



ESPAÑA

ES	(11) NUMERO	A1
	(21) 473.296	
(22) FECHA DE PRESENTACION	13.9.78	

PATENTE DE INVENCION

Concedido el Registro de acuerdo con los datos que figuran en la presente descripción y según el contenido de la Memoria adjunta.

(30) PRIORIDADES:		
(31) NUMERO	(32) FECHA	(33) PAIS
P 27 41 192.3	13 septiembre 1977	Alemania
P 27 55 803.8	14 diciembre 1977	Alemania
(47) FECHA DE PUBLICIDAD	(51) CLASIFICACION INTERNACIONAL	(52) PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	G01N; G07C	
(54) TITULO DE LA INVENCION		
Procedimiento para la determinación de α -amilasa		
(71) SOLICITANTE (S)		
Boehringer Mannheim GmbH		
DOMICILIO DEL SOLICITANTE		
Sandhofer Strasse 112-132, D-6800 Mannheim-Waldhof (Alemania)		
(72) INVENTOR (ES)		
Dr. Elli Rauscher, Dr. Ulrich Neumann, Dr. August Wilhelm Wahlefeld, Dr. Alexander Hagen, Dr. Wolfgang Gruber, Dr. Joachim Ziegenhorn, Dr. Eugen Schaich, Dr. Ulfert Deneke, Dr. Gerhard Michal y Dr. Günter Weimann.		
(73) TITULAR (ES)		
(74) REPRESENTANTE		
Carlos Fernández Candélas		

El invento concierne a un procedimiento para la -
determinación de α -amilasa.

La determinación del nivel de α -amilasa en el sug
ro es un importante parámetro clínico para la función del -
5 páncreas. Los reactivos usuales en el comercio para la de-
terminación de la α -amilasa se basan predominantemente en -
un sistema en el cual se degrada almidón mediante la α -amila
sa y las fracciones formadas son determinadas en el margen
visible o en el margen de ultravioletas, dependiendo de que
10 se emplee en el ensayo en calidad de sustrato para amilasa
almidón coloreado o almidón natural. Una desventaja esencial
de estos procedimientos y respectivamente reactivos se debe
a que el almidón, como macromolécula, puede ser caracteriza
do y normalizado sólo de una manera insuficiente, por lo que
15 el grado y la velocidad de reacción de las cargas individua
les se hace muy diverso y en las mediciones se debe llevar
consigo siempre un patrón. Para obtener mejores resultados
sería necesario un sustrato más uniforme, que proporcionase
resultados dignos de confianza en el desdoblamiento.

20 Un paso adelante en dirección a obtener un sustra
to más uniforme lo aportó la utilización de la maltopentaosa.
Esta es desdoblada por la α -amilasa en maltotriosa y mal
tosa la maltotriosa y la maltosa son transformadas por la -
 α -glucosidasa, en glucosa que luego puede ser determinada
25 según metodos cualesquiera desecados, por ejemplo con el co
nocido método de la hexoquinasa.

Además de la maltopenteosa también se propusieron

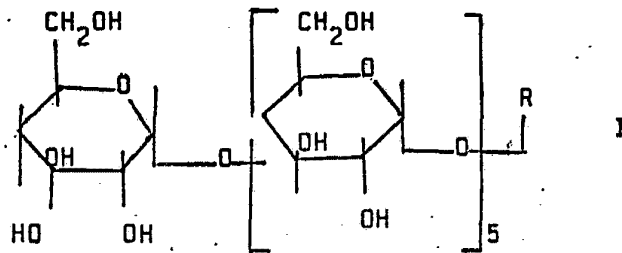
también ya como sustrato la maltotetraosa y la maltohexaosa (memorias de patente de los Estados Unidos 3.879.263 y 4.000.042). No obstante, en tal caso se obtuvieron con la tetraosa resultados claramente peores que con la pentaosa, y con la hexaosa resultados todavía peores que con la tetraosa. Así, para la maltoetraosa y la maltopentaosa se señala todavía una reacción estequiométrica, mientras que para la hexaosa ya se comprobaron desviaciones justamente todavía tolerables respecto de la reacción estequiométrica.

