

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

REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL



ESPAÑA

MICROFILMADO

MICROFICHAS

PATENTE DE INVENCION

1 SET. 1980

ES	11	NUMERO	482.455/5	A1
	21			
	22	FECHA DE PRESENTACION	12-7-79	

50 PRIORIDADES:	52 FECHA	53 PAIS
51 NUMERO		
924,528	13-7-78	Estados Unidos
CADUCADO		

47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C12K 1/00	

64 TITULO DE LA INVENCION
UN METODO DE DETERMINACION DE TRIGLICERIDOS EN FLUIDOS BILOGICOS MEDIANTE UNA REACCION ENZIMATICA.

71 SOLICITANTE (ES)
AMERICAN HOSPITAL SUPPLY CORPORATION

DOMICILIO DEL SOLICITANTE
One American Plaza - Evanston, Illinois 60201 - ESTADOS UNIDOS

72 INVENTOR (ES)
John C. Mazza, el cual ha cedido sus derechos para España a la entidad solicitante.

73 TITULAR (ES)

74 REPRESENTANTE
D. BERNARDO UNGRIA GOIBURU

1

RESUMEN DE LA INVENCION

Un método de determinación de triglicéridos en fluidos biológicos mediante una reacción enzimática. En la reacción, se agrega un fluido biológico a un reactivo enzimático constituido por una lipasa, glicerol-deshidrogenasa (GDH), piridin-nucleótido (PN), un tampón, un compuesto de tetrazolio y una diaforasa, con lo que los triglicéridos son enzimáticamente hidrolizados y el glicerol resultante es oxidado para formar un piridin-nucleótido (PN) reducido que reacciona con el compuesto de tetrazolio, en presencia de la diaforasa, para producir un formazano coloreado que es la forma reducida del tetrazolio, cuyo color se mide a una longitud de onda que oscila aproximadamente entre 475 y 325 nm. La lipasa es un enzima obtenido a partir de Chromobacterium viscosum. En el reactivo enzimático, hay presentes alrededor de 5,0 a 15,0 U.I./ml de la glicerol-deshidrogenasa (GDH).

10

15

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

20

Esta invención se refiere a un método de determinación de triglicéridos en fluidos biológicos de acuerdo con una reacción enzimática y a un reactivo para dicho método.

25

Existe la necesidad de determinar los triglicéridos del suero desde que hubo indicios que indicaban la existencia de una relación entre el metabolismo de las grasas y trastornos tales como aterosclerosis, diabetes, hipertensión y mayor riesgo de infarto de miocardio.

30

El primer procedimiento directo para la determinación de los triglicéridos fué publicado en 1957 por E. Van Handel y D.B. Zilversmit (J.Lab. and Clin.Med. (1957) 50, n° 1, pág. 152). En este procedimiento se utilizan disolventes

1 orgánicos para extraer los triglicéridos del suero y adsor-
ción en fase sólida para separar los fosfolípidos que inter-
fieren. Los triglicéridos extraídos son saponificados con
5 KOH, liberándose glicerol. El glicerol es oxidado con peryo-
dato a formaldehído. Este es condensado con un ácido cromo-
trópico para formar un complejo coloreado. Este procedimien-
to básico ha sido modificado pero, en todas las modificacio-
nes, la química y el método de este sistema han permanecido
esencialmente inalterados.

10 En 1966, M. Eggstein (Klin. Wochenschr 44 (1966),
págs. 262-266) introdujo un método parcialmente enzimático
para determinar los triglicéridos del suero. En el método de
Eggstein, el glicerol liberado del triglicérido saponificado
es fosforilado con adenosin-trifosfato (ATP) en presencia de
15 un sistema regenerador de ATP, sostenido por fosfoenol-piru-
vato que se degrada a piruvato. La reducción posterior del
piruvato a lactato mediante nicotinamido adenin-dinucleótido
reducido (es decir, NADH) es seguida espectrofotométricamen-
te y está directamente relacionada con la concentración de
20 glicerol.

