

## ENZYTEC™ L-MALICO E1215

Método UV, para aprox. 32 test

Para uso en laboratorio

Almacenar entre +2º y +8ºC

El método está contenido en la legislación alimentaria de Austria, Alemania, Italia y Suiza, así como en la regulación Europea. Recomendado por ejemplo por IFU (Federación Internacional de Productores de Frutas), AIJN (Asociación de la Industria de Frutas y Néctares), MEBAK (Mittleuropäische Brautechnische Analysen-Kommission), OICCC (Oficina Internacional del Cacao, el Chocolate y la Confitería), OIV (Oficina internacional de la Viña y el Vino). Estandarizado por normas DIN (Alemania), EN (Europa), GOST (Rusia), NEN (Holanda), NF (Francia). Aprobado por AOAC (Association of Analytical Communities).

### Principio

L-Malato + NAD<sup>+</sup> — L-MDH → oxaloacetato + NADH + H<sup>+</sup>

Oxaloacetato + L-glutamato — GOT → L-aspartato + 2-oxoglutarato

Ref.: 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.

### Realización del ensayo

Longitud de onda: 340 nm (NADH)

$$\epsilon = 6.3 \text{ l x mmol}^{-1} \text{ x cm}^{-1}$$

Paso de luz: 1.00 cm (cubetas de cristal o plástico)

Temperatura: +20 a +25 °C

Volumen de ensayo: 2.220 ml

Medida: contra aire o contra agua

Dilución de la muestra: 0.5 a 30 µg L-malico en 0.100 a 1.000 ml de muestra

### Reactivos

# 1: Aprox. 34 ml de tampón Glycylglycina , pH aprox. 10.0, aprox. 490 mg ácido L-glutámico (para estabilidad ver etiqueta). *La solución está lista para usar.*

# 2: NAD, liofilizado, aprox. 250 mg (para estabilidad ver etiqueta). *Disolver el contenido del bote # 2 con 7 ml de agua bidestilada.* La solución es estable durante 1 mes a +2 / +8 °C, ó 2 meses a -15/ -25 °C.

#3: Aprox. 0.4 ml de suspensión de glutamato oxaloacetato transaminasa (GOT) (approx. 160 U) en sulfato de amonio (para estabilidad ver etiqueta). *La solución está lista para usar.* Agitar suavemente antes de usar.

# 4: Aprox. 0.4 ml de solución L-malato dehydrogenasa (L-MDH) (approx. 2400 U) en glycerol (para estabilidad ver etiqueta). *La solución está lista para usar.*

A demás (no contenido en el kit):

Estándar ácido L-Málico 0.15 g/l, para control del test sólo.

Los reactivos para la determinación de ácido L-Málico no son peligrosos. Las normas generales de seguridad para el trabajo en laboratorios químicos deben ser aplicadas. Después de usar los reactivos deben de ser eliminados junto al agua del laboratorio. Los envoltorios deben de ser reciclados.

### Procedimiento

Pipetear en las cubetas	Blanco	Estándar 1	Muestra 2	Ensayo repetido 3	Ensayo con estándar interno4	Ensayo de alta sensibilidad 5
Tampón Glycylglycina # 1	1.000 ml	1.000 ml	1.000 ml	1.000 ml	1.000 ml	1.000 ml
Solución NAD # 2	0.200 ml	0.200 ml	0.200 ml	0.200 ml	0.200 ml	0.200 ml
Suspensión GOT # 3	0.010 ml	0.010 ml	0.010 ml	0.010 ml	0.010 ml	0.010 ml
<b>Muestra 6</b> (de 0,02 a 0,15 g. ác. L-Málico)	-	-	<b>0.100 ml</b>	<b>0.200 ml</b>	<b>0.100 ml</b>	<b>1.000 ml</b>
Estandar 6 (0,15 g. ác. L-Málico)	-	0.100 ml	-	-	0.100 ml	-
Agua bidestilada	1.000 ml	0.900 ml	0.900 ml	0.800 ml	0.800 ml	-
<b>Mezclar7, después de aprox. 3 min leer la absorbancia (A1). Añadir:</b>						
Solución L-MDH # 4	0.010 ml	0.010 ml	0.010 ml	0.010 ml	0.010 ml	0.010 ml
<b>Mezclar7, después de completada la reacción (aprox. 5 a 10 min) leer la absorbancia del blanco y de los otros ensayos (A2) inmediatamente uno después de otro. Repetir la lectura pasados 2 min8.</b>						

### Notas

- 1 Usar “estándares” para observar “accidentes” en el análisis. La medición de estándar no es necesaria para el cálculo de resultados.
- 2 Este ensayo junto con el blanco es una determinación sencilla.
- 3 En caso de doble determinación, realizar dos ensayos con diferentes volúmenes de muestra. La diferencia de absorbancia medida debe de ser proporcional a los volúmenes de muestra (calculados con respecto a volúmenes).
- 4 Recuperación =  $[(\Delta A_{\text{muestra+estándar}} - \Delta A_{\text{muestra}}) / \Delta A_{\text{estándar}}] \times 100 [\%]$
- 5 Ensayo recomendado en el caso trazas, con volumen de muestra incrementado a 1.000 ml (0.0005 a 0.015 g/l ác. L-Málico).
- 6 Antes de dispensar, lave o cambie la punta de pipeta.
- 7 Por ejemplo con una espátula de plástico, o después de cerrar la cubeta con Parafilm (Marca registrada de American Can Co., Greenwich Ct., USA)
- 8 La reacción termina cuando la absorbancia es constante. Si la reacción no ha terminado continuar leyendo las absorbancias hasta que estas incrementen

constantemente (p.e. cada 2 min.). extrapolar la absorbancia al tiempo de adición de la suspensión # 4 (L-MDH).