Una desventaja de la maltopentaosa, que también se encontró en el caso de la tetraosa, consiste, sin embargo, en que aparece un considerable valor en vacío de reactivos, es decir que la reacción de medición ya se está desarrollando, antes de que se añada la muestra a determinar. A esto se agrega el hecho de que tampoco es constante este valor en vacío de reactivos en el caso de elevadas concentraciones de sustrato, sino que se modifica en más de 25 minutos, antes de que se alcance constancia de esta reacción secundaria. También se comprobó que el supuesto desdoblamiento diverso de la maltopentaosa por α -amilasa de páncreas y por α -amilasa de saliva que hubiera hecho posible una diferenciación, no existe en realidad (J. BC, 1.970, 245 3.917 hasta 3.927; J. Biochem. 51 p. XVIII 1.952).

Por lo tanto el invento se basa en la misión de crear un procedimiento para la determinación de la α -amilasa, en el cual se utilice un sustrato que tenga un mejor grado de pureza y de uniformidad que los sustratos conocidos,

sea fácilmente asequible y corresponda a los requisitos en lo que se refiere al valor en vacío sin suero, a la duración de la fase Lag o de marcha en vacío a la máxima actividad - alcanzable. Además debe poder realizarse una medición sencilla sin aparatos caros ni complicados y una idoneidad para medios de diagnósticos rápidos, tales como tiras de ensayo.

Esta misión se resuelve, de acuerdo con el invento, mediante un procedimiento para la determinación de α -amilasa por desdoblamiento enzimático de un sustrato para α -amilasa y medición de un producto de desdoblamiento, el cual procedimiento está caracterizado porque como sustrato se utiliza un compuesto de la fórmula general I



en la que R representa un grupo glucósido, fenilglucósido, mononitrofenilglucósido, dinitrofenilglucósido, sorbita o ácido glucónico.

Sorprendentemente se ha puesto de manifiesto que la maltoheptaosa posee propiedades superiores como sustrato para la α -amilasa, a pesar de que en el caso de las oligomaltosas ya propuestas para este fin, se comprobó desde la malto-

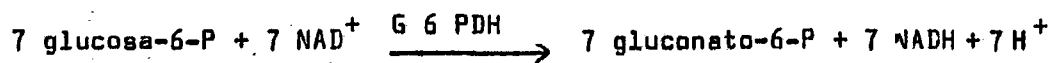
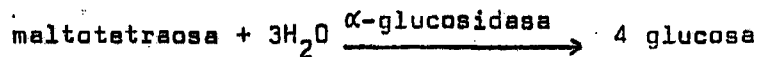
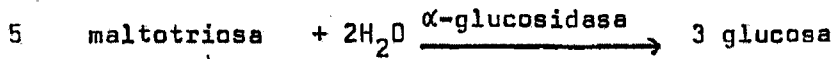
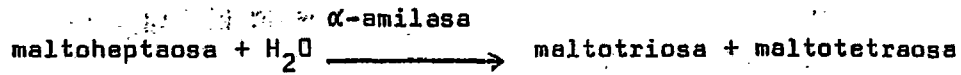
pentaosa a la maltohexaosa una esencial disminución de la idoneidad, dado que con ella se logran resultados esencialmente peores que con la pentaosa. Por lo tanto, hubiera sido de esperar que al prolongar aún más la cadena de maltosa-oligosacárido aparecieran errores que ya no fuesen tolerables. No obstante, sorprendentemente, se logran mejores resultados que con la pentaosa. Así, el valor en vacío de reactivos en el caso de 0,02 ml de muestra con maltopentaosa como sustrato es de 73%, mientras que con maltoheptaosa es sólo de 13%, referido al valor final de la determinación en el margen normal.

Además se encontró que en lugar de la maltoheptaosa propiamente dicha se pueden utilizar también determinados derivados de maltoheptaosa, que en al actuar la α -amilasa forman un producto de desdoblamiento derivatizado, que puede ser determinado de un modo especialmente ventajoso.

El procedimiento de acuerdo con el invento es especialmente idóneo en grado especial para la determinación de los productos de desdoblamiento mediante α -glucosidasa o maltosa-fosforilasa.

