

387511

21 E



SECCION TECNICA
CLASIFICACION I. P. C.
CLASE <u>G 01</u>
SUBCLASE <u>N</u>

387511

PATENTE DE INVENCION

Que por veinte años se solicita a favor de BAXTER LABORATORIES INC. de nacionalidad estadounidense, con domicilio en MORTON GROVE, ILLINOIS (Estados Unidos), y que ha de recaer sobre: " METODO PARA LA DETERMINACION DE TRIGLICERIDOS EN UN FLUIDO BIOLOGICO ".

=====

5

Memoria Descriptiva

El registro de la Patente de Invención que se solicita tiene por objeto garantizar la explotación exclusiva en todo el territorio nacional y sus posesiones de un método para la determinación de triglicéridos en un fluido biológico, conforme se describe a continuación.

10



Extracto de la descripción

Un método colorimétrico para la determinación de triglicéridos en el suero mediante la fosforilación de glicerina liberada empleando ATP como el donante de fosfato inmediato y fosfoenolpiruvato en un sistema auxiliar para producir piruvato, en el cual el piruvato es hecho reaccionar con 2,4-dinitrofenilhidrazina para producir piruvato de 2,4-dinitrofenilhidrazona que es medido colorimétricamente a 440 mμ.

-----

Este invento se refiere a un método para la determinación de triglicéridos en suero sanguíneo y otros fluidos biológicos.

Los triglicéridos, o ésteres de glicerina de ácidos grasos, son importantes sustancias insolubles en agua que se encuentran en plantas y animales, y constituyen una porción principal de los lípidos en el cuerpo humano. Aunque las grasas y aceites dietéticos son los principales manantiales de lípidos en el cuerpo, los lípidos son sintetizados también en el cuerpo a partir de precursores no lipídicos. La importancia de estas grasas en la dieta puede ser atribuida, en parte, al hecho de que son los más concentrados de todos los materiales alimenticios, proporcionando aproximadamente 9 calorías de energía por gramo como manantiales de calor y energía. Las grasas favorecen también la utilización más eficaz de calorías suministradas por otros alimentos, proporcionan apetitividad acrecentada y pequeñas cantidades de aromatización o saborización a otros alimentos, y son vehículos para las vitaminas A, D, E y K solubles en grasas.

Las grasas digeridas son absorbidas normalmente en la linfa a través del duodeno y del yeyuno. Aproximadamente 100 g de glicéridos exógenos son absorbidos por la mucosa intestinal diaria

387511

21E



mente y son transportados como quilomicrones a la corriente sanguínea. Juntamente con colesterol y fosfolípidos, los triglicéridos (grasas neutras) constituyen los lípidos principales que aparecen en la sangre.

5 El colesterol, los fosfolípidos y los triglicéridos son transportados en la sangre en forma de macromoléculas en combinación con globulinas de plasma como lipoproteínas, que incluyen también los ácidos grasos no esterificados combinados con la albúmina del plasma. Un aumento de cualesquiera de estos lípidos o de  
10 una combinación de ellos en el suero sanguíneo puede aumentar indeseablemente los lípidos totales (hiperlipemia), mientras que una disminución de los mismos puede disminuir indeseablemente los lípidos totales (hipolipemia). La determinación de los triglicéridos en el suero es necesaria para la diagnosis diferencial de las hiperlipemias idiopáticas. Los triglicéridos aumentan también usualmente en afecciones de almacenamiento de glicógeno, hipercolesterolemia y hiperfosfolipidemia. Consiguientemente, sería de gran valor en el campo de la diagnosis clínica un método rápido y conveniente para la determinación de los triglicéridos en el suero.

