

***Linea Polyquid***

# **ACIDO L-MALICO**

**Metodo UV ottimizzato con reattivi liquidi per la  
determinazione della concentrazione di  
Acido L-Malico su campioni di vino**

Test-Combination per 50 determinazioni

**CONF 1x100mL**

**REF PM4100**

Contenuto:

Reagente 1: <i>(Tampone – Substrato)</i>	1 flac. da 90mL
Reagente 2: <i>(Coenzima - NAD)</i>	1 flac. da 5,0mL
Reagente 3: <i>(Enzimi)</i>	1 flac. da 5,0mL
Calibratore: <i>(Acido L-Malico 1,0g/L)</i>	1 flac. da 3,0mL

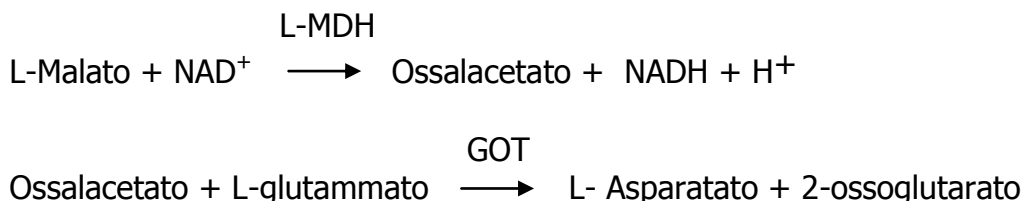


POLYMED s. r. l. – Via L. Da Vinci, 55 – 50020 Sambuca V.P. / FIRENZE  
Tel. 055 8071285 Fax: 055 8071703 – E-mail: [polymed@polymed.it](mailto:polymed@polymed.it) – [www.polymed.it](http://www.polymed.it)

## **1. PRINCIPIO DEL METODO**

L'acido L-Malico presente nel campione viene ossidato a Ossalacetato per azione di un accettore di protoni (NAD) in presenza dell'enzima L-Malico Deidrogenasi (L-MDH); da questa reazione si ottiene la formazione di NADH in quantità proporzionale alla concentrazione di L-Malato nel campione; il composto NADH presenta un picco di assorbanza alla lunghezza d'onda di 340nm. La formazione di NADH è misurabile dunque tramite un aumento di estinzione a 340nm.

Per ottenere che l'equilibrio di reazione sia spostato verso la formazione di NADH fino ad esaurimento di tutto l'acido Malico presente nel campione, l'ossalacetato viene rimosso dal sistema di reazione attraverso la reazione secondaria riportata nello schema seguente, catalizzata dall'enzima GOT in presenza di L-glutammato.



## **2. REAGENTI**

Le concentrazioni sono riferite alla miscela finale di reazione.

**1.** 1 flacone contenente 90 mL di reagente composto da:

Tampone Tris, pH = 9,8 a 37°C

L-Glutammato	240	mmol/L
Sodioazide	0,9	gr/L
Stabilizzante inerte		

**2.** 1 flacone contenente 5 mL di reagente composto da:

NAD	0,18	mM
Sodiazide	0,9	g/l
Stabilizzante inerte		

**3.** 1 flacone contenente 5 mL di reagente composto da:

Tampone Tris, pH = 7,8 a 37°C	80	mmol/L
GOT (Glutammato Ossalacetato Transaminasi)	> 0,5	U/mL
MDH (Malico Deidrogenasi)	> 1,0	U/mL
Sodioazide	0,9	g/L
Stabilizzante inerte		

**4.** 1 flacone contenente 3 mL di reagente pronto all'uso:

Acido L-Malico	1,0g/L
Stabilizzante inerte	

## **3. PREPARAZIONE REATTIVI**

I reattivi sono pronti all'uso.

## **4. CONSERVAZIONE E STABILITA' DEI REATTIVI**

I singoli reagenti sono stabili fino alla data di scadenza riportata in etichetta.

Il reagente (1+2) ha una validità di giorni 15 a 2-8°C

Il monoreattivo misto pronto all'uso ha una validità di giorni 7 a 2-8 °C.

Conservare la confezione a 2-8 °C e al riparo dalla luce.

## **5. PROCEDIMENTO DI MISURA**

### **MATERIALE NECESSARIO NON FORNITO**

- Fotometro per letture nel visibile con cella di lettura con cammino ottico di 1,0cm;
- Cuvette con cammino ottico di 1,0cm;
- Micropipette;

### **CAMPIONE**

Il campione è costituito da vino tal quale eventualmente diluito con acqua distillata e/o decolorato con carbone attivo.

