

ÁCIDO ACÉTICO

(LIQUID READY™)

INSTRUCCIONES DEL PRODUCTO

SKU: 700007708
K-ACETLQ

08/25

(50 ensayos manuales por kit) o
(500 ensayos de autoanalizador por kit)

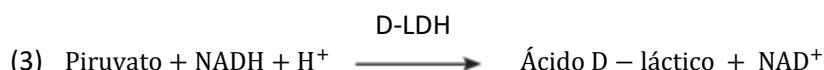
Megazyme®
by **NEOGEN®**

INTRODUCCIÓN:

El ácido acético (acetato) se encuentra en una amplia variedad de alimentos y bebidas. En la industria del vino, es uno de los parámetros de calidad más importantes y se mide a lo largo de todo el proceso de vinificación. El método más utilizado para la cuantificación enzimática del ácido acético es aquel que emplea la acetil-coenzima A sintetasa (ACS). Sin embargo, este método se basa en el uso de una reacción indicadora catalizada por la L-malato deshidrogenasa que está en equilibrio permanente y, por lo tanto, se observa un aumento no estequiométrico en la absorbancia a partir del acetato presente en la muestra. En el kit de prueba de ácido acético (Liquid Ready) se utiliza una bioquímica alternativa, basada en la enzima acetato quinasa. Este kit proporciona excelentes curvas de calibración lineal y da como resultado un cambio estequiométrico en la absorbancia debido al ácido acético presente en la muestra.

PRINCIPIO:

La acetato quinasa (AK) en presencia de ATP convierte el ácido acético en acetil-fosfato y adenosina-5'-difosfato (ADP) (1). El ADP formado en (1) se reconvierte en ATP y piruvato, por fosfoenolpiruvato (PEP) en presencia de piruvato quinasa (PK) (2). En presencia de la enzima D-lactato deshidrogenasa (D-LDH), el piruvato se reduce a D-lactato mediante la reducción del dinucleótido de nicotinamida-adenina (NADH) con la producción de NAD⁺ (3).



La cantidad de NAD⁺ formada en esta vía de reacción es estequiométrica con la cantidad de ácido acético. Es el NAD⁺ que se mide por la disminución de la absorbancia a 340 nm.

ESPECIFICIDAD, SENSIBILIDAD Y LINEALIDAD:

- El ensayo es específico para ácido acético.
- El kit proporciona dos métodos diferentes basados en el contenido estimado de ácido acético en la muestra: un método de rango alto para muestras con concentraciones más altas y un método de rango sensible para detectar concentraciones más bajas.
- **Rango alto:** El límite de detección (LOD) es de 0,011 g/L y el límite de cuantificación (LOQ) es de 0,033 g/L, utilizando un volumen de muestra de 0,025 mL. El rango de medición recomendado está entre 0,13 y 1,30 g/L utilizando un volumen de muestra de 0,025 mL. Esto corresponde a 3,25 µg-32,5 µg de ácido acético por ensayo.
- **Rango sensible:** El límite de detección (LOD) es de 0,005 g/L y el límite de cuantificación (LOQ) es de 0,014 g/L utilizando un volumen de muestra de 0,1 mL. El rango de medición recomendado está entre 0,033 y 0,33 g/L utilizando un volumen de muestra de 0,1 mL. Esto corresponde a 3,25 µg-32,5 µg de ácido acético por ensayo.

INTERFERENCIAS:

El cloruro de calcio interfiere en concentraciones superiores a 1 g/L. Se recomienda que las muestras que contengan este agente interferente se diluyan antes de la prueba.

SEGURIDAD:

Deben respetarse las medidas de seguridad generales que se aplican a todas las sustancias químicas. Después de su uso, los reactivos pueden eliminarse con los residuos de laboratorio estándar, de acuerdo con las normativas y directrices locales.

NOTA: Para más información sobre el funcionamiento y el uso seguro de este producto, consulte la FDS y el informe de validación asociados disponibles en el sitio web de Megazyme.

CONTENIDO DEL KIT:

Los kits están diseñados para su uso tanto en flujos de trabajo manuales como automatizados. Los reactivos son suficientes para realizar 50 ensayos en formato manual o 500 ensayos en formato autoanalizador. El kit contiene:

Reactivo 1 (2 x 50 mL): ATP, PEP, NADH
Listo para usar.
Conservar a 4 °C. Consulte la fecha de caducidad en cada etiqueta.