20 Haciendo historia, los triglicéridos del suero han sido determinados generalmente por diversos macrométodos y micrométodos tal como se describe por Bloor, "Biochemistry of the Fatty Acids", ACS Monograph N° 93, Reinhold Publishing Company, Nueva York, y Chapman & Hall, Ltd., Londres, en las páginas 37-49 (1943). Estos  
25 procedimientos hacen uso del fenómeno conocido de que los triglicéridos son fácilmente solubles en los llamados disolventes de grasas, por ejemplo éteres, éter de petróleo, cloroformo, bisulfuro de carbono y tetracloruro de carbono, pero sólo son escasamente solubles en alcohol. De acuerdo con estos procedimientos, los triglicéridos son extraídos de la sangre con éter. Debido a la presencia  
30 de un elevado porcentaje de proteínas, es necesario generalmen

387511

21 ENE 1969



te efectuar tras de la extracción original con éter, una extracción con alcohol seguida por una segunda extracción con éter. Después de las extracciones, el disolvente es separado por evaporación a baja temperatura, dejando como residuo la muestra de triglicéridos para examen y recuento.

5

Más recientemente, las concentraciones de glicerina en la sangre han sido utilizadas como un índice de casos lipóticos en el cuerpo, y se han desarrollado diversos métodos para determinar estas concentraciones de glicerina mediante cromatografía, colorimetría, enzimáticamente y/o fluorimétricamente. En estos procedimientos, los triglicéridos son primero saponificados y luego se determina la glicerina liberada. En un procedimiento típico desarrollado por Wieland, Biochem. Z. 329, página 313 (1957), la glicerina es convertida enzimáticamente por gliceroquinasa en alfa-glicerofosfato el cual, con alfa-glicerofosfato deshidrogenasa y difosfopiridina nucleótico (DPN) proporciona DPN reducido (DPNH) el cual es medido luego espectrofotométricamente a 340  $\mu$ . Una modificación de este procedimiento descrita por Eggstein, Klin. Wschr. 44, páginas 262 y 267 (1966) emplea adenosin-5' trifosfato (ATP), DPNH, fosfoenolpiruvato (PEP), gliceroquinasa (GK) y láctico-deshidrogenasa (LDH) en el sistema, en el que la disminución del contenido de DPNH es medida de modo similar espectrofotométricamente. En este sistema, el PEP actúa como donante de fosfato en la reacción de fosforilación por medio de su fosfato de elevada energía. El donante inmediato de fosfato es ATP que es regenerado de modo continuo por medio de PEP y PK.

10

15

20

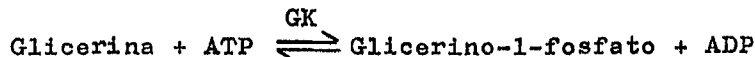
25

Lo que sigue es un resumen de este sistema de reacción triple tal como se describe por Richterich, "Clinical Chemistry", Academic Press, Nueva York y Londres, en las páginas 274-8 (1969).

387511



1. Sistema reactivo

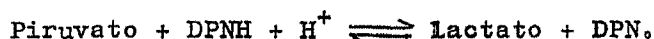


2. Sistema auxiliar



5

3. Sistema indicador



10

El presente invento tiene como bojeta prãncipal proporcionar una mejora en la determinaci3n enzimãtica antedicha de triglicãcidos en el suero, segun la cual la determinaci3n se conduce de una manera rãpida y conveniente tal como se indica a continuaci3n.

Otro bojeta de este invento consiste en proporcionar un ensayo enzimãtico mejorado para triglicãcidos en el cual la determinaci3n se puede efectuar colorimãtricamente.

15

Otros bojetos y ventajas del invento resultaran evidentes para los tãcnicos en la materia.

20

De acuerdo con el presente invento el sistema indicador del sistema de reacci3n enzimãtica de la tãcnica anterior antes descrita ha sido cambiado completamente de modo que la determinaci3n se puede efectuar colorimãtricamente a aproximadamente 440 m $\mu$ . El sistema indicador de la tãcnica anterior no proporciona ninguna reacci3n de color sino s3lamente absorbencia a 340 m $\mu$ . Una ventaja principal del presente invento, por lo tanto, es su adaptabilidad a una instrumentaci3n colorimãtrica que es mãs fãcilmente disponible en muchos laboratorios que no tienen acceso al equipo espectrofotomãtrico mãs costoso.

