

Megazyme

ETANOL

PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

K-ETOH 11/05

(60 Ensayos por Kit)

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

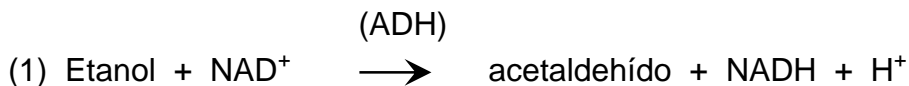


INTRODUCCIÓN:

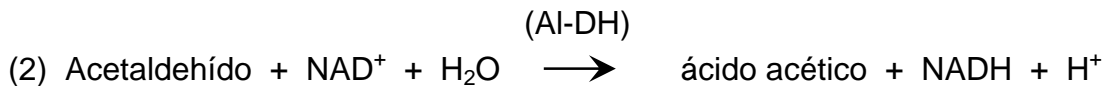
El etanol es un componente químico natural que se encuentra en casi todos los productos y por tanto su determinación cuantitativa no solo es importante en la producción de vinos, cervezas y bebidas alcohólicas, sino también en las bebidas sin alcohol o con un contenido bajo en alcohol, zumos de fruta, y otros alimentos, incluidos chocolates, caramelos, mermelada, miel, vinagre y productos lácteos. También hay una gran cantidad de productos no alimentarios que contienen cantidades significativas de etanol, como es el caso de los productos cosméticos y farmacéuticos.

PRINCIPIO:

La cuantificación del etanol requiere dos reacciones enzimáticas; la primera reacción está catalizada por alcohol deshidrogenasa (ADH), en la que el etanol se oxida en acetaldehído por dinucleótido nicotinamida-adenina (NAD^+) (1).



Sin embargo, dado que el equilibrio de la reacción (1) se produce a favor del etanol y NAD^+ , se requiere otra reacción para "atrapar" los productos. Esto se consigue por oxidación cuantitativa del acetaldehído en ácido acético en presencia de aldehído deshidrogenasa (AI-DH) y NAD^+ (2).



La cantidad de NADH que se forma en esta reacción es estequiométrica con dos veces la cantidad de etanol. Lo que se mide es el NADH por el incremento en la absorción a 340 nm.

ESPECIFICIDAD, SENSIBILIDAD, LINEALIDAD Y PRECISIÓN:

Para añadir los reagentes durante el ensayo elimine cualquier posible interferencia de los aldehidos y ketonas. El metanol no se convierte debido a los valores desfavorables K_m de los enzimas utilizados. El ensayo está optimizado para el etanol, sin embargo también se consigue la conversión cuantitativa de *n*-propanol y *n*-butanol. Los alcoholes altamente primarios reaccionan a una velocidad significativamente reducida, y cuando están presentes, pueden dar lugar a una reacción de fluencia lenta dependiente de la muestra.

El diferencial de absorción menor del ensayo es de 0,005 unidades. Esto corresponde a 0,023 mg/L de solución de muestra a un volumen máximo de muestra

de 2,0 mL. El límite de detección es de 0,093 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 0,25 a 12 µg de etanol 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 etanol de aproximadamente entre 0,023 y 0,046 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:

Los alcoholes presentes en el agua destilada y los tampones utilizados para el ensayo, o en el aire, pueden dar como resultado mayores muestras sin tratar o reacciones de fluencia lenta, respectivamente. Por eso es necesario tapar las cubetas durante el ensayo.

Si la conversión de etanol se ha completado en el tiempo especificado en el ensayo (aprox. 5 min), en general se puede concluir que no se ha producido ninguna interferencia. Sin embargo, se puede hacer otra comprobación añadiendo etanol (aprox. 5 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 ese estándar. Las pérdidas por la manipulación y extracción de la muestra se pueden identificar realizando experimentos de recuperación, es decir, añadiendo etanol a la muestra en las fases iniciales de la extracción.