Reactivo 2 (2 x 12,5 ml): AK, PK, D-LDH
Contiene azida sódica (0,05 % w/v) como conservante. Listo para usar.
Conservar a 4 °C. Consulte la fecha de caducidad en cada etiqueta.

Estándar (5 mL): Estándar de ácido acético (1,3 g/L)
Contiene azida sódica (0,02 % w/v) como conservante. Listo para usar.
Conservar a 4 °C. Consulte la fecha de caducidad en cada etiqueta.

NOTA: La solución estándar de ácido acético solo se ensaya cuando existan dudas sobre la precisión del espectrofotómetro utilizado o cuando se sospeche que la inhibición está siendo causada por sustancias presentes en la muestra. La concentración de ácido acético se determina directamente a partir del coeficiente de extinción de NAD⁺.

PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES DE REACTIVO:

Llevar todos los reactivos a temperatura ambiente (20 - 25 °C) antes de su uso.

PROCEDIMIENTO DE ENSAYO MANUAL - RANGO ALTO:

Longitud de onda: 340 nm

Cubeta: Camino óptico de 1 cm (vidrio o plástico)

Temperatura: 20 - 25 °C

Volumen de muestra: 0,025 mL

Volumen final: 2,525 mL

Solución de muestra: De 0,13 g/L a 1,3 g/L (es decir, 3,25 µg-32,5 µg de ácido acético por cubeta)

Leer contra aire (sin cubeta en el camino óptico) o contra agua.

Pipeta en cubetas	Blanco	Muestra
Reactivos 1	2,0 mL	2,0 mL
Muestra	-	0,025 mL
Agua destilada	0,025 mL	-
Mezclar*, incubar durante aproximadamente 3 minutos a 20-25 °C, a continuación, leer las absorbancias (A_1)		
Añadir el reactivo 2 como se indica a continuación:		
Reactivos 2	0,5 mL	0,5 mL
Mezclar*, incubar durante aproximadamente 15 minutos a 20-25 °C, a continuación, leer las absorbancias (A_2). **		

* Por aspiración con la punta de pipeta utilizada para dispensar el líquido o por inversión suave tras sellar la cubeta con un tapón de cubeta o Parafilm®.

** Puede ser necesario comprobar si la reacción se ha completado continuando la lectura de las absorbancias a intervalos de 1 minuto. Si la reacción no se ha completado, continuar midiendo las absorbancias hasta que los valores medidos permanezcan iguales o aumenten constantemente durante 1 minuto. Si esta tasa de "incremento" es mayor para la muestra que para el blanco, extrapolar las absorbancias (muestra y blanco) al momento de la adición del reactivo 2.

NOTA: El valor del blanco de reactivo debe determinarse una vez para cada serie y restarse de cada resultado de la muestra.

PROCEDIMIENTO DE ENSAYO MANUAL - RANGO SENSIBLE:

Longitud de onda: 340 nm

Cubeta: Camino óptico de 1 cm (vidrio o plástico)

Temperatura: 20 - 25 °C

Volumen de muestra: 0,1 mL

Volumen final: 2,6 mL

Solución de muestra: De 0,033 g/L a 0,33 g/L (es decir, 3,25 µg-32,5 µg de ácido acético por cubeta)

Leer contra aire (sin cubeta en el camino óptico) o contra agua.

Pipeta en cubetas	Blanco	Muestra
Reactivos 1	2,0 mL	2,0 mL
Muestra	-	0,1 mL
Agua destilada	0,1 mL	-
Mezclar*, incubar durante aproximadamente 3 minutos a 20-25 °C, a continuación, leer las absorbancias (A_1)		
Añadir el reactivo 2 como se indica a continuación:		
Reactivos 2	0,5 mL	0,5 mL
Mezclar*, incubar durante aproximadamente 15 minutos a 20-25 °C, a continuación, leer las absorbancias (A_2). **		

* Por aspiración con la punta de pipeta utilizada para dispensar el líquido o por inversión suave tras sellar la cubeta con un tapón de cubeta o Parafilm®.

** Puede ser necesario comprobar si la reacción se ha completado continuando la lectura de las absorbancias a intervalos de 1 minuto. Si la reacción no se ha completado, continuar midiendo las absorbancias hasta que los valores medidos permanezcan iguales o aumenten constantemente durante 1 minuto. Si esta tasa de "fluencia" es mayor para la muestra que para el blanco, extrapolar las absorbancias (muestra y blanco) al momento de la adición del reactivo 2.