#### **5.1. Procedura**

##### **CONDIZIONI DI REAZIONE**

Lunghezza d'onda	340nm
Temperatura	Ambiente, oppure 37°C
Percorso ottico	1 cm
Volume finale	2,050mL

Pipettare in cuvetta:

	Bianco Reagente	Calibratore (c)	Campione (s)
Acqua Distillata	0,050mL		
Calibratore 1,0g/L		0,050mL	
Campione			0,050mL
Reattivo 1	1,800mL	1,800mL	1,800mL
Reattivo 2	0,100mL	0,100mL	0,100mL
Miscelare i componenti e effettuare un prima lettura (A1) a 340nm azzerando contro il bianco reagente. Aggiungere ad ogni cuvetta:			
Reagente 3	0,100mL	0,100mL	0,100mL
Incubare le cuvette per 10 minuti a 37°C. Per letture a Temperatura Ambiente aumentare in modo opportuno il tempo di reazione. Effettuare le letture (A2)			

## **6. CALCOLO**

$$\text{Concentrazione di Ac. L-Malico nel Campione} = \frac{A2s - A1s}{A2c - A1c} \times \text{conc. Calibratore (1,0g/L)}$$

## **7. CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI E LIMITI DEL METODO**

Il reattivo presenta una linearità di risposta fino ad un massimo di 1,2g/L di Acido L-Malico circa.

Analisi ripetute *nella serie* e *tra* le serie hanno mostrato un Coefficiente di Variazione (CV%) compreso tra il 2 ed il 3%. La specificità del metodo di determinazione è provata in letteratura: non sono possibili cross-reazioni con composti simili.

## **8. CONTROLLI DI QUALITA' INTERNI**

E' opportuno effettuare sempre un controllo interno sulla qualità dei risultati, utilizzando insieme ai campioni un campione di controllo del commercio, oppure un pool di controllo domestico: ripetere tale controllo ad ogni sessione analitica fornisce una confidenza sul test che può portare, in caso di risultati al di fuori del range raccomandato dal produttore o stabilito internamente per quel campione, a rivalutare i risultati analitici ottenuti nella sessione.

## **9. PRETRATTAMENTO DEL CAMPIONE**

**Non sapendo se sia ancora avvenuta la rifermentazione malo-lattica si consiglia, in via preliminare, di diluire il campione 1+1 con acqua distillata e poi di moltiplicare il risultato finale per il fattore di diluizione (2).**

Generalmente un pretrattamento del campione non è necessario. Tuttavia, può essere utile decolorare i vini rossi molto strutturati con carbone attivo.

## **10. AVVERTENZE**

### **SOLO PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO**

#### Avvertenze per la sicurezza personale

Operare sempre secondo le "Buone Pratiche di Laboratorio".

Il reattivo contiene sostanze irritanti, evitare pertanto l'ingestione ed il contatto con le mucose. E' presente sodio azide la quale può formare miscele esplosive con rame e piombo: eliminarla per mezzo di grandi quantitativi di acqua.

Non pipettare con la bocca, usare guanti e protezioni personali adeguate nel maneggiare campioni e reattivi.

#### Avvertenze analitiche

- Prima dell'uso portare i reagenti ed i campioni a temperatura ambiente (15-25°C). Dopo l'uso riporre immediatamente i reagenti alla temperatura di conservazione.
- Non utilizzare i reagenti dopo la data di scadenza. Evitare l'inquinamento microbico dei reagenti poiché ciò riduce la validità del prodotto e può dar luogo a risultati errati.
- Non modificare la procedura né sostituire i reagenti con quelli di altri produttori.
- Evitare la contaminazione incrociata tra reagenti.

## **11. BIBLIOGRAFIA**

1. Ministero dell'Agricoltura e delle Foreste (1986) Approvazione dei "Metodi ufficiali di analisi per i mosti, i vini, gli agri di vino (aceti) e i sottoprodotti della vinificazione". Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana, n. 161 del 14 luglio 1986
2. Möllering, H. (1985) in Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H. U., ed.) 3rd. ed., vol. VII, pp. 39-47, Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach/Florida, Basel
3. Möllering, H. (1974) in Methoden der enzymatischen Analyse (Bergmeyer, H. U., Hrsg.) 3. Aufl., Bd. 2, S. 1636-1639; Verlag Chemie, Weinheim and (1974) in Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H. U., ed.) 2nd ed., vol. 3, pp. 1589-1593, Verlag Chemie, Weinheim/Academic Press, Inc., New York and London
4. Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts, Complément n° 1 à l'édition officielle de juin 1990, OFFICE INTERNATIONAL DE LA VIGNE ET DU VIN, pp. 195-197
5. AOAC Official Methods of Analysis (1990) 15th Ed., 5th Suppl. (1994), p. 274