

Megazyme

ÁCIDO GLUCÓNICO/ D-GLUCONO- δ -LACTONA

PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

K-GATE 11/05

(60 Ensayos por Kit)

Este folleto se puede conseguir en
www.megazyme.com en los siguientes idiomas:
Inglés-Francés-Alemán-Italiano-Portugués

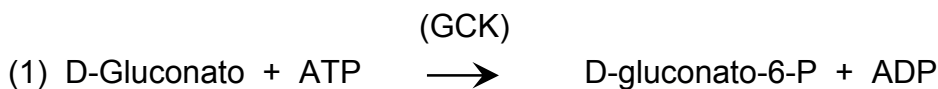


INTRODUCCIÓN:

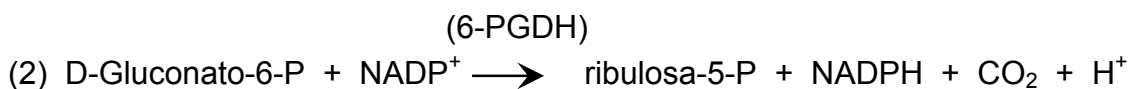
El ácido D-Glucónico se encuentra en alimentos y bebidas como el vino, refrescos, vinagre, carne, zumo de frutas, productos lácteos, arroz y miel. Este ácido orgánico no volátil imparte un saber amargo, pero refrescante y dada su aparición en los alimentos naturales y en el metabolismo humano se le ha concedido el estatus de GRAS. Los ratios de etanol y glicerol en el ácido D-glucónico son un indicador de calidad en la industria vinícola. Las uvas infectadas con *Botrytis* mostraban altos niveles de este ácido, que puede llegar a alcanzar 1-2 g/L. Existen otras muchas aplicaciones del ácido D-glucónico, como por ejemplo los complementos dietéticos, detergentes y alimentos escabechados. El D-Glucono-d-lactona se encuentra asociado con el ácido D-glucónico, como por ejemplo en el vino, y se utiliza también en la industria alimentaria. Entre los alimentos que contienen D-glucono-d-lactona se pueden citar el tofu, el yogur, requesón, pan, productos de confitería y carne.

PRINCIPIO:

El ácido D-Glucónico (D-gluconato) se fosforiliza en D-gluconato-6-fosfato por la adenosina-5'-trifosfato (ATP) y la enzima gluconato kinasa (GCK) con la formación de adenosina-5'-difosfato (ADP) (1).

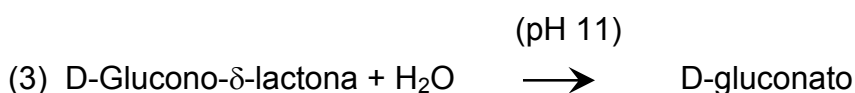


En presencia de nicotinamida-adenina dinucleotido fosfato (NADP^+), el D-gluconato-6-fosfato es descarboxilado oxidativamente por el 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6-PGDH) en ribulosa-5-fosfato con la formación de nicotinamida-adenina dinucleotido fosfato reducido (NADPH) (2).



La cantidad de NADPH que se forma en la doble reacción anterior es estequiométrica con la cantidad de ácido D-glucónico. Lo que se mide es el NADPH, por el aumento de la capacidad de absorción a 340 nm.

El D-Glucono- δ -lactona se determina por el mismo principio después de la hidrólisis alcalina (3).



ESPECIFICIDAD, SENSIBILIDAD, LINEALIDAD Y PRECISIÓN:

El ensayo es específico para el ácido D-glucónico.

El diferencial de absorción menor del ensayo es de 0,005 unidades. Esto corresponde a 0,198 mg/L de solución de muestra a un volumen máximo de muestra de 2,0 mL. El límite de detección es de 0,792 mg/L, que se deriva de un diferencial de absorción de 0,020 con un volumen máximo de muestra de 2,0 mL.