NOTA: El valor del blanco de reactivo debe determinarse una vez para cada serie y restarse de cada resultado de la muestra.

CÁLCULO:

NOTA: Estos cálculos pueden simplificarse utilizando la herramienta *MegaCalc™*, que se puede descargar desde la página del producto.

1. Cálculo del factor de dilución (df)

Determine el factor de dilución (df) en función de las proporciones de componentes:

$$df = \frac{\text{Volumen de muestra [ml]} + \text{Volumen de R1 [ml]}}{\text{Volumen total de la reacción [mL]}}$$

A continuación, para el procedimiento **de rango alto** para ácido acético:

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

Para el procedimiento **de rango sensible** para ácido acético:

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

2. Cálculo de la diferencia de absorbancia $\Delta A_{\text{ácido acético}}$

$$\Delta A_{\text{ácido acético}} = (A_1 \times df - A_2)_{\text{muestra}} - (A_1 \times df - A_2)_{\text{blanco}}$$

A continuación, para el procedimiento **de rango alto** para ácido acético:

$$\Delta A_{\text{ácido acético}} = (A_1 \times 0,802 - A_2)_{\text{muestra}} - (A_1 \times 0,802 - A_2)_{\text{blanco}}$$

Para el procedimiento **de rango sensible** para ácido acético:

$$\Delta A_{\text{ácido acético}} = (A_1 \times 0,808 - A_2)_{\text{muestra}} - (A_1 \times 0,808 - A_2)_{\text{blanco}}$$

NOTA: El aumento o la disminución del volumen de la muestra con volúmenes de reactivo inalterados requiere un nuevo cálculo del factor de dilución; si se modifican los volúmenes, el rendimiento puede verse afectado.

3. Cálculo del contenido de ácido acético en g/L

La concentración de ácido acético puede calcularse del siguiente modo:

$$c = \frac{V \times MW}{\epsilon \times d \times v} \times \Delta A_{\text{ácido acético}} \quad [\text{g/L}]$$

donde:

- V = volumen final [mL]
MW = peso molecular del ácido acético [g/mol].
 ϵ = coeficiente de extinción de NADH a 340 nm [$\text{l} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$]
d = camino óptico [cm]
v = volumen de muestra [mL]

A continuación, para el procedimiento **de rango alto** para ácido acético:

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

$$= 0,9627 \times \Delta A_{\text{ácido acético}} \quad [\text{g/L}]$$

Para el procedimiento **de rango sensible** para ácido acético:

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

$$= 0,2478 \times \Delta A_{\text{ácido acético}} \quad [\text{g/L}]$$

Si la muestra se ha diluido durante la preparación, el resultado debe multiplicarse por el factor de dilución de la muestra, F.

4. Cálculo del contenido de ácido acético residual en muestras sólidas o semisólidas:

Cuando se analizan muestras sólidas y semisólidas que se pesan para la preparación de la muestra, el contenido (g/100 g) se calcula a partir de la cantidad pesada de la siguiente manera:

$$\frac{C_{\text{Ácido acético}} \text{ [g/L de solución de muestra]}}{\text{peso}_\text{muestra} \text{ [g/L de solución de muestra]}} \times 100 \quad \text{[g/100 g]}$$

PROCEDIMIENTO DE ENSAYO CON AUTOANALIZADOR:

Este kit se ha diseñado para autoanalizadores y puede adaptarse a la mayoría de los instrumentos. A continuación se muestra un método de ejemplo (validado en el analizador Awareness ChemWell®-T).

NOTA: Para cada lote de muestras que se aplique a la determinación de ácido acético debe realizarse simultáneamente una curva de calibración utilizando el mismo lote de reactivos.

