



ESPAÑA

⑩ ES ⑪ ⑫ ⑬ ⑭ ⑮ ⑯ ⑰ ⑱ ⑲ ⑳ ㉑ ㉒ ㉓ ㉔ ㉕ ㉖ ㉗ ㉘ ㉙ ㉚ ㉛ ㉜ ㉝ ㉞ ㉟ ㊱ ㊲ ㊳ ㊴ ㊵ ㊶ ㊷ ㊸ ㊹ ㊺ ㊻ ㊼ ㊽ ㊾ ㊿

NUMERO	464038
FECHA DE PRESENTACION	3-11-1977

⑩ A 1

PATENTE DE INVENCION

③① PRIORIDADES: ③② NUMERO	③③ FECHA	③④ PAIS
29117 A/76	8-11-1976	Italia

④⑦ FECHA DE PUBLICIDAD	⑤① CLASIFICACION INTERNACIONAL	⑥② PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C07G ; G01N	

⑥③ TITULO DE LA INVENCION

"METODO PARA LA DETERMINACION ENZIMATICA DE LA GLUCOSA"

⑦① SOLICITANTE (S)

Istituto Sieroterapico e Vaccinogeno Toscano "SCLAVO" S.p.A.

DOMICILIO DEL SOLICITANTE

SIENA (Italia), Via Fiorentina, 1.

⑦② INVENTOR (ES)

Franco MEIATTINI

⑦③ TITULAR (ES)

⑦④ REPRESENTANTE

Don JOSE MIGUEL GOMEZ-ACEBO Y POMBO

UNE A - 4 MOD. 3106

Concedido el Registro de acuerdo con los datos que figuran en la presente descripción y según el contenido de la Memoria adjunta. UTILICESE COMO PRIMERA PAGINA DE LA MEMORIA

20 JUN. 1978

La presente invención se refiere a un método para la determinación enzimática de la glucosa, particularmente mediante empleo de un conjunto de reactivos.

Es conocida por la Patente italiana Nº 986.838 la posibilidad de determinar enzimáticamente la glucosa mediante el empleo de un particular conjunto de reactivos que aprovecha la transformación que experimenta la glucosa en presencia de la enzima glucosa-oxidasa y los sucesivos pasos que intervienen a expensas de las sustancias producidas, de entre las cuales destaca la oxidación, por parte del peróxido de hidrógeno formado, de un adecuado sustrato por medio de otra enzima: la peroxidasa.

Aparte de las composiciones enzimáticas y el eventual empleo de sustancias cromógenas, el conjunto de reactivos a que se refiere la susodicha Patente está constituido esencialmente por un componente conteniendo en la molécula un compuesto que presenta un grupo $>CH$ en posición α de un grupo enólico con dobles enlaces conjugados al doble enlace enólico y por un segundo componente con al menos un grupo reactivo ligado a una estructura derivada de la 1-fenil-5-pirazolinona.

Según la ya mencionada Patente, el reactivo está por tanto formado por fenol o compuesto análogo, y 4-amino antipirina o compuesto análogo: dicho reactivo puede ser preparado en solución lista para su empleo; o bien el fenol y la 4-amino antipirina pueden formar parte de soluciones separadas, que deban mezclarse y diluirse antes de su empleo; o bien, además, las sustancias pueden ser con-

servadas en forma seca que deba disolverse para la obtención de las soluciones listas para su empleo.

Sin embargo, el empleo del fenol tal cual no permite la formulación de un único reactivo, con las sustancias
5 mezcladas en estado seco, que deban disolverse o diluirse en una única solución lista para su empleo, ya que la presencia del fenol no asegura garantía de estabilidad.

Ahora se ha descubierto, y ello constituye una característica de la presente invención, que si se evita el
10 empleo del fenol tal cual y se utiliza en su lugar, en la formulación del reactivo, un compuesto que presente un grupo $>CH$ en posición α de un grupo enólico con dobles enlaces conjugados al doble enlace enólico, es
15 posible la formulación de un único reactivo, comprendiendo todos los constituyentes en los que se está interesado, en estado seco, es decir en forma de polvo que deba disolverse antes de su empleo, sin que se presenten los inconvenientes de inestabilidad según se ha dicho más arriba.

