

Megazyme

AMONIACO (Rápido)

PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

K-AMIAR 11/05

(Para realizar un ensayo rápido del amoniaco en todas las muestras,
incluido el zumo de uva y vino)

(96 Ensayos por Kit)

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



INTRODUCCIÓN:

El amoníaco es un compuesto natural muy común que se produce como consecuencia del catabolismo de la proteína microbiana y por tanto sirve para medir la calidad del zumo de fruta, leche, queso, carne, marisco y productos de repostería. A diferencia de otros kits, este kit se beneficia del uso de un glutamato deshidrogenasa que no lo inhiben los taninos que puede haber por ejemplo en el zumo de uva o el vino. KAMIAR se puede utilizar para determinar manualmente el amoníaco (véase página 5, "A"), o en formato de auto-analizador (véase página 7 "B"). En la industria vinícola, la determinación del amoníaco es importante para calcular el nitrógeno disponible en la levadura (YAN) El YAN contiene tres componentes muy variable, iones sin amoníaco, nitrógeno aminado primario (de ácidos aminados libres), y la aportación de la cadena lateral de la L-arginina¹. Por tanto, para determinar de forma precisa el YAN, será necesario cuantificar los tres componentes, lo cual es posible utilizando el kit L-Arginina/Urea/Amoníaco de Megazyme (K-LARGE) y el kit NOPA (K-PANOPA).

PRINCIPIO:

En presencia de glutamato deshidrogenasa (GIDH) y nicotinamida-adenina dinucleotido fosfato reducido (NADPH), amoníaco (en forma de iones de amoníaco; NH_4^+) reacciona con 2-oxoglutarato para formar ácido L-glutámico y NADP^+ (1).



La cantidad de NADP^+ que se forma en esta reacción es estequiométrica con la cantidad de amoníaco. Lo que se mide es el consumo de NADPH, por la disminución de absorción a 340 nm.²

ESPECIFICIDAD, SENSIBILIDAD, LINEALIDAD Y PRECISIÓN:

El ensayo es específico para el amoníaco. En el análisis del reagente de sulfato de amoníaco, se pueden esperar resultados del 100 %.

El diferencial de absorción menor del ensayo es de 0,005 unidades. Esto corresponde a 0,018 mg/L de solución de muestra a un volumen máximo de muestra de 2 mL. El límite de detección es de 0,071 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 0,2 a 7 μg de amoníaco por ensayo (Figura 2). 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 mL, esto corresponde a una concentración de amoníaco de aproximadamente entre 0,018 y 0,035 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.

INTERFERENCIA:

Si la conversión de amoníaco se ha completado en el tiempo especificado en el ensayo (aprox. 3 min), en general se puede concluir que no se ha producido ninguna interferencia. Sin embargo, se puede hacer otra comprobación añadiendo amoníaco (aprox. 4 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 en la manipulación y extracción de la muestra se pueden identificar realizando experimentos de recuperación, es decir, añadiendo amoníaco a la muestra en las fases iniciales de la extracción.

En soluciones tampón alcalinas, los fragmentos de proteína pueden liberar lentamente amoníaco que puede producir una reacción de fluencia lenta. En este kit esto no representa un problema, ya que la reacción se completa rápidamente. Los taninos en el zumo de fruta pueden inhibir de forma significativa el GIDH del hígado de buey, la enzima empleada en los kits de Amoníaco y Urea/Amoníaco de otros fabricantes. Sin embargo, la enzima utilizada en este kit no tiene esa limitación (Figura 3).

SEGURIDAD:

Los reagentes utilizados en la determinación del amoníaco 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 96 determinaciones. Los kits contienen el método completo de ensayo además de:

Botella 1: Tampón TEA (48 mL, 0,5 M, pH 8,0) más imidazole (200 mM), 2-oxoglutarato (40 mM) y azida de sodio 0,02 % (w/v) como conservante.

Estable durante > 2 años a 4°C.

Botella 2: Tabletas con NADPH (96). Se suministran en un frasco especial de plástico que contiene desecante impregnado. Deje este contenedor que se caliente a la temperatura ambiente (preferiblemente en presencia de un desecante) antes de abrirlo para sacar las tabletas. De esta forma las tabletas restantes no absorberán la humedad y se garantizará la máxima estabilidad.

Estable durante > 3 años cuando se guarda seco (si es posible en presencia de un desecante) a 4°C o -20°C.

NOTA: La estabilidad máxima a largo plazo de la tableta se consigue guardando la botella de la en un contenedor cerrado en presencia de un desecante como por ejemplo gel de sílice a 4°C o -20°C.