Parámetro	Detalles								
Longitud de onda	340/405 nm (primario/secundario)								
Temperatura	20 - 37 °C								
Prueba	<p>Prueba de punto final con la siguiente secuencia de prueba:</p> <ul style="list-style-type: none">- Añadir reactivo 1 [0,2 mL]- Añadir muestra o calibrador [0,01 mL]- Preincubar durante 1-3 minutos [20-37 °C]- Medir A_1 a 340/405 nm- Añadir reactivo 2 [0,05 mL]- Incubar 15 minutos a [20-37 °C]- Medir A_2 a 340/405 nm- Calcular $A_2 - A_1$ contra curva de calibración								
Calibración	<p>Calibrar utilizando 4 calibradores que oscilen entre 0 y 0,325 g/L. La curva de calibración es lineal.</p> <p>A continuación se muestra un ejemplo de cómo utilizar el estándar suministrado con el kit para crear una curva de calibración:</p> <table><tbody><tr><td>Calibrador 1</td><td>0 g/L (usar agua destilada)</td></tr><tr><td>Calibrador 2</td><td>0,065 g/L (diluir el estándar 20 veces)</td></tr><tr><td>Calibrador 3</td><td>0,130 g/L (diluir el estándar 10 veces)</td></tr><tr><td>Calibrador 4</td><td>0,325 g/L (diluir el estándar 4 veces)</td></tr></tbody></table> <p><i>Realizar todas las diluciones con agua destilada.</i></p>	Calibrador 1	0 g/L (usar agua destilada)	Calibrador 2	0,065 g/L (diluir el estándar 20 veces)	Calibrador 3	0,130 g/L (diluir el estándar 10 veces)	Calibrador 4	0,325 g/L (diluir el estándar 4 veces)
Calibrador 1	0 g/L (usar agua destilada)								
Calibrador 2	0,065 g/L (diluir el estándar 20 veces)								
Calibrador 3	0,130 g/L (diluir el estándar 10 veces)								
Calibrador 4	0,325 g/L (diluir el estándar 4 veces)								

PREPARACIÓN DE MUESTRAS

1. Dilución de muestras

El kit proporciona dos métodos diferentes basados en el contenido estimado de ácido acético en la muestra: un método de rango alto para muestras con concentraciones más altas (de 0,13 g/L a 1,3 g/L) y un método de rango sensible para detectar concentraciones más bajas (de 0,033 g/L a 0,33 g/L). La cantidad de ácido acético presente en la muestra debe oscilar entre 0,033 g/L y 1,3 g/L.

Tabla de dilución (ensayo manual)

Concentración estimada de ácido acético (g/L)	Dilución con agua	Factor de dilución (F)
<0,33	No requiere dilución (rango sensible)	1
<1,3	No requiere dilución (rango alto)	1
1,3-13	1 mL de muestra + 9 ml de agua (rango alto)	10
13-130	1 mL de muestra + 99 ml de agua (rango alto)	100

2. Guía general de preparación de muestras

- Las muestras líquidas, claras, ligeramente coloreadas y aproximadamente neutras, con una concentración de hasta 1,3 g/L, pueden utilizarse directamente en el ensayo.
- Las muestras turbias deben filtrarse o centrifugarse.
- Las muestras ácidas ($\text{pH} < 3,0$) deben neutralizarse hasta alcanzar aproximadamente un pH de 8,0.
- Las muestras que contengan dióxido de carbono deben desgasificarse mediante agitación suave o agitación con una varilla de vidrio.
- Las muestras sólidas deben homogeneizarse, extraerse en agua y filtrarse o centrifugarse si es necesario.
- Las muestras muy coloreadas deben tratarse añadiendo 0,2 g de polivinilpolipirrolidona (PVPP) cada 10 mL de muestra en un tubo. Agitar energicamente el tubo durante 5 minutos y filtrar con papel de filtro.
- Desproteinice muestras y/o elimine la grasa con el kit de clarificación Carrez (SKU; 700004270 K-CARREZ).

3. Ejemplos sugeridos de preparación de muestras

(a) Determinación de ácido acético en vino. Pasar por un filtro de jeringa 0,2 micras para clarificar. Alternativamente, centrifugar una alícuota de vino durante 5 minutos a 15.000 g.