En 1973, G. Bucolo y H. David (Clin.Chem. 19, (1973),
págs. 476-482) introdujeron un procedimiento totalmente en-
zimático para la determinación de los triglicéridos del
suero. En su método, la saponificación alcalina es sustituí-
da por una hidrólisis enzimática:



El glicerol liberado por hidrólisis enzimática reac-
ciona por el método de Eggstein. Este método constituye una
25 clara mejora sobre los métodos puramente químicos y parcial-

30

1 mente enzimáticos pero deja mucho que desear por las siguientes razones:

- (a) la presencia de blancos internos;
- (b) la inestabilidad de los reactivos reconstituídos y
- 5 (c) la necesidad de rígidas secuencias cronométricas.

Se han realizado varios intentos para resolver los inconvenientes del método de Bocolo y David. Entre éstos se encuentran una reacción enzimática como la descrita en la patente francesa 2.314.497. En esta patente francesa, se describen métodos enzimáticos para la determinación del glicero-
10 l que ha sido separado por hidrólisis de los triglicéridos, mediante la reacción de una solución de lipasa de Rhizopus Delemar y α -crimotripsina. El glicerol implica la reducción de NAD por glicerol y utiliza un solo enzima, glicero-
15 l-deshidrogenasa (GDH), o dos enzimas, glicerol-kinasa (GK) y glicerol-3-fosfato-deshidrogenasa (GPDH). En ambos métodos, la reacción produce nicotinamido adenin-dinucleótido reducido (es decir, NADH) cuya cantidad es proporcional a la del glicerol.

20 El principal objetivo de la patente francesa es proporcionar un método de determinación del glicerol que permite el análisis cuantitativo a la luz visible.

Por lo tanto, todavía continúa la necesidad de una reacción enzimática específica, fiable, para determinar los triglicéridos en los fluidos biológicos. Esta necesidad es satisfecha por el método de esta invención descrito a continuación.

COMPENDIO DE LA INVENCION

30 El método de determinación de triglicéridos en fluidos biológicos de esta invención se realiza mediante una reacción

1 enzimática. En esta reacción, se agrega un fluido biológico
a un reactivo enzimático que comprende una lipasa, glicerol-
deshidrogenasa (GDH), piridin-nucleótido (PN), un tampón,
5 un compuesto de tetrazolio y diaforasa, con lo que los tri-
glicéridos son enzimáticamente hidrolizados, y el glicerol
resultante es oxidado para formar un piridin-nucleótido (PN)
reducido que reacciona con el compuesto de tetrazolio, en
presencia de la diaforasa, para producir un formazano coloreado
10 cuyo color se mide a una longitud de onda comprendida aproxima-
damente entre 475 y 525 nm.

La lipasa es un enzima obtenido a partir de
Chromobacterium viscosum. En el reactivo enzimático, hay pre-
sentes alrededor de 5,0 a 15,0 U.I./ml de la glicerol-deshi-
drogenasa (GDH).

18

DESCRIPCION DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

Esta invención emplea un reactivo que contiene enzimas,
un compuesto de tetrazolio y un piridin-nucleótido (PN) para
determinar los triglicéridos en los fluidos biológicos.

20

De acuerdo con la realización preferida, el método de
determinación de los triglicéridos se realiza mediante una
reacción enzimática donde se agrega un fluido biológico y
se hace reaccionar con el reactivo enzimático.

25

El fluido biológico puede ser cualquier fluido que
contenga triglicéridos, tal como un suero.

