



30

386933

Sección
Clasificación
Clase	BOL
Subclase	N

MEMORIA DESCRIPTIVA
 de una Patente de Invención a nombre de:
 BOEHRINGER MANNHEIM GmbH, de nacionalidad
 alemana, domiciliada en Mannheim-Waldhof
 (Alemania); por: "PROCEDIMIENTO PARA LA
 DETERMINACION ENTERAMENTE ENZIMATICA Y
 CUANTITATIVA DE TRIGLICERIDOS".

-----ooo000ooo-----

El presente invento concierne a un procedimiento para la determinación enteramente enzimática y cuantitativa de triglicéridos, que están presentes como lipoproteidos en líquidos corporales.

5 Tanto en la investigación de la arterioesclerosis como también en investigaciones rutinarias clínicas y farmacológicas, la determinación cuantitativa de los triglicéridos, especialmente de los que están combinados con lipoproteínas, desempeña un papel cada vez más importantes.

10 Los procedimientos conocidos desde hace mucho tiempo

- 2 - 386933



5 tienen en cuanto a la técnica de trabajo diferentes desventajas y además de ello poseen frecuentemente sólo una pequeña especificidad y una limitada exactitud de análisis. Por lo tanto, la determinación enzimática de los triglicéridos se ha impuesto en los últimos tiempos de modo enteramente general a causa de su pronunciada especificidad y por su precisión de resultados; véase Klih. Wochenschr. 40, página 362 (1962) y Klin. Chemie 6, páginas 156-159 (1968).

10 En los procedimientos hasta ahora habituales, las grasas son desdobladas en primer lugar con una base fuerte, por ejemplo con lejía de potasa alcohólica, en las sales de los ácidos grasos y en glicerinas, después de lo cual en la glicerina contenida en el líquido, después de separación de las porciones de ácidos grasos (por ejemplo por precipitación y subsiguiente centrifugación), es transformada de manera conocida enzimáticamente en el piruvato. La cantidad de piruvato equivalente al contenido de glicerina original es transformada finalmente por NADH (nombre reducido del nicotinamido-adeninoducleótido o difosfopiridin-nucleótido), mediante lactatodes-
15 hidrogenasa, en ácido láctico, representando la disminución del NADH, susceptible de ser medida fotométricamente, una medida directa del contenido de glicerina.
20

25 La saponificación de las grasas, a pesar de los progresos en la metodología, por lo demás esenciales, sigue constituyendo todavía un proceso de trabajo largo y costoso, dado que esta sólo se puede alcanzar cuantitativamente por acción durante media hora de lejía de potasa etanólica en ca-



liente; además de ello, es necesario precipitar las sales de potasio de ácidos grasos resultantes en una etapa adicional, mediante sulfato de magnesio, en forma de sales de magnesio, y eliminar el precipitado resultante por ejemplo por centrifugación. Los intentos, de realizar también la primera etapa del desdoblamiento de grasas enzimáticamente, fracasaron hasta ahora esencialmente por tres razones:

1. En efecto, los triglicéridos combinados con lipoproteínas pueden ser desdoblados por lipoproteido-lipasas. No obstante, estas sólo se pueden obtener a partir de tejidos humanos o animales, son poco estables y poseen un contenido de proteínas tan elevado que se perturba la determinación fotométrica de NADH. Además de ello, el desdoblamiento tiene lugar de modo incompleto incluso después de largos tiempos de incubación.

2. Las grasas neutras emulsionadas son desdobladas por lipasas, que proceden del páncreas, de modo escalonado, pasando por los di-glicéridos y mono-glicéridos, en ácidos grasos libres y glicerina, conduciendo el desdoblamiento parcialmente sólo a monoglicéridos. No obstante, el método de determinación de acuerdo con el invento sólo se puede llevar a cabo cuando el desdoblamiento tiene lugar cuantitativamente hasta la etapa de la glicerina libre.

Con cantidades muy grandes de enzimas y con largos tiempos de incubación, que pueden producir en algunos casos el desdoblamiento total no se puede llevar a cabo una determinación cuantitativa, por razones prácticas.



1970

3. Los triglicéridos simples exentos de proteínas son desdoblados por una serie de lipasas "extrañas al cuerpo", obtenidas a partir de plantas o de hongos. El desdoblamiento del lipoproteído, es decir grasas combinadas con proteínas
5 tiene lugar, cuando lo tiene, sólo de modo incompleto o exige cantidades tan grandes de enzimas (más de 5 mg en aproximadamente 2 ml de solución, que ya no se puede llevar a cabo una determinación óptica a causa del enturbiamiento provocado por el reactivo.