En el caso de la determinación con α -glucosidasa y un compuesto de la fórmula general I con R = glucósido se desdoblan adicionalmente los productos de desdoblamiento de la maltoheptaosa, maltotetraosa y maltotriosa para formar glucosa, y esta última es medida luego de manera en sí conocida. Para la medición de la glucosa formada se prefiere en tal caso, en presencia de la α -glucosidasa, especialmente el

procedimiento de la hexoquinasa. El principio de esta forma de realización del procedimiento según el invento puede reproducirse mediante las siguientes ecuaciones:



Para esta forma de realización del invento son especialmente idóneos también los derivados de maltoheptaosa utilizados de acuerdo con el invento, es decir los compuestos de la fórmula general I, en los cuales R no representa ningún grupo glucósido. En el caso de la acción de las dos enzimas α -amilasa y α -glucosidasa, el sustituyente, es decir un grupo fenilo, un grupo mononitrofenilo o dinitrofenilo, o el radical de sorbita o ácido glucónico en posición terminal, es separado y puede ser determinado con facilidad. Los grupos fenilo pueden encontrarse en posición α ó β . Si se trata de la posición α , la separación de éstos se efectúa mediante la acción de α -amilasa y α -glucosidasa solas y los fenoles, sustituidos o no sustituidos, separados, pueden ser determinados luego con facilidad mediante conocidas reacciones de color. No obstante, el invento puede aplicarse también en el caso de sustituyentes en posición β . En el último caso se utiliza de mg

do adicional, junto a la α -glucosidasa, también β -glucosidasa.

En el caso de los radicales dinitrofenilo, los dos grupos nitro pueden presentarse en una posición cualquiera, por ejemplo como sustituyentes 2,4-, 2,6- ó 3,5-.

Los nitrofenoles o dinitrofeniles que se liberan al separarse los sustituyentes que contienen grupos nitro son compuestos coloreados por sí mismos, que pueden ser determinados ópticamente sin más. Si se separa fenol propiamente dicho, éste puede ser determinado según métodos conocidos, por ejemplo por reacción con un agente nucleófilo, tal como 3-metil-6-sulfonil-benzotiazolona-hidrazona-(2) (HSK) en presencia de monofenoloxidasas. En el caso de esta reacción se forma un colorante rojo, que puede ser medido.

En el caso de separarse sorbita ésta puede ser oxidada, por ejemplo mediante sorbita-deshidrogenasa, para formar fructosa; al mismo tiempo se reduce la NAD presente para formar NADH. La formación de esta última puede ser determinada con facilidad de manera conocida en el espectrofotómetro de ultravioletas. Si no está disponible tal aparato, por reacción con una sal de tetrazolio tal como por ejemplo INT. (cloruro de 2-(para-yodofenil)-3-(para-nitrofenil)-5-fenil-tetrazolio) en presencia de diaforasa u otro transmisor de electrones se puede formar también un formazano coloreado, que puede ser medido en el margen visible.

De modo análogo el ácido glucónico liberado se puede determinar según los métodos conocidos para ello, por -

ejemplo con gluconato-quinasa, ácido 6-fosfogluconico-des
hidrogenasa y NADP, así como eventualmente sal de tetrazo-
lio y transmisor de electrones.

Para la realización del procedimiento según el in-
5 v_{ento} son apropiados en general valor de pH entre 5 y 9. Pre-
ferentemente se trabaja con valores de pH entre 7 y 7,5, ya
que en tal caso se obtienen los mejores resultados y el tiem-
po de reacción más corto. Si se emplean según el invento com-
puestos nitrofenílicos, el margen de los valores de pH bien
10 apropiados es algo más estrecho y se encuentra en general -
entre pH 6 y pH 8,5.

Como tampones son apropiados los que son activos
dentro del margen principal de actividad de las enzimas em-
pleadas. Preferentemente se emplean tampones de fosfato, -
15 HEPES (N-(2-hidroxietil)-piperazin-N-ácido 2-etanosulfónico)
y glicilglicina. Concentraciones preferidas se encuentran en-
tre 10 y 200 milimoles/litro (= mMol/l).

La α -glucosidasa se emplea en general en cantida-
des entre 0,1 y 5.000 unidades/ml (U/ml). Una ventaja espe-
20 cial del procedimiento según el invento consiste en que pug-
dan utilizarse cantidades relativamente grandes de esta en-
zima, por lo que el desdoblamiento con α -amilasa es la etapa
determinante de la velocidad. Naturalmente, también es posi-
ble emplear cantidades todavía mayores de esta enzima, pero
25 con ello no se logran ningunas ventajas adicionales.

Los compuestos de la fórmula general I, utilizados
de acuerdo con el invento, son empleados en el ensayo en cen-

tidades entre 0,1 y 250 mMol/l. Se prefieren cantidades entre 0,5 y 100 mMol/l.