Botella 3: Suspensión de glutamato deshidrogenasa (2,2 mL, 475 U/mL).
Estable durante > 2 años a 4°C.

Botella 4: Solución estándar de amoníaco (5 mL, 0,04 mg/mL) en 0,02 % (w/v) de azida de sodio.

Estable durante > 2 años a 4°C.

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES DE REAGENTES:

- 1.** Use el contenido de la botella 1 según se suministra.
Estable durante > 2 años a 4°C.
- 2.** Añada 1 tableta de la botella 2 por ensayo a un tubo de vidrio de prueba o un tubo de plástico homologado. Añada 0,5 mL de la solución 1 (de la botella 1) por tableta y remueva de forma intermitente durante 2-3 min. Disuelva solo las tabletas necesarias, recordando incluir una tableta por cada reacción en vacío. En este tampón concentrado NADPH/TEA, puede que no se disuelvan algunos cristales del agente utilizado en la fabricación de la tableta (benzoato de sodio). Lo cual no represente un problema ya que no son necesarias para el ensayo y se disolverán por completo cuando esta solución (Solución 2) se añada a la reacción en la cubeta de ensayo.

Caliente la botella a temperatura ambiente (en un desecador si es posible) antes de retirar la tableta (para evitar la condensación de humedad en el contenedor de la tableta). Si abre la botella mientras todavía está fría las tabletas absorberán la humedad y se reducirá la estabilidad de los componentes de la tableta.

3 & 4. Use el contenido de la botella 3 y 4 según se suministra. Antes de abrir por primera vez, agite la botella para eliminar cualquier enzima que se haya quedado en el tapón de goma. A continuación, guarde las botellas en posición vertical. **Agite la botella para que se mezcle su contenido antes de utilizarlo.**

Estable durante > 2 años a 4°C.

NOTA: La solución estándar de amoníaco 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 amoníaco 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 mL).
3. Micropipetas, p. ej. Gilson Pipetman[®] (100 µL).
4. Pipeta de desplazamiento positivo p.ej. Eppendorf Multipette[®]
 - Con 12,5 mL de Combitip[®] (para administrar partes alícuotas de 0,5 mL de tampón NADPH/TEA (solución 2)).
 - Con 25 mL de Combitip[®] (para administrar partes alícuotas de 2 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).

A. FORMATO MANUAL:

Longitud de onda: 340 nm
Cubeta: Paso de luz de 1 cm (vidrio o plástico)
Temperatura: ~ 25°C
Volumen final: 2,62 mL
Solución de muestra: 0,2-7,0 µg de amoniaco por cubeta
(en 0,1-2,0 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 2 (tampón NADPH/TEA)	0,50 mL	0,50 mL
Mezcla*, lea la absorción de las soluciones (A_1) transcurridos aproximadamente 2 min e inicie las reacciones añadiendo:		
suspension 3 (GIDH)	0,02 mL	0,02 mL
Mezcla*, lea las absorciones de las soluciones (A_2) al final de la reacción (aprox. 3 min). Si la reacción no se ha detenido transcurridos 3 min, continúe leyendo las absorciones a intervalos de 1 min hasta que los valores de absorción sigan siendo los mismos.		

* 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 ($A_1 - A_2$) para realizar sin muestra y con muestra. Reste la diferencia de absorción de la solución sin muestra de la diferencia de absorción de la muestra, obteniendo con ello $\Delta A_{\text{amoniaco}}$. El valor de $\Delta A_{\text{amoniaco}}$ por regla general deberá ser de al menos 0,100 unidades de absorción para conseguir resultados suficientemente precisos.

La concentración de amoniaco se puede calcular de la siguiente forma:

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

Donde:

V = volumen final [mL]

MW = peso molecular del amoniaco [g/mol]

ε = coeficiente de extinción de NADPH a 340 nm
= 6300 [$\text{l} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$]

d = paso de luz [cm]

v = volumen de muestra [mL]

Sigue para el amoniaco:

$$c = \frac{2,62 \times 17,03}{6300 \times 1,0 \times 0,10} \times \Delta A_{\text{amoniaco}} \quad [\text{g/L}]$$

$$= 0,07082 \times \Delta A_{\text{amoniaco}} \quad [\text{g/L}]$$

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 semisólidas 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 amoniaco

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

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

B. FORMATO AUTOANALIZADOR:

Este kit se puede utilizar para preparar 274,6 mL de reagente (equivalente a 1248 reacciones de 0,225 mL). El reagente se prepara de de la siguiente forma:

Preparación de R1:

Componente	Volumen
Botella 1 (tampón):	3,5 mL
Botella 2 (tabletas NADPH):	8,0 Tab. (caliente a temperatura ambiente antes de utilizar)
H ₂ O	17,3 mL
Volumen final:	20,8 mL

(NB: las tabletas se pueden disolver completamente removiendo suavemente)

Preparación de R2:

Componente	Volumen
Botella 1 (tampón):	0,50 mL
Botella 3 (GIDH)	0,16 mL (remueva antes de utilizar)
H ₂ O	1,50 mL
Volumen final:	2,16 mL

MÉTODO DEL EJEMPLO

R1: 0,200 mL

Muestra: ~ 0,005 mL

R2: 0,020 mL

Tiempo de reacción:

5 min a 20-25°C o 37°C

Longitud de onda:

340 nm

Estabilidad del reagente preparado:

> 7 días cuando está en frigorífico

Cálculo:

punto final

Dirección de la reacción:

disminución

Linealidad:

hasta 2,2 µg/mL de amoníaco en solución de reacción final

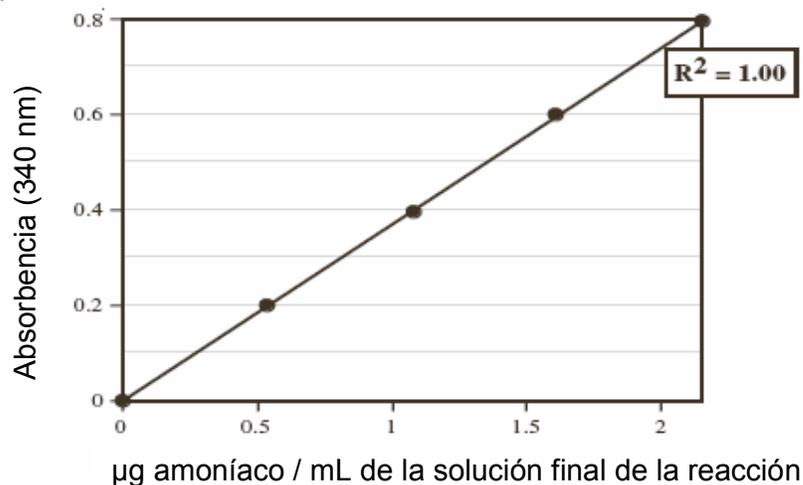


Figura 1. Curva de calibración demostrando la linealidad de KAMIAR. Las reacciones utilizadas para generar esta calibración se prepararon a 37°C durante 5 min, utilizando una cubeta con paso de luz de 10 mm.

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA (Formato Manual, A):

1. Dilución de la muestra.

La cantidad de amoníaco presente en la cubeta (es decir, en los 0,1 mL de muestra que se está analizando) deberá situarse entre 0,2 y 7 µg. La solución de muestra por tanto se debe diluir lo suficiente como para conseguir una concentración de amoníaco entre 0,01 y 0,07 g/L.

Tabla de dilución

Concentración estimada de amoníaco (g/L)	Dilución con agua	Factor de dilución (F)
< 0,07	No se requiere dilución	1
0,07-0,7	1 + 9	10
0,7-7,0	1 + 99	100

Si el valor de $\Delta A_{\text{amoníaco}}$ 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 2,00 mL, asegurándose de que los componentes de la muestra y el agua destilada en la reacción sumen 2,10 mL, utilizando el nuevo volumen de muestra en la ecuación.

2. Clarificación de la muestra.

Los reagentes Carrez no se pueden utilizar para la desproteización y su uso da como resultado recuperaciones significativamente reducidas. Los ácidos perclóricos o tricloroacético se pueden utilizar como alternativa (véanse ejemplos específicos).

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 zumo de fruta), el pH de la solución se debe aumentar a 8,0 aproximadamente, utilizando 2 M NaOH.

(c) Dióxido de carbono: las muestras que contengan dióxido de carbono se deben desgasificar aumentando el pH a 8,0 aproximadamente con 2 M NaOH y agitando suavemente o removiéndolo con una varilla de vidrio.

(d) Muestras coloreadas: se debe realizar una muestra adicional blank, es decir, una muestra sin GIDH, 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 polivinilpolipirrolidona (PVPP)/10 mL de muestra. Agitar bien el tubo durante 5 minutos y a continuación filtre en papel Whatman No. 1.

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

(g) Muestras que contengan grasas: extraiga dichas muestras con agua caliente a una temperatura por encima del punto de fusión de la grasa, p.ej. 100 mL en matraz a 60°C. Déjelo enfriar a la temperatura ambiente y rellene el matraz hasta la marca con agua destilada. 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.