10 Se ha encontrado ahora, sorprendentemente, que la lipasa descrita en Comptes Rendus Acad. Sc. Paris 259 (1964) páginas 4,394-4.396, obtenida a partir de Rhizopus arrhizus, es capaz de desdoblar triglicéridos combinados con lipoproteínas junto con los triglicéridos contenidos en quilomicrones,
15 con un índice de transformación extraordinariamente elevado, de modo cuantitativo en ácidos grasos libres y en glicerina, sin que se perjudique la subsiguiente determinación óptica de NADH en luz ultravioleta. Este resultado es tanto más sorprendente cuanto que hasta ahora no sera conocida de ninguna
20 lipasa "extraña al cuerpo" una suficiente actividad frente a triglicéridos combinados con lipoproteínas; naturalmente, tanto menos evidente resultaba el empleo para la determinación cuantitativa de tales sustancias.

25 De acuerdo con el invento es posible ahora llevar a cabo la determinación de grasas neutras exentas de proteínas y de triglicéridos combinados con proteínas sin previa saponificación de álcalis en caliente y el tratamiento de la



5 muestra de modo enteramente enzimático y sin menoscabo de la exactitud. Además de la evitación de los álcalis fuertemente caústicos, desagradables de manipular, el modo de realización de acuerdo con el invento significa sobre todo una considerable ganancia de tiempo.

10 La saponificación enzimática de grasas ofrece además la ventaja de poder disminuir considerablemente la cantidad necesaria de suero en comparación con los métodos habituales, a saber de 1/20 del volumen. Esto tiene importancia sobre todo en investigaciones en serie de pequeños animales de laboratorio, tales como por ejemplo ratones blancos y ratas. Finalmente, es posible ahora realizar la determinación también de triglicéridos combinados con proteínas por ejemplo en suero humano o en plasma capilar mediante combinaciones de ensayo previamente preparadas, que contienen las enzimas y sustancias auxiliares necesarias en las cantidades óptimas y eventualmente en solución tamponada y estabilizada, en corto tiempo y sin el gasto hasta ahora necesario.

20 Las combinaciones de ensayo previamente preparadas son mezclas preferiblemente con sustancias auxiliares estabilizadoras, con el fin de hacer posible un almacenamiento más largo de las mezclas de enzimas sensibles y con el fin de proporcionar una forma comercial estable para el empleo en laboratorios o en la práctica médica.

25 Como especialmente ventajosa se ha mostrado una combinación de ensayo que en un determinado volumen de una solución acuosa tamponada contiene una cantidad previamente dosi-



1970

ficada de trifosfato de adenosina que está estabilizada por una adición de trishidroximetil-aminometano o de álcali-azidas y, separadamente de esto, una mezcla en polvo, preferiblemente en forma de tabletas, que contiene NADH y fosfoenolpiruvato de sodio en cantidades previamente dosificadas. Dado que las mezclas en polvo o tabletas no son estables en la forma descrita, se añaden en calidad de estabilizadores un aminoácido neutro, tal como por ejemplo glicina, y ventajosamente una sal alcalina de un ácido fuerte, por ejemplo cloruro de potasio.

Para la realización de la reacción de ensayo, la mezcla en polvo o la tabletas es añadida a la solución arriba descrita de adenosin-trifosfato. Después de mezclar con la muestra que contiene tri-, di- o mono-glicéridos, se inicia entonces la reacción previa con una mezcla de enzimas, que contiene lactatodeshidrogenasa, piruvatoquinasa y gliceroquinasa. Después de haber transcurrido la reacción previa, se lee el primer valor de extinción y se pone en marcha la reacción principal de acuerdo con el invento con Rhizopus arrhizus-lipasa. La diferencia entre el primer valor de extinción y el segundo valor de extinción que se puede leer después de aproximadamente 5 minutos es directamente proporcional a la glicerina liberada. Dado que en este procedimiento es necesaria una única etapa de utilización de pipeta - es decir la adición de la muestra - la combinación de ensayo de acuerdo con el invento hace posible una simplificación adicional y una elevación de la precisión de la determinación cuantitativa de mono-, di o tri-glicéridos.



5 La lipasa de *Rhizopus arrhizus* (Var. Delemar) muy purificada, utilizada de acuerdo con el invento, tiene frente al aceite de oliva en los óptimos de pH de 3,5 y 7,0, actividades entre 3.500-8000 U/mg. La pureza de la *Rhizopus*-lipasa fue determinada electroforéticamente.

10 El procedimiento de acuerdo con el invento para la determinación enteramente enzimática y cuantitativa de triglicéridos, que están presentes combinados con lipoproteínas, y/o de grasas neutras libres de proteínas en soluciones, especialmente líquidos corporales, está caracterizado porque se desdoblan los lipoproteidos y grasas naturales mediante una lipasa obtenida a partir de *Rhizopus arrhizus*, y porque se determina enzimáticamente de manera de por sí conocida la glicerina obtenida como producto de desdoblamiento.