25

30

Dicho en forma breve, el mãtodo del presente invento comprende saponificar suero u otros flũdos biol3gicos y hacer reaccionar la glicerina liberada con ATP en la presencia de gliceroquinasa, hacer reaccionar el ADP resultante con PEP en la presencia de piruvatoquinasa, y despuẽs hacer reaccionar el piruvato resultante con 2,4-dinitrofenilhidrazina y medir el piruvato de 2,4-dini

387511 21



trofenilhidrazona resultante colorimétricamente a aproximadamente 440 mμ.

5 En el presente invento se emplea 2,4-dinitrofenilhidrazina en el sistema indicador en lugar de DPNH, el radical  $=\text{NNHC}_6\text{H}_3(\text{NO}_2)_2$  reemplaza al átomo de oxígeno en el grupo carbonilo del piruvato para formar el color rojo parduzco del compuesto piruvato de 2,4-dinitrofenilhidrazona, cuya intensidad es medida colorimétricamente.

10 Los triglicéridos son determinados de acuerdo con el presente método por la relación según la cual la concentración de la glicerina liberada es directamente proporcional a la intensidad de color, y a su vez la cantidad de triglicéridos es directamente proporcional a la concentración de glicerina.

15 La saponificación inicial del suero o de otro fluido biológico se puede llevar a cabo haciendo reaccionar la muestra con un exceso de álcali para desdoblar el triglicérido presente en la muestra en glicerina libre y en una sal o jabón del metal alcalino. El hidróxido de potasio alcohólico es el agente de saponificación preferido para la reacción. Los iones  $\text{OH}^-$  en exceso son precipitados luego por adición de una sal metálica capaz de formar un hidróxido insoluble. La sal preferida es sulfato de magnesio, el cual formará hidróxido de magnesio insoluble por reacción con los iones  $\text{OH}^-$  en exceso en la mezcla de productos de reacción de saponificación.

25 Las soluciones de KOH aproximadamente 0,5 N en etanol y de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  aproximadamente 0,15 M son eminentemente apropiadas para el procedimiento de saponificación anterior para liberar la glicerina libre. La saponificación completa se puede llevar a cabo incubando, por ejemplo, aproximadamente 0,2 ml de una muestra de 30 suero con aproximadamente 0,5 ml de KOH alcohólica a aproximadamen

387511

21E



5 te 60-70°C durante alrededor de 30 minutos. Después de añadir aproximadamente 1 ml de la solución de sulfato de magnesio a la mezcla de reacción enfriada y de mezclar bien, la mezcla de reacción es centrifugada o filtrada y el producto sobrenadante transparente o filtrado es retenido como la muestra de glicerina liberada para la determinación de glicerina.

10 La muestra de glicerina es sometida luego a dos incubaciones, comprendiendo la primera incubación tanto el sistema reactivo como el sistema auxiliar, y comprendiendo adicionalmente la segunda incubación el sistema indicador o de color.

15 Por razones de conveniencia para llevar a cabo las reacciones de reactivos y del sistema auxiliar, se prefiere reconstituir una piruvatoquinasa secada con una solución tamponada de ATP y luego mezclarla con una solución separada de gliceroquinasa. La piruvatoquinasa secada contiene adicionalmente PEP. Después de adición de las dos soluciones a la muestra de glicerina, las reacciones deseadas transcurrirán con mucha rapidez con apenas ninguna reacción secundaria. Para obtener reacción completa se prefiere conducir la incubación durante aproximadamente 10 minutos a 37°C.

20 La reacción del sistema indicador se lleva a cabo después, añadiendo una solución de 2,4-dinitrofenilhidrazina a la muestra e incubando durante aproximadamente otros 10 minutos a 37°C.

25 Después de la segunda incubación, la muestra es alcalinizada, preferiblemente con NaOH aproximadamente 0,4 N, para precipitar  $Mg(OH)_2$ , que luego es centrifugado o filtrado desde la muestra. La densidad óptica del producto sobrenadante o filtrado es leída luego a 440 m $\mu$ .

