

**ESSIGSÄURE
(LIQUID READY™)
PRODUKTANWEISUNGEN**

**SKU: 700007708
K-ACETLQ**

08/25

(50 manuelle Assays pro Kit) oder
(500 Auto-Analysiergeräte-Assays pro Kit)

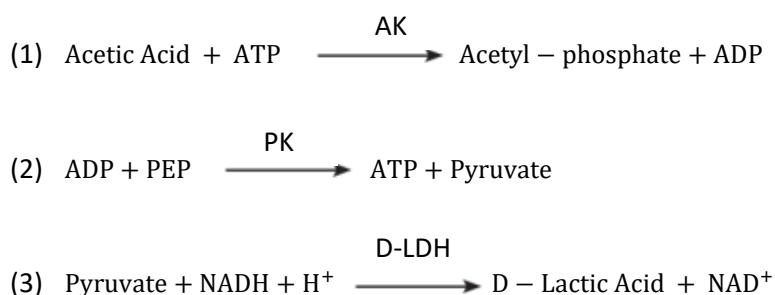
Megazyme®
by **NEOGEN®**

EINFÜHRUNG:

Essigsäure (Acetat) kommt in einer Vielzahl von Lebensmitteln und Getränken vor. In der Weinindustrie ist er einer der wichtigsten Qualitätsparameter und wird während des gesamten Weinherstellungsprozesses gemessen. Die am häufigsten verwendete Methode zur enzymatischen Quantifizierung von Essigsäure ist die Verwendung von Acetyl-Coenzym-A-Synthetase (ACS). Diese Methode basiert jedoch auf der Verwendung einer durch L-Malatdehydrogenase katalysierten Indikatorreaktion, die sich in einem permanenten Gleichgewicht befindet, sodass eine nicht-stöchiometrische Zunahme der Absorption durch das in der Probe vorhandene Acetat beobachtet wird. Im Testkit für Essigsäure (Liquid Ready) wird eine alternative Biochemie verwendet, die auf dem Enzym Acetatkinese basiert. Dieses Kit liefert hervorragende lineare Kalibrierungskurven und führt aufgrund der in der Probe vorhandenen Essigsäure zu einer stöchiometrischen Änderung der Absorption.

GRUNDSATZ:

Acetatkinese (AK) wandelt in Gegenwart von ATP Essigsäure in Acetylphosphat und Adenosin-5'-diphosphat (ADP) um (1). Das in (1) gebildete ADP wird durch Phosphoenolpyruvat (PEP) in Gegenwart von Pyruvatkinase (PK) (2) wieder in ATP und Pyruvat umgewandelt. In Gegenwart des Enzyms D-Laktatdehydrogenase (D-LDH) wird Pyruvat durch reduziertes Nicotinamidadenindinukleotid (NADH) zu D-Laktat reduziert, mit der Produktion von NAD⁺ (3).



Die Menge an NAD⁺, die im obigen Reaktionsweg gebildet wird, ist stöchiometrisch mit der Menge an Essigsäure. Das NAD⁺ wird durch die Senkung der Extinktion bei 340 nm gemessen.

SPEZIFITÄT, EMPFINDLICHKEIT UND LINEARITÄT:

- Das Assay ist spezifisch für Essigsäure.
- Das Kit bietet zwei verschiedene Methoden, die auf dem geschätzten Essigsäuregehalt in der Probe basieren: eine High-Range-Methode für den hohen Bereich für Proben mit höheren Konzentrationen und eine Sensitive-Range-Methode für den empfindlichen Bereich zum Nachweis niedrigerer Konzentrationen.
- **High Range:** Die Nachweigrenze (LOD) liegt bei 0,011 g/l, die Bestimmungsgrenze (LOQ) bei 0,033 g/l bei einem Probenvolumen von 0,025 ml. Der empfohlene Messbereich liegt zwischen 0,13 und 1,30 g/l (unter Verwendung eines Probenvolumens von 0,025 ml). Dies entspricht 3,25 µg – 32,5 µg Essigsäure pro Test.
- **Sensitive Range:** Die Nachweigrenze (LOD) beträgt 0,005 g/l und die Bestimmungsgrenze (LOQ) 0,014 g/l bei einem Probenvolumen von 0,1 ml. Der empfohlene Messbereich liegt zwischen 0,033 und 0,33 g/l bei einem Probenvolumen von 0,1 ml. Dies entspricht 3,25 µg – 32,5 µg Essigsäure pro Assay.