SEGURIDAD:

En general, los reagentes utilizados en la determinación del etanol 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 de pirofosfato de potasio (25 mL, 1.5 M, pH 9,0) más azida de sodio 0,02 % (w/v) como conservante.
Estable durante > 2 años a 4°C.
- Botella 2:** NAD⁺ (155 mg).
Estable durante > 5 años a -20°C.
- Botella 3:** Suspensión aldehído deshidrogenasa (1,3 mL, 15 U/mL).
Estable durante > 2 años a -20°C.
- Botella 4:** Suspensión de alcohol deshidrogenasa (1,3 mL, 167 U/mL).
Estable durante > 2 años a 4°C.
- Botella 5:** Solución de etanol estándar (5 mL, 5 mg/mL).
Estable en un contenedor bien sellado (según se entrega) durante > 2 años a 4°C.

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. Diluya el contenido de la botella 2 en 12,4 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 fresco mientras se está usando, si es posible. 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 (ADH) o -20°C (AI-DH)
5. Diluya 0,5 mL del contenido de la botella 5 en 50 mL con agua destilada. Guárdelo en una botella Duran[®] cerrada. Cuando se diluye, esta solución es estable durante 2 días a 4°C.

NOTA: La solución de etanol estándar solo se utiliza en el ensayo cuando se tienen dudas sobre la precisión del espectrofotómetro que se está utilizando o cuando se sospecha que la inhibición es causada por las sustancias de la muestra. La concentración de etanol se determina directamente a partir del coeficiente de extinción de NADH (página 6).

EQUIPO (RECOMENDADO):

1. Matraces aforados (100 mL y 50 mL).
2. Cubetas de plástico desechables (paso de luz de 1 cm, 3 mL).
3. Micropipetas, p. ej. Gilson Pipetman[®] (20 μ L y 100 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 pirofosfato y solución NAD⁺).
 - 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. Papel filtro Whatman No. 1 (9 cm).

PROCEDIMIENTO:

- Longitud de onda:** 340 nm
Cubeta: paso de luz de 1 cm (vidrio o plástico con tapa)
Temperatura: ~ 20-25°C
Volumen final: 2,54 mL
Solución de muestra: 0,25-12 µg de etanol por cubeta
(en 0,10-2,00 mL de volumen de muestra)

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

Pipeta en cubetas	Muestras sin tratar	Muestra
agua destilada (~ 25°C)	2,10 mL	2,00 mL
muestra	-	0,10 mL
solución muestra 1 (tampón pirofosfato)	0,20 mL	0,20 mL
solución 2 (NAD ⁺)	0,20 mL	0,20 mL
suspensión 3 (aldehído deshidrogenasa)	0,02 mL	0,02 mL
Mezcla*, lea la absorción de las soluciones (A ₁) transcurridos aprox. 2 min e inicie las reacciones añadiendo:		
suspensión 4 (alcohol deshidrogenasa)	0,02 mL	0,02 mL
Mezcla*, lea la absorción de las soluciones (A ₂) al final de la reacción (aproximadamente 5 minutos).		

* por ejemplo con una espátula de plástico o dando la vuelta suavemente a la cubeta después de haberla tapado con una tapa o Parafilm[®].

CÁLCULO:

Determine el diferencial de absorción (A₂-A₁) de la muestra sin tratar y la muestra. Reste la diferencia de absorción de la muestra sin tratar de la diferencia de absorción de la muestra, obteniendo con ello el ΔA_{etanol}. El valor de ΔA_{etanol} por regla general debería ser al menos de 0,100 unidades de absorción para conseguir resultados suficientemente precisos.

