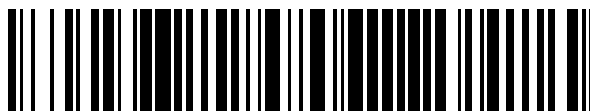


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 783 857**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/44 (2006.01)

G01N 33/92 (2006.01)

C07D 265/38 (2006.01)

C08G 77/14 (2006.01)

C12N 9/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.06.2016 PCT/JP2016/068116**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.12.2016 WO16204276**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.06.2016 E 16811750 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.03.2020 EP 3312291**

54 Título: **Solución de sustrato para medir la actividad de lipasa y método y reactivo para medir la actividad lipasa en una muestra**

30 Prioridad:

19.06.2015 JP 2015124010

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

18.09.2020

73 Titular/es:

**SHINO-TEST CORPORATION (100.0%)
7-9, Kanda-Surugadai 3-chome, Chiyoda-ku
Tokyo 101-8410, JP**

72 Inventor/es:

**IIZUKA, NAOMI y
HIKICHI, ATSUSHI**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 783 857 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Solución de sustrato para medir la actividad de lipasa y método y reactivo para medir la actividad lipasa en una muestra

- 5 La presente invención se refiere al uso de una composición que comprende un aceite de silicona modificada de tipo modificado con poliéter no reactivo de tipo e cadena lateral con éster de (6'-metilresorufina) de ácido 1,2-o-dilauril-rac-glicero-3-glutárico para estabilizar una solución de sustrato para medir la actividad lipasa que comprende éster de (6'-metilresorufina) de ácido 1,2-o-dilauril-rac-glicero-3-glutárico como sustrato para medir la actividad lipasa.
- 10 La presente invención se refiere al uso de una composición que comprende un aceite de silicona modificada de tipo modificado con poliéter no reactivo monocatenario junto con éster de (6'-metilresorufina) de ácido 1,2-o-dilauril-rac-glicero-3-glutárico para estabilizar una solución de emulsión que comprende partículas micelares de éster de (6'-metilresorufina) de ácido 1,2-o-dilauril-rac-glicero-3-glutárico.
- 15 La presente invención es útil en el campo de, por ejemplo, ciencias de la vida como pruebas de laboratorio clínico y química, tal como química analítica.

Técnica anterior

- 20 La actividad de lipasa en suero o plasma aumenta en las enfermedades pancreáticas (por ejemplo, pancreatitis aguda y crónica o cáncer pancreático), para que la actividad de lipasa sea un marcador útil para la pancreatitis, etc.

La lipasa es una enzima que cataliza una reacción en la que los enlaces éster en las posiciones α (posiciones 1 y 3) de un triglicérido (TG) (tres moléculas de ácido graso de cadena larga están unidas por medio de un enlace éster a glicerol) produce dos moléculas de ácido graso y una molécula de glicérido.

Esta molécula de β -monoglicérido se isomeriza a α -monoglicérido, que luego es hidrolizada por la lipasa para producir glicerol y un ácido graso.

- 30 Los ejemplos de técnicas para medir la actividad de lipasa en suero o plasma incluyen las siguientes técnicas (véanse los documentos no patentes 1 y 2).

Un ejemplo conocido es el método Cherry-Crandall en el que se usa una emulsión de aceite de oliva como sustrato de lipasa. Esta emulsión de aceite de oliva está se hace contactar y reaccionar con, por ejemplo, una muestra de suero a 37 °C durante 24 horas y, después, un ácido graso, que se ha generado mediante hidrólisis por la lipasa, se titula con un álcali.

En este método, sin embargo, el tiempo de reacción es largo, la lipasa de interés se puede inactivar y, por lo tanto, la reacción se inhibe notablemente.

- 40 Otro ejemplo conocido es el método Vogel-Zieve y un método modificado del mismo en el que se usa una emulsión de trioleína o aceite de oliva como sustrato de lipasa, esta emulsión de trioleína o aceite de oliva se pone en contacto y reacciona con, por ejemplo, una muestra de suero, las micelas emulsionadas se hidrolizan después mediante la lipasa para causar una disminución en la turbidez de la solución de reacción resultante, y la actividad lipasa se determina en función de la disminución.

Estos métodos, sin embargo, implican inhibición y/o interferencia mediada por proteínas séricas debido a la agregación inducida por el factor reumatoide, de modo que es difícil producir una emulsión uniforme y estable. Asimismo, los métodos son poco reproducibles y, por lo tanto, desventajosos.

- 50 Otro ejemplo conocido es una técnica para medir la actividad lipasa en la que se usa BALB (tributirato de 2,3-dimercapto-1-propanol) como sustrato de lipasa, este BALB está hecho para contactar y reaccionar con, por ejemplo, una muestra de suero, BAL (2,3-dimercapto-1-propanol), que se ha generado mediante hidrólisis por la lipasa, se hace reaccionar con DTNB (ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico), y la luz amarilla emitida por el anión TNB resultante se mide a 412 nm.

Esta medida, sin embargo, implica interferencia con una esterasa hepática en condiciones altamente concentradas. Por consiguiente, la esterasa hepática se mezcla a través de una célula de reacción o una boquilla (sonda) de un reactivo para medir otro elemento. Esto afecta a un valor medido y provoca un error, por lo que esta medida es desventajosa.

- 60 Otro ejemplo conocido es una técnica para medir la actividad lipasa en la que el 1,2-dilinoileilglicerol, que es un sustrato natural, se usa como sustrato de lipasa, este 1,2-dilinoileilglicerol se pone en contacto y reacciona con, por ejemplo, una muestra de suero, ácido linoleico, que se ha generado mediante hidrólisis por la lipasa, coopera, en presencia de la coenzima A, NAD⁺ y ATP, con acil-CoA sintetasa, acil-CoA oxidasa y un complejo multienzimático de enoil-CoA hidratasa-3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa-3-cetoacil-CoA tiolasa para realizar la oxidación β , y a

continuación se mide la tasa de producción de NADH cuando se produce la β -oxidación.

Esta medida, sin embargo, también implica interferencia con una esterasa hepática en condiciones altamente concentradas. Por consiguiente, la esterasa hepática se mezcla a través de una célula de reacción o una boquilla (sonda) de un reactivo para medir otro elemento. Esto afecta a un valor medido y provoca un error, por lo que esta medida es desventajosa.