INTERFERENZ:

Calciumchlorid stört bei Konzentrationen über 1 g/l. Es wird empfohlen, Proben, die diesen Störstoff enthalten, vor der Untersuchung zu verdünnen.

SICHERHEIT:

Die allgemeinen Sicherheitsmaßnahmen, die für alle chemischen Substanzen gelten, sollten beachtet werden. Nach Gebrauch können die Reagenzien gemäß den örtlichen Vorschriften und Richtlinien mit dem üblichen Laborabfall entsorgt werden.

HINWEIS: Weitere Informationen zur Leistung und sicheren Verwendung dieses Produkts finden Sie im zugehörigen Validierungsbericht und Sicherheitsdatenblatt, die auf der Megazyme-Website verfügbar sind.

KIT-INHALT:

Die Kits sind sowohl für den manuellen als auch für den automatisierten Einsatz konzipiert. Die Reagenzien sind ausreichend für die Durchführung von 50 Assays im manuellen Format oder 500 Assays im automatisierten Format mit einem Analysegerät. Der Kit enthält:

Reagenz 1 (2 x 50 ml): ATP, PEP, NADH
Gebrauchsfertig.
Bei 4 °C lagern. Verfallsdatum siehe individuelle Etiketten.

Reagenz 2 (2 x 12,5 ml): AK, PK, D-LDH
Enthält Natriumazid (0,05 % w/v) als Konservierungsmittel. Gebrauchsfertig.
Bei 4 °C lagern. Verfallsdatum siehe individuelle Etiketten.

Standard (5 ml): Essigsäure-Standard (1,3 g/l)
Enthält Natriumazid (0,02 % w/v) als Konservierungsmittel. Gebrauchsfertig.
Bei 4 °C lagern. Verfallsdatum siehe individuelle Etiketten.

HINWEIS: Die Essigsäure-Standardlösung wird nur dann getestet, wenn Zweifel an der Genauigkeit des verwendeten Spektralphotometers bestehen oder wenn der Verdacht besteht, dass eine Hemmung durch Substanzen in der Probe verursacht wird. Die Konzentration der Essigsäure wird direkt anhand des Extinktionskoeffizienten von NAD⁺ bestimmt.

VORBEREITUNG DER REAGENZLÖSUNGEN:

Alle Reagenzien sind vor Gebrauch auf Raumtemperatur (20–25 °C) zu bringen.

MANUELLES ASSAY-VERFAHREN – HIGH RANGE:

Wellenlänge: 340 nm
Küvette: 1 cm Lichtweg (Glas oder Kunststoff)
Temperatur: 20–25 °C
Probenvolumen: 0,025 ml
Endvolumen: 2,525 ml
Probenlösung: 0,13 g/l bis 1,3 g/l (d. h. 3,25 µg – 32,5 µg Essigsäure pro Küvette)
AbleSEN GEGEN LUFT (ohne Küvette im Lichtweg) oder gegen Wasser

In die Küvetten pipettieren	Leerwert	Probe
Reagenz 1	2,0 ml	2,0 ml
Probe	-	0,025 ml
Destilliertes Wasser	0,025 ml	-
Mischen*, ~ 3 Minuten bei 20–25 °C inkubieren, dann die Extinktionen ablesen (A_1) Reagenz 2 wie unten beschrieben hinzugeben:		
Reagenz 2	0,5 ml	0,5 ml
Mischen*, ~ 15 Minuten bei 20–25 °C inkubieren, dann die Extinktionen ablesen (A_2). **		

* Entweder durch Ansaugen mit der Pipettenspitze, die zur Abgabe der Flüssigkeit verwendet wurde, oder durch leichtes Umdrehen nach dem Verschließen der Küvette mit einem Küvettendeckel oder Parafilm®.

** Eventuell muss überprüft werden, ob die Reaktion abgeschlossen ist, indem die Extinktionen weiterhin in Abständen von 1 Minute gemessen werden. Wenn die Reaktion noch nicht abgeschlossen ist, mit der Messung der Extinktionen fortfahren, bis die gemessenen Werte entweder gleich bleiben oder über 1 Minute hinweg konstant ansteigen. Ist diese „Kriechrate“ bei der Probe größer als beim Leerwert, müssen die Extinktionen (Probe und Leerwert) zurück auf den Zeitpunkt der Zugabe von Reagenz 2 extrapoliert werden.