El ensayo es lineal a lo largo del intervalo de 0,8 a 50 µg de ácido D-málico por ensayo. En determinaciones dobles utilizando una solución de muestra, se puede producir una diferencia de absorción de 0,005 a 0,010. Con un volumen de muestra de 2,0 mL, esto corresponde a una concentración de ácido D-glucónico de aproximadamente entre 0,198 y 0,396 mg/L de solución de muestra. Si la muestra se diluye durante su preparación, el resultado se multiplica por el factor de dilución, F. Si en la preparación de la muestra, la muestra se pesa, por ejemplo, 10 g/L, cabe esperar una diferencia entre 0,02 a 0,05 g/100 g.

El análisis de las sales comerciales de ácido D-glucónico (D-gluconatos) deben dar resultados del ~ 100 %. Sin embargo, si las sales contienen algo de ácido D-glucónico libre, los valores pueden ser > 100 % (si los cálculos utilizan pesos moleculares de las sales respectivas de ácido D-glucónico).

INTERFERENCIA:

Si la conversión de ácido D-glucónico se ha completado en el tiempo especificado en el ensayo (aprox. 6 min), en general se puede concluir que no se ha producido ninguna interferencia. Sin embargo, se puede hacer otra comprobación añadiendo ácido D-glucónico (aprox. 25 µg en 0,1 mL) en la cubeta, cuando se complete la reacción. Se debería observar un aumento significativo de la absorción.

Las sustancias que interfieren en la muestra analizadas se pueden identificar incluyendo un estándar interno. Cabe esperar una recuperación cuantitativa de este estándar. Las pérdidas por manipulación y extracción de la muestra se pueden identificar realizando experimentos de recuperación, es decir, añadiendo ácido D-glucónico a la muestra en las fases iniciales de la extracción.

SEGURIDAD:

En general, los reagentes utilizados en la determinación del ácido D-glucónico no son materiales peligrosos según el Reglamento de Sustancias Peligrosas. Sin embargo, el concentrado tampón contiene azida de sodio 0,02 % (w/v) como conservante. Es necesario observar todas las medidas generales de seguridad que se aplican a todas las sustancias químicas.

KITS:

Megazyme dispone de kits idóneos para realizar 60 determinaciones. Los kits contienen el método completo de ensayo además de:

- Botella 1:** Tampón TEA (12,5 mL, 1 M, pH 7,6) más cloruro de magnesio (100 M) y azida de sodio 0,02 % (w/v) como conservante. Estable durante > 2 años a 4°C.
- Botella 2:** NADP⁺ (150 mg) mas ATP (440 mg). Estable durante > 5 años a -20°C.
- Botella 3:** Suspensión de 6-fosfogluconato deshidrogenasa (1,25 mL, 55 U/mL). Estable durante > 2 años a 4°C.
- Botella 4:** Suspensión de gluconato kinasa (1,25 mL, 365 U/mL). Estable durante > 2 años a 4°C.
- Botella 5:** D-gluconato sódico (~ 2 g).

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES/SUSPENSIONES DE REAGENTES:

1. Use el contenido de la botella 1 según se suministra. Estable durante > 2 años a 4°C.
2. Disuelva el contenido de la botella 2 en 12,5 mL de agua destilada. Divídala en partes alícuotas del tamaño adecuado y guárdelas en tubos de polipropileno a -20°C entre uso y uso y en hielo mientras lo está utilizando. Una vez disuelto, el reagente es estable durante > 2 años a -20°C.
- 3 & 4. Use el contenido de la botella 3 y 4 según se suministra. Antes de abrirla por primera vez, agite la botella para eliminar cualquier enzima que se pueda haber quedado en el tapón de goma. **Agite bien la botella para que se mezcle el contenido antes de utilizarla.** Estable durante > 2 años a 4°C.
5. Pese aproximadamente 279 mg de D-gluconato sódico (MW = 216,13) al más redondeando al 0,1 mg en un matraz de 1 L. Rellene hasta la marca con agua destilada y mezcle bien (esto se corresponde a aproximadamente 0,25 g de ácido D-glucónico/L). Guarde 10 mL de partes alícuotas de esta solución a -20°C. Estable durante > 2 años a -20°C.

