm:



Preparazione dei reagenti

Reagenti inclusi nel kit:

Vial 1: Tampone (30 ml, TEA 0.8 M, NaN₃ 0.02%),

Vial 2: pastiglia di NADH (0.4 mg NADH ognuna)

Vial 3: Sospensione NADH-POD (0.4 ml, 14.5 U/ml)

Vial 4: Sospensione SUOX (1.6 ml, 2.5 U/ml)

Tutti i reagenti sono stabili fino alla fine del mese di scadenza indicato, se conservati a temperatura compresa tra 2 e 8°C. Non congelare i reagenti. Portare i reagenti a temperatura ambiente (20-25°C) prima dell'utilizzo.

Soluzione di lavoro 1+2: dissolvere 1 pastiglia (vial 2) in 1 ml di tampone (vial 1); preparare la soluzione di lavoro giornalmente sulla base del numero di campioni da testare.

Applicare le comuni norme di sicurezza necessarie in un laboratorio chimico. Non ingerire. Evitare il contatto con la pelle e le mucose. Questo kit può contenere sostanze pericolose. Per informazioni sul rischio delle sostanze contenute, fare riferimento alla scheda di sicurezza di questo prodotto, disponibile on line sul sito www.r-biopharm.com. Dopo l'impiego, i reattivi devono essere eliminati come rifiuti di laboratorio. Gli imballaggi possono essere riciclati.

Preparazione dei campioni

- I campioni liquidi e limpidi possono essere analizzati tal quali, o dopo diluizione nell'intervallo di concentrazione opportuno (vedi sezione performance del test)
- Filtrare o centrifugare le soluzioni torbide
- Degasare i campioni contenenti anidride carbonica
- La chiarifica di Carrez non è indicata nel dosaggio dei solfiti
- Macinare ed omogeneizzare i campioni solidi o semi-solidi ed estrarli in acqua. Filtrare o centrifugare.
- Poiché i solfiti sono volatili, reattivi e facilmente ossidabili, prestare particolare attenzione nella preparazione del campione e nell'esecuzione dell'analisi. Data l'instabilità dei solfiti in soluzione, i campioni devono essere analizzati appena preparati.

Procedure operative

Lunghezza d'onda: 340 nm

Cammino ottico: 1 cm

Volume totale: 3.060 ml

Temperatura: ~ 25 °C

Misurazione: contro acqua distillata

Soluzione campione: 1 – 30 µg/test

	Bianco Reagente	Campioni
Soluzione 1+2	1000 µl	1000 µl
Campione	-	100 µl
Aqua distillata	2000 µl	1900 µl
NADH-POD (Vial 3)	10 µl	10 µl
Mescolare, incubare a 20-25°C per 5 min. Leggere l'assorbanza A ₁ al tempo esatto, quindi aggiungere:		
SUOX (Vial 4)	50 µl	50 µl
Mescolare, incubare a 20-25°C fino alla fine della reazione (circa 30 min)*. Leggere l'assorbanza A ₂		

*Se necessario, continuare a misurare l'assorbanza ad intervalli di 5 min fino a fine reazione, misurare la "creep reaction" e sottrarla.

Calcolo dei risultati

I risultati sono calcolati in accordo con la legge di Lambert-Beer.

$$\Delta A = (A_2 - A_1) \text{ campione oppure standard} - (A_2 - A_1) \text{ bianco reagente}$$

$$c = (V \times MW \times \Delta A) / (\epsilon \times d \times v \times 1000) \text{ [g/l]}$$

$$c = (3.060 \times 64.06 \times \Delta A) / (6.3 \times 1.00 \times 0.100 \times 1000)$$

$$c \text{ [g/l]} = 0.311 \times \Delta A$$

Se il campione è stato diluito in fase di preparazione, moltiplicare il risultato per il fattore di diluizione.

Quando si analizzano campioni solidi, calcolare il contenuto di solfiti riportando il risultato alla quantità di campione pesata:

$$\text{Contenuto Solfiti totali [g/100g]} = \frac{C_{\text{Solfiti Totali}} \text{ [g/l]}}{\text{Peso campione [g/l]}} \times 100$$

Test performance

Specificità

La solfito-ossidasi reagisce con i solfiti, gli isotiocianati e i loro glicosidi. Gli acidi organici solforati possono dar luogo a "creep reaction". Solfiti, tiosolfati, solfati e acidi organici e composti sulfonici non reagiscono nelle condizioni del test. Reagenti liofilizzati purificati, quali il solfito di sodio, il metabisolfito di sodio e assorbono umidità e sono facilmente ossidabili. In più, le soluzioni acquose sono instabili, per cui potrebbero portare a recuperi sottostimati.

Interferenze

L'acido L-ascorbico inibisce la solfito-ossidasi. Elevate concentrazioni di acido L-ascorbico nel saggio reagiscono con il perossido di idrogeno, che si forma come prodotto intermedio, determinando una sottostima dei risultati. L'acido L-Ascorbico deve essere rimosso prima dell'analisi dei solfiti, attraverso l'uso della ascorbato ossidasi.

Intervallo di misura

L'intervallo di misura raccomandato è 1 µg – 30 µg per saggio (cuvetta). Per un volume di 100 µl di campione, questa quantità corrisponde a 10 – 300 mg/l. Per concentrazioni di solfiti totali superiori, diluire il campione con acqua distillata, ristare e moltiplicare il risultato per il fattore di diluizione.

Sensibilità

La sensibilità è calcolata in accordo con la Legge di Lambert-Beer, e varia a seconda del valore di ΔA scelto. Il valore minimo di ΔA che può essere misurato in modo riproducibile è ΔA = 0.020 (A). Il volume di campione (v) può essere aumentato fino a 2 ml (riducendo il contenuto di acqua). Alcuni esempi:

- con v = 0.100 ml e ΔA = 0.050, limite = 15 mg/l (volume base)

- con v = 0.500 ml e ΔA = 0.050, limite = 3 mg/l (volume medio)

- con v = 2.000 ml e ΔA = 0.020, limite = 0.3 mg/l (volume massimo)

Controlli di qualità

Per preparare soluzioni di controllo di qualità a concentrazione di 300 mg/l equivalent SO₂, dissolvere in 100 mL di una soluzione di acido citrico (1g/l):

- Solfito di sodio (Na₂SO₃, 50.8% SO₂), 59 mg

- Metabisolfito di sodio (Na₂S₂O₅, 67.4 % SO₂), 44.5 mg

- Metabisolfito di potassio (K₂S₂O₅, 57.6% SO₂), 52 mg

Dichiarazione liberatoria

I dati corrispondono al nostro attuale stato di tecnologia e forniscono informazioni sui nostri prodotti e sul loro uso. R-Biopharm non fornisce alcuna garanzia, esplicita o implicita, oltre a quella relativa alla qualità standard dei materiali di cui sono costituiti i suoi prodotti. Nel caso tali materiali risultassero difettosi, R-Biopharm si impegna a fornire prodotti sostitutivi. Non esiste garanzia di commerciabilità o di idoneità del prodotto per uno scopo particolare. R-Biopharm non è da ritenersi responsabile per danni, ivi compresi danni speciali o indiretti, o spese derivanti direttamente o indirettamente dall'utilizzo del prodotto.