30 Todos los componentes químicos requeridos en las reacciones antedichas están disponibles comercialmente y se apreciará que las reacciones del sistema reactivo y del sistema auxiliar se pue-

387511<sup>21</sup>



den llevar a cabo de acuerdo con la práctica anterior. Así, el ATP se encuentra fácilmente disponible a partir de los músculos del esqueleto de mamíferos. Es aislado usualmente en forma de la sal dibárica y para la utilización es convertido en la sal sódica o potásica. En solución acuosa, la sal sódica es tamponada preferiblemente a un pH de aproximadamente 7 a aproximadamente 9. Un tampón conveniente para utilizarse en la práctica es tris(hidroximetil)-aminometano, aunque otros tampones resultarán evidentes para los técnicos en la materia.

10 Las enzimas gliceroquinasa (GK) y piruvato quinasa (PK) utilizadas en estas reacciones deberán estar preferiblemente en la forma más pura que sea posible. En particular, la GK deberá estar libre de glicerina. Dado que la GK comercialmente disponible puede contener vestigios de glicerina, se deberá efectuar una determinación patrón. Por razones de conveniencia en la utilización en la determinación de triglicéridos de este invento, la GK es preparada en solución acuosa de sulfato de amonio. En la reacción del sistema reactivo, la fosforilación de la glicerina libre por ATP, catalizada por la GK, da como resultado exclusivamente la formación de L-alfa-glicerofosfato.

20 Se deberá hacer observar que el PK tiene una precisión absoluta de iones  $Mg^{2+}$  para tener actividad, y éstos pueden ser suministrados por adición de una cantidad pequeña pero eficaz de una sal apropiada, por ejemplo  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  al substrato de enzimas. La PK cataliza la reacción del sistema auxiliar, en que un fosfato es transferido desde fosfoenolpiruvato (PEP) a ADP para regenerar ATP y producir piruvato. El PEP utilizado en el sistema auxiliar se utiliza preferentemente en una forma de sal soluble en agua, tal como por ejemplo la sal de triciclohexilamonio. Otras formas de sales apropiadas resultarán evidentes para el técnico en la materia.

387511



5 Por razones de conveniencia en la práctica, el sistema auxiliar, la PK y el PEP, es preparado en forma de una mezcla liofilizada seca con una pequeña cantidad de un agente protector tal como, por ejemplo, goma arábica, dextrano y materiales similares. Una solución de goma arábica al 1% es eminentemente apropiada para este fin. El reactivo anhidro es reconstituido con facilidad con agua destilada antes del uso.

10 Se apreciará que la 2,4-dinitrofenilhidrazina es un reactivo conocido para utilizarse en la determinación de aldehidos y cetonas, pero que hasta ahora no ha sido utilizada, como ocurre en la aplicación de este invento, para la determinación enzimática y colorimétrica de triglicéridos. Este reactivo es preparado usualmente en solución ácida/alcohólica. Tal como se utiliza aquí, se prefiere utilizar 2,4-dinitrofenilhidrazina desde aproximadamente 15 0,01 molar hasta aproximadamente 0,001 molar en solución diluida de HCl.

20 El presente invento es ilustrado con más detalle mediante el siguiente ejemplo, en que todos los porcentajes y proporciones se expresan en peso, a menos que se indique lo contrario. Se sobreentenderá que el invento no está limitado a este ejemplo específico, y que cualesquiera otras proporciones de reactivos y reaccionantes, otras formas iónicas de sales o variaciones en el tiempo, en la temperatura y en las condiciones de pH que pudieran ser determinadas con facilidad como útiles por el técnico en la 25 materia, están incluidas dentro del alcance de este invento. En general, son apropiadas cantidades equivalentes molares de ATP y PEP con respecto a la glicerina libre en la muestra biológica, cantidades pequeñas pero catalíticamente eficaces de las enzimas GK y PK para los sistemas reactivo y auxiliar, y una cantidad pequeña pero colorimétricamente eficaz de la 2,4-dinitrofenilhidra- 30 zina. Las condiciones de tiempo de incubación y de temperatura



no son críticas y pueden variarse para facilitar el que se completen las reacciones. Las condiciones de pH que se utilizan preferiblemente son las que hacen óptimas las reacciones.

Ejemplo 1

5 Los reactivos son preparados del siguiente modo:

Substrato de triglicéridos

Se añaden 100 ml de goma acacia al 10% a 900 ml de agua destilada, y luego se añaden a esta solución:

- (a) 1,0 g de fosfoenolpiruvato (sal de triciclohexilamonio)
- 10 (b) 1,5 g de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , y
- (c) 10.000 U.I. de piruvatoquinasa, y se liofiliza inmediatamente.