NOTA: La solución estándar de ácido D-glucónico solo se utiliza en el ensayo cuando existe alguna duda sobre la precisión del espectrofotómetro que se está utilizando o cuando se sospecha que las sustancias que intervienen en la muestra están produciendo una inhibición. La concentración de ácido D-glucónico se determina directamente a partir del coeficiente de extinción de NADPH (véase página 6).

EQUIPO (RECOMENDADO):

1. Tubos de vidrio de prueba (con la base redonda; 16 x 100 mm).
2. Cubetas de plástico desechables (paso de luz de 1 cm, 3,0 mL).
3. Micropipetas, p. ej. Gilson Pipetman[®] (20 μ L, 100 μ L y 200 μ L).
4. Pipeta de desplazamiento positivo p.ej. Eppendorf Multipette[®]
 - con 5 mL de Combitip[®] (para administrar partes alícuotas de 0,2 mL de tampón de TEA y solución NADP⁺/ATP).
 - con 25 mL de Combitip[®] (para administrar partes alícuotas de 2,0 mL de agua destilada).
5. Balanza de precisión.
6. Espectrofotómetro a 340 nm.
7. Agitador vibrador de tubos Vortex (p.ej. Agitador de tubos de prueba IKA[®] Yellowline TTS2).
8. Cronómetro.
9. Papeles filtro Whatman No.1 (9 cm).

PROCEDIMIENTO:

- Longitud de onda:** 340 nm
Cubeta: Paso de luz de 1 cm (vidrio o plástico)
Temperatura: ~ 25°C
Volumen final: 2,54 mL
Solución de muestra: 0,8-50 µg de ácido D-glucónico por cubeta
(en 0,1-2 mL de volumen de muestra)

Medir contra corriente de aire (sin cubeta en el paso de luz) o contra agua

Pipeta en cubetas	Muestra sin tratar	Muestra
agua destilada (~ 25°C)	2,10 mL	2,00 mL
muestra	-	0,10 mL
solución 1 (tampón de TEA)	0,20 mL	0,20 mL
solución 2 (NADP ⁺ /ATP)	0,20 mL	0,20 mL
suspensión 3 (6-PGDH)	0,02 mL	0,02 mL
Mezcle*, lea la absorción de las soluciones (A ₁) transcurridos aproximadamente 5 min e inicie las reacciones añadiendo:		
suspensión 4 (GCK)	0,02 mL	0,02 mL
Mezcle*, lea las absorciones de las soluciones (A ₂) al final de la reacción (aprox. 6 min).		

* aclare la pipeta con la solución de muestra antes de administrar la solución de muestra.

* por ejemplo con una espátula de plástico o dándole la vuelta con cuidado después de tapar la cubeta con tapa o Parafilm®.

CALCULO:

Calcule las diferencias de absorción (A_2-A_1) con muestra y muestra sin tratar. Reste la diferencia de absorción de la muestra sin tratar de la diferencia de absorción de la muestra, obteniendo con ello $\Delta A_{\text{ácido D-glucónico}}$.

El valor de $\Delta A_{\text{ácido D-glucónico}}$ por regla general deberá ser de al menos 0,100 unidades de absorción para conseguir resultados suficientemente precisos.