Además de las medidas respectivas anteriores, se ha desarrollado una técnica para medir la actividad lipasa en suero o plasma en la que éster de (6'-metilresorufina) de ácido 1,2-o-dilauril-rac-glicero-3-glutámico (en adelante, a veces denominado "DGGM") se utiliza como sustrato de lipasa (véase el Documento de patente 1 y el Documento no patente 2).

En esta medida, se hace que el éster de (6'-metilresorufina) de ácido 1,2-o-dilauril-rac-glicero-3-glutámico (DGGM) contacte y reaccione con, por ejemplo, una muestra de suero, y la lipasa cataliza la hidrólisis para generar 1,2-o-dilauril-rac-glicerol y éster de (6'-metilresorufina) de ácido glutámico.

Este éster de (6'-metilresorufina) de ácido glutámico es inestable y se hidroliza de forma fácil y naturalmente para generar 6'-metilresorufina ($\lambda_{\text{máx}}$: 580 nm).

Un aumento en la 6'-metilresorufina generada se mide leyendo la absorbancia a 580 nm o cerca del mismo. Por lo tanto, se puede determinar el valor de la actividad lipasa en la muestra.

Esta técnica para medir la actividad lipasa usando DGGM como sustrato de la lipasa es simple porque la medición se desarrolla en una serie de reacciones. Además, la medición también es ventajosa porque es poco probable que la medición se vea afectada por una esterasa mezclada a través de una celda de reacción o una boquilla (sonda) de otros reactivos de medición.

Mientras tanto, una lipasa contenida en, por ejemplo, suero o plasma es más eficiente en una interfaz agua-aceite de un sustrato de triglicéridos emulsionado. La velocidad de reacción de esta lipasa implica el área superficial del sustrato dispersado. Para medir la actividad lipasa, en consecuencia, parece crucial preparar un sustrato compuesto por partículas micelares y uniformes (véase el documento no patente 2).

Para este fin, cuando se produce convencionalmente una solución de sustrato para medir la actividad lipasa (es decir, una solución de sustrato para medir la actividad lipasa), la solución de sustrato debe estar emulsionada y compuesta por partículas micelares estables y uniformes. Con este fin, se han tenido en cuenta varios métodos. Por ejemplo, un sustrato puede mezclarse en una solución acuosa que contenga un tensioactivo, un sustrato puede mezclarse en una solución que contenga un disolvente orgánico (por ejemplo, un alcohol), un líquido que contiene sustrato puede añadirse gota a gota y mezclarse en una solución, un líquido que contiene sustrato puede inyectarse por chorro en una solución, una solución de sustrato puede agitarse con un mezclador potente a alta velocidad o una solución de sustrato puede someterse a ultrasonidos. Los métodos requieren un procesamiento complicado o especial de tal manera que se requiere dicha habilidad. Los métodos también requieren un aparato especial, instrumentos u otros artículos.

En general, una solución que contiene un sustrato para medir la actividad lipasa es inestable y es problemática en términos de estabilidad del almacenamiento.

Para mejorar la estabilidad de almacenamiento de una solución que contiene un sustrato para medir la actividad lipasa, en consecuencia, se han realizado varios intentos.

Por ejemplo, un proceso para producir una solución acuosa miscible transparente que contiene una sustancia insoluble en agua caracterizada por que una sustancia insoluble en agua (por ejemplo, triglicéridos) como sustrato de lipasa se añade a una solución acuosa que contiene un tensioactivo no iónico, la mezcla se calienta mientras se agita, la temperatura se eleva una vez a una temperatura más alta que el punto de enturbiamiento del tensioactivo no iónico y, a continuación, se enfría a una temperatura igual o inferior al punto de enturbiamiento, mientras que la mezcla se agita más, se ha desvelado como un proceso que haría que sustancia insoluble en agua fuera miscible, lo cual fue difícil en el pasado, y la solución acuosa miscible obtenida por dicho proceso es muy estable (véase el Documento de patente 2).

Además, una solución de diglicéridos para medir la actividad lipasa que comprende una solución tampón de pH de baja concentración y un tensioactivo no iónico, tal como un tensioactivo no iónico de éter alquilfenílico de polioxietileno se ha desvelado como una sustancia que permitiría la provisión de una solución acuosa de diglicérido que exhibe estabilidad de almacenamiento a largo plazo (véase el Documento de patente 3).

Además, una composición para medir la actividad lipasa derivada de plantas y/o microbios caracterizada por el uso de diglicéridos, como sustancia, disuelta en un tensioactivo no iónico, tal como un tensioactivo no iónico de éter alquilfenílico de polioxietileno, se ha desvelado que permitiría la provisión de un kit y una composición que contiene

una solución acuosa de diglicéridos excelente en cuanto estabilidad de almacenamiento a largo plazo (véase el Documento de patente 4).

Adicionalmente, una solución de sustrato de lipasa para medir la actividad enzimática, que se hizo soluble en un sustrato de lipasa que comprende DGGMR o similar mediante un nuevo solubilizador de sustrato de lipasa (es decir, 1,2-difitanoil-sn-glicero-3-fosfocolina), se ha desvelado como una sustancia que permitiría una mayor estabilidad de almacenamiento y un mayor grado de transparencia durante un largo período de tiempo (véase el documento de patente 5).

El documento JP 2002 214239 A se refiere a un método para separar y medir un componente lipídico en una fracción de lipoproteína específica mediante una operación simple. En particular, el documento JP 2002 214239 A desvela un método para medir los lípidos contenidos en los componentes sanguíneos en presencia de un compuesto organosilíceo.

YOSHINORI UJI ET AL. ("A "Serum pancreas lipase assay using Resorufin as new substrate", The Biliary Tract & Pancreas, 2002, vol. 23, n.º 6, páginas 455-459) y el documento JP H09 215500 tratan el uso del éster de (6'-metilresorfin) de ácido 1,2-o-dilauril-rac-glicero-3-glutárico como sustrato en las mediciones de la actividad lipasa.