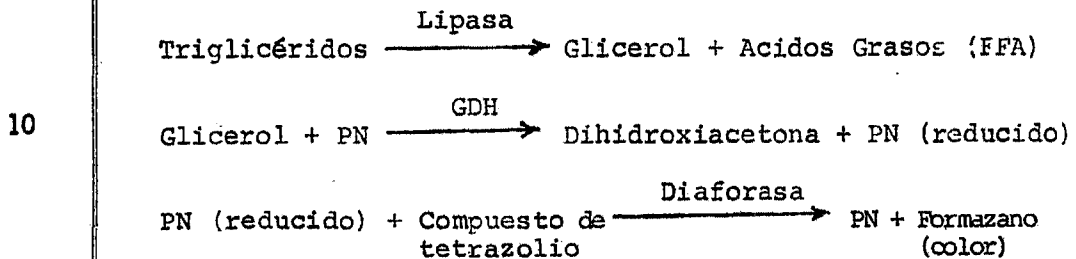
El reactivo enzimático contiene una lipasa, glicerol-
deshidrogenasa (GDH), piridin-nucleótido (PN), un tampón,
un compuesto de tetrazolio y diaforasa.

30

En la reacción del fluido biológico con el reactivo
enzimático, los triglicéridos son enzimáticamente hidroliza-
dos y el glicerol resultante es oxidado para formar un piri-

1 din-nucleótido (PN) reducido que reacciona con el compuesto
de tetrazolio , en presencia de diaforasa, para producir un
formazano coloreado. El color es medido a una longitud de
5 onda comprendida entre 475 y 525 nm aproximadamente, siendo
la longitud de onda preferida alrededor de 505 nm.

La secuencia de la reacción enzimática global es la
siguiente:



15 La función de la lipasa en el reactivo enzimático es
hidrolizar los triglicéridos a ácidos grasos (FFA) y glice-
rol. Los triglicéridos, de acuerdo con esta invención, de-
ben ser completamente hidrolizados.

La lipasa puede estar seleccionada entre las siguientes:

- Lipasa de lipoproteína (LPL)
- Lipasa pancreática porcina
- 20 Lipasa de Rhizopus arrhizus
- Lipasa de Candida cylindracea
- Lipasa de Pseudomonas

25 No obstante, la lipasa preferida para hidrolizar los
triglicéridos es la lipasa de lipoproteínas (LPL) que es
un enzima obtenido de Chromobacterium viscosum.

La cantidad de lipasa presente en el reactivo enzimá-
tico oscila aproximadamente entre 100 y 300 U.I./ml, siendo
la cantidad preferida alrededor de 200 U.I./ml.

30 La glicerol-deshidrogenasa (GDH) es el componente más
crítico del reactivo enzimático. En la reacción, la glicero-

1 deshidrogenasa (GDH) separa un hidrógeno del glicerol y simultáneamente convierte el piridin-nucleótido (PN) en su forma reducida.

5 La glicerol-deshidrogenasa (GDH) es un enzima obtenido a partir de Enterobacter aerogenes. La cantidad de glicerol-deshidrogenasa (GDH) en el reactivo enzimático puede oscilar aproximadamente entre 5,0 y 15,0 U.I./ml, siendo la cantidad preferida alrededor de 10,0 U.I./ml.

10 El piridin-nucleótido que ha dado los mejores resultados en la reacción enzimática es el nicotinamido-adenin-dinucleótido (NAD).

15 El nucleótido (NAD) oxida al glicerol producido por hidrólisis de los triglicéridos. El glicerol es oxidado por el nicotinamido-adenin-dinucleótido (NAD) en presencia de glicerol-deshidrogenasa (GDH) para formar la forma reducida del nicotinamido-adenin-dinucleótido (es decir, NADH) y dihidroxiacetona.

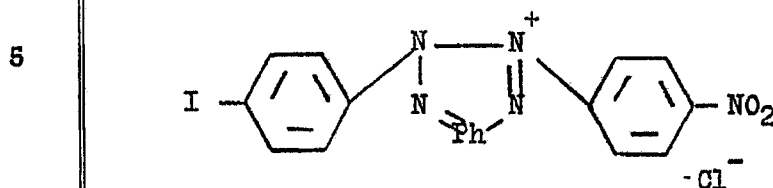
20 El NAD reducido formado (es decir, NADH) reacciona con el compuesto de tetrazolio en presencia de diaforasa para formar un compuesto coloreado. Por lo tanto, en la reacción enzimática, el nucleótido, es decir el compuesto NAD, es un portador de hidrógeno necesario entre el glicerol y el compuesto de tetrazolio.