Más particularmente, la presente invención se refiere a un método para la determinación enzimática de la glucosa comprendiendo el empleo, en un único reactivo en estado
20 seco, de la enzima glucosa-oxidasa, la enzima peroxidasa, un tampón, un compuesto que presenta un grupo $>CH$ en posición α de un grupo enólico con dobles enlaces conjugados al doble enlace enólico y un componente con al
25 menos un grupo reactivo ligado a una estructura derivada de la 1-fenil-5-pirazolinona.

En lo que se refiere a la naturaleza química y la exacta formulación de estas dos últimas sustancias, se remite al texto de la susodicha Patente, con la advertencia obvia de que, de todas las sustancias en ella indicadas, sólo aquéllas que son sólidas a temperatura ambiente podrán encontrar empleo en la formulación única, empleada según el método de la presente solicitud.

Debe hacerse constar, además, que para obtener un reactivo de fácil y económica preparación, así como de estabilidad adecuada, es aconsejable seleccionar, de entre todos los compuestos indicados, aquellos que respondan simultáneamente a las siguientes características:

- deben ser altofundentes no delicuescentes
- deben presentarse como polvo amorfo o cristalino
- deben ser suficientemente estables
- deben ser suficientemente no reactivos en estado seco, de modo que no tiendan a desnaturalizar las proteínas enzimáticas presentes en la mezcla en polvo, pero deben ser suficientemente reactivos en la solución lista para el empleo indicado.

Sin embargo, resultará fácil para el experto en el ramo seleccionar, de entre el vasto número de fórmulas químicas indicadas en la susodicha Patente, aquéllas más aptas para realizar la formulación del reactivo único en polvo, también en previsión de su utilización práctica, es decir del método de lectura que se desee seguir.

Los siguientes ejemplos se indican únicamente a fin de ilustrar algunos conjuntos de reactivos de entre los

muchos posibles, pero la invención no debe considerarse en modo alguno limitada al empleo de los mismos.

Ejemplos de formulaciones en polvo (reactivo único)

	A - Variando el tampón y el compuesto que presenta un	
5	grupo >CH en posición α de un grupo enólico con	
	dobles enlaces conjugados al doble enlace enólico.	
	A1 - Tampón fosfato pH 7,5,	150 mmoles/l
	GOD	18.000 U/l
	POD	1.000 U/l
10	4-aminoantipirina	0,4 mmoles/l
	4-hidroxibenzoato-Na	10 mmoles/l
	A2 - Tampón fosfato pH 7,3,	150 mmoles/l
	GOD	18.000 U/l
	POD	1.000 U/l
15	4-aminoantipirina	0,4 mmoles/l
	3-hidroxibenzoato-X	10 mmoles/l
	A3 - Tampón tris-maleato pH 7,7,	300 mmoles/l
	GOD	18.000 U/l
	POD	1.000 U/l
20	4-aminoantipirina	0,5 mmoles/l
	Na-salicilato	12 mmoles/l
	A4 - Tampón 2-amino-2-metil-	
	-1,3-propandiol pH 7,8,	200 mmoles/l
	GOD	25.000 U/l
25	POD	2.000 U/l
	4-aminoantipirina	0,6 mmoles/l
	salicilamida	7 mmoles/l