Documentos de la técnica anterior

Documentos de patente

Documento de patente 1: Publicación de Patente JP (Kokai) N.º. S61-254197A (1986)

Documento de patente 2: Publicación de Patente JP (Kokai) N.º. S58-156330A (1983)

Documento de patente 3: WO 2006/054681

Documento de patente 4: Publicación de patente japonesa (Kokai) n.º 2007-306821 A

Documento de patente 5: Publicación de patente japonesa (Kokai) N.º H11-318494 A (1999)

Documentos no patente

Documento no patente 1: Kanai's Manual of Clinical Laboratory Medicine, 30ª ed., p.670-674, editado por KANAI, Masamitsu, publicado por KANEHARA & Co., Ltd., el 20 de agosto de 1993.

Documento no patente 2: Kanai's Manual of Clinical Laboratory Medicine, 33ª ed., p.545-547, editado por KANAI, Masamitsu, publicado por KANEHARA & Co., Ltd., el jueves, 1 de abril de 2010.

Sumario de la invención

Objetos a alcanzar por la invención

Tal como se ha descrito anteriormente, El documento de patente 5 describe que una solución de sustrato de lipasa para medir la actividad enzimática que comprende DGGMR como sustrato para medir la actividad de lipasa en combinación con un nuevo solubilizador de sustrato de lipasa (es decir, 1,2-difitanoil-sn-glicero-3-fosfocolina) exhibe alta estabilidad de almacenamiento. Sin embargo,

la 1,2-difitanoil-sn-glicero-3-fosfocolina es costosa y, en consecuencia, el coste de una materia prima de la solución de sustrato aumenta de manera desventajosa.

Por el contrario, la presente divulgación pretende proporcionar una solución de sustrato para medir la actividad lipasa que comprende DGGMR que tiene varias ventajas cuando se usa como sustrato para medir la actividad lipasa como un sustrato para medir la actividad lipasa como se ha descrito anteriormente, que es excelente en términos de estabilidad de almacenamiento.

Asimismo, la presente divulgación pretende proporcionar un reactivo para medir la actividad lipasa que comprende una solución de sustrato para medir la actividad lipasa que comprende DGGMR como sustrato para medir la actividad lipasa, que es excelente en términos de estabilidad de almacenamiento.

Asimismo, la presente divulgación pretende proporcionar un método para medir la actividad lipasa en una muestra que implica el uso de una solución de sustrato para medir la actividad lipasa que comprende DGGMR como sustrato para medir la actividad lipasa, que puede proporcionar valores medidos con precisión durante un largo período de tiempo.

Asimismo, la presente divulgación pretende proporcionar una solución en emulsión que comprende partículas micelares de DGGMR y similares, que es excelente en términos de estabilidad de almacenamiento. la presente invención pretende proporcionar un método para estabilizar una solución de sustrato para medir la actividad lipasa que mejora la estabilidad de almacenamiento de la solución de sustrato para medir la actividad lipasa.

Asimismo, la presente invención pretende proporcionar un método para estabilizar una solución de emulsión que

comprende partículas micelares de DGGMR y similares que mejora la estabilidad de almacenamiento de la solución de emulsión que comprende partículas micelares.

Medios para alcanzar los objetivos

Los presentes inventores han realizado estudios concentrados sobre un método para mejorar la estabilidad de almacenamiento de una solución de sustrato para medir la actividad lipasa que comprende DGGMR como sustrato para medir la actividad lipasa, un método para estabilizar una solución de emulsión que comprende partículas micelares de DGGMR y similares. Como resultado, descubrieron que los objetivos de la presente invención podrían lograrse incorporando DGGMR en combinación con aceite de silicona modificado de tipo modificado con poliéter no reactivo de cadena lateral en la solución. Esto ha llevado a la finalización de la presente invención.

La presente invención se resume como sigue.

[1.] Uso de una composición que comprende un aceite de silicona modificado de tipo modificado con poliéter no reactivo de tipo cadena lateral junto con éster de (6'-metilresorufina) de ácido 1,2-o-dilauril-rac-glicero-3-glutámico para estabilizar una solución de sustrato para medir la actividad lipasa, que comprende éster de (6'-metilresorufina) de ácido 1,2-o-dilauril-rac-glicero-3-glutámico como sustrato para medir la actividad lipasa.

[2.] Uso de una composición que comprende un aceite de silicona modificada de tipo modificado con poliéter no reactivo de tipo cadena lateral con éster de (6'-metilresorufina) de ácido 1,2-o-dilauril-rac-glicero-3-glutámico para estabilizar una solución de sustrato para medir la actividad lipasa que comprende éster de (6'-metilresorufina) de ácido 1,2-o-dilauril-rac-glicero-3-glutámico como sustrato para medir la actividad lipasa.

El uso de acuerdo con la invención para estabilizar una solución para medir la actividad lipasa en una muestra puede proporcionar valores medidos con precisión durante un largo período de tiempo.

La solución de emulsión que comprende partículas micelares de DGGMR es excelente en términos de estabilidad de almacenamiento, cuando se estabiliza de acuerdo con la invención.

El uso de la composición de la presente invención para estabilizar la solución de sustrato para medir la actividad lipasa es capaz de mejorar la estabilidad de almacenamiento de la solución de sustrato para medir la actividad lipasa.

El uso de la composición de la presente invención para estabilizar la solución de emulsión que comprende partículas micelares de DGGMR es capaz de mejorar la estabilidad de almacenamiento de la solución de emulsión.

Tal como se ha descrito anteriormente, el uso de la composición de la presente invención permite el uso estable de una solución de sustrato para medir la actividad de lipasa que comprende DGGMR como sustrato para medir la actividad de lipasa y la solución de emulsión que comprende partículas micelares de DGGMR y similares durante un largo período de tiempo. Por lo tanto, la presente invención es conveniente para los usuarios y es ventajosa con respecto al coste.

Tal como se ha descrito anteriormente, el uso de la composición de la presente invención para estabilizar la solución de emulsión o la solución de sustrato para medir la actividad lipasa que comprende DGGMR como sustrato para medir la actividad lipasa, permite su uso estable durante un largo período de tiempo. Por consiguiente, una solución de sustrato para medir la actividad lipasa que proporciona resultados precisos de medición (el valor medido) durante un largo período de tiempo y un reactivo para medir la actividad lipasa que comprende dicha solución de sustrato se puso a disposición de instituciones médicas y similares. En instituciones médicas y similares, en consecuencia, los resultados precisos de medición (el valor medido) de la actividad lipasa en una muestra se obtuvieron durante un largo período de tiempo.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra una curva de absorción de una mezcla usando la solución de sustrato almacenada para medir la actividad lipasa.