Por lo general, se requiere una dilución de 5 veces en agua destilada para el vino tinto (debido a la coloración del vino)

Por lo general, no se requiere dilución para el vino blanco (rango sensible)

- (b) **Determinación de ácido acético en vinagre:** Pasar por un filtro de jeringa 0,2 micras para clarificar. Alternativamente, centrifugar una alícuota de vinagre durante 5 minutos a 15.000 g. *Por lo general, se requiere una dilución de 500 veces en agua destilada (rango sensible).*
- (c) **Determinación del ácido acético en zumos de frutas (por ejemplo, zumo de manzana):** Pasar por un filtro de jeringa 0,2 micras para clarificar. Alternativamente, centrifugar una alícuota de zumo durante 5 minutos a 15.000 g. *Por lo general, no se requiere dilución (rango sensible).*
- (d) **Determinación de ácido acético en sidra:** Eliminar la carbonatación agitando una muestra en un vaso de precipitados durante aproximadamente 60 segundos utilizando una varilla de vidrio. Pasar a través de un filtro de jeringa de 0,2 micras y utilizar el filtrado claro en el ensayo. *Por lo general, no se requiere dilución (rango sensible).*
- (e) **Determinación de ácido acético en el queso duro (por ejemplo, cheddar):** Pesar con precisión 2 g de queso molido en un matraz aforado de 100 mL y añadir 60 mL de agua destilada. Incubar el matraz a aprox. 60 °C durante 20 minutos, agitando intermitentemente. Enfrie el matraz a 20-25 °C y llénelo hasta la marca con agua destilada. Guarde el matraz a 4 °C durante 30 minutos y luego filtre con papel de filtro. Utilice el filtrado transparente en el ensayo. *Por lo general, no se requiere dilución (rango sensible).*
- (f) **Determinación de ácido acético en aderezos y salsas agrias (por ejemplo, ketchup):** Añadir 1 g de muestra a un matraz aforado de 100 mL y ajustar el volumen a 100 mL con agua destilada. Almacenar la solución a 4 °C durante 20 minutos para obtener la separación de la grasa. Filtrar la solución con un filtro de papel y utilizar un filtrado claro para el ensayo. Por lo general, no se requiere dilución adicional (*rango sensible*).
- (g) **Determinación de ácido acético en salmón ahumado:** Pesar con precisión 10 g de salmón ahumado, agregar directamente a una licuadora seguido de 100 mL de agua destilada y licuar durante 30 segundos o hasta que esté homogéneo. Filtrar la solución con un filtro de papel y utilizar un filtrado claro para el ensayo. *Por lo general, no se requiere dilución (rango alto).*

NOTA IMPORTANTE: Los anteriores son solo ejemplos sugeridos de preparación de muestras. Si tiene alguna pregunta sobre estas u otras matrices, póngase en contacto con su representante de ventas local para obtener asistencia.

SERVICIOS Y ASISTENCIA TÉCNICA

Póngase en contacto con su representante de ventas local si necesita ayuda, sobre todo en relación con:

- Solución de problemas
- Análisis de datos
- Pruebas matriciales adicionales
- Asistencia de aplicación en relación con los analizadores automatizados

Los documentos de apoyo se encuentran en la página del producto:

- Guía de consulta rápida
- MegaCalc™
- Fichas de datos de seguridad (FDS)
- Certificados de análisis (COA)
- Informe de validación



Póngase en contacto con nosotros para obtener más información: neogen.com/contact

Sin garantía

La información contenida en este protocolo de ensayo es, a nuestro leal saber y entender, veraz y exacta, pero dado que las condiciones de uso están fuera de nuestro control, no se ofrece ni se implica ninguna garantía respecto a cualquier recomendación o sugerencia que pueda hacerse o que cualquier uso no infrinja ninguna patente.

Responsabilidad del usuario:

- Los usuarios son responsables de familiarizarse con las instrucciones y la información del producto. Visite nuestro sitio web en neogen.com o comuníquese con su representante local o distribuidor autorizado de Neogen® para obtener más información.
- Al seleccionar un método de prueba, es importante reconocer que factores externos como los métodos de muestreo, los protocolos de prueba, la preparación de la muestra, la manipulación, la técnica de laboratorio y la muestra en sí pueden influir en los resultados.
- Es responsabilidad del usuario al seleccionar cualquier método de prueba o producto evaluar un número suficiente de muestras con las matrices y pruebas adecuadas para convencer al usuario de que el método de prueba elegido cumple con los criterios del usuario.
- También es responsabilidad del usuario determinar que los métodos de prueba y los resultados cumplan con los requisitos de sus clientes y proveedores.
- Al igual que con cualquier método de prueba, los resultados obtenidos no constituyen una garantía de la calidad de las matrices o procesos analizados.

Términos y condiciones:

Los términos y condiciones completos de Neogen están disponibles [en línea](#).