(h) Muestras que contengan proteína: desproteínez las muestras que contengan proteína añadiendo un volumen igual de hielo 1 M de ácido perclórico con mezcla. Centrifugue a 1.500 g durante 10 min y neutralice el sobrenadante con 1 M KOH. También se puede utilizar ácido tricloroacético, según se describe en el ejemplo de preparación de la muestra (c) más abajo.

EJEMPLOS PARA PREPARAR LAS MUESTRAS:

(a) Determinación del amoníaco en zumos de uva/mosto y vino.

Generalmente la concentración de amino nitrógeno primario en el zumo de uva blanca y roja, mosto y el vino en general se puede determinar sin tratar la muestra (salvo mediante dilución y filtrado, según la tabla de dilución, si fuera necesario). Si se van a analizar volúmenes superiores a 25 μL de vino tino, puede ser necesario eliminar algo de color añadiendo 0,2 g de PVPP/10 mL de muestra. Agitar bien el tubo durante 5 minutos y a continuación filtre en papel Whatman No. 1. *Normalmente, no se requiere dilución y un volumen de muestra de 25-50 μL es adecuado.*

(b) Determinación del amoníaco en zumos de fruta (p.ej. zumo de naranja).

Ajuste 25 mL de muestra filtrada a un pH de aproximadamente 8,0 utilizando 2 M NaOH. Traslade cuantitativamente la solución a un matraz de 50 mL y ajuste el volumen con agua destilada. Si la solución está muy coloreada, puede ser necesario eliminar algo de color añadiendo 0,2 g de PVPP/10 mL de muestra. Agitar bien el tubo durante 5 minutos y a continuación filtre en papel Whatman No. 1. *Normalmente, no se requiere dilución y un volumen de muestra de 0,1 mL es adecuado.*

(c) Determinación del amoníaco en la leche.

En un tubo de prueba de vidrio, mezcle 1 mL de leche con 3 mL de 0,3 M ácido tricloroacético. Incube a temperatura ambiente durante 5 min para asegurar la precipitación completa de la proteína y a continuación centrifugue a temperatura ambiente durante 3 min a 2.000 g. Decante el sobrenadante y, utilizando tiras reactivas de pH, neutralice con 10 M KOH (la alta concentración de KOH da como resultado un aumento insignificante en volumen). Filtre, y utilice el sobrenadante claro directamente en el ensayo. *Normalmente, no se requiere otra dilución y serán necesarios volúmenes de muestra de hasta 2,0 mL.*

(d) Determinación del amoníaco en productos de pastelería.

Pese aproximadamente 10 g de material representativo en una botella Duran[®] de 100 mL. Añada 20 mL de 1 M ácido perclórico y homogeneice durante 2 min utilizando homogeneizador Ultraturax[®] o Polytron[®] (o equivalente). Traslade cuantitativamente a un vaso de precipitados de 40 mL y ajuste el pH a 8,0 aproximadamente utilizando 2 M KOH. Traslade cuantitativamente a un matraz aforado de 100 mL y rellénelo hasta la marca con agua destilada (asegurándose de que la capa de grasa queda “por encima” de la marca, y la capa acuosa queda a la altura de la marca). Guárdelo en hielo durante 20 min para precipitar perclorato de potasio y deje que se separe la grasa. Filtre y tire los primeros 3-5 mL y utilice la solución que ha filtrado para el ensayo. *Normalmente, no se requiere dilución y un volumen de muestra de 0,5 mL es adecuado.*

(e) Determinación del amoníaco en la carne y productos cárnicos.

Pese aproximadamente 5 g de material representativo en una botella Duran[®] de 100 mL. Añada 20 mL de 1 M ácido perclórico y homogenice durante 2 min utilizando homogeneizador Ultraturrax[®] o Polytron[®] (o equivalente). Traslade cuantitativamente a un vaso de precipitados de 40 mL y ajuste el pH a 8,0 aproximadamente utilizando 2 M KOH. Traslade cuantitativamente a un matraz aforado de 100 mL y rellénelo hasta la marca con agua destilada (asegurándose de que la capa de grasa queda “por encima” de la marca, y la capa acuosa queda a la altura de la marca). Guárdelo en hielo durante 20 min para precipitar perclorato de potasio y deje que se separe la grasa. Filtre y tire los primeros 3-5 mL y utilice la solución que ha filtrado para el ensayo. *Normalmente, no se requiere dilución y un volumen de muestra de 0,5 mL es adecuado.*

(f) Determinación del amoníaco en productos de regaliz.