### Cálculos

$\Delta A = (A_2 - A_1) \text{ muestra/estándar} - (A_2 - A_1) \text{ blanco}$

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

$c = (2.220 \times 134.09 \times \Delta A) / (6.3 \times 1.00 \times 0.100 \times 1000) = \mathbf{0.4725 \times \Delta A \text{ [g/l L-málico]}}$

Si la muestra ha sido diluida durante el proceso de preparación de la muestra, multiplicar el resultado por el factor de dilución F.

Cuando se analizan muestras que son pesadas para el análisis de las mismas, calcular el contenido de la cantidad pesada:

$$\text{Concentración L-Málico} = \frac{\text{C L-Málico [g/l muestra]}}{\text{Peso de la muestra [en g/l muestra]}} \times 100 \text{ [g/100 g]}$$

### Preparación de la muestra

Si la muestra tiene una de las características abajo mencionadas, que dificultan el ensayo, por favor siga el procedimiento correspondiente de preparación de la muestra:

1. Diluir las muestras líquidas (claras, incoloras y casi neutras) para obtener una solución de la muestra con 0,02 a 0,15 g/l de L-málico.
2. Filtrar o centrifugar las soluciones turbias, diluir (véase el punto. 1).
3. Desgasificar las muestras que contienen dióxido de carbono, por ejemplo por filtración, o añadir NaHCO<sub>3</sub> hasta que la solución sea ligeramente alcalina, diluir (véase el punto. 1).
4. Ajustar las soluciones ácidas (especialmente las ligeramente coloreadas) con NaOH o KOH a aprox. pH 8-10, incubar unos minutos, o diluir (véase el punto. 1) sin ajuste de pH en el caso de muestras sin color.
5. Medir "*muestras con color*" (ajustar a pH 8) contra blanco de muestra.
6. Tratar "soluciones fuertemente coloreadas" con PVPP sin diluir, p.e. 1 g/100 ml, mezclar, incubar unos minutos, filtrar.
7. Moler (tamaño de grano <0,3 mm) o homogeneizar muestras sólidas o semi-sólidas (pasta), extraer con agua, o disolver en agua, filtrar y diluir (véase el punto. 1) si es necesario.
8. Extraer muestras que contienen grasas con agua caliente a una temperatura superior al punto de fusión de la grasa, por ejemplo, en un matraz aforado de 100 ml. Ajustar a +20 ° C, llenar el matraz aforado hasta la marca. Conservar en hielo o en el frigorífico durante aprox. 15 / 30 min, filtrar.

9. Clarificar las muestras que contienen proteínas con reactivos Carrez .  
Pesar una cantidad suficiente de muestra sólida o pastosa en un matraz aforado de 100 ml, añadir aprox. 60 ml de agua. O pipetear una muestra líquida en un matraz aforado de 100 ml que contenga aprox. 60 ml de agua. Añadir y mezclar después de cada adición, 5 ml de Carrez-I-solución (3,60 g  $K_4 [Fe (CN) 6] \times 3H_2O$  = hexacianoferrato de potasio (II) / 100 ml), 5 ml de Carrez-II-solución (7,20 g  $ZnSO_4 \times 7 H_2O$  = sulfato de zinc hepta-hydrate/100 ml). Ajustar el pH a 7,5 a 8,5 mediante la adición de, por ejemplo 10 ml de NaOH (0,1 M). Llenar el matraz a la marca, mezclar y filtrar.

### Características del ensayo

1. *Especificidad* para L-málico (el ion reactivo L-malato ion). En el análisis de L-málico comercial el resultado esperado es de aprox. el 99 % .
2. *Sensibilidad:* 0.25 mg/l ( $\Delta A = 0.005$ ;  $v = 1.000$  ml ;  $V = 2.220$  ml)
3. *Límite de detección:* 0.5 mg/l ( $\Delta A = 0.010$ ;  $v=1.000$  ml;  $V= 2.220$  ml)
4. *Linealidad:* 0.5  $\mu$ g/ensayo ( $v = 1.000$  ml;  $V = 2.220$  ml)  
a 30  $\mu$ g/ensayo ( $v = 0.100$  ml;  $V = 2.220$  ml)
5. *Precisión:*  $\Delta A = +/- 0.005$  to  $0.010$  unidades de absorbancia  
 $CV =$  aprox. 1 to 2 %  
Zumo de fruta  $r = 0.014 + 0.030 \times cL\text{-málico en g/l [g/l]}$   
 $R = 0.032 + 0.070 \times cL\text{-málico en g/l [g/l]}$   
Vino:  $r = 0.03 + 0.034 \times cL\text{-málico en g/l [g/l]}$   
 $R = 0.05 + 0.071 \times cL\text{-málico en g/l [g/l]}$
6. *Interferencias:* puede haber reactivos dependiendo de la lentitud de la reacción después de la conversión de L-malato en A2. Una extrapolación de las absorbancias en el tiempo de la adición de L-MDH no será necesaria si se miden inmediatamente una detrás de otra las de los blancos y las muestras.