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

$$c = \frac{V \times MW}{\varepsilon \times d \times v \times 2} \times \Delta A_{\text{etanol}} \quad [\text{g/L}]$$

Donde:

V = volumen final [mL]

MW = Peso molecular del etanol [g/mol]

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

d = paso de luz [cm]

v = volumen de muestra [mL]

2 = 2 moles de NADH producidas por cada mol de etanol

Sigue para el etanol:

$$c = \frac{2,54 \times 46,07}{6300 \times 1,0 \times 0,10 \times 2} \times \Delta A_{\text{etanol}} \quad [\text{g/L}]$$

$$= 0,09287 \times \Delta A_{\text{etanol}} \quad [\text{g/L}]$$

Sigue para el etanol en (v/v):

$$c = \frac{2,54 \times 46,07}{6300 \times 1,0 \times 0,10 \times 2} \times 0,1266 \times \Delta A_{\text{etanol}} \quad [\% \text{ (v/v)}]$$

$$= 0,01176 \times \Delta A_{\text{etanol}} \quad [\% \text{ (v/v)}]$$

Donde:

0,1266 = factor para convertir el g/L a % (v/v), tomando la densidad del etanol puro para ser 0.79 g/mL.

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

Cuando se analizan muestras sólidas y semisólidas que se pesan para la preparación de la muestra, el contenido (g/100 g) se calcula a partir de la cantidad pesada de la siguiente forma:

Contenido de etanol

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

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).

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA:

1. Dilución de la muestra.

La cantidad de etanol presente en la cubeta (es decir, en los 0,1 mL de la muestra que se está analizando) debe estar entre 0,25 y 12 µg. La solución de muestra debe por tanto diluirse lo suficiente para que resulte en una concentración entre 0,01 y 0,12 g/L.

Tabla de dilución

Concentración estimada de etanol (g/L)	Dilución con agua	Factor de dilución (F)
< 0,12	No se requiere dilución	1
0,12-1,20	1 + 9	10
1,20-12,0	1 + 99	100
12,0-120	1 + 999	1000
> 120	1 + 9999	10000

Si el valor del ΔA_{etanol} es muy bajo (p.ej. < 0,100), pese un poco más de muestra o dilúyala con menos fuerza. Como alternativa, el volumen de la muestra que se echa desde la pipeta a la cubierta se puede aumentar hasta 2,0 mL, asegurándose de que la suma de la muestra y el agua destilada en la reacción alcance los 2,10 mL y utilizando el nuevo volumen de muestra en la ecuación.

2. Manipulación de la muestra.

Como el etanol es volátil, todas las operaciones deberían realizarse en lo posible en botellas de vidrio Duran® selladas.

También es necesario tener mucho cuidado cuando se filtren, diluyan o echen en pipetas las soluciones. Las tiras de plástico de las pipetas se deben aclarar 3 veces con la solución antes de tomar la parte alícuota. Las cubetas y las tiras de plástico se deben aclarar 3 veces con agua destilada sin etanol y secarlas antes de utilizarlas.

Asegúrese de que las botellas con reagentes (sobre todo las que tienen agua destilada) queden selladas después de utilizarlas, para reducir al mínimo la absorción del alcohol del aire. Cuando prepare los ensayos, no utilice la pipeta que utilizó en la parte alícuota de etanol estándar y otro concentrado de solución de etanol.

3. Clarificación de la muestra.

a. Soluciones:

Solución Carrez I. 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.

4. 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 fruta), el pH de la solución se debe aumentar a 9,0 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 significativa de dióxido de carbono, como la cerveza, se deben desgasificar aumentando el pH a aproximadamente 9,0 con 2 M NaOH, agitando suavemente.

(d) Muestras coloreadas: puede que sea necesario realizar una muestra adicional sin tratar, es decir, una muestra sin ADH, 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 PVPP por cada 10 mL de muestra. Agite durante 5 minutos y a continuación filtre con 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. Otra alternativa es clarificar con reagentes Carrez.

(h) Muestras que contengan proteína: desproteíne las muestras que contengan proteína con ácido perclórico; también se puede clarificar con reagentes Carrez.