HINWEIS: Der Reagenzleerwert muss für jeden Lauf einmal bestimmt und von jedem Probenergebnis subtrahiert werden.

MANUELLES ASSAY-VERFAHREN – SENSITIVE RANGE:

Wellenlänge: 340 nm
Küvette: 1 cm Lichtweg (Glas oder Kunststoff)
Temperatur: 20–25 °C
Probenvolumen: 0,1 ml
Endvolumen: 2,6 ml
Probenlösung: 0,033 g/l bis 0,33 g/l (d. h. 3,25 µg – 32,5 µg Essigsäure pro Küvette)
AbleSEN GEGEN LUFT (ohne Küvette im Lichtweg) oder gegen Wasser

In die Küvetten pipettieren	Leerwert	Probe
Reagenz 1	2,0 ml	2,0 ml
Probe	-	0,1 ml
Destilliertes Wasser	0,1 ml	-
Mischen*, ~ 3 Minuten bei 20–25 °C inkubieren, dann die Extinktionen ablesen (A_1) Reagenz 2 wie unten beschrieben hinzugeben:		
Reagenz 2	0,5 ml	0,5 ml
Mischen*, ~ 15 Minuten bei 20–25 °C inkubieren, dann die Extinktionen ablesen (A_2). **		

* Entweder durch Ansaugen mit der Pipettenspitze, die zur Abgabe der Flüssigkeit verwendet wurde, oder durch leichtes Umdrehen nach dem Verschließen der Küvette mit einem Küvettendeckel oder Parafilm®.

** Eventuell muss überprüft werden, ob die Reaktion abgeschlossen ist, indem die Extinktionen weiterhin in Abständen von 1 Minute gemessen werden. Wenn die Reaktion noch nicht abgeschlossen ist, mit der Messung der Extinktionen fortfahren, bis die gemessenen Werte entweder gleich bleiben oder über 1 Minute hinweg konstant ansteigen. Ist diese „Kriechrate“ bei der Probe größer als beim Leerwert, müssen die Extinktionen (Probe und Leerwert) zurück auf den Zeitpunkt der Zugabe von Reagenz 2 extrapoliert werden.

HINWEIS: Der Reagenzleerwert muss für jeden Lauf einmal bestimmt und von jedem Probenergebnis subtrahiert werden.

BERECHNUNG:

HINWEIS: Diese Berechnungen können mit dem Tool *MegaCalc™* vereinfacht werden, das von der Produktseite heruntergeladen werden kann.

1. Berechnung des Verdünnungsfaktors (df)

Bestimmen Sie den Verdünnungsfaktor (df) anhand der Komponentenverhältnisse:

$$df = \frac{\text{Probenvolumen [ml]} + R1\text{-Volumen [ml]}}{\text{Gesamtes Reaktionsvolumen [ml]}}$$

Folgendes gilt für das Essigsäure **High-Range-Testverfahren**:

$$df = \frac{0,025 + 2,0}{2,525} = 0,802$$

Folgendes gilt für das Essigsäure **Sensitive-Range-Testverfahren**:

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

2. Berechnung der Extinktionsdifferenz $\Delta A_{\text{Essigsäure}}$

$$\Delta A_{\text{Essigsäure}} = (A_1 \times df - A_2)_{\text{Probe}} - (A_1 \times df - A_2)_{\text{Leerwert}}$$

Folgendes gilt für das Essigsäure **High-Range-Testverfahren**:

$$\Delta A_{\text{Essigsäure}} = (A_1 \times 0,802 - A_2)_{\text{sample}} - (A_1 \times 0,802 - A_2)_{\text{Leerwert}}$$

Folgendes gilt für das Essigsäure **Sensitive-Range-Testverfahren**:

$$\Delta A_{\text{Essigsäure}} = (A_1 \times 0,808 - A_2)_{\text{sample}} - (A_1 \times 0,808 - A_2)_{\text{Leerwert}}$$

HINWEIS: Eine Vergrößerung oder Verkleinerung des Probenvolumens bei unverändertem Reagenzienvolumen erfordert eine Neuberechnung des Verdünnungsfaktors. Wenn die Volumina geändert werden, kann die Leistung beeinträchtigt werden.