La concentración de ácido D-glucónico se puede calcular de la siguiente forma:

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

Donde:

V = volumen final [mL]

MW = peso molecular del ácido D-glucónico [g/mol]

ε = coeficiente de extinción de NADPH a 340 nm
= 6300 [l x mol⁻¹ x cm⁻¹]

d = paso de luz [cm]

v = volumen de muestra [mL]

Sigue para el ácido D-glucónico:

$$c = \frac{2,54 \times 196,1}{6300 \times 1,0 \times 0,10} \times \Delta A_{\text{ácido D-glucónico}} \quad [\text{g/L}]$$

$$= 0,7906 \times \Delta A_{\text{ácido D-glucónico}} \quad [\text{g/L}]$$

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

Cuando se analicen muestras sólidas o semi-sólidas que se pesan para preparar la muestra, el contenido (g/100 g) se calcula a partir de la cantidad pesada de la siguiente forma:

Contenido de ácido D-glucónico

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

NOTA: Estos cálculos se pueden simplificar utilizando la aplicación **Mega-Calc**TM de Megazyme, que se puede descargar desde la página web donde aparece el producto (www.megazyme.com).

Determinación de D-glucono- δ -lactona:

Ajuste el pH de la solución de muestra a aproximadamente 11,0 con 2 M NaOH e incube a aproximadamente 25°C durante 5-10 min. Supervise el pH de la solución con tiras reactivas de pH, y ajuste si fuera necesario. Utilice una parte alícuota de esta solución en el ensayo. D-Glucono-d-lactona se determina junto con el ácido D-Glucónico "libre" y se calcula como ácido D-glucónico total.

Sigue para D-glucono- δ -lactona:

$$c = \frac{2,54 \times 178,1}{6300 \times 1,0 \times 0,10} \times \Delta A_{\text{ácido D-glucónico total}} \quad [\text{g/L}]$$
$$= 0,7181 \times \Delta A_{\text{ácido D-glucónico total}} \quad [\text{g/L}]$$

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA:

1. Dilución de la muestra.

La cantidad de ácido D-glucónico y de D-glucono- δ -lactona hidrolizado presente en la cubeta (es decir, en los 0,1 mL de muestra que se está analizando) deberá situarse entre 0,8 y 50 μg . La solución de muestra por tanto se debe diluir lo suficiente como para conseguir una concentración de ácido D-glucónico entre 0,08 y 0,5 g/L.

Tabla de dilución

Concentración estimada de ácido D-glucónico (g/L)	Dilución sin agua	Factor de dilución (F)
< 0,5	No se requiere dilución	1
0,5-5,0	1 + 9	10
5,0-50	1 + 99	100
> 50	1 + 999	1000

Si el valor de $\Delta A_{\text{ácido D-glucónico}}$ es demasiado bajo (p.ej. < 0,100), pese más muestra o diluya con menos fuerza. Como alternativa, la muestra que se debe verter en la cubeta se puede aumentar a 2,0 mL, asegurándose de que los componentes de la muestra y el agua destilada en la reacción sumen 2,1 mL, utilizando el nuevo volumen de muestra en la ecuación.

2. Clarificación de la muestra.

a. Soluciones:

Carrez I solution. Disuelva 3,60 g de hexacianoferrato de potasio (II) $\{K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O\}$ (Sigma cat. no. P-9387) en 100 mL de agua destilada. Guárdelo a temperatura ambiente.

Solución Carrez II. Disuelva 7,20 g de sulfato de cinc ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) (Sigma cat. no. Z-4750) en 100 mL de agua destilada. Guárdelo a temperatura ambiente.

Hidróxido sódico (NaOH, 100 mM). Disuelva 4 g de NaOH en 1 L de agua destilada. Guárdelo a temperatura ambiente.

b. Procedimiento:

Vierta la muestra líquida en un matraz de 100 mL que contenga aproximadamente 60 mL de agua destilada, o pese suficiente cantidad de muestra en un matraz de 100 mL y añada 60 mL de agua destilada. Añada con cuidado 5 mL de solución Carrez I, 5 mL de solución Carrez II y 10 mL de solución de NaOH (100 mM). Mezcle cada vez que añada un componente. Llene el matraz hasta la marca, mezcle y filtre.

