

**ACIDO D-LATTICO
(LIQUID READY™)
ISTRUZIONI DEL PRODOTTO**

**SKU: 700007709
K-DATELQ**

08/25

(50 saggi manuali per kit) o
(500 saggi con analizzatore automatico per kit)

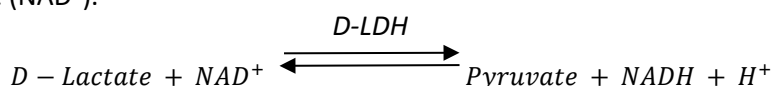


INTRODUZIONE:

L'acido D-lattico si trova in molti alimenti e bevande. Prodotto naturalmente dai batteri lattici, l'acido D-lattico si trova nei prodotti lattiero-caseari fermentati come yogurt e formaggio, nelle verdure in salamoia, nei salumi e nel pesce. La qualità del latte, della carne e dei succhi di frutta può essere stabilita misurando il contenuto di acido D-lattico. Nell'industria vinicola, la produzione di acido D-lattico può indicare il deterioramento del vino da parte dei batteri lattici.

PRINCIPIO:

La quantificazione dell'acido D-lattico richiede due reazioni. Nella prima reazione, catalizzata dalla D-lattato deidrogenasi (D-LDH), l'acido D-lattico (D-lattato) viene ossidato a piruvato in presenza di nicotinamide-adenina dinucleotide (NAD^+).



Poiché l'equilibrio della reazione è saldamente a favore dell'acido D-lattico e del NAD^+ , è necessaria un'ulteriore reazione per "intrappolare" il prodotto piruvato. Questa reazione è catalizzata chimicamente. La quantità di NADH formata nella reazione di accoppiamento è stechiometrica rispetto alla quantità di acido D-lattico. Il NADH viene misurato dall'aumento dell'assorbanza a 340 nm.

SPECIFICITÀ, SENSIBILITÀ E LINEARITÀ:

- Il saggio è specifico per l'acido D-lattico.
- Il limite di rilevazione (LOD) è pari a 0,004 g/l e il limite di quantificazione (LOQ) è pari a 0,011 g/l (utilizzando un volume di campione di 0,1 ml).
- L'intervallo di misurazione consigliato è compreso tra 0,02 e 0,5 g/L (utilizzando un volume di campione di 0,1 mL). Ciò corrisponde a 2-50 µg di acido D-lattico per saggio.

INTERFERENZA:

Il D-Fruttosio interferisce a concentrazioni superiori a 50 g/l. L'acido ascorbico interferisce a concentrazioni superiori a 1 g/L e i solfiti interferiscono a concentrazioni superiori a 0,1 g/L. Si raccomanda di diluire i campioni con il contenuto dichiarato di questi agenti interferenti prima del test.

SICUREZZA:

È necessario attenersi alle misure di sicurezza generali applicabili a tutte le sostanze chimiche. Dopo l'uso, i reagenti possono essere smaltiti con i normali rifiuti di laboratorio, in conformità con le normative e le linee guida locali.

NOTA: per ulteriori informazioni sulle prestazioni di questo prodotto, fare riferimento al rapporto di validazione associato disponibile sul sito Web di Megazyme. Per ulteriori informazioni sull'utilizzo e sulla manipolazione in sicurezza di questo prodotto, fare riferimento alla scheda dati di sicurezza (SDS) disponibile sul sito Web di Megazyme.