3. Berechnung des Essigsäuregehalts in g/l

Die Konzentration von Essigsäure kann wie folgt berechnet werden:

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

wobei:

V = endgültiges Volumen [ml]

MW = Molekulargewicht der Essigsäure [g/mol]

ϵ = Extinktionskoeffizient von NADH bei 340 nm [$\text{l} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$]

d = Strahlengang [cm]

v = Probenvolumen [ml]

Folgendes gilt für das Essigsäure **High-Range-Testverfahren**:

$$c = \frac{2,525 \times 60,05}{6300 \times 1,0 \times 0,025} \times \Delta A_{\text{Essigsäure}} \quad [\text{g/l}]$$

$$= 0,9627 \times \Delta A_{\text{Essigsäure}} \quad [\text{g/l}]$$

Folgendes gilt für das Essigsäure **Sensitive-Range-Testverfahren**:

$$c = \frac{2,6 \times 60,05}{6300 \times 1,0 \times 0,1} \times \Delta A_{\text{Essigsäure}} \quad [\text{g/l}]$$

$$= 0,2478 \times \Delta A_{\text{Essigsäure}} \quad [\text{g/l}]$$

Wurde die Probe während der Vorbereitung verdünnt, ist das Ergebnis mit dem Proben-Verdünnungsfaktor F zu multiplizieren.

4. Berechnung des Essigsäure-Gehalts in festen oder halbfesten Proben:

Bei der Analyse von festen und halbfesten Proben, die für die Probenvorbereitung gewogen werden, wird der Gehalt (g/100 g) aus der gewogenen Menge wie folgt berechnet:

$$\frac{C_{\text{Essigsäure}} \text{ [g/l Probennlösung]}}{\text{Gewicht}_{\text{Probe}} \text{ [g/l Probennlösung]}} \times 100 \quad [\text{g}/100 \text{ g}]$$

AUTOMATISIERTES TESTVERFAHREN MIT EINEM ANALYSEGERÄT:

Dieser Kit wurde für automatische biochemische Analysegeräte entwickelt und kann an die meisten Geräte angepasst werden. Nachfolgend ist eine Beispielmethode dargestellt (validiert auf dem Awareness Technology, Inc. ChemWell®-T-Analysegerät).

HINWEIS: Für jede Probencharge, die für die Bestimmung von Essigsäure verwendet wird, muss gleichzeitig eine Kalibrierungskurve mit derselben Reagenziencharge erstellt werden.

Parameter	Details								
Wellenlänge	340/405 nm (primär/sekundär)								
Temperatur	20–37 °C								
Test	<p>Endpunkttest mit folgender Testfolge:</p> <ul style="list-style-type: none">– Reagenz 1 hinzugeben [0,2 ml]– Probe oder Kalibrator hinzugeben [0,01 ml]– 1–3 Minuten vorinkubieren [20–37 °C]– A₁ bei 340/405 nm messen– Reagenz 2 hinzugeben [0,05 ml]– 15 Minuten bei [20–37 °C] inkubieren– A₂ bei 340/405 nm messen– A₂ – A₁ gegen die Kalibrierkurve berechnen								
Kalibrierung	<p>Mit 4 Kalibratoren im Bereich von 0–0,325 g/l kalibrieren. Die Kalibrierkurve ist linear.</p> <p>Ein Beispiel für die Verwendung des mit dem Kit gelieferten Standards zur Erstellung einer Kalibrierungskurve ist unten dargestellt:</p> <table><tbody><tr><td>Kalibrator 1</td><td>0 g/l (destilliertes Wasser verwenden)</td></tr><tr><td>Kalibrator 2</td><td>0,065 g/l (Standard 20-fach verdünnen)</td></tr><tr><td>Kalibrator 3</td><td>0,130 g/l (Standard 10-fach verdünnen)</td></tr><tr><td>Kalibrator 4</td><td>0,325 g/l (Standard 4-fach verdünnen)</td></tr></tbody></table> <p><i>Alle Verdünnungen mit destilliertem Wasser durchführen.</i></p>	Kalibrator 1	0 g/l (destilliertes Wasser verwenden)	Kalibrator 2	0,065 g/l (Standard 20-fach verdünnen)	Kalibrator 3	0,130 g/l (Standard 10-fach verdünnen)	Kalibrator 4	0,325 g/l (Standard 4-fach verdünnen)
Kalibrator 1	0 g/l (destilliertes Wasser verwenden)								
Kalibrator 2	0,065 g/l (Standard 20-fach verdünnen)								
Kalibrator 3	0,130 g/l (Standard 10-fach verdünnen)								
Kalibrator 4	0,325 g/l (Standard 4-fach verdünnen)								