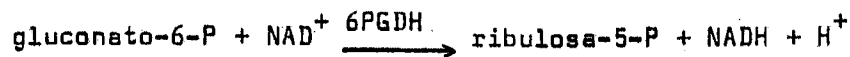
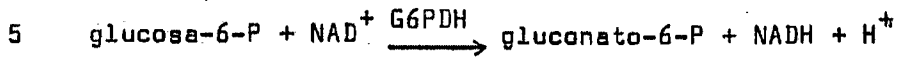
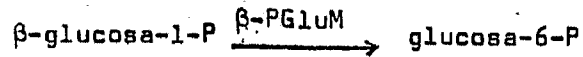
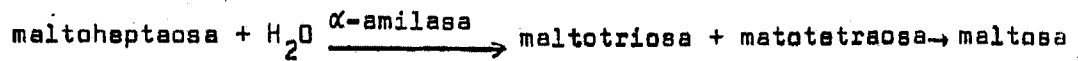
La saturación del sustrato para la α -amilasa con maltoheptaosa se presenta con una concentración de 8 a 10 milimoles. Convenientemente se utiliza por lo tanto una concentración mínima de 8 milimoles de maltoheptaosa, caso de que deba trabajarse en condiciones de saturación del sustrato, lo cual ocurre en general.

Además se añade convenientemente un agente activador para la α -amilasa. Tales agentes activadores son conocidos. Se prefiere cloruro sódico o cloruro potásico.

En otra forma preferida de realización del procedimiento del invento, la determinación de los productos de desdoblamiento se efectúa por reacción con maltosa-fosforilasa con formación de glucosa-1-fosfato, que luego es determinado de manera en sí conocida. De acuerdo con una forma de realización especialmente preferida, la determinación del glucosa-1-fosfato se realiza por conversión en glucosa-6-fosfato mediante β -fosfo-glucosa-mutasa, oxidación del glucosa-6-fosfato formado con NAD en presencia de glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa con formación de gluconato-6-fosfato y NADH, pudiéndose vigilar fácilmente por medios fotométricos la formación de esta última. La señal de medición puede ser amplificada aún más mediante oxidación adicional con NAD en presencia de 6-fosfogluconato-deshidrogenasa con formación de ribulosa-5-fosfato y otra molécula de NADH.

El principio de esta forma de realización lo repr

ducen las siguientes ecuaciones:



Una ventaja de esta forma de realización del inven-
to consiste en que la maltosa-fosforilasa es más específica
que la α -glucosidasa y por lo tanto no perturba la glucosa
10 endógena.

En lo que se refiere al tampón es válido de igual
modo lo que se ha dicho con respecto a la forma de realiza-
ción del procedimiento de acuerdo con el invento con el pro-
cedimiento de α -glucosidasa.

15 Aparte de las dos formas de realización arriba ex-
puestas del procedimiento según el invento, la determinación
de las fracciones formadas de la maltoheptaosa, es decir mal-
totetraosa maltotriosa, y de la maltosa formada a partir de
ellas, puede efectuarse también según otros métodos conoci-
20 dos para ello.

Los derivados de maltoheptaosa utilizados de acuer-
do con el invento pueden ser preparados según diferentes mé-
todos. Si se trata de los derivados fenilados, se pueden apli-
car métodos tanto químicos como también enzimáticos. La sín-

tesis química se basa principalmente en la reacción de malto heptaosa peracetilada con el correspondiente fenol en presencia de un catalizador de Friedel-Crafts. Este método es apropiado tanto para fenol propiamente dicho como también para mononitrofenol y dinitrofenol. Alternativamente, también es posible preparar primero el derivado fenílico y nitrar seguidamente a éste, por ejemplo con el procedimiento descrito en Bull. Chem. Soc. Japan 34, (1961) 718. Este método es apropiado especialmente para el derivado mononitrado, pudiéndose llevar a cabo en ciertos casos una separación de los derivados orto- y para-nitrofenílicos.

Preferiblemente esta reacción se lleva a cabo por fusión o ebullición a reflujo en un disolvente no polar con $ZnCl_2$, $SnCl_4$ ó $TiCl_4$ como catalizador Friedel-Crafts. Después de la introducción del fenol o nitrofenol, los grupos protectores son separados de manera en sí conocida, por ejemplo con metilato de sodio, amoníaco, KOH o metóxido de bario, - en cada caso en solución metanólica, con solución acuosa de hidróxido de bario, etc.

