

P.- 50.440

Nº 1979 U.S.Ser.
Nº 127.054

401014



Memoria descriptiva

Int. Cl.: G01N

para solicitar PATENTE DE INVENCION por 20 años

a nombre de WORTHINGTON BIOCHEMICAL CORPORATION

entidad / ~~de nacionalidad~~ norteamericana

con domicilio en Freehold, Nueva Jersey, Estados Unidos de América.

por: "METODO MEJORADO PARA LA DETERMINACION ENZIMATICA DEL CONTENIDO DE ETANOL DE UN MATERIAL QUE CONTIENE ETANOL"

(Clase Internacional G01n)

40 10 14



La presente invención se refiere a métodos y reactivos para usar en la determinación del contenido de etanol de un material que contenga etanol. La invención se refiere más específicamente a un método enzimático mejorado para determinar el contenido de etanol de un material. Por ejemplo, es especialmente útil en la determinación del contenido de etanol en el suero u otro fluido biológico. Sin embargo, puede ser empleado análogamente para medir el contenido de alcohol en un material tal como vino o vinagre.

Se han usado diversos métodos para determinar cuantitativamente el contenido de etanol en fluidos biológicos y otros materiales. Con la excepción de los métodos enzimáticos y de cromatografía de gas, todos ellos han presentado un error probable de 10 a 15%, e interferencias por otros materiales. El método de cromatografía de gas es exacto, pero engorroso y caro. Aunque se han propuesto métodos de ensayo enzimático para la detección y la determinación del etanol que tienen la ventaja de ser muy específicos, han hallado muy poco uso debido a desventajas tales como inestabilidad de los reactivos, necesidad de agentes de captación para que la reacción transcurra hasta su fin, y la necesidad de usar un instrumento que pueda trabajar en la región ultravioleta, y que por tanto no está disponible en muchos laboratorios de ensayo.

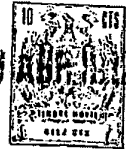
Constantemente hay necesidad de recurrir a un método de ensayo por el que se pueda determinar con exactitud el contenido de etanol de un material. Tal necesidad se presenta frecuentemente en relación con



los aspectos científicos de la jurisprudencia. Así, el contenido de etanol en un fluido biológico puede ser necesario en una investigación sobre si el etanol fué o no fué causa, o concomitante a la causa, de una muerte. 5 Aún más común es el ensayo cuantitativo del etanol que se origina al tratar de determinar si ciertos actos, tales como la conducción de un automóvil, fueron efectuados bajo una influencia excesivamente grande de etanol.

Particularmente cuando un ensayo para la determinación cuantitativa de la presencia de etanol se efectúa en relación con la observancia de las leyes, u otro aspecto de jurisprudencia, tiene gran importancia que el ensayo sea digno de confianza en lo que respecta a su exactitud, precisión y especificidad para el etanol. El método de ensayo debe ser tal que responda a cualquier etanol que esté presente, y solo al etanol, y que responda cuantitativamente a todo el etanol que esté presente. El elemento práctico también tiene importancia en aspectos tales como la sencillez, facilidad de ejecución, requisitos de equipo, requisitos de tiempo, requisitos de muestra, y disponibilidad y estabilidad de los reactivos que se empleen. Aunque se pueden hacer de terminaciones de etanol por ensayo de muestras de aliento u orina, las muestras de sangre están más fácil y consistentemente disponibles, y también son más dignas de confianza. Además, es deseable que el método de ensayo sea tal que sea digno de confianza sin emplear una muestra de sangre excesivamente grande. La cantidad de etanol en una muestra típica de sangre es relativamente pequeña. Un contenido de etanol de 0,15% o más es con-

401014



siderado normalmente como más del que el individuo medio toleraría sin menoscabo sustancial de sus facultades. El intervalo de contenido de etanol que se encuentra usualmente asciende a menos de 0,3%. Sin embargo, en el caso de coma o muerte el contenido de etanol en la sangre puede ser del orden de 0,35% a 0,45%. Debido a la posible significación de pequeñas diferencias en el contenido de etanol en la sangre, se necesita un alto orden de sensibilidad y especificidad.