EJEMPLOS PARA PREPARAR LAS MUESTRAS:

(a) Determinación del etanol en el vino.

La concentración de etanol en el vino tinto y blanco en general se puede determinar sin tratar la muestra (salvo mediante dilución, según la tabla de dilución).

Normalmente, los vinos con 10-15 % (v/v) de etanol, una dilución de 1:1,000 y volumen de muestra de 0,1 mL es adecuado.

(b) Determinación del etanol en la cerveza, sidra y zumos de fruta con alcohol.

Después de eliminar el dióxido de carbono aumentando el pH de la solución a un valor aproximado de 9,0 con 2 M NaOH y agitando suavemente, diluya y analice la muestra según la tabla de dilución. *Normalmente, las bebidas con 3-8 % (v/v) de etanol, una dilución de 1:500 y volumen de muestra de 0,1 mL es adecuado.*

(c) Determinación del etanol en cervezas sin alcohol y con bajo contenido de alcohol y otras bebidas.

Después de eliminar el dióxido de carbono aumentando el pH de la solución a un valor aproximado de 9,0 con 2 M NaOH y agitando suavemente, diluya y analice la muestra según la tabla de dilución. *Normalmente una dilución de 1:50 y un volumen de muestra de 0,1 mL es adecuado.*

(d) Determinación del etanol en bebidas alcohólicas (whisky, brandy, etc).

La concentración de etanol en las bebidas alcohólicas en general se puede determinar sin tratar la muestra (salvo mediante dilución, según la tabla de dilución). Sin embargo, será necesario realizar los dos pasos necesarios de dilución.

Normalmente, las bebidas con 30-60 % (v/v) de etanol, una dilución de 1:10000 y volumen de muestra de 0,1 mL es adecuado.

(e) Determinación del etanol en el zumo de fruta, concentrados y bebidas similares.

La concentración de etanol en soluciones claras y neutras en general se puede determinar sin tratar la muestra (salvo mediante dilución, según la tabla de dilución). Cuando se utilice sin diluir, el pH de las soluciones ácidas se debe aumentar a un valor de 9,0 aproximado con 2 M NaOH. Los líquidos turbios en general solo hay que filtrarlos antes de la fase de dilución. Las soluciones coloreadas en general se pueden utilizar para el análisis después de diluirlas en una concentración adecuada de etanol. Sin embargo, si las soluciones coloreadas requieren un análisis sin diluir, se pueden decolorar de la siguiente forma: trate la solución con polivinilpolipirrolidona (PVPP) o carbón activado a 2 g/100 mL y fíltrelo en papel Whatman No. 1.

Normalmente, no se requiere dilución y serán necesarios volúmenes de muestra de hasta 0,5 mL.

(f) Determinación del etanol en alimentos sólidos (como en chocolates rellenos de licor).

Homogeneice los alimentos sólidos (~ 10 g) utilizando un mortero u homogeneizador si fuera necesario. Añada 2 g de material representativo a 50 mL de agua sin etanol y remueva durante 30 min en una botella Duran[®] sellada (caliente a 60°C si fuera necesario). Enfríe el extracto (si fuera necesario) y trasládalo cuantitativamente a un matraz de 100 mL. Diluya hasta la marca con agua sin etanol. Filtre la solución turbia, diluya si fuera necesario (según la tabla de dilución) u analice. *Normalmente una dilución de 1:10 y un volumen de muestra de 0,1 mL es adecuado.*

(g) Determinación del etanol en el vinagre.

En general, para analizar el vinagre solo hay que filtrar y diluir antes del ensayo. Sin embargo, el pH de las muestras que se tienen que analizar sin diluir se debe aumentar a un valor aproximado de 9,0 utilizando 2 M NaOH antes de filtrar.

Normalmente una dilución de 1:20 y un volumen de muestra de 0,1 mL es adecuado.

(h) Determinación del etanol en la mermelada.