Hidróxido de potasio alcohólico.

Se disuelven 33 g de KOH al 85% (calidad para reactivos, libre de glicerina) en 100 ml de agua destilada. Después de enfriar hasta la temperatura ambiente, se completa hasta 1 litro con etanol al 95%.

Solución de sulfato de magnesio.

Se disuelven 37 g de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (calidad para reactivos) en 1 litro de agua destilada y se filtra a través de un filtro "Millipore" utilizando una almohadilla de vidrio, membranas de 1,2  $\mu$ , 0,45  $\mu$  y 0,22  $\mu$ .

Solución tamponada de ATP

Se disuelven 18,2 g de tris(hidroximetil)aminometano en 950 ml de agua destilada, se ajusta el pH a 9,0. Se disuelven 3,6 g de sal sódica de adenosín-5'-trifosfato en esta solución tampón y se completa hasta 1 litro con agua destilada.

Gliceroquinasa

Se diluye gliceroquinasa concentrada comercialmente disponible hasta 2,0 mg/ml con  $(NH_4)_2SO_4$  2,4 M, preparada disolviendo

387511



317 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (calidad para reactivos, libre de glicerina), en 1 litro de agua destilada, y se esteriliza.

Solución patrón de glicerina.

5 Se disuelven 2,0 g de ácido benzoico en 900 ml de agua destilada caliente, se enfría hasta la temperatura ambiente y se completa hasta 1 litro con agua destilada. Se añaden 25,0 mg de glicerina al 95% (calidad para reactivos) a 900 ml de esta solución de ácido benzoico, se completa hasta 1 litro con agua destilada y se filtra a través de un filtro "Millipore" utilizando una  
10 almohadilla de vidrio, membranas de 1,2  $\mu$ , 0,45  $\mu$  y 0,22  $\mu$ .

Solución de 2,4-dinitrofenilhidrazina.

Se disuelven 0,198 g de 2,4-dinitrofenilhidrazina en 83,3 ml de HCl concentrado y se completa hasta 1 litro con agua destilada.

15 Hidróxido de sodio 2 N.

Se disuelven 80 g de NaOH en 1 litro de agua destilada.

El substrato de triglicéridos liofilizado antes preparado, la solución tamponada de ATP, la gliceroquinasa, el hidróxido de potasio alcohólico, y la solución de 2,4-dinitrofenilhidrazina son  
20 almacenados preferiblemente a una temperatura que oscile entre aproximadamente 2°C y aproximadamente 8°C, antes de su utilización, para mantener la estabilidad. Estos materiales son estables durante periodos de tiempo de más de un año bajo estas condiciones de almacenamiento.

25 Antes de la utilización, el substrato de triglicéridos seco es reconstituido con la solución tamponada de ATP ( 5 ml por 0,5 ml de solución de substrato original) y el NaOH 2 N es diluido con 4 partes de agua destilada. Esta solución de NaOH deberá ser protegida de contaminación con  $\text{CO}_2$  procedente de la atmósfera.

3875 121 ENE



Los reactivos antes preparados y reconstituidos son empleados luego en una determinación de triglicéridos de una muestra de suero sanguíneo del siguiente modo:

5 Se añaden 0,5 ml de KOH alcohólico y 0,2 ml de suero a un tubo de ensayo. Se mezcla bien y se incuba a 60° hasta 70°C durante 30 minutos con un tapón en el tubo. Se deja enfriar la mezcla hasta la temperatura ambiente, se añade 1 ml de solución de sulfato de magnesio y se mezcla bien. Se centrifuga a 2000 rpm durante 5 minutos y se recoge el producto sobrenadante transparente  
10 te que comprende la glicerina libre.