5
10 Un objeto de esta invención es proporcionar un ensayo para la determinación cuantitativa del contenido de etanol en sangre y en otros materiales, el cual ensayo es una mejora respecto a los métodos de ensayo hasta ahora conocidos en la técnica.

15 Más especialmente, un objeto de esta invención es proporcionar un ensayo colorimétrico para la determinación cuantitativa del contenido de etanol en un material, el cual ensayo es sensible, específico, exacto y eficaz para medir todo el contenido de etanol del material sometido a ensayo.

20 Otro objeto de la invención es proporcionar un ensayo colorimétrico para determinar el etanol, el cual ensayo es sencillo y rápido, y que no requiere recurrir al uso de luz ultravioleta, y proporcionar un ensayo que no requiere el uso de un agente de captación para efectuar la reacción con todo el contenido de etanol en la muestra sometida a ensayo.

25
30 Otro objeto de esta invención es proporcionar una composición de copulación catalítica enzimática en estado liofilizado estable, la cual puede ser reconsti-



tuida por adición de agua, para proporcionar una solución que por adición posterior del cromógeno contiene todos los reactivos que se requieren en el sistema de reacción.

5 Según esta invención, los anteriores objetivos y mejoras se consiguen por adición de la muestra que contiene etanol a una solución que contiene alcohol-deshidrogenasa (denominada en lo sucesivo ADH) en combinación con cloruro de 2-p-yodofenil-3-p-nitrofenil-
10 5-feniltetrazolio (denominado en lo sucesivo INT), en cantidad tal que en el sistema de reacción sea al menos suficiente para responder cuantitativamente por colorimetría al contenido de etanol de la muestra, nicotinamida-adenina-dibucleótido (aquí denominado NAD en el estado oxidado y NADH en el estado reducido), diaforasa y un tampón que sea sustancialmente inerte en la solución y que mantengan el pH de la solución a un valor comprendido entre aproximadamente 7,5 y aproximadamente 9,5, bajo las condiciones de ensayo. Preferiblemente, el tampón mantiene el pH a aproximadamente 8,9-9,00.

Una de las características de la invención es que se proporciona, de manera que esté disponible en el momento del ensayo, una composición de copulación liofilizada que puede ser reconstituída, que contiene alcohol-deshidrogenasa, NAD y un tampón que durante el ensayo mantiene a la solución de ensayo a un pH del orden de 6,5 a 9,5, y de preferencia a aproximadamente 8,9-9,00. En la composición de copulación liofilizada que puede ser reconstituída se pueden incorporar tales componentes adicionales de la solución de ensayo como puedan

401014

20 APR 1972



ser empleados opcionalmente, por ejemplo un estabilizador.

Análogamente, el INT es proporcionado en forma liofilizada o seca que puede ser reconstituída, a un pH al que sea estable.

Cuando se efectúa el ensayo, la composición de copulación es reconstituída, y se le añade una cantidad de INT reconstituído que sea al menos suficiente para responder cuantitativamente a lo que se considera como el máximo contenido de etanol que pueda hallarse en la muestra medida del material que contiene etanol que se ha de ensayar. Se añade la muestra a la solución así preparada, y en la medida en que pueda haber etanol presente tiene lugar una reacción a temperatura ambiente con producción de formazano de INT, en forma de solución o suspensión coloidal de color rojo, respondiendo el color desarrollado cuantitativamente al contenido de etanol en la muestra. Es adecuado un período de incubación de 15 minutos. La incubación puede efectuarse a temperatura ambiente. Al final del período de incubación de 15 minutos, la solución es acidificada, tal como por adición de un ácido tal como ácido clorhídrico o sulfúrico. También se pueden usar otros ácidos, tal como el acético, evitando así cualquier aumento no específico de la densidad óptica, y aclarando la solución coloidal del formazano. La acidificación hasta que el pH sea 4 es suficiente para detener la reacción e impedir así un aumento no específico de la densidad óptica. Sin embargo, si se reduce el pH hasta un valor menor que 3 se hace que el formazano, que se forma inicialmen

401014



5 te como suspensión coloreada de partículas insolubles,
pase a solución y forme una solución coloreada que es
más adecuada para medida colorimétrica. Se ha hallado
que un período de incubación de 15 minutos es adecuado
para efectuar la reacción con todo el etanol contenido
en una muestra tal como una muestra de suero sanguíneo.
Además, dado que el formazano de INT, según se forma
inicialmente, es un producto de reacción insoluble que
es sacado del sistema de reacción, la reacción avanza
10 hasta completarse, es decir, continúa hasta que haya
habido reacción con todo el etanol de la muestra, con
la correspondiente producción cuantitativa del formaza-
no coloreado.