	A5 - Tampón tris-KH ₂ PO ₄ pH 7,6,	150 mmoles/l
	GOD	18.000 U/l
	POD	1.000 U/l
	4-aminoantipirina	0,4 mmoles/l
5	ácido vainílico	12 mmoles/l
	A6 - Tampón fosfato pH 6,	150 mmoles/l
	GOD	20.000 U/l
	POD	2.000 U/l
	4-aminoantipirina	0,35 mmoles/l
10	ácido cromotrópico (ácido 4,5- -dihidroxi-2,7-naftalenedisulfó- nico)	4 mmoles/l
	A7 - Tampón acetato-maleato pH 6,	100 mmoles/l
	GOD	25.000 U/l
15	POD	2.500 U/l
	4-aminoantipirina	0,6 mmoles/l
	8-hidroxiquinolina-citrato	15 mmoles/l
	A8 - Tampón fosfato pH 6,7,	100 mmoles/l
	GOD	18.000 U/l
20	POD	500 U/l
	4-aminoantipirina	0,35 mmoles/l
	ácido barbitúrico	4 mmoles/l
	B - Variando la 4-aminoantipirina	
	B1 - Tampón fosfato pH 7,5,	150 mmoles/l
25	GOD	18.000 U/l
	POD	1.000 U/l
	sulfamipirina (ácido 2,3-dimetil- -1-fenil-5-pirazolona-4-	

-aminometan-sulfónico) sal	
sódica	1 mmol/l
4 - hidroxibenzoato-Na	10 mmoles/l

Ejemplos de utilización

5 C - Con "lectura al término"

Muestra: suero, plasma, orina

(sangre desproteinizada) ml 0,02 (0,2)

Reactivo en polvo, disuelto en H₂O ml 2,5

10 Mezcla e incubación a la temperatura y durante el tiempo necesarios para que el desarrollo del color haya terminado y haya alcanzado su máximo.

15 Lectura fotométrica a la longitud de onda óptima para el sistema cromógeno utilizado (por ejemplo a 340 ó a 500-510 nm con 4-hidroxibenzoato y 4-aminoantipirina, a 340 ó a 600 nm con ácido cromotrópico y 4-aminoantipirina, etc.).

20 El cálculo puede ser efectuado utilizando el coeficiente de extinción del cromógeno coloreado o bien utilizando una o varias soluciones de referencia (Standard) de contenido conocido de glucosa, tratadas como la muestra, en contraste con las cuales puede efectuarse el cálculo, según la ecuación:

$$\frac{\text{Concentración del Standard}}{\text{D.O. del Standard}} \times \text{D.O. de la muestra} =$$

25 = concentración de la muestra.

La medición de los volúmenes y el mezclado de los reactivos pueden efectuarse ya sea manualmente, según se ha indicado, o bien mediante empleo de adecuados instru-

mentos estudiados para la mecanización y la automatización de las diversas operaciones.

D - Con lectura "en cinética"

Muestra: suero, plasma, orina

5 (sangre desproteïnizada) ml 0,01 (0,1)

Reactivo en polvo, disuelto en H₂O ml 2

Mezcla y lectura fotométrica inmediata, a 340 nm o a la longitud de onda óptima para el sistema cromógeno utilizado (compárese Ejemplo C).

10 La lectura fotométrica puede ser repetida a intervalos regulares de tiempo, o bien ser registrada en continuo sobre papel. La variación medida $\frac{\Delta D.O.}{\Delta t}$ es proporcional a la concentración de glucosa de la muestra.

15 También el método "en cinética" puede ser efectuado manualmente, según se ha indicado, o bien mediante empleo de adecuados instrumentos estudiados para la mecanización y la automatización de las operaciones de medición de los reactivos, mezclado, lectura fotométrica, temporización, termostatación, registro, cálculo, etc.