25 La concentración del nicotinamido-adenin-dinucleótido (NAD) en el reactivo enzimático oscila aproximadamente entre 2,5 y 5,5 mg/ml. La concentración preferida de NAD es 2,5 mg/ml.

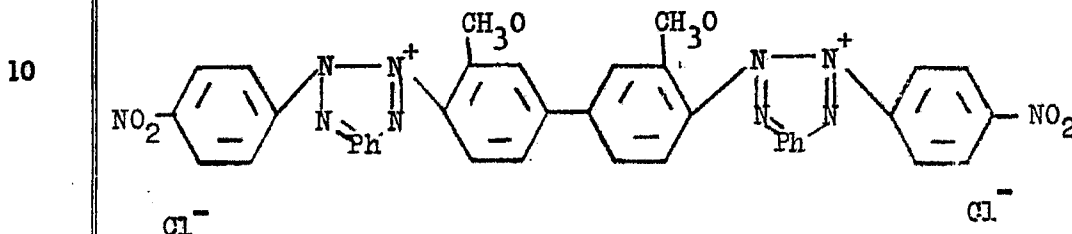
30 El compuesto de tetrazolio contenido en el reactivo enzimático puede ser cloruro de yodofenilnitrofeniltetrazolio (INT) o cloruro de nitroazultetrazolio (NBT). Los

1 compuestos de tetrazolio tienen las siguientes fórmulas es-
2 tructurales:

3 Cloruro de yodofenilnitrofeniltetrazolio (INT)



10 Cloruro de nitroazultatrazolio (NBT)



15 El compuesto de tetrazolio se reduce a un formazano rojo cuando reacciona con el NAD reducido (es decir, NADH). El formazano rojo absorbe luz a una longitud de onda de unos 505 nm.

20 El compuesto de tetrazolio preferido es el cloruro de yodofenilnitrofeniltetrazolio debido a que es el que tiene mayor potencial reductor negativo. La concentración del compuesto de tetrazolio oscila aproximadamente entre 0,45 y 1,35 mg/ml, siendo la concentración preferida alrededor de 0,90 mg/ml.

25 El enzima diaforasa cataliza la oxidación del nicotinamido-adenin-dinucleótido (NAD) reducido, es decir NADH, a NAD y por lo tanto, reduce el compuesto de tetrazolio (es decir INT) a un formazano coloreado.

30 La cantidad de diaforasa en el reactivo enzimático puede oscilar aproximadamente entre 15,0 y 45,0 U.I./ml, siendo la cantidad preferida para una actividad óptima alrededor de

1 28,5 U.I./ml.

La diaforasa es el enzima obtenido a partir de Clostridium kluyveri.

5 Los enzimas (es decir, lipasa, GDH y diaforasa) del reactivo enzimático tienen cada uno de ellos un pH óptimo individual. El pH del sistema enzimático debe ser tal que todos los enzimas funcionen eficientemente, formando un reactivo con buena sensibilidad. Así, el pH del reactivo oscila aproximadamente entre 6,4 y 8,0, siendo el pH preferido alrededor de 7,6.

10 En el reactivo enzimático puede utilizarse cualquier tampón adecuado que sea eficaz en la región de pH citada (es decir, 6,4 a 8,0). Un tampón eficaz es el fosfato potásico. Otros tampones que pueden ser utilizados son tampón de trietanolamina, el tampón Tris, el tampón de imidazol y el tampón de bicina.

15 De acuerdo con esta invención, se agrega manganeso a la glicerol-deshidrogenasa (GDH) para aumentar su especificidad de reacción. El manganeso que puede agregarse a la glicerol-deshidrogenasa (GDH) tiene una concentración que oscila aproximadamente entre 0,05 y 0,15 mM en el substrato líquido. La concentración preferida de manganeso con la glicerol-deshidrogenasa es alrededor de 0,10 mM.