15 Una de las ventajas de la invención es que el
color rojo desarrollado según la cantidad de formazano
que se produce cuantitativamente en relación con el eta-
nol de la muestra está en la región visible, y puede ser
medido por un fotómetro o un colorímetro ordinario. Cuan-
do se utiliza un fotómetro, la densidad óptica se mide
20 preferiblemente a 500 nm, y se puede obtener directamen-
te el contenido de etanol en la muestra relacionando la
densidad óptica medida con una curva preparada a partir
de soluciones patrón de etanol de diferentes concentra-
ciones. El color rojo del formazano de INT es estable
25 durante al menos 1 hora.

30 En el método de ensayo enzimático para la de-
terminación cuantitativa de etanol que ha encontrado
más extenso uso hasta ahora, se ha empleado alcohol-
deshidrogenasa para catalizar la conversión de etanol
a acetaldehído, con liberación de hidrógeno, en presen-

401014

20



5 cia de NAD, que es incoloro y que es convertido en su forma reducida coloreada, NADH. Sin embargo, para que esta reacción transcurra hasta su término se requiere un agente de captación. Además, cualquier desarrollo de color resultante de la formación de NADH está en la región ultravioleta, siendo medido ordinariamente el cambio de densidad óptica a 340 nm.

10 Se conocía antes de ahora la actividad de la diaforasa para convertir un cromógeno en un formazano coloreado, con oxidación de una coenzima reducida tal como NADH. Según la presente invención, esta reacción ha sido asociada con la determinación enzimática de etanol de la técnica anterior, y así se han obtenido mejoras sobresalientes, en comparación con los métodos de ensayo de la técnica anterior para la determinación cuantitativa de etanol. Así, la especificidad de la alcohol-

15 deshidrogenasa para el etanol es producida en un sistema de reacción que, en ausencia de un agente de captación, transcurre hasta su término hasta que se haya agotado todo el alcohol de la muestra. La reacción de copulación es tal que se mide el NADH a medida que se forma, por formación de una cantidad equimolecular de formazano que se acumula en una magnitud que está determinada por el contenido de etanol en la muestra. El desarrollo de color no solo es en la región visible, sino

20 que también es más de dos veces y media mayor que el que tiene lugar en la región ultravioleta cuando se intenta utilizar la reducción de NAD per se a NADH, como indicador. El intervalo de linealidad se extiende desde aproximadamente 0,05 g de etanol por 100 ml hasta

25

30

401014

20



0,4 g de etanol por 100 ml. Además, el método de ensayo está virtualmente exento de interferencias, y su sensibilidad, exactitud y reproducibilidad son muy buenas. La exactitud obtenida corresponde a la obtenida en el
5 mucho más complejo y engorroso método de cromatografía de gas.

Cada una de las enzimas y demás reactivos implicados en el sistema de reacción son conocidos, cuando son considerados individualmente. Así, la alcohol-
10 deshidrogenasa puede obtenerse a partir de levadura, de manera conocida. Sin embargo, también puede obtenerse de fuentes animales, por ejemplo de hígado. La alcohol-deshidrogenasa obtenida a partir de la levadura es la usada ordinariamente en la práctica de esta inven-
15 ción, ya que es más estable y puede ser obtenida más económicamente.

El NAD se obtiene usualmente de la levadura, por métodos conocidos.

Diaforasa es un término aplicado a una enzi-
20 ma en forma de proteína de flavina de un sistema de transporte de electrones implicada en la oxidación de NADH, o con un aceptor artificial. Ha sido aislada antes de ahora del moho Clostridium o bacterias. Análogamente, ha sido aislada del corazón de cerdo.

Aunque también hay sales de tetrazolio distin-
25 tas del INT, y otros cromógenos, que son capaces de conversión en presencia de diaforasa y NADH para formar productos de reacción coloreados, para los fines de la invención el INT es superior, en lo que respecta a su
30 estabilidad a la luz, color, y propiedades oxidantes.

