

**ETANOLO
(LIQUID READY™)
ISTRUZIONI DEL PRODOTTO**

**SKU: 700007710
K-ETOHLQ**

08/25

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

Megazyme®
by **NEOGEN®**

INTRODUZIONE:

L'etanolo è onnipresente in natura, quindi la sua determinazione quantitativa non è importante solo nella produzione di vini, birre e liquori, ma anche per bevande a bassa gradazione alcolica e analcoliche, succhi di frutta e una serie di altri alimenti, tra cui cioccolatini, dolci, marmellate, miele, aceto e prodotti lattiero-caseari.

PRINCIPIO:

L'alcol deidrogenasi (AldH) catalizza l'ossidazione dell'etanolo ad acetaldeide accoppiata alla riduzione di nicotinamide-adenina dinucleotide (NAD^+).



La quantità di NADH formata in questo percorso di reazione è stochiometrica rispetto alla quantità di etanolo. È il NADH che viene misurato dall'aumento dell'assorbanza a 340 nm.

SPECIFICITÀ, SENSIBILITÀ E LINEARITÀ:

- Il saggio è specifico per l'etanolo.
- Il limite di rilevazione (LOD) è pari a 0,002 g/l e il limite di quantificazione (LOQ) è pari a 0,005 g/l (utilizzando un volume di campione di 0,1 ml).
- L'intervallo di misurazione consigliato è compreso tra 0,01 e 0,3 g/L (utilizzando un volume di campione di 0,1 mL). Ciò corrisponde a 1-30 µg di etanolo per saggio.

INTERFERENZA:

Non sono stati identificati composti interferenti.

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 di questo prodotto, fare riferimento al rapporto di convalida associato disponibile sul sito Web di Megazyme. Per ulteriori informazioni sull'utilizzo e sulla manipolazione in sicurezza di questo prodotto, fare riferimento alla scheda dati di sicurezza (SDS) disponibile 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):

Tampone

Contiene sodio azide (0,02% p/v) come conservante. Pronto all'uso.

Conservare a una temperatura di 4 °C. Consultare l'etichetta individuale per la data di scadenza.

Reagente 2 (2 x 12,5 ml):

NAD⁺, AIDH

Contiene sodio azide (0,02% p/v) come conservante. Pronto all'uso.

Conservare a una temperatura di 4 °C. Consultare l'etichetta individuale per la data di scadenza.

Standard (5 ml):

Etanolo standard (0,3 g/L).

Contiene sodio azide (0,02% p/v) come conservante. Pronto all'uso.

Conservare a una temperatura di 4 °C. Consultare l'etichetta individuale per la data di scadenza.

NOTA: la soluzione standard di etanolo 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 etanolo viene determinata direttamente dal coefficiente di estinzione di NADH.

PREPARAZIONE DELLE SOLUZIONI DEI REAGENTI:

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

PROCEDURA DI SAGGIO MANUALE:

Lunghezza d'onda: 340 nm

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

Temperatura: 20-37 °C

Volume finale: 2,60 ml

soluzione di campione: da 0,01 g/L a 0,3 g/L (ovvero da 1 a 30 µg di etanolo per cuvetta)

Leggere controluce (senza una cuvette 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 20-37 °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 ~7 minuti a 20-37 °C, quindi leggere le assorbanze (A_2).**		

* Sia 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 di saggio manuale per l'etanolo:

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

2. Calcolo della differenza di assorbanza $\Delta A_{\text{Etanolo}}$

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

Segue la procedura di saggio manuale per l'etanolo:

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

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 etanolo in g/L

La concentrazione di etanolo può essere calcolata come segue:

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

dove:

V = volume finale [ml]

MW = peso molecolare dell'etanolo [g/mol]

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

d = percorso ottico [cm]

v = volume di campione [ml]

Segue la procedura di saggio manuale per l'etanolo:

$$c = \frac{2,6 \times 46,07}{6.300 \times 1,0 \times 0,1} \times \Delta A_{\text{Etanolo}} \quad [\text{g/l}]$$

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

4. Calcolo del contenuto di etanolo in termini % (v/v):

Per calcolare la % di alcol in volume (v/v) per l'etanolo:

$$c = \frac{2,6 \times 46,07}{6.300 \times 1,0 \times 0,1} \times 0,1266 \times \Delta A_{\text{Etanolo}} \quad [\% \text{ v/v}]$$

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

dove:

0,1266 = fattore per convertire g/L in % (v/v), portando la densità dell'etanolo puro a 0,79 g/mL

Se il campione è stato diluito durante la preparazione, il risultato deve essere moltiplicato per il fattore di diluizione del campione F.