25 En la hidrólisis de los triglicéridos puede utilizarse un diluyente tal como soluciones de Triton X-100, un agente tensoactivo (fabricado por Rohm and Haas Co., Filadelfia, Pensilvania). El Triton X-100 es un alquil-aril-poliéter-alcohol que se utiliza para reducir la turbidez de la reacción. El Triton X-100 reduce la turbidez al solubilizar a los ácidos grasos liberados durante la hidrólisis de los triglicéridos.

30

1 glicéridos producida por la lipasa.

La adición de solamente un 0,5 % en volumen de Triton X-100 por volumen de agua reduce los blancos debidos a la turbidez en un 1800 %. Sin embargo, la cantidad máxima de Triton X-100 es alrededor de 2,0 % ya que el nivel de turbidez medido a 660 nm es 0 en presencia de 2 % de Triton X-100.

5 En el diluyente se incluye con el Triton X-100 un ácido como el HCl para interrumpir la reacción por desnaturalización de los enzimas. El ácido también sirve para solubilizar al formazano. Se ha hallado que todas las concentraciones de ácido interrumpen la reacción y producen un color final estable. La concentración de HCl puede oscilar entre 0,01 y 0,20 mM aproximadamente. La concentración preferida de HCl es alrededor de 0,1 mM.

10 El siguiente ejemplo ilustra la presente invención:

EJEMPLO

Procedimientos enzimáticos para la determinación de triglicéridos

15 Para evaluar la eficacia del presente procedimiento enzimático, se han comparado las características y las etapas de este método con las de otros procedimientos enzimáticos. Este método ha sido comparado con los métodos descritos en:

20 (A) Calbiochem, patente estadounidense 3.703.591, concedida el 21 de Noviembre de 1972

(B) Boehringer Mannheim GmbH, patente estadounidense 3.862.009, concedida el 21 de Enero de 1975 y

(C) Dow Chemical Co., patente estadounidense 4.001.089, concedida el 4 de Enero de 1977.

25 Las características y etapas de los procedimientos en-

1 zimáticos están registradas en la siguiente tabla:

TABLA

Procedimientos enzimáticos para la determinación de triglicéridos

5	<u>Características</u>	<u>Método de esta invención</u>	<u>Calbiochem (A)</u>
10	DESCRIPCION DEL PRODUCTO	Tri-ES	Reactivo triglicéridos-glicerol
	MIDE EL ENSAYO	Glicerol endógeno	Glicerol endógeno
	NUMERO DE ENSAYOS	95	50
	PRINCIPIO DE REACCION	<p>Lipasa</p> <p>Tri $\xrightarrow{\hspace{1cm}}$ Gli + FFA</p> <p>Gli + NAD $\xrightarrow{\hspace{1cm}}$ dihidroxi-acetona + NADH</p> <p>Diaforasa</p> <p>NADH + INT $\xrightarrow{\hspace{1cm}}$ NAD + formazano</p>	<p>Lipasa</p> <p>Tri $\xrightarrow{\hspace{1cm}}$ Gli+FFA</p> <p>GK</p> <p>Gli + ATP $\xrightarrow{\hspace{1cm}}$ αGP + ADP</p> <p>PK</p> <p>ADP + PEP $\xrightarrow{\hspace{1cm}}$ ATP + Pi</p> <p>LDH</p> <p>Pi + NADH $\xrightarrow{\hspace{1cm}}$ Lac + NAD</p>
15	TAMAÑO DE LA MUESTRA	20 μ l	50 μ l
	PREPARACION DEL REACTIVO	1 - Reconstituir el substrato	3 - Reconstituir la lipasa, agregar al vial de substrato reconstituido. Reconstituir la glicerol-kinasa
20	ESTABILIDAD RECONSTITUIDA	Substrato 72 h. a 4°C	Todos los reactivos preparados 24 horas a 2-8°C
	NUMERO DE REACTIVOS	2 + patrón	3
	PIPETEADOS	3	3
	EXTRACCIONES	ninguna	ninguna
25	TIEMPO/TEMPERATURA DE INCUBACION	1 para 20 minutos a 37°C	3 para un total de 33 minutos a 30°C
	TIEMPO/DETERMINACION	25 minutos	38 minutos
	LONGITUD DE ONDA	505 nm	340 nm
	LINEALIDAD	700 mg/dl	400 mg/dl
30	INTERVALO NORMAL	50-167 mg/dl	Macho 45, 168 mg/dl; hembra 49, 170