401014

20 APR 1972



Dado que la función del tampón es simplemente controlar el pH en las proximidades de o en el óptimo para las reacciones enzimáticas que tienen lugar, la selección del tampón no es crítica siempre que el tampón no intervenga en la reacción y que sea adecuado para obtener el pH deseado, que preferiblemente es de 8,9-9,00, pero que puede variar desde aproximadamente 7,5 a aproximadamente 9,5. Se emplea preferiblemente pirofosfato sódico como base para el tampón, en combinación con glicina. Se puede usar ácido clorhídrico para ajustar el pH de la combinación de pirofosfato sódico con glicina. Otro tampón que puede ser usado es el tampón tris (hidroxi-metil-amino-metano) en combinación con un ácido tal como ácido clorhídrico o acético.

Aunque su presencia no es esencial para la práctica de esta invención, es preferible incluir en la composición de copulación enzimática un agente estabilizador de proteínas que sea eficaz para reforzar la estabilidad de las enzimas. Esto es particularmente deseable en relación con la preparación de la composición de copulación enzimática en forma liofilizada adaptada para ser almacenada en estado liofilizado hasta que pueda ser deseable reconstituirla por adición de agua. El agente estabilizador sirve para estabilizar la enzima frente al deterioro durante la liofilización. También estabiliza a la suspensión del formazano de INT a medida que se produce. El agente estabilizador que se prefiere es la albúmina. Sin embargo, se pueden usar otras proteínas solubles en agua y que no reaccionen, tales como gelatina.



Dado que las enzimas ADH y diaforasa catalizan la reacción, a diferencia de tomar parte en ella, y dado que la coenzima NAD es usada de nuevo cíclicamente, la cantidad de estos reactivos no es crítica. Todo lo que se requiere es que estén presentes las cantidades suficientes para permitir la oxidación completa de todo el etanol de la muestra, dentro del tiempo de reacción especificado, o menos. La cantidad de INT que se usa permite una máxima velocidad a que puede transcurrir la reacción mientras que está simultáneamente en exceso suficiente para asegurar la presencia del INT suficiente para permitir su conversión continuada en formazano de INT, hasta que se haya agotado todo el etanol de la muestra. Dado que las cantidades de las enzimas y coenzima no son críticas, y dado que un exceso no produce efectos adversos, al preparar la composición de copulación enzimática es práctica usual emplear un exceso considerable de cada una de las enzimas y de la coenzima, de manera que se compense cualquier pérdida ocasionada por liofilización u otra causa. Análogamente, la cantidad de tampón no es crítica, siempre que esté presente el suficiente para llevar a la composición al pH deseado, durante el ensayo.

Otra característica de la práctica preferida de esta invención es la de emplear en la composición de copulación un mercaptano en forma reducida, en una cantidad eficaz como antioxidante para hacer mínima la desactivación del sistema por oxidación. El mercaptano preferido es la glutatióna.

La práctica de esta invención puede ser ilustrada

401014



trada en relación con la detección cuantitativa de etanol en una muestra de suero desproteínizado. Para desproteínizar el suero se pueden añadir 0,2 ml de suero que contiene una pequeña cantidad de un anticoagulante, tal como heparina, oxalato o fluoruro, a 1,8 ml de agua destilada que ha sido puesta en un tubo de ensayo de 5 a 10 ml. Se mezcla con esto 1,0 ml de solución de $Ba(OH)_2$ al 1,8% y 1,0 ml de solución de $ZnSO_4$, seguido por filtración o centrifugación. También se pueden usar otras técnicas conocidas de desproteínización. Por ejemplo, se puede usar como agente de desproteínización $HClO_4$ al 5,1%, si se neutraliza el material desproteínizado final.