Homogenice aproximadamente 3 g de muestra utilizando un mortero y pese exactamente 1 g. de material representativo en un matraz aforado de 100 mL. Añada 60 mL de agua destilada e incube a 70°C durante 10 min, o hasta que esté completamente disuelto. Deje que se equilibre a temperatura ambiente y rellene hasta la marca con agua destilada. Filtre, y utilice la solución que ha filtrado ligeramente coloreada para el ensayo. *Normalmente, no se requiere dilución y un volumen de muestra de 0,5 mL es adecuado.*

(g) Determinación del amoníaco en el agua (p.ej. agua de las piscinas).

La concentración de amoníaco en agua se puede determinar en general sin tratar la muestra. *Normalmente, no se requiere dilución y serán necesarios volúmenes de muestra de hasta 2.0 mL.*

REFERENCIAS:

1. Martin, O., Brandriss, M. C., Schneider, G. & Bakalinsky, A. T. (2003). Improved anaerobic use of arginine by *Saccharomyces cerevisiae*. *App. Env. Microbiol.* **69**, 1623-1628.
2. Bergmeyer, H. U. & Beutler, H. -O. (1990). Ammonia. In *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, H. U., ed.), 3^a ed., **Vol.VIII**, pp. 454-461, VCH Publishers (UK) Ltd., Cambridge, UK.

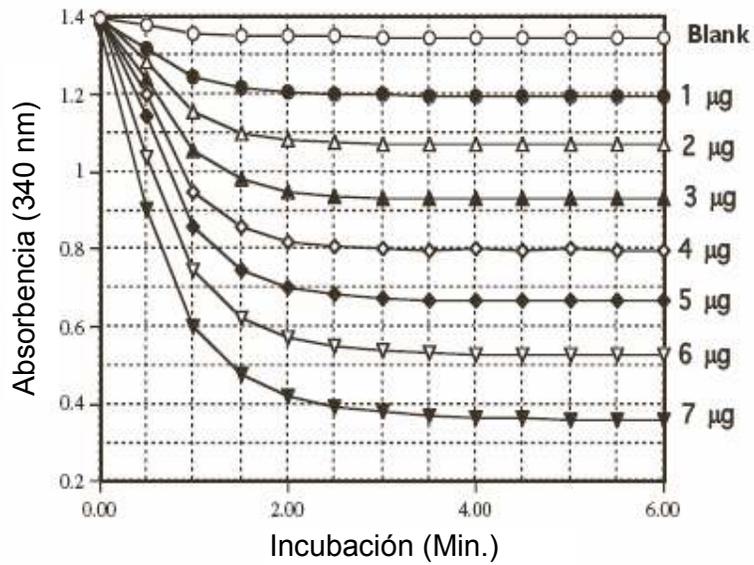


Figura 2: Disminución de la absorción en 340 nm con incubación de 1-7 µg amoníaco con glutamato deshidrogenasa en presencia de NADPH.

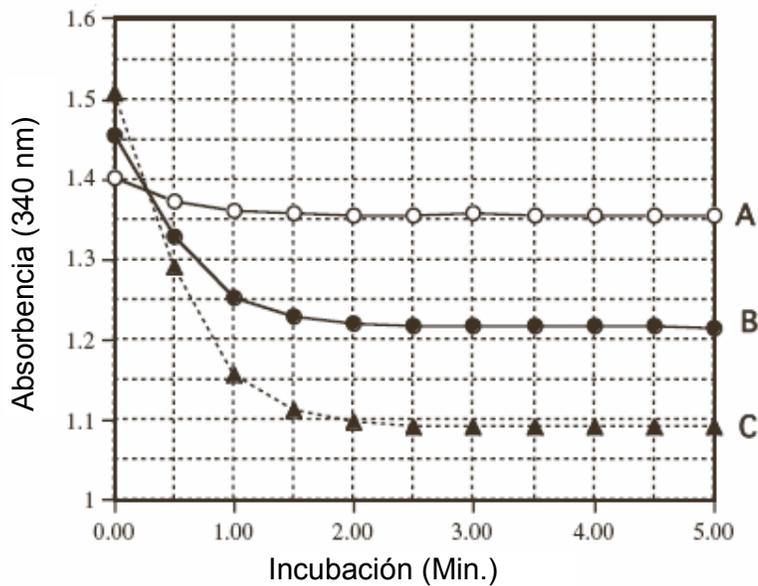


Figura 3: Disminución de la absorción en 340 nm con incubación de mosto tinto sin tratar con glutamato deshidrogenasa en presencia de NADPH. A. Vacío; B. 0,025 mL de muestra de mosto tinto; C. 0,05 mL de muestra de mosto tinto.

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.