CONTENUTO DEL KIT:

I kit sono progettati per saggi manuali e automatizzati. I reagenti sono sufficienti per eseguire 50 saggi in formato manuale o 500 saggi in formato con analizzatore automatico. Il kit contiene:

Reagente 1 (2 x 50 ml):	Tampone, D-LDH Contiene sodio azide (0,05% <i>p/v</i>) come conservante. Pronto all'uso. Conservare a una temperatura di 4 °C. Verificare la data di scadenza su ciascuna delle etichette.
Reagente 2 (2 x 12,5 ml):	NAD ⁺ Pronto all'uso. Conservare a una temperatura di 4 °C. Verificare la data di scadenza su ciascuna delle etichette.
Standard (5 ml):	Acido D-lattico standard (0,5 g/L). Contiene sodio azide (0,05% <i>p/v</i>) come conservante. Pronto all'uso. Conservare a una temperatura di 4 °C. Verificare la data di scadenza su ciascuna delle etichette.

NOTA: la soluzione standard di acido D-lattico viene sottoposta al saggio laddove vi siano dubbi sulla precisione dello spettrofotometro utilizzato o si sospetti che l'inibizione sia causata da sostanze presenti nel campione. La concentrazione di acido D-lattico viene determinata direttamente dal coefficiente di estinzione di NADH.

PREPARAZIONE DELLE SOLUZIONI DEI REAGENTI:

Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (20-25 °C) prima dell'uso.

PROCEDURA DI SAGGIO MANUALE:

Lunghezza d'onda: 340 nm

Cuvette: percorso ottico di 1 cm (vetro o plastica)

Temperatura: 20-37 °C

Volume finale: 2,60 ml

soluzione di campione: da 0,02 g/L a 0,5 g/L (ovvero da 2 a 50 µg di acido D-lattico per cuvetta)

Leggere controluce (senza una cuvetta lungo il percorso ottico) o sull'acqua

Pipetta nelle cuvette	Bianco	Campione
Reagente 1	2,0 ml	2,0 ml
Campione	-	0,1 ml
Acqua distillata	0,1 ml	-
Mescolare*, incubare per ~3 minuti a 20-37 °C, quindi leggere le assorbanze (A_1) Aggiungere il Reagente 2 come descritto di seguito:		
Reagente 2	0,5 ml	0,5 ml
Mescolare*, incubare per ~10 minuti a 20-37 °C, quindi leggere le assorbanze (A_2). **		

* Per aspirazione con il puntale per pipetta utilizzato per dispensare il liquido, oppure per delicata inversione dopo aver sigillato la cuvetta con un tappo per cuvette o Parafilm®.

** Potrebbe essere necessario controllare se la reazione ha raggiunto il completamento continuando a leggere le assorbanze a intervalli di 1 minuto. Se la reazione non ha raggiunto il completamento, continuare a misurare le assorbanze fino a quando i valori misurati rimangono invariati o aumentano costantemente nell'arco di 1 minuto. Se il tasso di incremento dell'assorbanza è maggiore per il campione rispetto al bianco, estrapolare le assorbanze (campione e bianco) fino al momento dell'aggiunta del Reagente 2.

NOTA: il valore del reagente bianco deve essere determinato una volta per ogni sessione e sottratto dal risultato di ciascun campione.

CALCOLO:

NOTA: questi calcoli possono essere semplificati utilizzando lo strumento *MegaCalc™*, scaricabile dalla pagina del prodotto.

1. Calcolo del fattore di diluizione (df)

Determinare il fattore di diluizione (df) in base ai rapporti dei componenti:

$$df = \frac{\text{Volume di campione [mL]} + \text{volume R1 [mL]}}{\text{Volume totale di reazione [ml]}}$$

Segue la procedura di saggio manuale per l'acido D-lattico:

$$df = \frac{0,1 + 2,0}{2,6} = 0,808$$

2. Calcolo della differenza di assorbanza $\Delta A_{\text{Acido D-lattico}}$

$$\Delta A_{\text{Acido D-lattico}} = (A_2 - df \times A_1)_{\text{campione}} - (A_2 - df \times A_1)_{\text{blank}}$$

Segue la procedura di saggio manuale per l'acido D-lattico:

$$\Delta A_{\text{Acido D-lattico}} = (A_2 - 0,808 \times A_1)_{\text{campione}} - (A_2 - 0,808 \times A_1)_{\text{bianco}}$$

NOTA: l'aumento o la diminuzione del volume di campione con volumi di reagente invariati richiede il ricalcolo del fattore di diluizione; se i volumi vengono modificati, le prestazioni potrebbero risentirne.