La composición de copulación enzimática puede ser preparada en forma liofilizada lista para su uso, en viales que pueden contener la composición suficiente para cinco ensayos, y en los que la composición puede ser reconstituída convenientemente por adición de agua destilada. La composición puede ser preparada en cualquier cantidad, dependiendo del número de viales a producir en una sola tanda. La siguiente es una composición típica en una cantidad que es apropiada para proporcionar 100 viales:

	Pirofosfato sódico	24,53 g
25	Glicina	0,55 g
	NAD	1,65 g
	Albúmina	1,10 g
	Glutaciona (reducida)	0,143 g
	Diaforasa	2200 unidades
30	ADH (levadura)	33000 unidades

401014

20



HCl (5N) para proporcionar pH 8,9
Agua (exenta de alcohol) 520 ml

5 En la formulación anterior, el contenido de diaforasa se expresa en unidades de absorción, que miden la velocidad de desorción del tinte 2,6-diclorofenolindofenol, por minuto, en presencia de NADH_2 como sustrato, bajo condiciones controladas que son usuales para este ensayo. Una unidad es igual a una disminución de absorbancia de 1,0 por minuto.

10 En el caso de la alcohol-deshidrogenasa, las unidades indicadas son unidades internacionales que se determinan bajo condiciones controladas que son usuales, correspondiendo una unidad internacional a la reacción por vía enzima, de 1 micromol de NAD por minuto.

15 Al preparar la composición es preferible disolver los ingredientes distintos de la alcohol-deshidrogenasa, en una porción del agua, seguido por adición del resto del agua y enfriamiento en un baño de hielo, antes de incluir la alcohol-deshidrogenasa. Al añadir la alcohol-deshidrogenasa, la solución, en cantidad de 5,0 ml por vial, es añadida a viales en los que la solución está liofilizada por almacenamiento refrigerado. Cuando se necesita para un ensayo, la composición liofilizada contenida en un vial puede ser reconstituída por adición de 9,0 ml de agua destilada.

25 Para que el INT pueda estar más fácilmente disponible cuando es necesario para un ensayo, se puede preparar una solución del mismo disolviendo 0,22 g de INT en 110 ml de agua que contienen el HCl suficiente para proporcionar un pH de 3,5. Esto proporciona so

30

401014

20



lución suficiente para 20 viales, que contienen 5,5 ml
cada uno, conteniendo cada vial solución suficiente pa-
ra 25 ensayos, cuando se usa con la composición de co-
pulación enzimática antes mencionada. Dado que el INT
5 no debe ser expuesto a la luz durante períodos de tiempo
largos, el INT debe ser puesto en viales ambarinos cuan-
do se prevé un almacenamiento. Los contenidos de los via-
les están liofilizados por almacenamiento refrigerado,
y cada vial puede ser reconstituido por adición de 5,5
10 ml de agua.

En la práctica típica, utilizando los compo-
nentes antes descritos, se pueden realizar cuatro ensa-
yos de forma sustancialmente simultánea, efectuándose
cada ensayo en un tubo de ensayo de 10 a 15 ml que ha-
ya sido marcado para identificar la muestra a ensayar
15 en él. Se efectúa un ensayo testigo en un quinto tubo.
Se añaden a cada uno de los cinco tubos 1,7 ml de solu-
ción reconstituída de la composición de copulación en-
zimática, y 0,2 ml de la solución reconstituída de INT.
20 A intervalos medidos se añaden 0,1 ml de suero despro-
teinizado de cada muestra de suero a ensayar, a su tubo
marcado apropiadamente, y se añaden 0,1 ml de agua al
del ensayo testigo. Cada tubo es incubado durante 15
minutos a temperatura ambiente, y al final del interva-
25 lo aplicable de 15 minutos se añaden a cada tubo 4 ml
de HCl 0,1N. Se mide la densidad óptica a 500 nm den-
tro de 1 hora tras la edición del HCl. El fotómetro que
se usa puede ser calibrado a cero usando el reactivo
testigo, y la densidad óptica de cada una de las cua-
30 tro muestras puede ser leída frente a una curva patrón



5 preparada a partir de soluciones de etanol de concentra-
ciones conocidas, para obtener directamente el conteni-
do de etanol en las respectivas muestras. Desde luego,
alternativamente, se puede leer del ensayo testigo fren-
te a agua, y restar la lectura del ensayo testigo de las
lecturas respectivas de muestra.

