

ÁCIDO D-LÁCTICO (LIQUID READY™) INSTRUCCIONES DEL PRODUCTO

**SKU: 700007709
K-DATELQ**

08/25

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

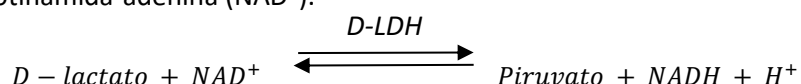


INTRODUCCIÓN:

El ácido D-láctico se encuentra en muchos alimentos y bebidas. El ácido D-láctico, producido naturalmente por las bacterias del ácido láctico, se encuentra en productos lácteos fermentados como el yogur y el queso, y en verduras en escabeche, carnes y pescados curados. La calidad de la leche, la carne y el zumo de frutas se puede establecer midiendo el contenido de ácido D-láctico. En la industria del vino, la producción de ácido D-láctico puede indicar el deterioro del vino a causa de las bacterias del ácido láctico.

PRINCIPIO:

La cuantificación del ácido D-láctico requiere dos reacciones. En la primera reacción, catalizada por la D-lactato deshidrogenasa (D-LDH), el ácido D-láctico (D-lactato) se oxida a piruvato en presencia de dinucleótido de nicotinamida-adenina (NAD^+).



Dado que el equilibrio de la reacción se encuentra firmemente a favor del ácido D-láctico y NAD^+ , se requiere una reacción adicional para “atrapar” el producto de piruvato. Este es catalizado químicamente. La cantidad de NADH formada en la reacción acoplada anterior es estequiométrica con la cantidad de ácido D-láctico. NADH se mide por el aumento de la absorbancia a 340 nm.

ESPECIFICIDAD, SENSIBILIDAD Y LINEALIDAD:

- El ensayo es específico para el ácido D-láctico.
- El límite de detección (LOD) es de 0,004 g/L, y el límite de cuantificación (LOQ) es de 0,011 g/L (utilizando un volumen de muestra de 0,1 mL).
- El intervalo de medición recomendado se sitúa entre 0,02 y 0,5 g/L (utilizando un volumen de muestra de 0,1 mL). Esto corresponde a 2-50 µg de ácido D-láctico por ensayo.

INTERFERENCIAS:

La D-fructosa interfiere en concentraciones superiores a 50 g/L. El ácido ascórbico interfiere en concentraciones superiores a 1 g/l y los sulfitos interfieren en concentraciones superiores a 0,1 g/l. Se recomienda que las muestras con el contenido declarado de estos agentes interferentes 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 obtener más información sobre el rendimiento de este producto, consulte el informe de validación asociado disponible en el sitio web de Megazyme. Para más información sobre el uso y manipulación seguros de este producto, consulte la FDS asociada disponible 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):	Solución tampón, 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.
Reactivo 2 (2 x 12,5 mL):	NAD ⁺ Listo para usar. Conservar a 4 °C. Consulte la fecha de caducidad en cada etiqueta.
Estándar (5 mL):	Estándar de ácido D-láctico (0,5 g/L). Contiene azida sódica (0,05 % 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 D-láctico 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 D-láctico se determina directamente a partir del coeficiente de extinción de NADH.

PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES DE REACTIVO:

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

PROCEDIMIENTO DE ENSAYO MANUAL:

Longitud de onda: 340 nm

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

Temperatura: 20 - 37 °C

Volumen final: 2,60 mL

Solución de muestra: De 0,02 g/L a 0,5 g/L (es decir, 2-50 µg de ácido D-láctico por cubeta)

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

Pipeta en cubetas	Blanco	Muestra
Reactivo 1	2,0 mL	2,0 mL
Muestra	-	0,1 mL
Agua destilada	0,1 mL	-
Mezclar*, incubar durante aproximadamente 3 minutos a 20-37 °C, a continuación, leer las absorbancias (A_1) Añadir el reactivo 2 como se indica a continuación:		
Reactivo 2	0,5 mL	0,5 mL
Mezclar*, incubar durante aproximadamente 10 minutos a 20-37 °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.