3. Calcolo del contenuto di acido D-lattico

La concentrazione di acido D-lattico può essere calcolata come segue:

$$c = \frac{V \times MW}{\epsilon \times d \times v} \times \Delta A_{\text{Acido D-lattico}} \quad [\text{g/l}]$$

dove:

V = volume finale [ml]

MW = peso molecolare dell'acido D-lattico [g/mol]

ϵ = coefficiente di estinzione di NADH a 340 nm [$\text{l} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$]

d = percorso ottico [cm]

v = volume di campione [ml]

Segue la procedura di saggio manuale per l'acido D-lattico:

$$c = \frac{2,6 \times 90,1}{6.300 \times 1,0 \times 0,1} \times \Delta A_{\text{Acido D-lattico}} \quad [\text{g/l}]$$

$$= 0,3718 \times \Delta A_{\text{Acido D-lattico}} \quad [\text{g/l}]$$

Se il campione è stato diluito durante la preparazione, il risultato deve essere moltiplicato per il fattore di diluizione del campione F.

4. Calcolo del contenuto di acido D-lattico in campioni solidi o semisolidi:

Quando si analizzano campioni solidi e semisolidi che vengono pesati per la preparazione del campione, il contenuto (g/100 g) viene calcolato dalla quantità pesata come segue:

$$\frac{C_{\text{Acido D-lattico}} [\text{g/L soluzione di campione}]}{\text{peso}_{\text{campione}} [\text{g/l soluzione di campione}]} \times 100 \quad [\text{g/100 g}]$$

PROCEDURA DI SAGGIO CON ANALIZZATORE AUTOMATICO:

Questo kit è stato progettato per l'uso con analizzatori automatici e può essere adattato alla maggior parte degli strumenti. Di seguito è riportato un metodo esemplificativo (convalidato sull'analizzatore Awareness ChemWell®-T).

NOTA: per ciascun lotto di campioni che viene applicato alla determinazione dell'acido D-lattico deve essere eseguita contemporaneamente una curva di calibrazione utilizzando lo stesso lotto di reagenti.

Parametro	Dettagli								
Lunghezza d'onda	340/405 nm (primaria/secondaria)								
Temperatura	20 - 37 °C								
Test	<p>Test finale con la seguente sequenza di test:</p> <ul style="list-style-type: none">– Aggiungere il Reagente 1 [0,2 ml]– Aggiungere il campione o il calibratore [0,01 ml]– Preincubare per 1-3 minuti a [20-37 °C]– Misurare A₁ a 340/405 nm– Aggiungere il Reagente 2 [0,05 ml]– Incubare per 10 minuti a [20-37 °C]– Misurare A₂ a 340/405 nm– Calcolare A₂ – A₁ rispetto alla curva di calibrazione								
Calibrazione	<p>Calibrare utilizzando 2-4 calibratori con valori compresi tra 0 e 0,5 g/l. La curva di calibrazione è lineare.</p> <p>Di seguito è riportato un esempio di come utilizzare lo standard fornito con il kit per creare una curva di calibrazione:</p> <table><tr><td>Calibratore 1</td><td>0 g/l (utilizzare acqua distillata)</td></tr><tr><td>Calibratore 2</td><td>0,05 g/l (diluire lo Standard di 10 volte)</td></tr><tr><td>Calibratore 3</td><td>0,25 g/l (diluire lo Standard di 2 volte)</td></tr><tr><td>Calibratore 4</td><td>0,5 g/l (utilizzare lo standard come tale)</td></tr></table> <p><i>Eseguire tutte le diluizioni con acqua distillata.</i></p>	Calibratore 1	0 g/l (utilizzare acqua distillata)	Calibratore 2	0,05 g/l (diluire lo Standard di 10 volte)	Calibratore 3	0,25 g/l (diluire lo Standard di 2 volte)	Calibratore 4	0,5 g/l (utilizzare lo standard come tale)
Calibratore 1	0 g/l (utilizzare acqua distillata)								
Calibratore 2	0,05 g/l (diluire lo Standard di 10 volte)								
Calibratore 3	0,25 g/l (diluire lo Standard di 2 volte)								
Calibratore 4	0,5 g/l (utilizzare lo standard come tale)								