La curva patrón de la que se toman valores de
lectura se prepara preferiblemente a partir de etanol
puro. Para obtener una solución de etanol al 0,1% en pe-
so/volumen, se diluyen 1,32 ml de etanol del 95%, o bien
1,27 ml de etanol al 100%, con 1000 ml de agua, a sustan-
cialmente 25°C. En la práctica preferida, las soluciones
patrón de trabajo que se emplean para reacción en la pre-
paración de la curva patrón son sometidas al mismo mé-
todo de desproteínización que se usa con el suero. Las
soluciones patrón de trabajo se preparan de manera que
proporcionen una respuesta colorimétrica correspondien-
te a la obtenida con un contenido correspondiente de eta-
nol en la muestra. Cuando las soluciones hayan de ser
desproteínizadas, los patrones de trabajo pueden ser
preparados de manera que indiquen la presencia de 0,1%,
0,2% y 0,3% de etanol, respectivamente, en muestras hi-
potéticas, según las siguientes recetas:

25	Patrón de tra- bajo, %	ml de etanol al 0,1%	ml de agua des- tilada
	0,1%	0,2	1,8
	0,2%	0,4	1,6
	0,3%	0,6	1,4

30 La precisión del ensayo fué determinada tanto por la

401014

20



reproducibilidad de los patrones como por ensayo de dos sueros en duplicidad.

Se obtuvieron densidades ópticas (DO) de tres niveles de doce patrones de etanol, concretamente 0,1%, 0,2% y 0,3%. Se determinaron la desviación típica (DT) y el coeficiente de variación (CV). El CV aumentó desde 3,9% al nivel de 0,1% hasta 4,8% al nivel de 0,3%. Los datos se tabulan en la siguiente tabla:

10

Patrones de etanol en % en peso/volumen

	<u>0,1%</u>	<u>0,2%</u>	<u>0,3%</u>
Densidad óptica media	0,247	0,502	0,751
Desviación típica	0,0097	0,0151	0,036
15 Coeficiente de variación	3,9%	3,0%	4,8%
Nº de muestras	12	12	12
Intervalo (%)	<u>± 5%</u>	<u>± 4,3%</u>	<u>± 7,4%</u>

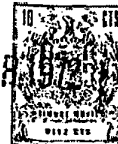
20

Es digno de atención que el intervalo de interés clínico y legal produce absorbancias en la parte más baja y más exacta de la escala fotométrica.

25

Se ensayaron dos sueros, por duplicado, por dos operarios, en dos días separados por una semana. De la tabla siguiente es evidente que las desviaciones típicas (DT) son muy próximas en ambos niveles, aunque ha ya algo de variación en los intervalos.

401014



Muestras de suero - Etanol % en peso/volumen

Operario nº 1 - 1^{er} día

	<u>Suero nº 1</u>	<u>Suero nº 2</u>
5 Media	0,197%	0,095%
Desviación típica (DT)	0,010%	0,0054%
Coeficiente de variación (CV)	5,05%	5,7%
Nº de muestras	11	11
Intervalo	+ 7,5%	+ 10%

10

Operario nº 2 - 2^a día

	<u>Suero nº 1</u>	<u>Suero nº 2</u>
15 Media	0,199%	0,099%
Desviación típica (DT)	0,012%	0,0042%
Coeficiente de variación (CV)	6%	4,2%
Nº de muestras	12	11
Intervalo	+ 7,5%	+ 6%

20

Para comprobar el tanto por ciento de recuperación de etanol del suero, se añadieron dos niveles de etanol a dos juegos de cinco muestras. Después, las muestras fueron desproteinizadas y ensayadas. Se halló que la recuperación fué próxima al 100%, como lo indica la

25

tabla siguiente:

13.4.72

401014

20 ABR 1972



Recuperación de etanol de sueros

Muestra nº	Etanol - 1 mg/ml		Etanol - 2 mg/ml		
	% de etanol (peso/vol)	% de recuperación	% de etanol (peso/vol)	% de recuperación	
5	1	0,107	104	0,208	104
	2	0,107	104	0,196	98
	3	0,102	99	0,204	102
	4	0,100	97	0,190	96
10	5	0,100	97	0,190	98

También se determinó la medida en que interfieren los anticoagulantes. Se halló que el oxalato potásico, fluoruro sódico y citrato sódico se añadían apreciablemente a los resultados, en las concentraciones comúnmente usadas, mientras que la heparina y el EDTA no lo hacían. También se halló que la formalina reacciona lentamente y aumenta los resultados, mientras que la acetona no lo hace.