La figura 2 muestra una curva de absorción de una mezcla que usa la solución de sustrato almacenada para medir la actividad lipasa como muestra de control.

La figura 3 muestra el porcentaje de DGGMR degradado en el momento del almacenamiento de la solución de sustrato para medir la actividad lipasa y una solución de sustrato de un reactivo de control disponible en el mercado.

La figura 4 muestra el porcentaje de DGGMR degradado en el momento del almacenamiento de la solución de sustrato para medir la actividad lipasa y una solución de sustrato de un reactivo de control disponible en el mercado.

La figura 5 muestra el porcentaje de DGGMR degradado en el momento del almacenamiento de la solución de sustrato para medir la actividad lipasa y una solución de sustrato de un reactivo de control disponible en el mercado.

La figura 6 muestra el porcentaje de DGGMR degradado en el momento del almacenamiento de la solución de sustrato para medir la actividad lipasa y una solución de sustrato de un reactivo de control disponible en el mercado.

La figura 7 muestra la distribución del diámetro de las micelas (tamaño de partícula) en una emulsión de la solución

de sustrato almacenada para medir la actividad lipasa

La figura 8 muestra la distribución del diámetro de las micelas (tamaño de partícula) en una emulsión de la solución de sustrato almacenada para medir la actividad lipasa

La figura 9 muestra la distribución del diámetro de las micelas (tamaño de partícula) en una emulsión de la solución de sustrato almacenada para medir la actividad lipasa

La figura 10 muestra los resultados de medir la actividad lipasa en una muestra usando el reactivo almacenado para medir la actividad lipasa

La figura 11 muestra los resultados de medir la actividad lipasa en una muestra usando el reactivo almacenado para medir la actividad lipasa

La figura 12 muestra los resultados de medir la actividad lipasa en una muestra usando el reactivo almacenado para medir la actividad lipasa

Realizaciones para llevar a cabo la invención

[1] Solución de sustrato para medir la actividad lipasa

I. Descripción general

1. Solución de sustrato para medir la actividad lipasa

La solución de sustrato para medir la actividad lipasa está compuesta por una solución de emulsión que comprende partículas micelares de éster de (6'-metilresorufina) de ácido 1,2-o-dilauril-rac-glicero-3-glutárico y aceite de silicona modificado de tipo modificado con poliéter no reactivo de tipo cadena lateral.

Debido a tal composición, la solución de sustrato para medir la actividad lipasa es excelente en términos de estabilidad de almacenamiento.

2. Lipasa

En la presente invención, una lipasa debe tener actividad como lipasa; es decir, debería tener actividad lipasa. La lipasa no está particularmente limitada siempre que tenga la actividad lipasa.

En la presente invención, los ejemplos de la lipasa incluyen una lipasa pancreática (EC 3.1.1.3) que cataliza una reacción en la que el éster se une en las posiciones α (posiciones 1 y 3) de un triglicérido (TG) (tres moléculas de ácidos grasos de cadena larga están unidas mediante un enlace éster a glicerol) se hidrolizan para producir dos moléculas de ácido graso y una molécula de β -monoglicérido.

La presente invención es preferible para medir la actividad de una lipasa presente en un fluido corporal, un órgano o un tejido, más preferible, para medir la actividad de una lipasa presente en un fluido corporal, aún más preferible para medir la actividad de una lipasa presente en sangre, suero o plasma, y adicionalmente preferible para medir la actividad de una lipasa presente en suero o plasma.

Además, la presente invención es adecuada para medir la actividad de una lipasa pancreática.

3. Muestra

En la presente invención, una muestra para medir la actividad lipasa puede ser una muestra que puede contener la lipasa anterior. La muestra no está particularmente limitada siempre que la muestra pueda contener la lipasa anterior.

Ejemplos de muestras incluyen muestras de origen humano, animal y vegetal.

Los ejemplos de muestras de origen humano y animal incluyen, pero sin limitarse particularmente a los mismos, fluido corporal humano o animal (por ejemplo, sangre, suero, plasma, orina, semen, líquido espinal, saliva, sudor, lágrimas, ascitis o líquido amniótico), excrementos (por ejemplo, heces), órganos (por ejemplo, un páncreas, hígado o estómago), tejidos (por ejemplo, un cabello, piel, clavo, músculo o nervio) y células.

La presente invención es adecuada cuando la muestra de origen humano o animal se usa como muestra y más adecuada cuando la muestra de origen humano se usa como muestra.

Además, la presente invención es preferible cuando se usa fluido corporal, órgano o tejido como muestra, más preferible cuando se usa fluido corporal como muestra, aún más preferible cuando se usa sangre, suero o plasma como muestra, y adicionalmente preferible cuando se usa suero o plasma como muestra.

Cabe destacar que, en la presente invención, se prefiere una muestra líquida. Por lo tanto, si la muestra no es líquida, el pretratamiento (por ejemplo, extracción o solubilización) puede realizarse de acuerdo con un procedimiento conocido para preparar una muestra líquida.

Además, la muestra puede diluirse o enriquecerse según sea necesario.

II. Solución de emulsión

1. Descripción general

Como se ha descrito anteriormente en el uso de la invención, la solución de sustrato para medir la actividad lipasa puede comprender una solución de emulsión que comprende partículas micelares de éster de (6'-metilresorufina) de ácido 1,2-o-dilauril-rac-glicero-3-glutámico y aceite de silicona modificado de tipo modificado con poliéter no reactivo de tipo cadena lateral.

La solución de emulsión que comprende partículas micelares de éster de (6'-metilresorufina) de ácido 1,2-o-dilauril-rac-glicero-3-glutámico y aceite de silicona modificado con poliéter no reactivo de tipo lateral de cadena lateral de la presente invención se describe a continuación.

