

**ACIDO ACETICO  
(LIQUID READY™)  
ISTRUZIONI DEL PRODOTTO**

**SKU: 700007708  
K-ACETLQ**

08/25

(50 saggi manuali per kit) o  
(500 saggi con analizzatore automatico per kit)

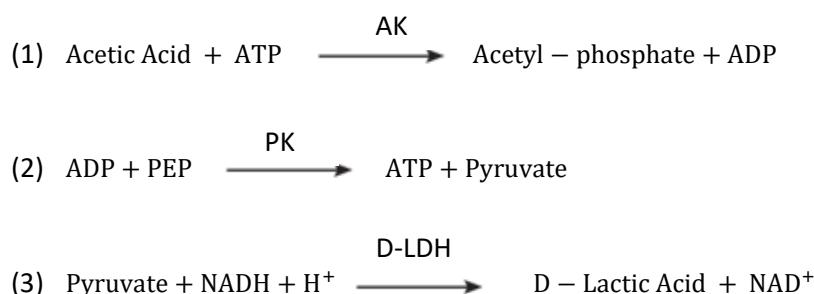
**Megazyme®**  
by **NEOGEN®**

## INTRODUZIONE:

L'acido acetico (acetato) si trova in un'ampia gamma di alimenti e bevande. Nell'industria vinicola è uno dei parametri di qualità più importanti e viene misurato durante l'intero processo di vinificazione. Il metodo più utilizzato per la quantificazione enzimatica dell'acido acetico è quello che impiega l'acetil-coenzima A sintetasi (ACS). Tuttavia, questo metodo si basa sull'utilizzo di una reazione indicatore catalizzata dalla L-malato deidrogenasi che è in equilibrio permanente, pertanto si osserva un aumento non stechiometrico dell'assorbanza dall'acetato presente nel campione. Nel kit per il test dell'acido acetico (Liquid Ready) viene impiegata una biochimica alternativa, basata sull'enzima acetato chinasi. Questo kit fornisce eccellenti curve di calibrazione lineari e determina una variazione stechiometrica dell'assorbanza dovuta all'acido acetico presente nel campione.

## PRINCIPIO:

L'acetato chinasi (AK) in presenza di ATP converte l'acido acetico in acetil-fosfato e adenosina-5'-difosfato (ADP) (1). L'ADP formato in (1) viene riconvertito in ATP e piruvato dal fosfoenolpiruvato (PEP) in presenza di piruvato chinasi (PK) (2). In presenza dell'enzima D-lattato deidrogenasi (D-LDH), il piruvato viene ridotto a D-lattato dal nicotinamide-adenina dinucleotide (NADH) ridotto con produzione di NAD<sup>+</sup> (3).



La quantità di NAD<sup>+</sup> formata in questo percorso di reazione è stechiometrica con la quantità di acido acetico. È il NAD<sup>+</sup> che viene misurato dalla diminuzione dell'assorbanza a 340 nm.

## SPECIFICITÀ, SENSIBILITÀ E LINEARITÀ:

- Il saggio è specifico per l'acido acetico.
- Il kit prevede due diversi metodi in base al contenuto stimato di acido acetico nel campione: un metodo per campioni con concentrazioni più elevate e un metodo ad alta sensibilità per rilevare le concentrazioni più basse.
- **Concentrazioni elevate:** il limite di rilevazione (LOD) è pari a 0,011 g/L e il limite di quantificazione (LOQ) è pari a 0,033 g/L utilizzando un volume di campione di 0,025 ml. L'intervallo di misurazione consigliato è compreso tra 0,13 e 1,30 g/L utilizzando un volume di campione di 0,025 mL. Ciò corrisponde a 3,25 µg – 32,5 µg di acido acetico per saggio.
- **Alta sensibilità:** Il limite di rilevabilità (LOD) è di 0,005 g/L e il limite di quantificazione (LOQ) è di 0,014 g/L utilizzando un volume di campione di 0,1 mL. L'intervallo di misurazione consigliato è compreso tra 0,033 e 0,33 g/L utilizzando un volume di campione di 0,1 mL. Ciò corrisponde a 3,25 µg – 32,5 µg di acido acetico per saggio.

## **INTERFERENZA:**

Il cloruro di calcio interferisce a concentrazioni superiori a 1 g/L. Si raccomanda di diluire i campioni contenenti questo agente interferente 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 e sull'utilizzo sicuro di questo prodotto, fare riferimento al rapporto di validazione e alla scheda dati di sicurezza (SDS) associati, disponibili 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):** ATP, PEP, NADH

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):** AK, PK, D-LDH

Contiene sodio azide (0,05% p/v) come conservante. Pronto all'uso.