Dado que la ADH procede de una fuente de levadura, se determinó la oxidación de otros alcoholes, por densidad óptica (DO), al cabo de 15 minutos y se comparó a 100% para una concentración equivalente de etanol. El metanol y la glicerina no reaccionaron, mientras que el n-propanol, isopropanol y n-butanol mostraron diferentes magnitudes de reactividad. El n-propanol, isopropanol y n-butanol no se encuentran normalmente cuando se ensaya el contenido de etanol en el suero sanguíneo u otro material que contenga etanol. Sin embargo, el técnico debe ser cauteloso en cuanto a contaminación por los

401014

31 JUL. 1974



alcoholes superiores reactivos.

Por lo que antecede es evidente que esta invención proporciona un ensayo para la determinación cuantitativa del contenido de etanol de un material, que es tan bueno como la cromatografía de gas, en lo que respecta a su precisión y exactitud, y que proporciona la ventaja de ser rápido, sencillo y conveniente.

Esta solicitud que corresponde a la presentada en Estados Unidos de América, el día 22 de Marzo de 1971, con el número 127.054, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

REIVINDICACIONES

Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los siguientes:

27.7.74

401014

31 JUL 1974



1ª.- Método mejorado para la determinación enzimática del contenido de etanol de un material que contiene etanol, cuyas mejoras comprenden entremezclar una muestra de material que contiene etanol con una solución acuosa de alcohol-deshidrogenasa que contiene 5 cloruro de 2-p-yodofenil-3-p-nitrofenil-5-feniltetrazolio en una cantidad que en el sistema de reacción es al menos suficiente para responder cuantitativamente al contenido de etanol en la muestra, en lo que respecta a 10 la conversión en formazano, nicotinamida-adenina-dinucleótido, diaforasa y un tampón que es sustancialmente inerte en dicha solución y que mantiene el pH de la solución en un valor comprendido entre aproximadamente 7,5 y aproximadamente 9,5, bajo las condiciones de en 15 sayo.

2ª.- Método según la reivindicación 1ª, donde de dicho tampón consiste esencialmente en una mezcla de pirofosfato sódico y glicina.

3ª.- Método según la reivindicación 2ª, donde 20 de el tampón mantiene a la solución, durante el ensayo, a un pH de aproximadamente 8,9.

4ª.- Método según la reivindicación 1ª, donde 25 de dicha solución contiene una sustancia elegida del grupo que consta de albúmina y gelatina, en cantidad eficaz como estabilizador.

27.7.74

cmE

401014

31



5^a.- Método según la reivindicación 1^a, don
de dicha solución contiene un mercaptano en forma re
ducida, en cantidad eficaz como antioxidante.

5
10
6^a.- Método según la reivindicación 1^a, don
de reaccionantes entremezclados se incuban durante un
período de tiempo medido, mientras son mantenidos a
una temperatura constante entre aproximadamente 23°C
y aproximadamente 30°C, se acidifica la mezcla de reac
ción añadiendo ácido a la misma, para detener la reac
ción al final del período de incubación, y se mide la
absorción de luz por la dispersión resultante a apro
ximadamente 500 nm.

15
7^a.- Método según la reivindicación 6^a, don
de la mezcla de reacción se acidifica de manera que
proporcione un pH no mayor que aproximadamente 4.

8^a.- Método según la reivindicación 6^a, don
de la mezcla de reacción se acidifica de manera que
se proporcione un pH no mayor que aproximadamente 3,
en el que es soluble el formazano.

20
9^a.- Método según la reivindicación 1^a, don
de se utiliza una sustancia elegida del grupo que cons
ta de albúmina y gelatina, en cantidad eficaz como es
tabilizador, y un mercaptano en forma reducida, en
cantidad eficaz como antioxidante.

25
10^a.- Método según la reivindicación 9^a, don

27.7.74

401014



de dicho mercaptano comprende glutatona.

11ª.- Método mejorado para la determinación enzimática del contenido de etanol de un material que contiene etanol.

5 Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede y con los fines que se han especificado.

Esta Memoria consta de veintidos hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 31 JUL. 1974

10

P.A.

Alberto de Elzoburu
Alberto de Elzoburu

ME