A 0,25 ml del producto sobrenadante transparente se añaden 0,5 ml del substrato de triglicéridos reconstituido y 0,02 ml de gliceroquinasa y la mezcla es incubada durante 10 minutos a 37°C. Luego se añaden 0,5 ml de la solución de 2,4-dinitrofenilhidrazina  
15 y la mezcla es incubada de nuevo durante 10 minutos a 37°C. Finalmente, se añaden 5 ml de la solución diluída (0,4 N) de NaOH, la mezcla es centrifugada a 2000 rpm durante 5 minutos, el precipitado es eliminado y se determina a 440 m $\mu$  la densidad óptica (D.O.) del producto sobrenadante. Instrumentos tales como un "Coleman Jr.  
20 II", un "Klett Colorimeter" y un "Spectronic 20" pueden ser utilizados para la determinación de D.O.

La parte del anterior procedimiento que sigue a la liberación de la glicerina libre desde la muestra de suero se lleva a cabo con un preparado patrón de concentración conocida de glicerina  
25 y con la muestra y testigos patrones que no contienen la enzima de gliceroquinasa.

Los cálculos para la determinación de triglicéridos se efectúan luego del siguiente modo:

1. Se resta la D.O. patrón de la correspondiente D.O. de  
30 la muestra:



387511

Glicerina total:

$$\frac{\Delta D.O. \text{ de muestra}}{\Delta D.O. \text{ de patrón}} \times 2,3 \text{ mg \%} \times 8,3 = \text{glicerina total mg \%}$$

2. Glicerina de triglicéridos:

$$\text{Glicerina total, mg \%} - 0,80 \text{ mg \%} = \text{glicerina de triglicéridos, mg \%}$$

5

3. Triglicéridos (grasa neutra):

$$\text{Glicerina de triglicéridos, mg \%} \times 9,63 = \text{triglicéridos, mg \%}$$

En el procedimiento anterior, si la D.O. es mayor de 0,500, la muestra es diluida preferiblemente con agua destilada y el resultado final es multiplicado por el factor de dilución.

10

Diversos otros ejemplos y modificaciones en los ejemplos anteriores pueden ser desarrollados por una persona técnica en la materia después de leer la memoria que antecede y las reivindicaciones que siguen, sin apartarse del espíritu y alcance del invento. Todos estos ejemplos y modificaciones están incluidos dentro del alcance del invento tal como se define en las siguientes reivindicaciones.

15

NOTA DE REIVINDICACIONES

Se reivindica como de propia y nueva invención a favor de BAXTER LABORATORIES INC., con domicilio en MORTON GROVE, ILLINOIS (Estados Unidos), lo especificado en las siguientes reivindicaciones:

20

1.- Un método para la determinación de triglicéridos en un fluido biológico, que comprende saponificar dicho fluido biológico y hacer reaccionar la glicerina libre resultante con ATP en la presencia de gliceroquinasa, hacer reaccionar el ADP resultante con fosfoenolpiruvato en la presencia de piruvatoquinasa, hacer reaccionar el piruvato resultante con 2,4-dinitrofenilhidrazina, y medir la densidad óptica del piruvato de 2,4-dinitrofenilhidrazo-

25



21 E

387511

na resultante, colorimétricamente, a aproximadamente 440 mμ.

2.- Un método según la reivindicación 1, en que el fluido biológico es suero sanguíneo.

5 3.- Un método enzimático para la determinación de triglicéridos en un fluido biológico mediante la fosforilación de glicerina a glicerofosfato empleando ATP como el donante inmediato de fosfato y PEP, en un sistema auxiliar, para producir piruvato, caracterizado en que comprende hacer reaccionar el piruvato con 2,4-dinitrofenilhidrazina y medir colorimétricamente la densidad óptica del  
10 piruvato de 2,4-dinitrofenilhidrazona resultante, a aproximadamente 440 mμ.

4.- Un método según la reivindicación 3, caracterizado en que el fluido biológico es suero sanguíneo.

15 5.- " METODO PARA LA DETERMINACION DE TRIGLICERIDOS EN UN FLUIDO BIOLOGICO ".

Tal y como se deja descrito en la memoria precedente, que consta de trece hojas foliadas y mecanografiadas por una sola de sus caras.

Madrid, 21 de Enero de 1.971

P.A. de BAXTER LABORATORIES INC.

Victor Gil Vega