La solución de emulsión de la presente invención (es decir, la solución de emulsión que comprende partículas micelares de éster de (6'-metilresorufina) de ácido 1,2-o-dilauril-rac-glicero-3-glutámico y aceite de silicona modificado de tipo modificado con poliéter no reactivo de tipo cadena lateral) puede comprender otras sustancias distintas del éster de (6'-metilresorufina) de ácido 1,2-o-dilauril-rac-glicero-3-glutámico y aceite de silicona modificado de tipo modificado con poliéter no reactivo de tipo cadena lateral, tal como se describe a continuación.

2. Sustrato para medir la actividad lipasa

(1) Descripción general

Información general En el uso de la presente invención, un sustrato de lipasa para medir la actividad de lipasa en una muestra; es decir, un sustrato para medir la actividad lipasa, es éster de (6'-metilresorufina) de ácido 1,2-o-dilauril-rac-glicero-3-glutámico (DGGMR).

DGGMR, que es un sustrato para medir la actividad lipasa, se pone en contacto con una muestra y, a continuación, se deja reaccionar con una lipasa contenida en la muestra. Por lo tanto, El 1,2-o-dilauril-rac-glicerol y el éster de (6'-metilresorufina) de ácido glutámico se generan a partir de DGGMR como resultado de la hidrólisis catalizada por la lipasa.

Este éster de (6'-metilresorufina) de ácido glutámico es inestable y se hidroliza de forma fácil y naturalmente para generar 6'-metilresorufina ($\lambda_{\text{máx.}}$: 580 nm).

Un aumento en la 6'-metilresorufina generada se mide leyendo la absorbancia a 580 nm o cerca del mismo. Por lo tanto, se puede determinar el valor de la actividad lipasa en la muestra.

El DGGMR está disponible en el mercado en, por ejemplo, Roche Diagnostics K. K. (Japón) o Sigma-Aldrich Co. LLC. (Japón).

(2) Concentración de sustrato para medir la actividad lipasa

La concentración de DGGMR en la solución de emulsión es, preferentemente, de 0,05 mM o superior para obtener una solución de emulsión compuesta de partículas micelares estables y uniformes.

La concentración de DGGMR en la solución de emulsión es más preferentemente 0,1 mM o superior, y aún más preferentemente 0,2 mM o superior en vista de la finalidad anterior.

La concentración de DGGMR contenida en la solución de emulsión es 2 mM o inferior en vista de la finalidad anterior.

La concentración de DGGMR en la solución de emulsión es, más preferentemente, 1 mM o menor, y, aún más preferentemente, 0,8 mM o menor en vista de la finalidad anterior.

2. Aceite de silicona modificado

(1) Descripción general

Tal como se ha descrito anteriormente, la solución de sustrato para medir la actividad lipasa está compuesta por una solución de emulsión que comprende partículas micelares de DGGMR como sustrato para medir la actividad lipasa y aceite de silicona modificado de tipo modificado con poliéter no reactivo de tipo cadena lateral.

Específicamente, la solución de emulsión comprende DGGMR en combinación con aceite de silicona modificado de

tipo modificado con poliéter no reactivo de tipo cadena lateral.

(2) Aceite de silicona modificado de tipo modificado con poliéter no reactivo de tipo cadena lateral

5 A continuación se describe el aceite de silicona modificado de tipo modificado con poliéter no reactivo de tipo cadena lateral utilizado en la presente invención (en lo sucesivo, en ocasiones denominado "el presente aceite de silicona modificado").

10 El compuesto de silicona es un compuesto polimérico que contiene, como cadena principal, un enlace de siloxano (-Si-O-Si-) y, como cadena lateral, un grupo orgánico (por ejemplo, un grupo metilo (CH₃-)) unido a un átomo de silicio.

En esta ocasión, un compuesto lineal de silicona es aceite de silicona.

15 El aceite de silicona modificado es un compuesto en el que se introduce un grupo orgánico en una porción de átomos de silicio de un compuesto lineal de dimetilsilicona "Si(CH₃)₃-O-[Si(CH₃)₂-O]_m-Si(CH₃)₃".

20 Los ejemplos del aceite de silicona modificado incluyen aceites de silicona en los que se introducen diversos grupos orgánicos en una parte de las cadenas laterales de polisiloxano, cualquier extremo de polisiloxano, ambos extremos de polisiloxano, y una parte de cadenas laterales y ambos extremos de polisiloxano.

Entre ellos, el aceite de silicona en el que se introducen varios grupos orgánicos en una parte de las cadenas laterales de polisiloxano es el aceite de silicona modificado de tipo de cadena lateral "Si(CH₃)₃-O-[Si(CH₃)₂-O]_m-[Si(CH₃)(un grupo orgánico)-O]_n-Si(CH₃)₃".

25 Dependiendo de las características de los grupos orgánicos a introducir, los aceites de silicona modificados se clasifican en aceite de silicona reactivos y aceite de silicona no reactivos.

30 Dependiendo del grupo orgánico a introducir, los ejemplos del aceite de silicona modificado no reactivo incluyen el tipo modificado con poliéter, el tipo modificado con aralquilo, el tipo modificado con fluoroalquilo, el tipo modificado con alquilo de cadena larga, el tipo modificado con éster de ácido graso superior, el tipo modificado con amida de ácido graso superior, el tipo modificado con poliéter/alquilo de cadena larga/aralquilo, el tipo modificado con alquilo/aralquilo de cadena larga y aceite de silicona de tipo modificado con fenilo.

35 Como el aceite de silicona modificado no reactivo de tipo de cadena lateral "Si(CH₃)₃-O-[Si(CH₃)₂-O]_m-[Si(CH₃)(un grupo orgánico)-O]_n-Si(CH₃)₃", los ejemplos del aceite de silicona de tipo modificado incluyen un aceite de silicona de tipo modificado con poliéter (el grupo orgánico: -R(C₂H₄O)_a(C₃H₆O)_bR'), un aceite de silicona de tipo modificado con poliéter/alquilo de cadena larga/aralquilo (el grupo orgánico: -R(C₂H₄O)_a(C₃H₆O)_bR', -C_aH_{2a+1}, -CH₂-CH(CH₃)-C₆H₅), un aceite de silicona modificado con aralquilo (el grupo orgánico: -CH₂-CH(CH₃)-C₆H₅), un aceite de silicona modificado con fluoroalquilo (el grupo orgánico: -CH₂CH₂CF₃), un aceite de silicona de tipo modificado con alquilo de cadena larga (el grupo orgánico: -C_aH_{2a+1}), un aceite de silicona de tipo modificado con alquilo de cadena larga/aralquilo (el grupo orgánico: -C_aH_{2a+1}, -CH₂-CH(CH₃)-C₆H₅), un aceite de silicona modificado con éster de ácido graso superior (el grupo orgánico: -OCOR), un aceite de silicona de tipo modificado con amida de ácido graso superior (el grupo orgánico: -RNHCOR'), y un aceite de silicona de tipo modificado con fenilo (el grupo orgánico: -C₆H₅).