PREPARAZIONE DEL CAMPIONE:

1. Diluizione del campione

La quantità di acido D-lattico presente nel campione deve essere nel rango da 0,02 g/L a 0,5 g/L. Se il valore di $\Delta A_{\text{Acido D-lattico}}$ è troppo basso (ad es. <0,1), pesare più campione o ridurre la diluizione. Se il valore di $\Delta A_{\text{Acido D-lattico}}$ è troppo alto (ad es. >2,0), aumentare la diluizione in acqua distillata.

Tabella di diluizione del campione

Concentrazione stimata di acido D-lattico (g/L)	Diluizione con acqua	Fattore di diluizione (F)
<0,5	Non è richiesta alcuna diluizione	1
0,5 - 5	1 mL di campione + 9 mL di acqua	10
5 - 50	1 mL di campione + 99 mL di acqua	100

2. Guida alla preparazione del campione in linea generale

- È possibile utilizzare direttamente nel saggio campioni liquidi limpidi, leggermente colorati e pressoché neutri, con una concentrazione fino a 0,5 g/L di acido D-lattico.
- I campioni torbidi devono essere filtrati o centrifugati.
- I campioni acidi (pH <3,0) devono essere neutralizzati fino a un pH approssimativamente pari a 8,0.
- I campioni contenenti anidride carbonica devono essere degassati mediante agitazione delicata o rimescolamento con una bacchetta di vetro.
- I campioni solidi devono essere omogeneizzati, estratti in acqua e, se necessario, filtrati o centrifugati.
- I campioni fortemente colorati devono essere trattati aggiungendo 0,2 g di polivinilpolipirrolidone (PVPP) per 10 mL di campione in una provetta. Agitare energicamente la provetta per 5 minuti e poi filtrare su carta da filtro.
- Deproteinizzare i campioni utilizzando il kit di chiarificazione Carrez (700004270, K-CARREZ).
- Rimuovere i lipidi utilizzando il kit di chiarificazione Carrez (700004270, K-CARREZ).

3. Esempi di preparazione dei campioni suggeriti

(a) Determinazione dell'acido D-lattico nel vino. Filtrare attraverso un filtro per siringa da 0,2 micron per la chiarificazione. In alternativa, centrifugare un'aliquota di vino per 5 minuti a 15.000 g. *In genere, è necessaria una diluizione di 5 volte in acqua distillata per il vino rosso e non è richiesta alcuna diluizione per il vino bianco.*

(b) Determinazione dell'acido D-lattico nella birra (ad es. lager). Eliminare la carbonatazione agitando un campione in un becher per circa 60 secondi con una bacchetta di vetro. Filtrare attraverso un filtro per siringa da 0,2 micron e utilizzare il filtrato limpido nel saggio. *In genere non è necessaria alcuna diluizione.*

(c) Determinazione dell'acido D-lattico nei prodotti lattiero-caseari fermentati (ad es. panna acida).

Pesare 10 g di prodotto fermentato in un matraccio volumetrico da 50 mL, aggiungere le seguenti soluzioni e mescolare dopo ogni aggiunta: 5 ml di soluzione di Carrez I, 5 ml di soluzione di Carrez II e 10 ml di soluzione di NaOH (100 mM). Riempire fino al segno con acqua distillata, mescolare accuratamente e filtrare con un filtro di carta. *In genere non è necessaria un'ulteriore diluizione.*

(d) Determinazione dell'acido D-lattico nei prodotti a base di carne (ad es. salame).