1

5

10

15

20

25

30

TABLA (continuación)

<u>Características</u>	<u>Método de esta invención</u>	<u>Calbiochem (A)</u>
PATRON	sí	no
ALMACENAMIENTO	Refrigerado (2-8°C)	Refrigerado (2-8°C)
<u>Características</u>	<u>Boehringer Mannheim (B)</u>	<u>Dow Chemical (C)</u>
DESCRIPCION DEL PRODUCTO	Triglicéridos	Triglicérido enzimático
MIDE EL ENSAYO	Glicerol endógeno	Glicerol endógeno
NUMERO DE ENSAYOS	24	100
PRINCIPIO DE REACCION	$\text{Tri} \xrightarrow{\text{Lipasa}} \text{Gli} + \text{FFA}$ $\text{Gli} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{GK}} \text{Gli-3-phos} + \text{ADP}$ $\text{ADP} + \text{PEP} \xrightarrow{\text{PK}} \text{ATP} + \text{Pi}$ $\text{Pi} + \text{NADH} \xrightarrow{\text{LDH}} \text{Lac} + \text{NAD}$	$\text{Tri} \xrightarrow{\text{Lipasa}} \text{Gli} + \text{FFA}$ $\text{Gli} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{Kinasa}} \text{Gli-1-phos} + \text{ADP}$ $\text{Gli-1-phos} + \text{NAD} \xrightarrow{\text{deshidrogenasa}} \text{Gli-1-phos} + \text{NADH}$ $\text{NADH} + \text{INT} \xrightarrow{\text{diaforasa}} \text{formazan} + \text{NAD}$
TAMAÑO DE LA MUESTRA	50 µl	20 µl
PREPARACION DEL REACTIVO	Reconstituir la solución de NADH. Combinar las soluciones 1, 2 y 3 para el sustrato de ensayo	Reconstituir el sustrato
NUMERO DE REACTIVOS		3 + patrón
ESTABILIDAD RECONSTITUIDA	Sustrato 8 horas a la temperatura ambiente o 30 horas a 4°C, NADH estable 2 semanas a 4°C	Sustrato 24 horas a 4°C
PIPETEADO	4	3
EXTRACCIONES	2	ninguna
TIEMPO/TEMPERATURA DE INCUBACION	Ninguno	2 para un total de 20 minutos a 37°C
TIEMPO/DETERMINACION	2 para un total de 25 minutos a la temperatura ambiente o 15 minutos a 37°C	25 minutos

1

TABLA (continuación)

<u>Características</u>	<u>Boehringer Mannheim (B)</u>	<u>Dow Chemical (C)</u>
ESTABILIDAD DEL COLOR FINAL	25 minutos	10 minutos
LONGITUD DE ONDA	340 o 566 nm	500 nm
LINEALIDAD	580 mg/dl	700 mg/dl
INTERVALO NORMAL	72-172 mg/dl	19-167 mg/dl
PATRON	No	Si
ALMACENAMIENTO	Refrigerado (2-8°C)	Refrigerado (2-8°C)

5

10

De la información proporcionada en la tabla anterior puede deducirse fácilmente que esta invención es eficaz y presenta ventajas sobre las reacciones enzimáticas anteriores para las determinaciones de triglicéridos.

15

En resumen, la Patente de Invención que se solicita deberá recaer sobre las siguientes:

REIVINDICACIONES

20

25

1. Un método de determinación de triglicéridos en fluidos biológicos mediante una reacción enzimática, donde se agrega un fluido biológico a un reactivo enzimático que comprende una lipasa, glicerol-deshidrogenasa (GDH), piridín-nucleótido (PN), un tampón, un compuesto de tetrazolio y diaforasa, con lo que los triglicéridos son enzimáticamente hidrolizados y el glicerol resultante es oxidado para formar un piridín-nucleótido (PN) reducido que reacciona con el compuesto de tetrazolio en presencia de la diaforasa para producir un formazano coloreado, que se mide a una longitud de onda que oscila entre 475 y 525 nm aproximadamente.