45 En la presente invención, se usa el aceite de silicona modificado de tipo modificado con poliéter no reactivo de tipo cadena lateral (Si(CH₃)₃-O-[Si(CH₃)₂-O]_m-[Si(CH₃)(un grupo orgánico)-O]_n-Si(CH₃)₃) (un grupo orgánico: -R(C₂H₄O)_a(C₃H₆O)_bR')).

50 Los ejemplos de aceite de silicona modificado de tipo modificado con poliéter no reactivo de cadena lateral comercialmente disponibles incluyen "KF-351A", "KF-354L", "KF-355A", y "KF-6011" (el distribuidor de los productos anteriores es Shin-Etsu Chemical Co., Ltd. (Japón)).

(3) Concentración del presente aceite de silicona modificado

55 La concentración del presente aceite de silicona modificado en la solución de emulsión es, preferentemente, del 0,01 % (p/v) o superior para preparar una solución de emulsión compuesta por partículas micelares estables y uniformes.

La concentración del presente aceite de silicona modificado en la solución de emulsión es, más preferentemente, del 0,05 % (p/v) o más, y, aún más preferentemente, del 0,1 % (p/v) o más en vista de la finalidad anterior.

60 La concentración del presente aceite de silicona modificado que va a estar contenido en la solución de emulsión es, preferentemente, del 20 % (p/v) o inferior en vista de la finalidad anterior.

65 La concentración del presente aceite de silicona modificado en la solución de emulsión es, más preferentemente, del 10 % (p/v) o inferior y, aún más preferentemente, del 5 % (p/v) o inferior en vista de la finalidad anterior.

3. Promotor de lipasa

(1) Promotor de lipasa

5 La solución de emulsión del uso de la presente invención puede comprender un promotor de lipasa.

En la presente invención, cualquier sustancia puede usarse como promotor de lipasa, siempre que dicha sustancia pueda promover la actividad lipasa. Los ejemplos incluyen, pero sin limitarse particularmente a los mismos, ácido biliar y una sal del mismo.

10 Los ejemplos del ácido biliar incluyen ácido desoxicólico, ácido taurodesoxicólico, ácido glicodesoxicólico, ácido cólico, ácido litocólico, ácido glicocólico, ácido taurocólico, ácido quenodesoxicólico, ácido ursodesoxicólico, ácido 7-oxolitocólico, ácido 12-oxolitocólico, ácido 12-oxoquenodesoxicólico, ácido 7-oxodesoxicólico, ácido hiocólico, ácido hiodesoxicólico, ácido deshídrocólico y derivados del ácido cólico.

15 Además, los ejemplos de una sal del ácido biliar incluyen sales de metales alcalinos o alcalinotérreos de ácido biliar y una sal de amonio de ácido biliar.

20 Los ejemplos de metal alcalino incluyen potasio, sodio y litio. Además, los ejemplos de metal alcalinotérreo incluyen magnesio y calcio.

Como promotor de la lipasa, es preferente ácido biliar o una sal del mismo debido a su función promotora de la actividad lipasa, la capacidad para formar una interfaz compuesta por un sustrato para medir la actividad lipasa, solubilidad en agua y coste.

25 Como ácido biliar, es preferente el ácido taurodesoxicólico porque es soluble en un intervalo ácido dentro del cual un sustrato para medir la actividad lipasa (DGGM) es estable. En vista del coste, es preferente el ácido desoxicólico.

30 Como ácido biliar, es más preferente el ácido taurodesoxicólico.

Como sal del ácido biliar, es preferente una sal de metal alcalino de ácido biliar, una sal de potasio o sodio del ácido biliar es más preferente, y una sal de sodio del ácido biliar es aún más preferente.

35 Por lo tanto, como sal del ácido biliar, es preferente una sal de metal alcalino (por ejemplo, de potasio o sodio) de ácido desoxicólico o ácido taurodesoxicólico, es más preferente una sal de metal alcalino (por ejemplo, de potasio o sodio) de ácido taurodesoxicólico y, aún más preferente, una sal de sodio de ácido taurodesoxicólico.

(2) Concentración de promotor de lipasa

40 La concentración del promotor de lipasa en la solución de emulsión es, preferentemente, del 0,2 % (p/v) o superior.

La concentración del promotor de lipasa en la solución de emulsión es, más preferentemente, del 0,4 % (p/v) o superior y, aún más preferentemente, del 1 % (p/v) o superior.

45 La concentración del promotor de lipasa en la solución de emulsión es, preferentemente, del 20 % (p/v) o menor.

La concentración del promotor de lipasa en la solución de emulsión es, más preferentemente del 10 % (p/v) o menor y, aún más preferentemente, del 5 % (p/v) o menor.

50 4. Activador de lipasa

(1) Activador de lipasa

55 La solución de emulsión del uso de la presente invención puede comprender un activador de lipasa.

En la presente invención, el activador de lipasa puede ser cualquier sustancia, siempre que pueda activar una lipasa. Los ejemplos de los mismos incluyen, pero sin limitarse particularmente a los mismos, un ion o sal de un metal alcalinotérreo.

60 Los ejemplos del ion o sal de un metal alcalinotérreo incluyen un ion de berilio o sal de berilio, un ion de magnesio o sal de magnesio y un ion de calcio o sal de calcio.

Los ejemplos de la sal de calcio incluyen una sal de calcio soluble en agua. Los ejemplos específicos de los mismos incluyen una sal soluble en agua que contiene un anión monovalente o divalente o superior y un ion de calcio.