3. Consideraciones generales.

(a) Muestras líquidas: muestras claras, ligeramente coloreadas y aproximadamente neutras se pueden utilizar directamente en el ensayo.

(b) Muestras ácidas: Si se va a analizar más de 0,1 mL de muestra ácida sin diluir (como vino o de fruta), el pH de la solución se debe aumentar a 7,6 aproximadamente, utilizando 2 M NaOH, y la solución incubada a temperatura ambiente durante 30 min.

(c) Dióxido de carbono: las muestras que contengan una cantidad importante de dióxido de carbono, como la cerveza, se deben desgasificar aumentando el pH a 7,6 aproximadamente con 2 M NaOH y agitando suavemente o removiéndolo con una varilla de vidrio.

(d) Muestras coloreadas: puede que sea necesario realizar una muestra sin tratar, es decir, una muestra sin GCK, en caso de muestras coloreadas.

(e) Muestras muy coloreadas: Si se utilizan sin diluir, las muestras muy coloreadas se deben tratar añadiendo 0,2 g de polivinilpirrolidona PVPP/10 mL de muestra. Agite durante 5 minutos y a continuación filtre.

(f) Muestras sólidas: homogeneizar o triturar muestras sólidas en agua destilada y filtrar si fuera necesario.

(g) Muestras que contengan grasa: extraiga dichas muestras con agua caliente a una temperatura por encima del punto en que se derrite la grasa, por ejemplo, en un matraz de 100 mL. Ajuste a temperatura ambiente y llene el matraz hasta la marca con agua. Guárdelo en hielo o en un frigorífico durante 15-30 min y a continuación fíltrelo. Tire los primeros mL de lo que filtre, y utilice el sobrenadante claro (que puede estar ligeramente opalescente) para el ensayo. Otra alternativa es clarificar con reagentes Carrez.

(h) Muestras que contengan proteína: desproteíne las muestras que contengan proteína añadiendo un volumen igual de hielo 1 M de ácido perclórico con mezcla. Centrifugu a 1.500 g durante 10 min y neutralice el sobrenadante con 1 M KOH. De forma alternativa puede utilizar reagentes Carrez.

EJEMPLOS PARA PREPARAR LAS MUESTRAS:

(a) Determinación del ácido D-glucónico en el vino.

Para la hidrólisis del D-glucono-d-lactona, ajuste el pH del vino a aproximadamente 11,0 con 2 M NaOH e incube a temperatura ambiente durante 5-10 min. Supervise el pH y ajústelo si fuera necesario. Diluya la muestra según la tabla de dilución. *Normalmente, no se requiere dilución y un volumen de muestra de 0,1 mL es adecuado.*

(b) Determinación del ácido D-glucónico o D-glucono- α -lactona en productos cárnicos.

Pese aproximadamente 5 g de muestra representativa homogeneizada en una botella Duran[®] de 100 mL y añada 20 mL de 1 M ácido perclórico. Homogeneice con un homogeneizador Ultraturax o Polytron (o equivalente) en un medio durante 2 min a temperatura ambiente. Lave la cabeza del homogeneizador con agua y ajuste el volumen total a 60 mL aproximadamente. Ajuste el pH a 11,0 aproximadamente con 2 M KOH agitando en un agitador magnético y supervisando el pH con un medidor de pH. Traslade cuantitativamente la solución a un matraz de 100 mL y ajuste el volumen con agua destilada. La capa grasa debe quedar por encima de la marca y la capa acuosa en la marca. Para ayudar a la separación de la grasa y precipitación del perclorato potásico, guarde la solución en un frigorífico o en hielo durante 20 minutos. Filtre la solución. Tire los primeros mL y utilice una solución clara o ligeramente turbia para el ensayo. *Normalmente, no se requiere dilución y un volumen de muestra de 0,5 mL es adecuado.*

REFERENCIA:

1. Moellering, H. & Bergmeyer, H. U. (1988). D-Gluconate (D-Glucono- δ -lactone) and D-Gluconate 6-Phosphate. In *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, H. U., ed.), 3rd ed., **Vol.VI**, pp. 220-227, VCH Publishers (UK) Ltd., Cambridge, UK.

