

ETANOL
(LIQUID READY™)
INSTRUCCIONES DEL PRODUCTO

SKU: 700007710
K-ETOHLQ

08/25

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



INTRODUCCIÓN:

La presencia natural del etanol es muy extendida y, por lo tanto, su determinación cuantitativa no solo es importante en la fabricación de vinos, cervezas y licores, sino también en bebidas bajas en alcohol y sin alcohol, zumos de frutas y una variedad de otros productos alimenticios, incluyendo chocolates, dulces, mermeladas, miel, vinagre y productos lácteos.

PRINCIPIO:

La alcohol deshidrogenasa (AIDH) cataliza la oxidación del etanol a acetaldehído junto con la reducción del dinucleótido de nicotinamida-adenina (NAD^+).



La cantidad de NADH formada en esta vía de reacción es estequiométrica con la cantidad de etanol. El NADH es lo que se mide mediante el aumento en la absorbancia a 340 nm.

ESPECIFICIDAD, SENSIBILIDAD Y LINEALIDAD:

- El ensayo es específico para etanol.
- El límite de detección (LOD) es de 0,002 g/L, y el límite de cuantificación (LOQ) es de 0,005 g/L (utilizando un volumen de muestra de 0,1 mL).
- El intervalo de medición recomendado se sitúa entre 0,01 y 0,3 g/L (utilizando un volumen de muestra de 0,1 mL). Esto corresponde a 1-30 µg de etanol por ensayo.

INTERFERENCIAS:

No se han identificado compuestos interferentes.

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 Contiene azida sódica (0,02 % 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 ⁺ , AIDH Contiene azida sódica (0,02 % w/v) como conservante. Listo para usar. Conservar a 4 °C. Consulte la fecha de caducidad en cada etiqueta.
Estándar (5 mL):	Estándar de etanol (0,3 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 etanol 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 etanol 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 0,01 g/L a 0,3 g/L (es decir, 1-30 µg de etanol 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 7 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 min. 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 ensayo manual de etanol:

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

2. Cálculo de la diferencia de absorbancia ΔA_{etanol}

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

A continuación, para el procedimiento de ensayo manual de etanol:

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

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 etanol en g/l

La concentración de etanol puede calcularse del siguiente modo:

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

donde:

V = volumen final [mL]

MW = peso molecular de etanol [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 etanol:

$$c = \frac{2,6 \times 46,07}{6300 \times 1,0 \times 0,1} \times \Delta A_{\text{etanol}} \quad [\text{g/L}]$$

$$= 0,1901 \times \Delta A_{\text{etanol}} \quad [\text{g/L}]$$

4. Cálculo del contenido de etanol en % (v/v):

Para calcular el % de alcohol por volumen (v/v) para etanol:

$$c = \frac{2,6 \times 46,07}{6300 \times 1,0 \times 0,1} 0,1266 \times \Delta A_{\text{etanol}} \quad [\% \text{ v/v}]$$

$$= 0,0241 \times \Delta A_{\text{etanol}} \quad [\% \text{ v/v}]$$

donde:

0,1266 = factor para convertir g/L en % (v/v), tomando la densidad del etanol puro como 0,79 g/mL

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

5. Cálculo del contenido de etanol 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:

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

PROCEDIMIENTO CON ENSAYO DE 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 etanol debe crearse 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 7 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 - 0,3 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>0,03 g/L (diluir el estándar 10 veces)</td></tr><tr><td>Calibrador 3</td><td>0,15 g/L (diluir el estándar 2 veces)</td></tr><tr><td>Calibrador 4</td><td>0,3 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	0,03 g/L (diluir el estándar 10 veces)	Calibrador 3	0,15 g/L (diluir el estándar 2 veces)	Calibrador 4	0,3 g/L (usar el estándar tal como está)
Calibrador 1	0 g/L (usar agua destilada)								
Calibrador 2	0,03 g/L (diluir el estándar 10 veces)								
Calibrador 3	0,15 g/L (diluir el estándar 2 veces)								
Calibrador 4	0,3 g/L (usar el estándar tal como está)								

PREPARACIÓN DE MUESTRAS

1. Dilución de muestras

La cantidad de etanol presente en la muestra debe oscilar entre 0,01 g/L y 0,3 g/L. Si el valor de ΔA_{etanol} es demasiado bajo (por ejemplo, $<0,1$), pesar más muestra o disminuir la dilución. Si el valor de ΔA_{etanol} es demasiado alto (por ejemplo, $>2,0$), aumentar la dilución en agua destilada.

Tabla de dilución de muestras

Concentración estimada de etanol (g/L)	Dilución con agua	Factor de dilución de la muestra (F)
$<0,3$	No requiere dilución	1
0,3-3	1 ml de muestra + 9 ml de agua	10
3 -30	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 0,3 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 polivinilpirrolidona (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 etanol 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 1000 veces en agua destilada para el vino tinto y no se requiere dilución para el vino blanco.*
- (b) **Determinación de etanol en cervezas “sin alcohol”:** Elimine la carbonatación agitando una muestra en un vaso de precipitados y aumentando el pH a aproximadamente pH 9 utilizando hidróxido de sodio 2 M. Pasar a través de un filtro de jeringa de 0,2 micras y utilizar el filtrado claro en el ensayo. *Normalmente, se requiere dilución de 20 veces.*

- (c) **Determinación de etanol en licores “sin alcohol” (por ejemplo, ginebra sin alcohol):** La concentración de etanol de los licores sin alcohol generalmente se puede determinar sin ningún tratamiento de la muestra (excepto la dilución según la tabla de dilución). *Normalmente, se requiere una dilución de 10 veces en agua destilada.*
- (d) **Determinación de etanol en kombucha cruda sin pasteurizar.** Elimine la carbonatación agitando una muestra en un vaso de precipitados y aumentando el pH a aproximadamente pH 9 utilizando hidróxido de sodio 2 M. Pasar a través de un filtro de jeringa de 0,2 micras y utilizar el filtrado claro en el ensayo. *Normalmente, se requiere dilución de 10 veces.*
- (e) **Determinación de etanol en zumos de frutas (por ejemplo, zumo de tomate).** 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 2 veces.*

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](#).