PROBENVORBEREITUNG:

1. Probenverdünnung

Das Kit bietet zwei verschiedene Methoden, die auf dem geschätzten Essigsäuregehalt in der Probe basieren: eine High-Range-Methode für den hohen Bereich für Proben mit höheren Konzentrationen (0,13 g/l bis 1,3 g/l) und eine Sensitive-Range-Methode für den empfindlichen Bereich zum Nachweis niedrigerer Konzentrationen (0,033 g/l to 0,33 g/l). Die in der Probe vorhandene Menge an Essigsäure sollte zwischen 0,033 und 1,3 g/l liegen.

Verdünnungstabelle (manuelles Testverfahren)

Geschätzte Konzentration von Essigsäure (g/l)	Verdünnung mit Wasser	Verdünnungsfaktor (F)
< 0,33	Keine Verdünnung erforderlich (Sensitive Range).	1
< 1,3	Keine Verdünnung erforderlich (High Range).	1
1,3–13	1 ml Probe + 9 ml Wasser (High Range)	10
13–130	1 ml Probe + 99 ml Wasser (High Range)	100

2. Allgemeiner Leitfaden für die Probenvorbereitung

- Klare, leicht gefärbte und annähernd neutrale, flüssige Proben mit einer Konzentration von bis zu 1,3 g/l können direkt für den Test verwendet werden.
- Trübe Proben sollten filtriert oder zentrifugiert werden.
- Saure Proben ($\text{pH} < 3,0$) müssen auf etwa pH 8,0 neutralisiert werden.
- Kohlendioxidhaltige Proben sollten durch leichtes Schütteln oder Rühren mit einem Glasstab entgast werden.
- Feste Proben sollten homogenisiert, in Wasser extrahiert und gegebenenfalls filtriert oder zentrifugiert werden.
- Stark gefärbte Proben sollten durch Zugabe von 0,2 g Polyvinylpolypyrrrolidon (PVPP) pro 10 ml Probe in einem Röhrchen behandelt werden. Das Röhrchen wird 5 Minuten lang kräftig geschüttelt und dann durch Filterpapier filtriert.
- Proben entproteinisieren und/oder entfetten mit dem Carrez Clarification Kit (SKU: 700004270 K-CARREZ).

3. Beispiele für die Probenvorbereitung

(a) **Bestimmung von Essigsäure in Wein.** Zur Klärung durch ein 0,2-Mikron-Spritzenfilter laufen lassen. Alternativ dazu kann ein aliquoter Teil des Weins 5 Minuten lang bei 15.000 g zentrifugiert werden.

In der Regel ist für Rotwein (aufgrund der Färbung des Weins) eine 5-fache Verdünnung in destilliertem Wasser erforderlich

In der Regel ist für Weißwein keine Verdünnung erforderlich (Sensitive Range).

(b) **Bestimmung von Essigsäure in Essig.** Zur Klärung durch ein 0,2-Mikron-Spritzenfilter laufen lassen.

Alternativ kann eine Aliquote des Essigs 5 Minuten lang bei 15.000 g zentrifugiert werden. *In der Regel ist eine 500-fache Verdünnung in destilliertem Wasser erforderlich (Sensitive Range).*