**Conservare a una temperatura di 4 °C. Verificare la data di scadenza su ciascuna delle etichette.**

**Standard (5 mL):** Acido acetico standard (1,3 g/L)

Contiene sodio azide (0,02% p/v) 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 acetico 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 acetico viene determinata direttamente dal coefficiente di estinzione di NAD<sup>+</sup>.

## **PREPARAZIONE DELLE SOLUZIONI DEI REAGENTI:**

Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (20-25 °C) prima dell'uso.

## PROCEDURA DI SAGGIO MANUALE - CONCENTRAZIONI ELEVATE:

**Lunghezza d'onda:** 340 nm

**Cuvette:** percorso ottico di 1 cm (vetro o plastica)

**Temperatura:** 20-25 °C

**Volume di campione:** 0,025 mL

**Volume finale:** 2,525 mL

**Soluzione di campione:** da 0,13 g/L a 1,3 g/L (ovvero da 3,25 µg a 32,5 µg di acido acetico 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	-	0,025 ml
Acqua distillata	0,025 ml	-
Mescolare*, incubare per ~3 minuti a 20-25 °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 ~15 minuti a 20-25 °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.

## PROCEDURA DI SAGGIO MANUALE - ALTA SENSIBILITÀ:

**Lunghezza d'onda:** 340 nm

**Cuvette:** percorso ottico di 1 cm (vetro o plastica)

**Temperatura:** 20-25 °C

**Volume di campione:** 0,1 ml

**Volume finale:** 2,6 ml

**Soluzione di campione:** da 0,033 g/L a 0,33 g/L (ovvero da 3,25 µg a 32,5 µg di acido acetico 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 20-25 °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 ~15 minuti a 20-25 °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 per concentrazioni elevate** per l'acido acetico:

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

Segue la **procedura ad alta sensibilità** per l'acido acetico:

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

### 2. Calcolo della differenza di assorbanza $\Delta A_{\text{Acido acetico}}$

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

Segue la **procedura per concentrazioni elevate** per l'acido acetico:

$$\Delta A_{\text{Acido acetico}} = (A_1 \times 0,802 - A_2)_{\text{campione}} - (A_1 \times 0,802 - A_2)_{\text{bianco}}$$

Segue la **procedura ad alta sensibilità** per l'acido acetico:

$$\Delta A_{\text{Acido acetico}} = (A_1 \times 0,808 - A_2)_{\text{campione}} - (A_1 \times 0,808 - A_2)_{\text{bianco}}$$

**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 acetico in g/L

La concentrazione di acido acetico può essere calcolata come segue:

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

**dove:**

V = volume finale [ml]

MW = peso molecolare dell'acido acetico [g/mol]

$\epsilon$  = coefficiente di estinzione di NADH a 340 nm [ $\text{l} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ ]

d = traccia luminosa [cm]

v = volume di campione [ml]

Segue la **procedura per concentrazioni elevate** per l'acido acetico:

$$c = \frac{2,525 \times 60,05}{6.300 \times 1,0 \times 0,025} \times \Delta A_{\text{Acido acetico}} \quad [\text{g/L}]$$

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

Segue la **procedura ad alta sensibilità** per l'acido acetico:

$$c = \frac{2,6 \times 60,05}{6.300 \times 1,0 \times 0,1} \times \Delta A_{\text{Acido acetico}} \quad [\text{g/l}]$$

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

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 acetico 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:

$$\frac{C_{\text{Acido acetico}} \text{ [g/L soluzione di campione]}}{\text{peso}_{\text{campione}} \text{ [g/L soluzione di campione]}} \times 100 \quad [\text{g/100 g}]$$

## 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 Technology, Inc. ChemWell®-T).

**NOTA:** per ciascun lotto di campioni che viene applicato alla determinazione dell'acido acetico 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"><li>– Aggiungere il Reagente 1 <b>[0,2 ml]</b></li><li>– Aggiungere il campione o il calibratore <b>[0,01 ml]</b></li><li>– Preincubare per 1-3 minuti a [20-37 °C]</li><li>– Misurare <math>A_1</math> a 340/405 nm</li><li>– Aggiungere il Reagente 2 <b>[0,05 ml]</b></li><li>– Incubare per 15 minuti a [20-37 °C]</li><li>– Misurare <math>A_2</math> a 340/405 nm</li><li>– Calcolare <math>A_2 - A_1</math> rispetto alla curva di calibrazione</li></ul>								
Calibrazione	<p>Calibrare utilizzando 4 calibratori con valori compresi tra 0 e 0,325 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>0,065 g/l (diluire lo Standard di 20 volte)</td></tr><tr><td>Calibratore 3</td><td>0,130 g/l (diluire lo Standard di 10 volte)</td></tr><tr><td>Calibratore 4</td><td>0,325 g/l (diluire lo Standard di 4 volte)</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	0,065 g/l (diluire lo Standard di 20 volte)	Calibratore 3	0,130 g/l (diluire lo Standard di 10 volte)	Calibratore 4	0,325 g/l (diluire lo Standard di 4 volte)
Calibratore 1	0 g/l (utilizzare acqua distillata)								
Calibratore 2	0,065 g/l (diluire lo Standard di 20 volte)								
Calibratore 3	0,130 g/l (diluire lo Standard di 10 volte)								
Calibratore 4	0,325 g/l (diluire lo Standard di 4 volte)								