La preparación enzimática de los derivados fenílicos se efectúa por transglucosidación del fenilglucósido o de los correspondientes fenilglucósidos nitrados con α -ciclodextrina, amilasa o almidón soluble, en presencia de una transferasa microbiana específica. Preferentemente se utiliza para ello una transferasa a base de *Bacillus macerans*. En tal caso se puede utilizar para esta transglucosidación la conocida amilasa de *Bacillus macerans* (E.C. 2.4.1.19).

DSM 24; aislamiento: J.A. de Pinto, L.L. Campbell, Biochemistry
7, (1968) 114; reacción de transferencia: Methods in Carbohydr.
Chemistry, Vol.II, 347), la cual, además de su efecto hidro-
lítico y ciclizante, tiene evidentemente también una activi-
5 dad transferidora de glucosilo.

El compuesto de fórmula I, en que R representa un
radical sorbita, puede ser preparado en condiciones suaves a
partir de la maltoheptaosa por reducción con borohidruro de
sodio (NaBH_4).

10 Finalmente, el compuesto de fórmula I, en que R re-
presenta un grupo de ácido glucónico, puede ser preparado --
químicamente o enzimáticamente a partir de maltoheptaosa se-
gún los métodos conocidos para la preparación de ácido glucó-
nico, por ejemplo por oxidación con bromo (methods in Carbohydr.
15 Chemistry, Vol.II, 13).

Tal como ya se ha mencionado, por medio del inven-
to no sólo se crea un procedimiento rápido y específico para
la determinación de la α -amilasa sino que además se elimina
especialmente de modo total o amplio la fase Lag, lo cual es
20 especialmente importante en el caso de la aplicación del pro-
cedimiento a máquinas analizadoras automáticas. Además de -
ello, el procedimiento de acuerdo con el invento puede lle-
varse a cabo para la evaluación en muchas formas de realiza-
ción, sin aparatos complicados y por consiguiente es apropi-
25 do especialmente para diagnósticos rápidos y para la determi-
nación óptica en el margen visible. Al mismo tiempo, en las
diferentes formas de realización del procedimiento de acuer-

do con el invento se puede determinar también con aparatos
medidores de ultravioletas. Otras ventajas las constituyen
la estricta proporcionalidad y la ausencia de perturbaciones
por componentes constitutivos de la sangre, químicamente -
5 afines.

Los sustratos empleados de acuerdo con el invento
son accesibles bien y con elevada pureza. Un sencillo pro-
cedimiento para la preparación de la maltoheptaosa está des-
crito en la solicitud de patente alemana P 27 41 191.2. El
10 procedimiento es apropiado para la determinación de la α -ami-
lase en líquidos biológicos, tales como suero, plasma con -
heparina, orina y similares, o en otros materiales líquidos
o sólidos.

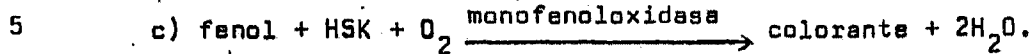
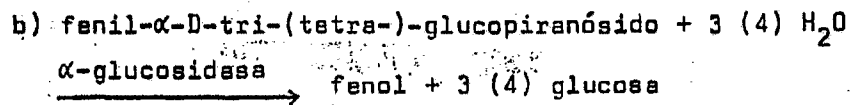
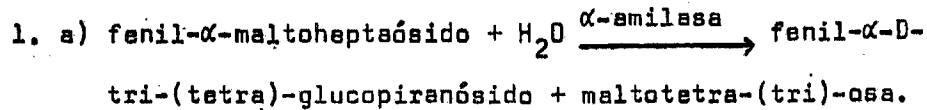
Los siguientes ejemplos explican el invento.

15 EJEMPLO 1

Detección de α -amilasa con fenil- α -maltoheptaósido
como sustrato.

El fenil- α -maltoheptaósido es desdoblado por la -
 α -amilasa en fenil- α -maltotriida o -tetraida, que se hacen
20 reaccionar mediante α -glucosidasa para formar fenol y gluco-
sa. El fenol liberado es copulado mediante monofenol-oxidasa,
de manera oxidante, con el reactivo nucleófilo 3-metil-6-sul-
fonil-benzotiazolon-hidrazona-(2) (HSK) para formar un colo-
rante rojo, cuya velocidad de formación es proporcional a la
25 actividad de amilasa en la muestra y puede ser vigilada foto-
métricamente.