30

2. Un método según la Reivindicación 1, donde dicha

1 lipasa es un enzima obtenido a partir de Chromobacterium
viscosum.

5 3. Un método según la Reivindicación 1, donde dicha
glicerol-deshidrogenasa es un enzima obtenido a partir de
5 Enterobacter aerogenes.

4. Un método según la Reivindicación 1, donde dicha
diaforasa es un enzima obtenido a partir de Clostridium
kluveri.

10 5. Un método según la Reivindicación 1, donde el pH
del reactivo enzimático oscila entre 6,4 y 8,0 aproximada-
mente.

6. Un método según la Reivindicación 1, donde dicho
fluido biológico es suero.

15 7. Un método según la Reivindicación 1, donde hay
presente en dicho reactivo enzimático alrededor de 100 a
300 U.I./ml de dicha lipasa.

8. Un método según la Reivindicación 1, donde hay
presente en dicho reactivo enzimático alrededor de 5,0 a
15,0 U.I./ml de dicha glicerol-deshidrogenasa (GDH).

20 9. Un método según la Reivindicación 5, donde hay
presente alrededor de 0,05 a 0,15 mM de manganeso con dicha
glicerol-deshidrogenasa (GDH) en dicho reactivo enzimático.

25 10. Un método según la Reivindicación 1, donde hay pre-
sente en dicho reactivo enzimático alrededor de 2,5 a 7,5 mg/
ml de dicho piridin-nucleótido (PN).

11. Un método según la Reivindicación 1, donde hay
presente en dicho reactivo enzimático alrededor de 15,0 a
45,0 U.I./ml de dicha diaforasa.

30 12. Un método según la Reivindicación 1, donde hay pre-
sente en dicho reactivo enzimático alrededor de 0,075 a

1 2,0 g/litro de dicho compuesto de tetrazolio.

13. Un método según la reivindicación 1, donde hay presente en dicho reactivo enzimático alrededor de 0,45 a 1,35 mg/ml de dicho compuesto de tetrazolio.

5 14. Un método según la reivindicación 1, donde el piridín-nucleótido (PN) es nicotinamido-adenin-dinucleótido (NAD).

15. Un método según la reivindicación 14, donde hay presente alrededor de 100 a 300 U.I./ml de dicha lipasa.

10 16. Un método según la reivindicación 14, donde hay presente alrededor de 5,0 a 15,0 U.I./ml de dicha glicerol-deshidrogenasa. (GDH).

15 17. Un método según la reivindicación 14, donde hay presente alrededor de 0,05 a 0,15 mM de manganeso con dicha glicerol-deshidrogenasa (GDH) en dicho reactivo enzimático.

18. Un método según la reivindicación 14, donde hay presente alrededor de 2,5 a 7,5 mg/ml de dicho nicotinamido-adenin-dinucleótido (NAD).

20 19. Un método según la reivindicación 14, donde hay presente alrededor de 15,0 a 45,0 U.I./ml de dicha diafo-rasa.

20. Un método según la reivinciación 14, donde hay presente alrededor de 0,45 a 1,35 mg/ml de dicho compuesto de tetrazolio.

25 21. Un método según la reivindicación 1, donde el piridín-nucleotido (PN) es nicotinamido-adenin-dinucleótido (NAD), y el compuesto de tetrazolio es cloruro de yodofenil nitrofeniltetrazolio (INT).

30 22. Un método según la reivindicación 21, donde e-
pH del reactivo oscila entre 6,4 y 8,0 aproximadamente.

1 23. Un método según la reivindicación 21, donde hay presente alrededor de 100 a 300 U.I. /ml de dicha lipasa.