## PREPARAZIONE DEL CAMPIONE:

### 1. Diluizione del campione

Il kit prevede due diversi metodi in base al contenuto stimato di acido acetico nel campione: un metodo per concentrazioni elevate per campioni con concentrazioni da 0,13 g/L a 1,3 g/L e un metodo ad alta sensibilità per rilevare concentrazioni da 0,033 g/L a 0,33 g/L. La quantità di acido acetico presente nel campione deve essere fra concentrazioni da 0,033 g/L a 1,3 g/L.

**Tabella di diluizione (saggio manuale)**

Concentrazione stimata di acido acetico (g/L)	Diluizione con acqua	Fattore di diluizione (F)
<0,33	Nessuna diluizione richiesta (Metodo alta sensibilità)	1
<1,3	Non è richiesta alcuna diluizione (Metodo concentrazione elevata)	1
1,3-13	1 mL di campione + 9 mL di acqua (Metodo concentrazione elevata)	10
13-130	1 mL di campione + 99 mL di acqua (Metodo concentrazione elevata)	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 1,3 g/L.
- 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 e/o rimuovere il grasso utilizzando il kit di chiarificazione Carrez (SKU; 700004270 K-CARREZ).

### 3. Esempi di preparazione dei campioni suggeriti

**(a) Determinazione dell'acido acetico 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 giri.

*In genere, è necessaria una diluizione di 5 volte in acqua distillata per il vino rosso (a causa della colorazione del vino).*

*In genere, non è richiesta alcuna diluizione per il vino bianco (Metodo alta sensibilità)*

- (b) **Determinazione dell'acido acetico nell'aceto:** Filtrare attraverso un filtro per siringa da 0,2 micron per la chiarificazione. In alternativa, centrifugare un'aliquota di aceto per 5 minuti a 15.000 g. *In genere, è necessaria una diluizione di 500 volte in acqua distillata (Metodo alta sensibilità).*
- (c) **Determinazione dell'acido acetico nei succhi di frutta (ad esempio, succo di mela):** 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, non è richiesta alcuna diluizione (Metodo alta sensibilità).*
- (d) **Determinazione dell'acido acetico nel sidro:** 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 richiesta alcuna diluizione (Metodo alta sensibilità).*
- (e) **Determinazione dell'acido acetico nei formaggi a pasta dura (ad es. cheddar):** pesare accuratamente 2 g di formaggio macinato in un matraccio volumetrico da 100 ml e aggiungere 60 ml di acqua distillata. Incubare il matraccio a circa 60 °C per 20 minuti, agitandolo a intermittenza. Raffreddare il matraccio a 20-25 °C e riempirlo fino al segno con acqua distillata. Conservare il matraccio a 4 °C per 30 minuti e poi filtrare con carta da filtro. Utilizzare il filtrato limpido nel saggio. *In genere, non è richiesta alcuna diluizione (Metodo alta sensibilità).*
- (f) **Determinazione dell'acido acetico nei condimenti acidi e nelle salse (ad es. ketchup):** aggiungere 1 g di campione a un matraccio volumetrico da 100 mL e regolare il volume a 100 mL con acqua distillata. Conservare la soluzione a 4 °C per 20 minuti per ottenere la separazione dei grassi. Filtrare la soluzione con carta da filtro e utilizzare il filtrato limpido per il saggio. In genere, non è richiesta ulteriore diluizione *(Metodo alta sensibilità).*
- (g) **Determinazione dell'acido acetico nel salmone affumicato:** pesare accuratamente 10 g di salmone affumicato, aggiungerlo direttamente a un frullatore seguito da 100 ml di acqua distillata e frullare per 30 secondi o fino a ottenere un composto omogeneo. Filtrare la soluzione con carta da filtro e utilizzare il filtrato limpido per il saggio. *In genere, non è richiesta alcuna diluizione (Metodo alta sensibilità).*

**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](http://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](http://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](#).