- (c) **Bestimmung von Essigsäure in Fruchtsaft (z. B. Apfelsaft):** Zur Klärung durch ein 0,2-Mikron-Spritzenfilter laufen lassen. Alternativ kann eine Aliquote des Safts 5 Minuten lang bei 15.000 g zentrifugiert werden. *In der Regel ist keine Verdünnung erforderlich (Sensitive Range).*
- (d) **Bestimmung von Essigsäure in Apfelwein:** Karbonisierung durch etwa 60 Sekunden langes Umrühren der Probe mit einem Glasstab entfernen. Durch ein 0,2-Mikron-Spritzenfilter laufen lassen und das klare Filtrat für den Test verwenden. *In der Regel ist keine Verdünnung erforderlich (Sensitive Range).*
- (e) **Bestimmung von Essigsäure in Hartkäse (z. B. Cheddar):** Wiegen Sie genau 2 g gemahlenen Käse in einen 100-ml-Messkolben ein und geben Sie 60 ml destilliertes Wasser hinzu. Die Flasche 20 Minuten lang bei ca. 60 °C inkubieren und dabei gelegentlich schütteln. Die Flasche auf 20–25 °C abkühlen lassen und bis zur Markierung mit destilliertem Wasser auffüllen. Die Flasche 30 Minuten lang bei 4 °C lagern und anschließend mit Filterpapier filtern. Das klare Filtrat im Assay verwenden. *In der Regel ist keine Verdünnung erforderlich (Sensitive Range).*
- (f) **Bestimmung von Essigsäure in sauren Dressings und Saucen (z. B. Ketchup):** 1 g Probe in einen 100-ml-Messkolben geben und mit destilliertem Wasser auf 100 ml auffüllen. Die Lösung 20 Minuten lang bei 4 °C lagern, um eine Trennung des Fetts zu erreichen. Die Lösung mit einem Papierfilter filtern und das klare Filtrat für den Test verwenden. In der Regel ist keine weitere Verdünnung erforderlich (*Sensitive Range*).
- (g) **Bestimmung von Essigsäure in geräucherter Lachs.** Genau 10 g Räucherlachs abwiegen, direkt in einen Mixer geben, 100 ml destilliertes Wasser hinzufügen und 30 Sekunden lang oder bis zur homogenen Konsistenz mixen. Die Lösung mit einem Papierfilter filtern und das klare Filtrat für den Test verwenden. *In der Regel ist keine Verdünnung erforderlich (High Range).*

WICHTIGER HINWEIS: Die oben genannten Beispiele sind lediglich Vorschläge für die Probenvorbereitung. Wenden Sie sich mit evtl. Fragen zu diesen oder anderen Matrices bitte an Ihren örtlichen Vertriebsmitarbeiter.

SERVICES UND TECHNISCHE UNTERSTÜTZUNG

Bitte wenden Sie sich an Ihren örtlichen Vertriebsmitarbeiter, wenn Sie Unterstützung benötigen, insbesondere im Zusammenhang mit:

- Fehlerbehebung
- Datenanalyse
- Zusätzliche Matrixtests
- Anwendungsunterstützung bezüglich automatisierter Analysegeräte

Unterstützende Dokumente sind auf der Produktseite zu finden:

- Kurzreferenz-Leitfaden
- MegaCalc™
- Sicherheitsdatenblätter (SDS)
- Analysezertifikate (COA)
- Validierungsbericht



Kontaktieren Sie uns für weitere Informationen: neogen.com/contact

Ohne Gewähr

Die in diesem Assay-Protokoll enthaltenen Informationen sind nach unserem besten Wissen und Gewissen wahrheitsgetreu und genau. Da sich die Anwendungsbedingungen jedoch unserer Kontrolle entziehen, wird keine Garantie für etwaige Empfehlungen oder Vorschläge oder dafür, dass die Verwendung keinen Patenten schadet, gegeben oder impliziert.

Verantwortung des Benutzers:

- Es liegt in der Verantwortung des Benutzers, sich mit den Produktanweisungen und -informationen vertraut zu machen. Besuchen Sie unsere Website unter neogen.com oder wenden Sie sich an Ihren lokalen Neogen®-Vertreter oder autorisierten Händler, um weitere Informationen zu erhalten.
- Bei der Auswahl einer Testmethode ist es wichtig zu berücksichtigen, dass externe Faktoren wie Probenahmemethoden, Testprotokolle, Probenvorbereitung, Handhabung, Labortechnik und die Probe selbst die Ergebnisse beeinflussen können.
- Es liegt in der Verantwortung des Anwenders, bei der Auswahl einer Prüfmethode oder eines Produkts eine ausreichende Anzahl von Proben mit den geeigneten Matrizen und Herausforderungen zu bewerten, um sich davon zu überzeugen, dass die gewählte Prüfmethode seinen Kriterien entspricht.
- Es liegt auch in der Verantwortung des Benutzers, festzustellen, ob alle Testmethoden und -ergebnisse den Anforderungen seiner Kunden und Lieferanten entsprechen.
- Wie bei jeder Prüfmethode stellen die erzielten Ergebnisse keine Garantie für die Qualität der geprüften Matrizen oder Prozesse dar.

Bedingungen:

Die vollständigen Geschäftsbedingungen von Neogen sind [online](#) verfügbar.