

Determinación enzimática de Etanol en productos alimentarios y otros
 AOAC® *Official Method*™ 2017.07 para kombucha, zumo de fruta y cerveza sin alcohol
 2 x 50 ml R1 + 2 x 12,5 ml R2 (50 pruebas)

Para uso "in vitro" solamente

Conservar entre +2 y +8 °C

Principio

Ensayo enzimático con Alcohol Deshidrogenasa (ADH). Se produce NADH que es medido a 340 nm:



Reactivos

Los reactivos están listos para usar.

Reactivo 1: dos frascos ≥ 50 ml (tampón)

Reactivo 2: dos frascos ≥ 12,5 ml (NAD, ADH)

Los reactivos son estables hasta el final del mes indicado en la fecha de vencimiento, si se almacenan a 2 - 8 °C. No se deben congelar los reactivos. Dejar que los reactivos alcancen la temperatura del laboratorio antes de su uso (20 - 25 °C).

Se deben seguir las normas habituales de trabajo del laboratorio. No ingerir! Evitar el contacto con piel y mucosas.

Este kit puede contener sustancias peligrosas. Para informarse sobre las sustancias peligrosas contenidas, por favor consultar las hojas de seguridad de materiales (MSDS) de este producto, disponibles en línea en www.r-biopharm.com. Luego de su uso, los reactivos pueden eliminarse como residuos de laboratorio. Los embalajes pueden reciclarse.

Preparación de las muestras

- Método de AOAC® para kombucha, zumo de fruta y cerveza sin alcohol: filtrar o centrifugar turbias soluciones, prueba clara directamente, o después de una dilución en el rango de medida relevante.
- Usar muestras líquidas y limpias directamente o después de una dilución en el rango de medida relevante (ver Rendimiento del ensayo).
- Las muestras con dióxido de carbono deben degasificarse
- Las muestras con contenido graso o proteico deben clarificarse por el método de clarificación de Carrez
- Las muestras sólidas o semi-sólidas deben molerse y homogeneizarse. Luego extraer con agua, filtrar o centrifugar, o realizar una clarificación de Carrez si es necesario.

Método operatorio

Longitud de onda: 340 nm
 Camino óptico: 1 cm
 Temperatura: 20 - 25 °C / 37 °C
 Medida: contra aire o agua
 Muestras: 3 - 500 mg/l

	Blanco reactivo (BR)	Muestras
Reactivo 1	2000 µl	2000 µl
Muestra/ standard	-	100 µl
Agua destilada	100 µl	-
Mezclar, incubar 1 min a 37 °C o 3 min a 20 - 25 °C. Leer la absorbancia A1, luego añadir:		
Reactivo 2	500 µl	500 µl
Mezclar, esperar el final de la reacción (10 min a 37°C o 15 min a 20 - 25°C). Leer la absorbancia A2.		

El blanco reactivo debe medirse una vez por cada serie, y debe sustraerse de cada muestra en el cálculo de los resultados.

Con el fin de evitar evaporación, debe dispensarse primero el reactivo 1 y la muestra debe pipetarse dentro del mismo.

Cálculo de los resultados

$\Delta A = (A_2 - df \times A_1)_{\text{muestra}} - (A_2 - df \times A_1)_{\text{RB}}$
 df (factor de dilución) = factor de dilución de la densidad óptica
 $df = (\text{muestra} + R1) / (\text{muestra} + R1 + R2) = 0,808.$

$c = (V \times MW \times \Delta A) / (\epsilon \times d \times v \times 1000)$ [en g/l de Etanol]
 $c = (2,600 \times 46,07 \times \Delta A) / (\epsilon \times 1 \times 0,1 \times 1000)$
 Resulta para una determinación a 340 nm ($\epsilon = 6,3 \text{ l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$):
 $C_{\text{Etanol}} [\text{g/l}] = 0,190 \times \Delta A$

$\% \text{ Alcohol [Vol. \%]} = C_{\text{Etanol}} [\text{g/l}] / 7,894$

Notas

El test es muy sensible. El etanol presente en el aire (por ejemplo productos de limpieza y desinfección) causan una reacción "creep" o falsos resultados. Es necesario realizar la prueba en una atmósfera sin etanol, o trabajar en cubetas tapadas y firmemente cerradas.

Debido a la volatilidad del etanol, es necesario preparar las muestras de manera adecuada:

- Si la muestra debe diluirse, pipetear la misma por debajo de la superficie del diluyente.
- Utilizar un mínimo de volumen de muestra de 100 µl.
- Si la muestra debe filtrarse, el filtrado no debe caer en gotas, debe deslizarse a lo largo del recipiente receptor.
- Usar las muestras diluidas el mismo día de preparadas
- La exactitud es altamente dependiente de la técnica de pipeteo

Rendimiento del ensayo

Especificidad

La enzima ADH oxida los alcoholes primarios. La recuperación del etanol es de aprox. 100%, mientras que los otros alcoholes primarios (n-butanol y n-propanol) muestran una recuperación inferior. Los alcoholes secundarios y terciarios pueden conducir a una reacción "creep".

Linealidad y rango de medida

La prueba es lineal hasta 500 mg/l de Etanol. El rango de medida recomendado va desde 20 a 300 mg/l, para tener un $\Delta A \approx 1,5$ (A). Cuando los valores superan este rango, las muestras deben diluirse con agua destilada desde 50 a 300 mg/l. Multiplicar el resultado obtenido por el factor de dilución.

Sensibilidad

El límite inferior de detección (LD) y el límite de cuantificación (LQ) se determinaron según la norma DIN 32645:2008 - 11:

- LD = 1,9 mg/l
- LQ = 3,3 mg/l

Precisión y recuperación

Para kombucha, zumo de fruta y cerveza sin alcohol:
 - desvío estándar relativo para repetitividad [RSD(r)] < 2%
 - desvío estándar relativo para reproducibilidad [RSD(R)] < 3%
 - recuperación = 95-105%

Aviso legal

Los datos corresponden a nuestro estado actual de tecnología y proporcionan información sobre nuestros productos y sus usos. R-Biopharm no ofrece garantías de ningún tipo, ya sea expresa o implícita, excepto que los materiales con los que están fabricados sus productos son de calidad estándar. Los productos defectuosos serán reemplazados. No hay ninguna garantía de comercialización de este producto, o de la idoneidad del producto para cualquier propósito. R-Biopharm no será responsable de ningún daño, incluyendo daño especial o consecuente, o gastos derivados directa o indirectamente del uso de este producto.