65 Los ejemplos del anión incluyen un ion de halógeno, un grupo ácido de un compuesto orgánico y un grupo ácido de

otro compuesto inorgánico.

Los ejemplos del ion halógeno incluyen un ion de flúor y un ion de cloro.

- 5 Los ejemplos del grupo ácido de un compuesto orgánico incluyen un ion acetato, un ion citrato y un ion gluconato.

Los ejemplos del grupo ácido de un compuesto inorgánico incluyen un ion sulfato, un ion fosfato y un ion carbonato.

El activador de la lipasa es, preferentemente, un ion o una sal de un metal alcalinotérreo.

- 10 Como el ion o la sal de un metal alcalinotérreo, es preferente un ion de calcio o una sal de calcio en vista de los siguientes puntos (i) y (ii):

- 15 (i) la capacidad de activar una lipasa; y
(ii) un ácido graso que se libera de un sustrato para medir la actividad lipasa mientras la lipasa ejerce su actividad catalítica altera una interfaz compuesta del sustrato para medir la actividad lipasa, pero un ion de calcio o una sal de calcio puede capturar el ácido graso liberado, evitando así que se interrumpa la interfaz.

Como la sal de calcio, es preferente una sal de calcio soluble en agua que contiene un anión y un ion de calcio.

- 20 El anión es, preferentemente, un ion halógeno o un grupo ácido de un compuesto orgánico. De manera más específica, un ion de cloro o un ion acetato es particularmente preferente.

- 25 Como la sal de calcio, en consecuencia, es preferente un haluro de calcio o una sal de calcio de un grupo ácido de un compuesto orgánico y es, más preferentemente, cloruro de calcio o acetato de calcio.

(2) Concentración de activador de lipasa

La concentración del activador de lipasa en la solución de emulsión es, preferentemente, de 0,1 mM o superior.

- 30 La concentración del activador de lipasa en la solución de emulsión es, más preferentemente 1 mM o más y, aún más preferentemente, 5 mM o más.

La concentración del activador de lipasa en la solución de emulsión es, preferentemente, 100 mM o inferior.

- 35 La concentración del activador de lipasa en la solución de emulsión es, más preferentemente, 50 mM o inferior y, aún más preferentemente, 25 mM o inferior.

5. Colipasa

- 40 (1) Colipasa

La solución en emulsión del uso de la presente invención puede comprender una colipasa.

- 45 En la presente invención, una colipasa no está particularmente limitada, siempre que tenga el efecto, función o actividad de una colipasa. Los ejemplos de los mismos incluyen colipasas derivadas de mamífero (por ejemplo, un ser humano o un cerdo) y colipasas preparadas, modificadas o alteradas mediante ingeniería genética.

- 50 Es preferente una colipasa derivada de un mamífero (por ejemplo, un cerdo) y es, más preferentemente, una colipasa derivada del páncreas de un mamífero (por ejemplo, un cerdo).

(2) Valor de la actividad de la colipasa

El valor de la actividad de la colipasa en la solución de emulsión es, preferentemente, 15 K Unidad/l o más alto.

- 55 El valor de la actividad de la colipasa en la solución de emulsión es, más preferentemente, 150 K Unidad/l o más alto y, aún más preferentemente, 750 K Unidad/l o más alto.

El valor de la actividad de la colipasa en la solución de emulsión es, preferentemente, 7.500 K Unidad/l o inferior.

- 60 El valor de la actividad de la colipasa en la solución de emulsión es, más preferentemente, 3.750 K Unidad/l o inferior y, aún más preferentemente, 2.250 K Unidad/l o inferior.

- 65 En la descripción y los dibujos de la presente solicitud, cada valor de actividad (Unidad/l) de la colipasa se basa en la indicación del valor de actividad de una colipasa derivada de páncreas porcino (Roche Diagnostics K. K. (Japón)) (1 mg/l = 75 K Unidad/l).

La colipasa está disponible en el mercado en, por ejemplo, Roche Diagnostics K. K. (Japón) o Sigma-Aldrich Co. LLC. (Japón).

5 6. Agua

La solución en emulsión del uso de la presente invención puede comprender agua.

Específicamente, la solución de emulsión puede ser una solución acuosa.

10 El agua que debe contener la solución de emulsión no está particularmente limitada. Los ejemplos de agua incluyen agua pura, agua destilada y agua purificada.

15 7. pH

El sustrato para medir la actividad lipasa (DGGMR) es estable a pH 4 o cercano al mismo.

Por lo tanto, el pH de la solución de emulsión está, preferentemente, dentro de un cierto intervalo con respecto al pH 4.

20 En vista de la estabilidad de DGGMR, de manera específica, el pH de la solución de emulsión es, preferentemente, de 2 a 7, más preferente de 3 a 5, y, aún más preferentemente, de 3,5 a 4,5 (los valores de pH se miden a 20 °C).

25 8. Tampón

(1) Tampón

La solución de emulsión del uso de la presente invención puede comprender un tampón.

30 En la presente invención, la solución de emulsión puede comprender un tampón con capacidad de tamponamiento dentro del intervalo de pH descrito en 7, anteriormente, según la necesidad, para ajustar el nivel de pH de la solución de emulsión dentro del intervalo de pH descrito en 7, anteriormente.

35 Los ejemplos de tampones que pueden estar contenidos en la solución de emulsión incluyen, pero sin limitarse particularmente a los mismos, ácidos orgánicos (por ejemplo, ácido tartárico, ácido succínico, ácido malónico y ácido cítrico), glicina, ácido fosfórico y sales de los mismos.

(2) Concentración del tampón

40 En la presente invención, la concentración del tampón que debe contener la solución de emulsión de la presente invención no está particularmente limitada, siempre que la capacidad de tamponamiento se pueda ejercer dentro de un intervalo de pH prescrito.

45 Por ejemplo, la concentración del tampón en la solución de emulsión es, preferentemente, 5 mM o superior, más preferentemente 10 mM o superior y, aún más preferentemente, 30 mM o superior.

La concentración del tampón en la solución de emulsión es, preferentemente, 500 mM o inferior, más preferentemente 100 mM o inferior y, particularmente preferentemente, 50 mM o inferior.