 24. Un método según la reivindicación 21, donde hay presente alrededor de 5,0 a 15,0 U.I./ml de dicha glicerol-
5 deshidrogenasa (GDH).

 25. Un método según la reivindicación 21, donde hay presente alrededor de 0,05 a 0,15 mM de manganeso con dicha glicerol-deshidrogenasa (GDH).

 26. Un método según la reivindicación 21, donde hay presente alrededor de 15,0 a 45,0 U.I./ml de dicha diaforasa.
10

 27. Un método según la reivindicación 21, donde hay presente alrededor de 0,45 a 1,35 mg/ml de dicho cloruro de yodofenil-nitrofenil-tetrazolio (INT).

 28. Un método según la reivindicación 1, donde la lipasa en una lipasa de lipoproteínas (LPL), la glicerol-
15 deshidrogenasa es una glicerol-deshidrogenasa con mangane-
so, el compuesto de tetrazolio es cloruro de yodofenilni-
trofeniltetrazolio (INT) y el piridin-nucleótido es nicoti-
namido-adenin-dinucleótido (NAD).

 29. Un método según la reivindicación 28, donde di-
20 cha lipasa de lipoproteínas (LPL) es un enzima obtenido a
partir de Chromobacterium viscosum.

 30. Un método según la reivindicación 28, donde di-
25 cha glicerol-deshidrogenasa (GDH) es un enzima obtenido a
partir de Enterobacter aerogenes.

 31. Un método según la reivindicación 28, donde di-
 cha diaforasa es un enzima obtenido a partir de Clostridium
30 kluyveri.

 32. Un método según la reivindicación 28, donde hay presente en dicho reactivo enzimático alrededor de 5,0 a

1 15,0 U.I./ml de dicha glicerol-deshidrogenasa (GDH).

33. Un método según la reivindicación 32, donde hay presente alrededor de 0,05 a 0,15 mM de manganeso con dicha glicerol-deshidrogenasa (GDH) en el reactivo enzimático.

5 34. Un método según la reivindicación 28, donde el pH del reactivo enzimático oscila entre 6,4 y 8,0 aproximadamente.

35. Un método según la reivindicación 28, donde hay presente en el reactivo enzimático alrededor de 100 a 300 U.I./ml de dicha lipasa de lipoproteína (LPL).

10 36. un método según la reivindicación 28, donde hay presente en el reactivo enzimático alrededor de 2,5 a 7,5 mg/ml de dicho nicotinamido-adenin-dinucleótido (NAD).

37. Un método según la reivindicación 28, donde hay presente en el reactivo enzimático alrededor de 15,0 a 45,0 U.I./ml de dicha diaforasa.

15 38. Un método según la reivindicación 28, donde hay presente en dicho reactivo enzimático alrededor de 0,45 a 1,35 mg/ml de dicho cloruro de yodofenilnitrofeniltetrazolio (INT).

20 39. Un método según la reivindicación 28, donde se agrega una solución de Triton X-100 para diluir la mezcla de reacción y reducir la turbidez.

40. Un método según la reivindicación 39, donde hay presente de 0,5 a 2,0 % en volumen de Triton X-100.

25 41. Un método según la reivindicación 39, donde se agrega un ácido con el Triton X-100 para interrumpir la reacción.

30 42. Un método según la reivindicación 41, donde el ácido es HCl.

1 43. Un método según la reivindicación 42, donde hay
presente HCl de 0,01 a 0,2 mM.

5 44. Se reivindica por último como objeto sobre el que
ha de recaer la Patente de Invención que se solicita: UN ME
5 TODO DE DETERMINACION DE TRIGLICERIDOS EN FLUIDOS BIOLÓGICOS
MEDIANTE UNA REACCIÓN ENZIMÁTICA.

Todo conforme queda descrito y reivindicado en la pre
sente Memoria descriptiva que consta de dieciocho páginas
mecnografiadas.

10
Madrid, 12 de Julio de 1.979
BERNARDO UNGRIA

P. E.



15

20

25

30