15 EJEMPLO 1.

10 μ l de suero humano son mezclados sucesivamente con los siguientes reactivos:

- 20 1,5 ml de tampón de trietanolamina (0,1 molar) ajustado a pH 7,6, que contiene NADH (0,12 milimoles) y sulfato de magnesio (0,74 milimoles)
- 0,1 ml de fosfoenolpiruvato de sodio (4,8 milimoles) y adenosin-trifosfato (1,3 milimoles) disueltos en tampón de trietanolamina (0,1 molar) ajustado a pH 7,6
- 25 0,02 ml de lipasa de *Rhizopus arrhizus* (4 mg/ml) (3500 unidades/mg = 14.000 unidades/ml).
- 0,005 ml de lactatodeshidrogenasa (900 unidades/ml)/piruvatoquinasa (150 unidades/ml).

386933



La solución así preparada es añadida después de 5 minutos a una cubeta y se determina la extinción (E_1) a 366 nm. Por la adición de 0,005 ml de gliceroquinasa (85 unidades/ml) se pone en marcha la reacción con enzimas, la cual a fin de cuentas, pasando por el piruvato con disminución de NADH, conduce al NAD. Después de 10 minutos más se lee el segundo valor de extinción (E_2). A partir de la diferencia de extinciones $\Delta E = E_1 - E_2$ resulta el contenido de triglicéridos según la siguiente fórmula:

$$\Delta E \times 4224 = \text{mg \% de triglicéridos.}$$

EJEMPLO 2

De acuerdo con el procedimiento indicado en el ejemplo 1 se llevaron a cabo 37 determinaciones individuales de suero humano en un caso de acuerdo con el método convencional (saponificación de las grasas con lejía de potasa alcohólica) y después de acuerdo con el invento con la enzima obtenida a partir de *Rhizopus arrhizus*.

A partir de los resultados resultó un coeficiente de correlación de

$$r = 0,998$$

Los resultados individuales están reproducidos en la Tabla I.



T A B L A I

Contenido de triglicéridos de muestras de suero humano en mg%.

	A. Después de saponificación con lejía de potasa alcohólica.	B. Después de desdoblamiento de grasas con lípasa a partir de <i>Rhizopus arrhizus</i> .
5	417	416
	160	145
10	445	430
	472	460
	135	110
	608	621
	1798	1925
15	1843	1710
	108	105
	124	133
	350	305
	492	445
20	1063	1020
	126	149
	160	154
	400	372
	129	132
25	72	74
	268	250
	72	74
	177	167
	375	355
30	167	149
	65	57
	154	145
	189	189
	232	215
35	63	65
	165	159
	110	116
	365	362
	214	198
40	462	456
	90	89
	438	410
	194	188
	70	72



EJEMPLO 3

2,5 ml de solución tampón acuosa que contiene:

65 mg de clorhidrato de trietanolamina

25 mg de tris-hidroximetil-aminometano

5 1,25 mg de adenosintrifosfato-disódico

1,25 mg de sulfato de magnesio ($MgSO_4 \times 7H_2O$)

son mezclados con una tabletas que contiene:

4,5 mg de NADH

6,0 mg de fosfoenol-piruvato de sodio

10 58,8 mg de glicina

14,8 mg de cloruro de potasio y

4,4 mg de polímera (Poliwachs 6000)(DAB 7)

Después de disolver la tableta, la solución de trabajo así preparada es vertida en una cubeta y es mezclada con:

15 20 μl de suero así como con aproximadamente

30 μl de mezcla de enzimas, consistente en lactatodeshidrogenasa, piruvatoquinasa y gliceroquinasa.

Después de haber transcurrido la reacción previa, se determina la extinción, la mezcla es mezclada con 20 μl de lipasa de *Rhizopus arrhizus* y se calcula el contenido de triglicéridos, tal como se describe en el Ejemplo 1, a partir del segundo valor de extinción.

20



-----N O T A-----

Se reivindica como nuevo y de propia invención:

5 1.- Procedimiento para la determinación enteramente
enzimática y cuantitativa de triglicéridos, que están presen-
tes combinados con lipoproteínas y/o con grasas neutras exen-
tas de proteínas en soluciones, especialmente en líquidos cor-
porales, caracterizado porque se desdoblán los lipoproteidos
y las grasas neutras exentas de proteínas mediante una lipasa
obtenida a partir de *Rhizopus arrhizus* y se determina enzimá-
10 ticamente de manera de por sí conocida la glicerina obtenida
como producto de desdoblamiento.

2.- PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACION ENTERAMENTE
ENZIMATICA Y CUANTITATIVA DE TRIGLICERIDOS.

15 Tal como se describe y reivindica en la presente
Memoria Descriptiva, que consta de once hojas escritas a má-
quina por una sola cara.

Madrid, 30 DIC. 1970

CARLOS FERRAZ CANDELAS
P.P.