Principio de ensayo:



Condiciones de medición: 25°C, longitud de onda de medición 492 nm, celdas de 1 cm; la composición de reactivos la muestra la siguiente tabla.

T A B L A

10	Reactivos	Concentración en el ensayo
	Tampón de fosfato, pH 7,4	0,05 Mol/l
	Cloruro de sodio	0,05 Mol/l
	Fenil- α -D-maltoheptaósido	10 mMol/l
	HSK	1 mMol/l
15	Monofenoloxidasas	1 U/ml
	α -glucosidasa	10 U/ml

Volumen de ensayo: 2,0 ml

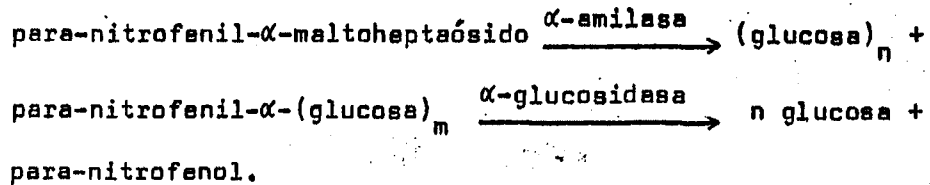
En lugar de tampón de fosfato se manifiestan también como útiles los tampones de glicina, glicilglicina, Hepes,

20 Tris, Tra y otros.

EJEMPLO 2

Determinación de α -amilasa con para-nitrofenil-maltoheptaósido.

Principio de ensayo



5 Después del desdoblamiento del maltoheptaósido los productos de desdoblamiento son degradados para formar glucosa y para-nitrofenol. El anión para-nitrofenolato está coloreado de amarillo en solución alcalina y por lo tanto puede ser medido ópticamente de modo directo.

10 Sistema de ensayo:

Mezcla de reacción: 50 mMol/l de tampón de fosfato, pH 7,4;
50 mMol/l de cloruro de sodio;
5 hasta 50 u/ml de α -glucosidasa;
5 ó 10 mMol/l de para-nitrofenil- α -maltoheptaósido.

15 Carga de ensayo:

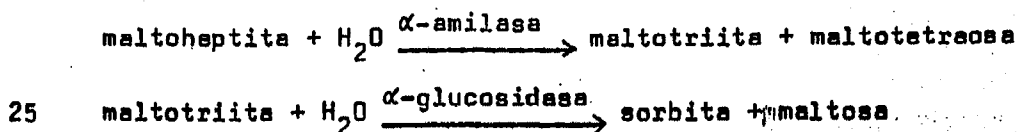
1 ml de mezcla de reacción + 50 μ l de muestra (suero);
temperatura 30°C;
longitud de onda: 405 nm.

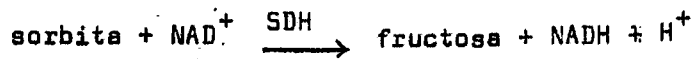
Comienzo con suero después de alcanzarse la temperatura de
20 medición (incubación previa durante 10 minutos);

EJEMPLO 3

Determinación de α -amilasa con maltoheptite.

Principio de ensayo:





SDH = sorbita-deshidrogenasa.

6 Sistema de ensayo:

	Carga de reacción	ml	Concentración en el ensayo
	Tampón de Na-/K-PO ₄ 0,02 Mol/l	1,92	12,8 mMol/l PO ₄
	+ Triton X100 2 ml/100 ml		6,4 mMol/l
	+ NaCl 10 mMol/l, pH 6,9		
10	MgCl ₂ 0,3 Mol/l	0,01	1,0 mMol/l
	Maltoheptita 100 mMol/l	0,10	3,3 mMol/l
	NAD c = 40 mg/ml	0,05	1,0 mMol/l
	INT c = 0,6 mg/ml	0,20	0,09 mMol/l
15	Diaforasa (Clostr.Kluyveri) 5 mg/ml ⁺	0,05	167 U/l
	ATP c = 50 mg/ml	0,10	3,29 mMol/l
	Hexoquinasa 280 U/ml ⁺	0,05	4666 U/l
	SDH 180 U/ml ⁺	0,30	18000 U/l
	α-glucosidasa 1120 U/ml ⁺	0,20	74670 U/l
20	Muestra (suero)	0,02	

+ en tampón de ensayo

Comienzo mediante adición de muestra: la medición se efectúa a 492 nm; temperatura 25°C.