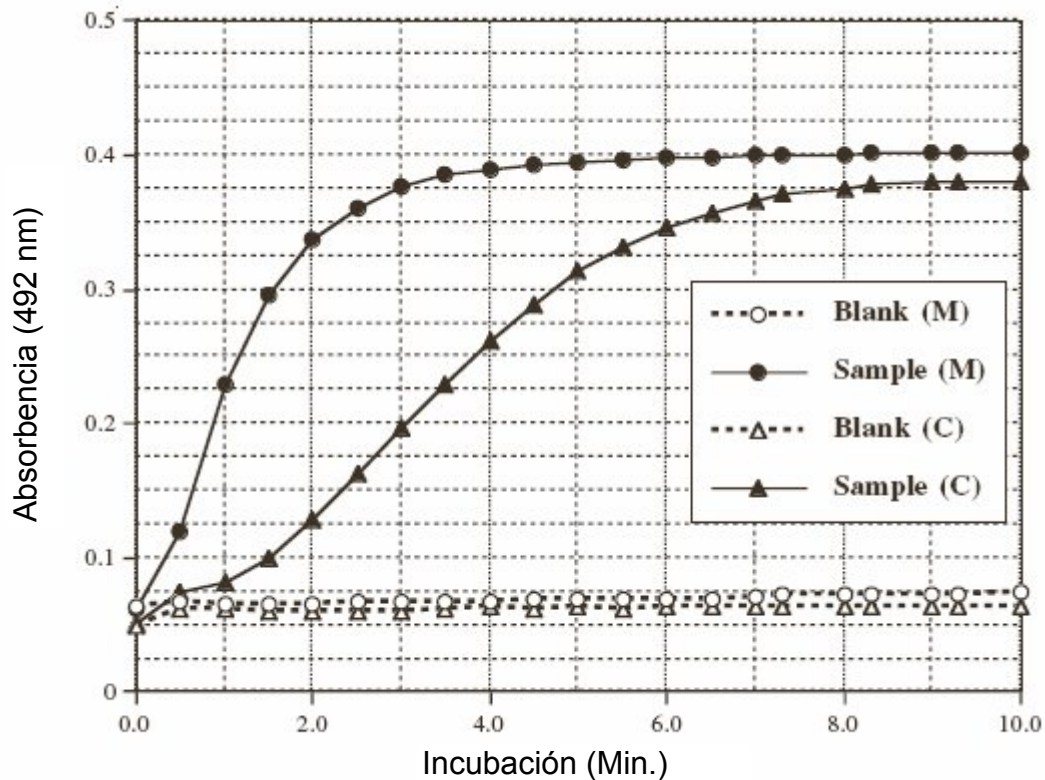


Figura 1. Aumento de la absorción en 492 nm con incubación de 25 μ g ácido D-gluconato con gluconato kinasa 6-fosfogluconato deshidrogenasa en presencia de NADP^+ .

NOTAS:



**Megazyme International Ireland Ltd.,
Bray Business Park, Bray,
Co. Wicklow,
IRLANDA**

Teléfono: (353.1) 286 1220

Fax: (353.1) 286 1264

Página Web: www.megazyme.com

Correo electrónico: info@megazyme.com

SIN GARANTÍA

La información contenida en este librete está, al mejor de nuestro conocimiento, verdad y exacto, pero puesto que las condiciones del uso están más allá de nuestro control, de ninguna garantía se da o se implica por lo que se refiere a cualquier recomendación o sugerencia que puedan ser hechas o que ningún uso no infringirá ninguna patentes.