

**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)

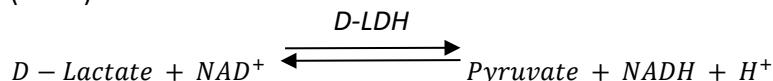
Megazyme®
by **NEOGEN®**

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 stochiometrica 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:

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

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 $\Delta A_{\text{Acido D-lattico}}$

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

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:

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

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 A_1 a 340/405 nm– Aggiungere il Reagente 2 [0,05 ml]– Incubare per 10 minuti a [20-37 °C]– Misurare A_2 a 340/405 nm– Calcolare $A_2 - A_1$ 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><tbody><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></tbody></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 range 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, veritieri 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](#).