Omogeneizzare i campioni solidi in un frullatore e pesare accuratamente 5 g di materiale rappresentativo in un recipiente da 100 ml (ad es. un flacone Duran®). Aggiungere 20 ml di acido perclorico 1 M e mescolare con una spatola per 5 minuti o fino a quando il campione è disperso uniformemente. Aggiungere 40 ml di acqua distillata e mescolare per altri 10 minuti utilizzando una bacchetta per agitazione. Regolare il pH a 7,0 con KOH 8 M, trasferire quantitativamente la sospensione in un matraccio volumetrico e portare a 100 mL con acqua distillata. Conservare su ghiaccio o in frigorifero per 20 minuti per far precipitare il perclorato di potassio e consentire la separazione dei lipidi. Filtrare e scartare i primi 3-5 mL, quindi utilizzare il filtrato limpido per il saggio. *In genere non è necessaria un'ulteriore diluizione.*

(e) Determinazione dell'acido D-lattico nel succo di crauti.

Filtrare attraverso un filtro per siringa da 0,2 micron per la chiarificazione. In alternativa, centrifugare un'aliquota di succo per 5 minuti a 15.000 g. *In genere, è necessaria una diluizione di 20 volte in acqua distillata.*

NOTA IMPORTANTE: I precedenti sono soltanto esempi di preparazione del campione suggeriti. In caso di domande su queste o altre matrici, si prega di contattare il rappresentante di vendita locale per ricevere assistenza.

SERVIZI E ASSISTENZA TECNICA

Per qualsiasi assistenza, si prega di rivolgersi al rappresentante di vendita locale, in particolare per quanto riguarda:

- Risoluzione dei problemi
- Analisi dei dati
- Ulteriori test sulla matrice
- Supporto applicativo in relazione agli analizzatori automatici

La documentazione di supporto è disponibile nella pagina del prodotto:

- Guida rapida di riferimento
- MegaCalc™
- Schede dati di sicurezza (SDS)
- Certificato di analisi (COA)
- Rapporto di validazione



Per ulteriori informazioni, contattarci all'indirizzo: neogen.com/contact

Assenza di garanzia

Le informazioni contenute nel presente protocollo di saggio sono, per quanto a nostra conoscenza, veritiere e accurate, ma poiché le condizioni d'uso sono al di fuori del nostro controllo, non si fornisce o si implica alcuna garanzia in merito a qualsiasi raccomandazione o suggerimento che possa essere fatto o che qualsiasi utilizzo non costituisca una violazione di brevetti.

Responsabilità dell'utente:

- Gli utenti sono tenuti a familiarizzare con le istruzioni e le informazioni sul prodotto. Per maggiori informazioni, visitare il nostro sito Web all'indirizzo neogen.com o contattare il rappresentante o il distributore autorizzato Neogen® locale.
- Quando si seleziona un metodo di test, è importante riconoscere che fattori esterni come i metodi di campionamento, i protocolli di prova, la preparazione del campione, la manipolazione, la tecnica di laboratorio e il campione stesso possono influenzare i risultati.
- Al momento della selezione del metodo di test o del prodotto, è responsabilità dell'utente valutare un numero sufficiente di campioni con le matrici e i fattori interferenti appropriati per assicurarsi che il metodo di test scelto soddisfi i propri criteri.
- È inoltre responsabilità dell'utente determinare che tutti i metodi di prova e i risultati soddisfino i requisiti dei propri clienti e fornitori.
- Come con qualsiasi metodo di test, i risultati ottenuti non costituiscono una garanzia della qualità delle matrici o dei processi testati.

Termini e condizioni:

I termini e le condizioni completi di Neogen sono disponibili [online](#).