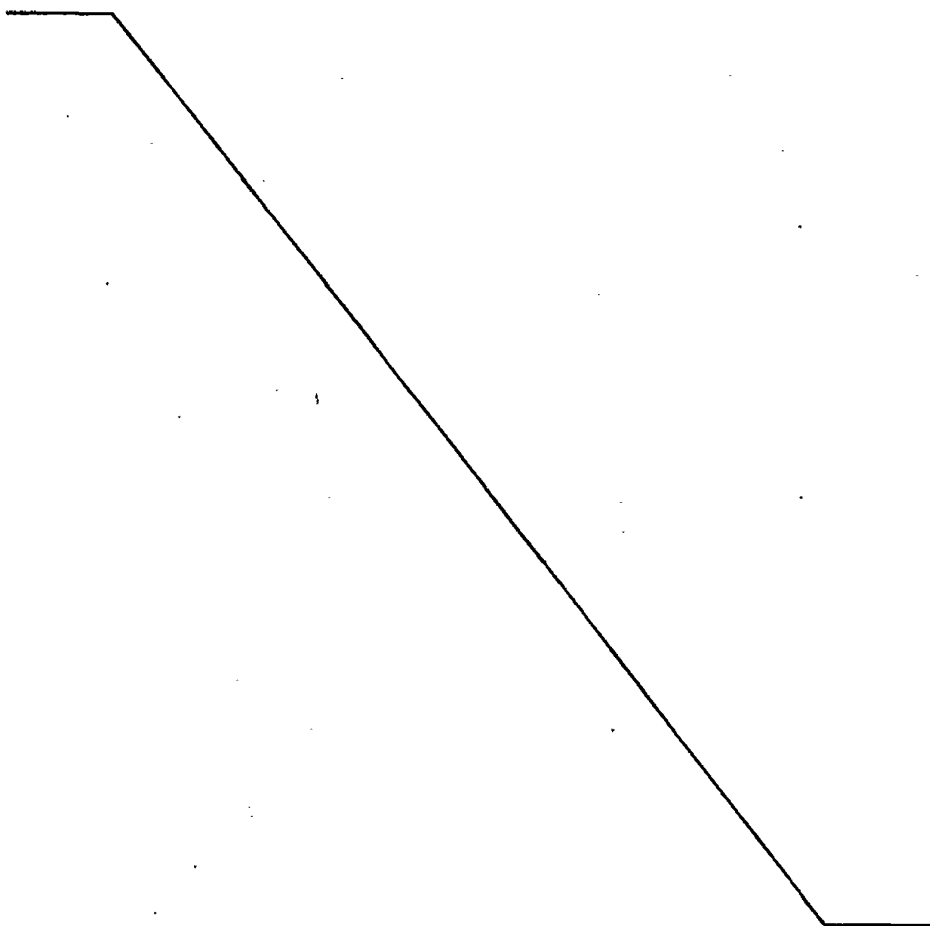
20 Para el cálculo, véase el Ejemplo C precedente.

Abreviaciones

	GOD	=	glucosa-oxidasa
	POD	=	peroxidasa
	D.O.	=	densidad óptica
25	nm	=	nanómetros
	m (prefijo)	=	mili
	l	=	litro
	t	=	tiempo

Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de ponerlo en práctica, se hace constar que todo cuanto no altere, cambie o modifique su principio fundamental puede quedar sometido a variaciones de detalle.

5 También se hace constar que esta invención corresponde a la descrita en la Solicitud de Patente Nº 29117 A/76, depositada en Italia en 8 de Noviembre de 1976, cuya prioridad se reivindica de acuerdo con los Convenios Internacionales en vigor, siendo lo esencial y por lo que se
10 solicita Patente de Invención, por veinte años, lo que queda resumido en las siguientes reivindicaciones:



REIVINDICACIONES

1^a.- Método para la determinación enzimática de la glucosa, caracterizado porque se hace reaccionar la muestra sometida a examen con un único conjunto reactivo en estado seco constituido por la enzima glucosa-oxidasa, la enzima peroxidasa, un tampón, un compuesto que presenta un grupo $>CH$ en posición α de un grupo enólico con dobles enlaces conjugados al doble enlace enólico y un componente con al menos un grupo reactivo ligado a una estructura derivada de la 1-fenil-5-pirazolinona.

2^a.- METODO PARA LA DETERMINACION ENZIMATICA DE LA GLUCOSA, tal y como queda descrito y reivindicado en la presente memoria que consta de nueve hojas mecanografiadas por una sola cara.

BARCELONA, 3 de Noviembre de 1977.

Istituto Sieroterapico e
Vaccinogeno Toscano
"SCLAVO" S.p.A.
P.P.
J. M. GOMEZ-ACEBO Y POMBO
p. p. fdo. J. M. Valentin-Fernández