EJEMPLO 4

25 Determinación de α-amilasa con ácido maltoheptaglu cónico.

Principio de ensayo:

ácido maltoheptaglucónico + H₂O $\xrightarrow{\alpha\text{-amilasa}}$ ácido maltotrioglucónico + maltotetraosa

ácido maltotrioglucónico + H₂O $\xrightarrow{\alpha\text{-glucosidasa}}$ ácido glucónico + maltosa

5 ácido glucónico + ATP $\xrightarrow{\text{gluconatoquinasa}}$ ácido glucónico-6-P + ADP

ácido glucónico-6-P + NADP⁺ $\xrightarrow{\text{ácido 6-fosfogluconico-deshidrogenasa tibulosa-5-P + NADPH + CO}_2 + \text{H}^+}$

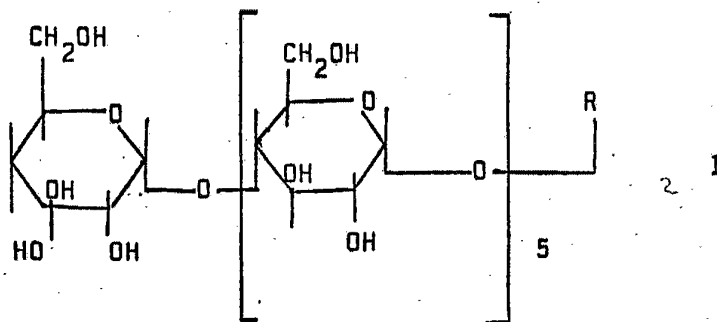
Sistema de ensayo:

	Carga de reacción	ml	concentración en el ensayo
10	Tamón de Na-/K-PO ₄ 0,02 Mol/l	2,19	14,6 mMol/l de fosfato
	+ NaCl 10 mMol/l, pH 6,9		7,3 mMol/l de NaCl
	MgCl ₂ 1 mol/l	0,01	3,3 mMol/l
15	Ácido maltoheptaglucónico 150 mMol/l	0,10	5 mMol/l
	NADP c = 10 mg/ml	0,10	0,38 mMol/l
	ATP c = 50 mg/ml	0,10	2,7 mMol/l
	Gluconatoquinasa 40 U/ml	0,03	1066 U/l
20	Acido 6-fosfogluconico-deshidrogenasa 24 U/ml	0,10	800 U/l
	α -glucosidasa 1120 U/ml	0,30	11,2 x 10 ⁴ U/l
	Muestra (suero)	0,02	

Comienzo mediante adición de muestra, la medición se efectúa a 340 nm ó 365 nm, temperatura 25°C, volumen de ensayo 3,00 ml.

- REIVINDICACIONES -

1.- Procedimiento para la determinación de α -amilasa por desdoblamiento enzimático de un sustrato para α -amilasa y medición de un producto de desdoblamiento, caracteriza
 5 do porque en calidad de sustrato se utiliza un compuesto de la fórmula general I



en la que R representa un grupo glucósido, fenilglucósido, mononitrofenilglucósido, dinitrofenilglucósido, sorbita o
 10 ácido glucónico.

2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque los productos de desdoblamiento son transformados mediante α -glucosidasa en glucosa y ésta es determinada de manera en sí conocida.

15 3.- Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado porque se trabaja a valores de pH entre 5 y 9.

4.- Procedimiento según las reivindicaciones 2 ó 3 caracterizado porque se emplean 0,1 a 250 milimoles/litro de compuesto de fórmula I.

20 5.- Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque en el caso de un susti

tuyente en posición β en el radical azucar del grupo R se utiliza adicionalmente β -glucosidasa.

6.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque los productos de desdoblamiento son hechos reaccionar con maltosa-fosforilasa con formación de glucosa-1-fosfato y este último es determinado.

7.- Procedimiento según la reivindicación 6, caracterizado porque para la determinación del glucosa-1-fosfato formado, éste es transformado con fosfoglucomutasa en glucosa-6-fosfato y con este último se reduce NAD en presencia de glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa para formar NADH, que es medida.