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 ensayo manual de ácido D-láctico:

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

2. Cálculo de la diferencia de absorbancia $\Delta A_{\text{ácido D-láctico}}$

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

A continuación, para el procedimiento de ensayo manual de ácido D-láctico:

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

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 D-láctico

La concentración de ácido D-láctico puede calcularse del siguiente modo:

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

donde:

V = volumen final [mL]

MW = peso molecular del ácido D-láctico [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 ensayo manual de ácido D-láctico:

$$c = \frac{2,6 \times 90,1}{6300 \times 1,0 \times 0,1} \times \Delta A_{\text{ácido D-láctico}} \quad [\text{g/L}]$$

$$= 0,3718 \times \Delta A_{\text{ácido D-láctico}} \quad [\text{g/L}]$$

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 D-láctico 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:

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

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 D-láctico 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 10 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 2 - 4 calibradores que oscilen entre 0 - 0,5 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><tr><td>Calibrador 1</td><td>0 g/L (usar agua destilada)</td></tr><tr><td>Calibrador 2</td><td>0,05 g/L (diluir el estándar 10 veces)</td></tr><tr><td>Calibrador 3</td><td>0,25 g/L (diluir el estándar 2 veces)</td></tr><tr><td>Calibrador 4</td><td>0,5 g/L (usar el estándar tal como está)</td></tr></table> <p><i>Realizar todas las diluciones con agua destilada.</i></p>	Calibrador 1	0 g/L (usar agua destilada)	Calibrador 2	0,05 g/L (diluir el estándar 10 veces)	Calibrador 3	0,25 g/L (diluir el estándar 2 veces)	Calibrador 4	0,5 g/L (usar el estándar tal como está)
Calibrador 1	0 g/L (usar agua destilada)								
Calibrador 2	0,05 g/L (diluir el estándar 10 veces)								
Calibrador 3	0,25 g/L (diluir el estándar 2 veces)								
Calibrador 4	0,5 g/L (usar el estándar tal como está)								

PREPARACIÓN DE MUESTRAS:

1. Dilución de muestras

La cantidad de ácido D-láctico presente en la muestra debe oscilar entre 0,02 g/L y 0,5 g/L. Si el valor de $\Delta A_{\text{ácido D-láctico}}$ es demasiado bajo (por ejemplo, $<0,1$), pesar más muestra o disminuir la dilución. Si el valor de $\Delta A_{\text{ácido D-láctico}}$ es demasiado alto (por ejemplo, $>2,0$), aumentar la dilución en agua destilada.

Tabla de dilución de muestras

Concentración estimada de ácido D-láctico (g/L)	Dilución con agua	Factor de dilución (F)
$<0,5$	No requiere dilución	1
0,5-5	1 ml de muestra + 9 ml de agua	10
5 - 50	1 ml de muestra + 99 ml de agua	100

2. Guía general de preparación de muestras

- Las muestras líquidas, claras, ligeramente coloreadas y aproximadamente neutras, con una concentración de hasta 0,5 g/L de ácido D-láctico, 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 enérgicamente el tubo durante 5 minutos y filtrar con papel de filtro.
- Desproteinizar las muestras utilizando el kit de clarificación Carrez (700004270, K-CARREZ).
- Eliminar la grasa utilizando el kit de clarificación Carrez (700004270, K-CARREZ).

3. Ejemplos sugeridos de preparación de muestras

- (a) **Determinación de ácido D-láctico 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 y no se requiere dilución para el vino blanco.*
- (b) **Determinación de ácido D-láctico en cerveza (por ejemplo, Lager).** 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. *Normalmente, no se requiere dilución.*

- (c) **Determinación de ácido D-láctico en productos lácteos fermentados (por ejemplo, crema agria).** Pesar 10 g de producto fermentado en un matraz aforado de 50 mL, añadir las siguientes soluciones y mezclar después de cada adición: 5 mL de solución de Carrez I, 5 mL de solución de Carrez II y 10 mL de solución de NaOH (100 mM). Llenar hasta la marca con agua destilada, mezclar bien y filtrar con un filtro de papel. *Normalmente, no se requiere más dilución.*
- (d) **Determinación del ácido D-láctico en productos cárnicos (por ejemplo, salami).** Homogeneizar las muestras sólidas en una batidora y pesar con precisión 5 g de material representativo en un recipiente de 100 ml (por ejemplo, frasco Duran®). Añadir 20 mL de ácido perclórico 1 M y mezclar con una espátula durante 5 minutos, o hasta que la muestra esté uniformemente dispersa. Agregue 40 mL de agua destilada y revuelva durante otros 10 minutos con una barra agitadora. Ajustar el pH en 7,0 utilizando hidróxido potásico 8 M, transferir cuantitativamente la suspensión a un matraz aforado y enrasar a 100 mL con agua destilada. Conservar en hielo o en el frigorífico durante 20 minutos para precipitar el perclorato potásico y permitir la separación de la grasa. Filtrar y desechar los primeros 3-5 mL, y utilizar el filtrado claro para el ensayo. *Normalmente, no se requiere más dilución.*
- (e) **Determinación de ácido D-láctico en el zumo de chucrut.** 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, se requiere una dilución de 20 veces en agua destilada.*

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](#).