5. Calcolo del contenuto di etanolo 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:

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

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 ChemWell®-T).

NOTA: per ciascun lotto di campioni che viene applicato alla determinazione dell'etanolo deve essere creata 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">- Aggiungere il Reagente 1 [0,2 ml]- Aggiungere il campione o il calibratore [0,01 ml]- Preincubare per 1-3 minuti a [20-37 °C]- Misurare A_1 a 340/405 nm- Aggiungere il Reagente 2 [0,05 ml]- Incubare per 7 minuti a [20-37 °C]- Misurare A_2 a 340/405 nm- Calcolare $A_2 - A_1$ rispetto alla curva di calibrazione								
Calibrazione	<p>Calibrare utilizzando 2-4 calibratori con valori compresi tra 0 e 0,3 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>0,03 g/l (diluire lo Standard di 10 volte)</td></tr><tr><td>Calibratore 3</td><td>0,15 g/l (diluire lo Standard di 2 volte)</td></tr><tr><td>Calibratore 4</td><td>0,3 g/l (utilizzare lo standard come tale)</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	0,03 g/l (diluire lo Standard di 10 volte)	Calibratore 3	0,15 g/l (diluire lo Standard di 2 volte)	Calibratore 4	0,3 g/l (utilizzare lo standard come tale)
Calibratore 1	0 g/l (utilizzare acqua distillata)								
Calibratore 2	0,03 g/l (diluire lo Standard di 10 volte)								
Calibratore 3	0,15 g/l (diluire lo Standard di 2 volte)								
Calibratore 4	0,3 g/l (utilizzare lo standard come tale)								

PREPARAZIONE DEL CAMPIONE:

1. Diluizione del campione

La quantità di etanolo presente nel campione deve essere compresa fra 0,01 g/L a 0,3 g/L. Se il valore di $\Delta A_{\text{Etanolo}}$ è troppo basso (ad es. <0,1), pesare più campione o ridurre la diluizione. Se il valore di $\Delta A_{\text{Etanolo}}$ è troppo alto (ad es. >2,0), aumentare la diluizione in acqua distillata.

Tabella di diluizione del campione

Concentrazione stimata di etanolo (g/L)	Diluizione con acqua	Fattore di diluizione del campione (F)
<0,3	Non è richiesta alcuna diluizione	1
0,3-3	1 mL di campione + 9 mL di acqua	10
3 -30	1 mL di campione + 99 mL di acqua	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 0,3 g/L.
- I campioni torbidi devono essere filtrati o centrifugati.
- I campioni acidi ($\text{pH} < 3,0$) 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 utilizzando il kit di chiarificazione Carrez (700004270, K-CARREZ).
- Rimuovere i lipidi utilizzando il kit di chiarificazione Carrez (700004270, K-CARREZ).

3. Esempi di preparazione dei campioni suggeriti

(a) Determinazione dell'etanolo 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 g. *In genere, è necessaria una diluizione di 1.000 volte in acqua distillata per il vino rosso e non è richiesta alcuna diluizione per il vino bianco.*

(b) Determinazione dell'etanolo nelle birre analcoliche: Rimuovere la carbonatazione agitando un campione in un becher e aumentando il pH a circa pH 9 utilizzando NaOH 2 M. Filtrare attraverso un filtro per siringa da 0,2 micron e utilizzare il filtrato limpido nel saggio. *In genere, è necessaria una diluizione di 20 volte.*

- (c) **Determinazione dell'etanolo nei liquori analcolici (ad es. gin analcolico):** la concentrazione di etanolo dei liquori analcolici può generalmente essere determinata senza alcun trattamento del campione (ad eccezione della diluizione secondo la tabella di diluizione). *In genere, è necessaria una diluizione di 10 volte in acqua distillata.*
- (d) **Determinazione dell'etanolo nel kombucha grezzo non pastorizzato.** Rimuovere la carbonatazione agitando un campione in un becher e aumentando il pH a circa pH 9 utilizzando NaOH 2 M. Filtrare attraverso un filtro per siringa da 0,2 micron e utilizzare il filtrato limpido nel saggio. *In genere, è necessaria una diluizione di 10 volte.*
- (e) **Determinazione dell'etanolo nel succo di frutta (ad es., succo di pomodoro).** 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, è necessaria una diluizione di 2 volte.*

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

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 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](#).