8.- Procedimiento según una de las precedentes reivindicaciones, caracterizado porque, cuando R representa un grupo fenilglucósido, se determina el fenol separado con 3-metil-6-sulfonil-benzotiazolon-hidrazona-(2) en presencia de monofenoloxidasa.

9.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque, cuando R representa un grupo sorbita, se determina la sorbita separada con sorbita-deshidrogenasa y NAD.

10.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque, cuando R representa un grupo de ácido glucónico, se determina el ácido glucónico separado con gluconato-quinasa, ácido 6-fosfogluconico-deshidrogenasa y NADP.

11.- Procedimiento según las reivindicaciones 9 ó

10, caracterizado porque en el caso de la reducción de NAD se hace reaccionar el NADH formado con una sal de tetrazolio en presencia de un transmisor de electrones para formar el formazano, y este último es determinado.

5 12.- Procedimiento según la reivindicación 11, caracterizado porque como transmisor de electrones se utiliza diforasa o metosulfato de fenazina.

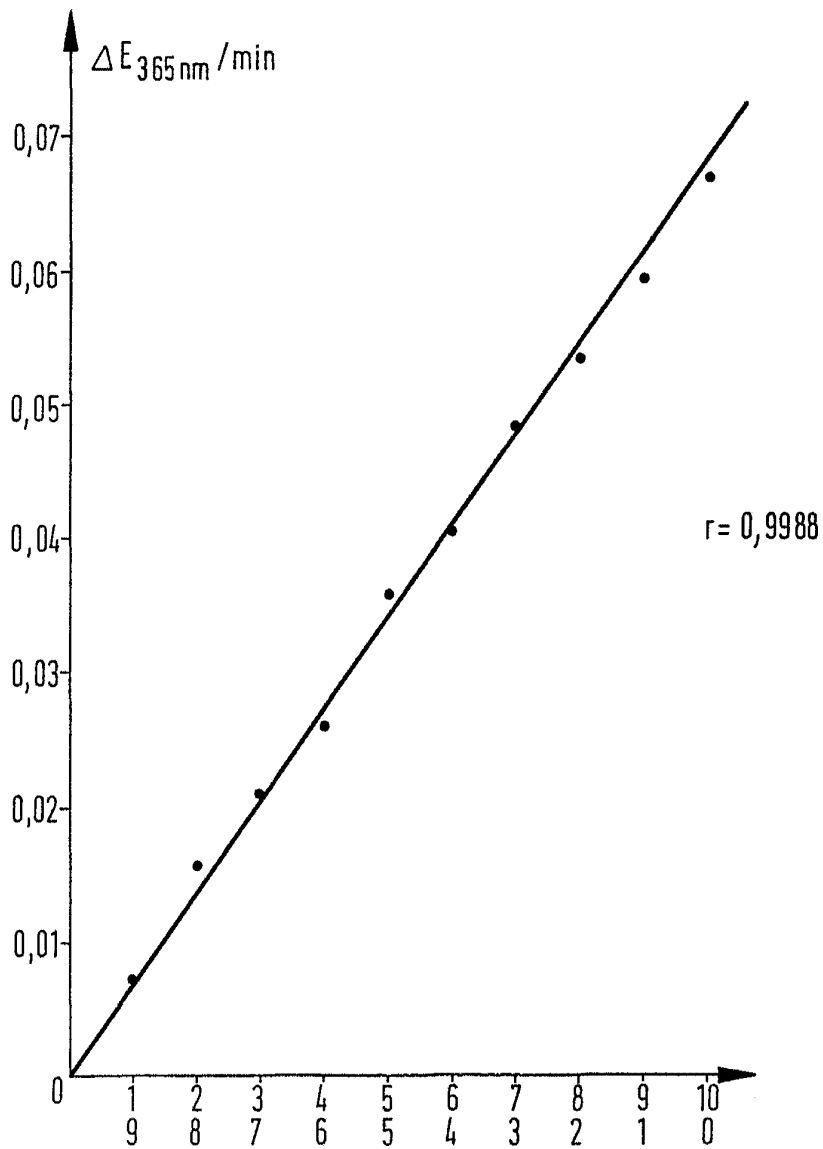
13.- "PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACION DE α -AMILASA".

10 Tal como se describe y reivindica en la presente Memoria Descriptiva que consta de diecinueve hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 13 SEP. 1978

J. J. J.
el

Fig.1



Escala variable

Madrid, 13 Septiembre 1978