Pese con precisión aproximadamente 5 g de material representativo en una botella Duran[®] de 100 mL y extraiga con 50 mL de agua sin etanol, agitando durante 30 min a 60°C (con la botella sellada). Enfríe el extracto, y si está ácido, ajuste el pH a 9,0 utilizando 2 M NaOH. Traspase cuantitativamente la solución a un matraz de 100 mL y llénelo hasta la marca con agua sin etanol. Filtre la solución turbia, diluya si fuera necesario según la tabla de dilución. *Normalmente, no se requiere dilución y serán necesarios volúmenes de muestra de hasta 0,5 mL.*

(i) Determinación del etanol en la miel.

Pese con precisión 10 g aproximados de material representativo y échelos en un matraz de 100 mL con 40 mL de agua sin etanol, tapando el matraz inmediatamente. Disuelva la miel removiendo suavemente a 60°C durante 10 min. Después de

enfriare, llene el matraz hasta la marca con agua sin etanol. Filtre la solución turbia, diluya si fuera necesario según la tabla de dilución. *Normalmente, no se requiere dilución y serán necesarios volúmenes de muestra de hasta 0,5 mL.*

(j) Determinación del etanol en los productos lácteos.

Pese con precisión aproximadamente 10 g de material representativo en una botella Duran[®] de 100 mL y extraiga con 50 mL de agua sin etanol, agitando durante 30 min a 60°C (con la botella sellada). Enfríe el extracto y traspase cuantitativamente la solución a un matraz de 100 mL y llénelo hasta la marca con agua sin etanol. Filtre la solución turbia, diluya si fuera necesario según la tabla de dilución.

Normalmente, no se requiere dilución y serán necesarios volúmenes de muestra de hasta 0,5 mL.

REFERENCE:

1. Beutler, H. -O. (1988). Ethanol. In *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, H. U., ed.), 3rd ed., **Vol.VI**, pp. 598-606, VCH Publishers (UK) Ltd., Cambridge, UK.

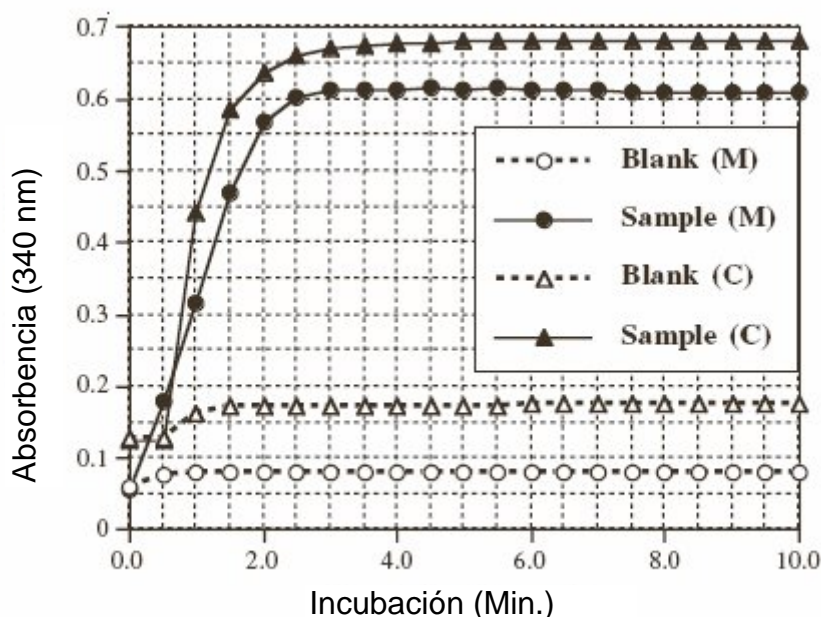


Figura 1. Disminución de la absorción en 340 nm con incubación de 5 µg de etanol con alcohol deshidrogenasa en presencia de NAD⁺. (M), Ket de Megazyme; (C) kit de la competencia.

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.