50 9. Diámetro de las micelas en la solución de emulsión

55 Tal como se ha descrito anteriormente, una lipasa actúa más eficazmente en una interfaz agua-aceite de un sustrato de triglicéridos emulsionado. La velocidad de reacción de la lipasa está asociada con el área de superficie del sustrato dispersado. Por lo tanto, la preparación de un sustrato compuesto por partículas micelares estables y uniformes parece crucial para medir la actividad lipasa (véase el documento no patente 2).

60 En el uso de la presente invención, es preferente que el diámetro (tamaño de partícula) de las micelas en la solución de emulsión que contiene un sustrato para medir la actividad lipasa (DGGMR) esté dentro de un intervalo de 60 a 1.500 nm, para que la velocidad de reacción con la lipasa sea alta, la emulsión es estable y la solución de emulsión puede almacenarse y usarse durante un largo período de tiempo.

Por este motivo, el diámetro (tamaño de partícula) de las micelas en la solución de emulsión es, más preferentemente, de 70 a 1.000 nm, aún más preferentemente, de 80 a 600 nm, y, todavía más preferentemente, de 100 a 200 nm.

65 III. Proceso para producir la solución de emulsión

1. Descripción general

Un proceso para producir la solución de emulsión no está particularmente limitado, siempre que la solución de emulsión "que comprende partículas micelares de DGGMR y el presente aceite de silicona modificado" se pueda producir mediante dicho proceso.

Un ejemplo de un proceso para producir la solución de emulsión es un proceso que comprende las etapas (a) y (b) descritas a continuación. El "proceso que comprende las etapas (a) y (b) descritas a continuación" abarca el "proceso que comprende las etapas (a) y (b) descritas a continuación".

Es preferente el proceso que comprende las etapas (a) y (b), ya que la solución de emulsión se puede producir sin un procesamiento complicado o especial de manera que se requiera habilidad o sin el uso de un aparato, instrumentos u otros artículos especiales:

- (a) una etapa de mezclar DGGMR con el presente aceite de silicona modificado para preparar una mezcla; y
- (b) una etapa de mezclar toda o una parte de la mezcla preparada en la etapa (a) con agua o una solución acuosa.

2. Etapa de mezclar DGGMR con el presente aceite de silicona modificado para preparar una mezcla

A continuación, la etapa (a) en el apartado 1 descrito anteriormente; es decir, se describe con detalle "una etapa de mezclar DGGMR con el presente aceite de silicona modificado para preparar una mezcla".

(1) Mezclar DGGMR con aceite de silicona modificado

En la etapa (a) en el apartado 1; es decir, la etapa de mezclar DGGMR con el presente aceite de silicona modificado para preparar una mezcla, DGGMR, que es un sustrato para medir la actividad lipasa, se mezcla con el presente aceite de silicona modificado.

Específicamente, el DGGMR se mezcla directamente con el presente aceite de silicona modificado.

Se puede mezclar un solo tipo del presente aceite de silicona modificado o una pluralidad de tipos del mismo con DGGMR.

(2) Cantidad de DGGMR mezclado

En el paso de mezclar DGGMR como sustrato para medir la actividad lipasa con el presente aceite de silicona modificado para preparar una mezcla, la cantidad de DGGMR a mezclar no está particularmente limitada.

La concentración de DGGMR es, preferentemente, 0,05 mM o superior después de la etapa (b) en el apartado 1 anterior (es decir, la etapa de mezclar "toda o una parte de la mezcla de DGGMR y el presente aceite de silicona modificado" con "agua o una solución acuosa") (en lo sucesivo, en ocasiones denominado "segunda mezcla") con el fin de producir una solución de emulsión compuesta por partículas micelares estables y uniformes.

Después de la segunda mezcla, la concentración de DGGMR es, más preferentemente, 0,1 mM o superior y, aún más preferentemente, 0,2 mM o superior en vista de la finalidad anterior.

Después de la segunda mezcla, la concentración de DGGMR es, preferentemente, 2 mM o inferior en vista de la finalidad anterior.

Después de la segunda mezcla, la concentración de DGGMR es, más preferentemente, 1 mM o inferior y, aún más preferentemente, 0,8 mM o inferior en vista de la finalidad anterior.

La concentración preferente de DGGMR después de la segunda mezcla es como se ha descrito anteriormente.

En la etapa (a) en el apartado 1 descrito anteriormente (es decir, la etapa de mezclar DGGMR con el presente aceite de silicona modificado para preparar una mezcla") (en adelante, en ocasiones denominado "primer mezcla"), puede determinarse adecuadamente la cantidad de DGGMR y la del presente aceite de silicona modificado para mezclar entre sí, para ajustar la concentración de DGGMR al nivel descrito anteriormente después de la segunda mezcla. Esto es preferente a la luz del procedimiento de producción.

Con respecto a la cantidad de DGGMR mezclado y la concentración del mismo, por ejemplo, se pueden considerar los siguientes casos (a) y (b).

(a) Caso en el que toda la mezcla del sustrato para medir la actividad lipasa y el presente aceite de silicona modificado se mezcla con agua o una solución acuosa

La cantidad de sustrato para medir la actividad lipasa mezclada en el momento de la primera mezcla se establece en W_s (representada en gramos). El volumen final (por ejemplo, el volumen ajustado al nivel designado) después de mezclar agua o una solución acuosa en el momento de la segunda mezcla se establece en V_f (representado en ml). El peso molecular del sustrato para medir la actividad lipasa se establece en MWs . La concentración C_s (representada en mM) del sustrato para medir la actividad lipasa después de la segunda mezcla se puede expresar mediante la siguiente ecuación.

$$C_s = (W_s \times 10^6) / (V_f \times MWs).$$

- 10 Dado que el peso molecular MWs del sustrato para medir la actividad lipasa (DGGMR) es 752,05, la ecuación anterior se puede expresar como sigue.

$$C_s = (W_s \times 10^6) / (V_f \times 752,05).$$

- 15 En dicho caso, la cantidad W_s (representada en gramos) del sustrato para medir la actividad lipasa (DGGMR) mezclada en el momento de la primera mezcla se puede expresar como sigue.

$$W_s = (C_s \times V_f \times MWs) / 10^6.$$

- 20 Esto es, $W_s = (C_s \times V_f \times 752,05) / 10^6$.

(b) Caso en el que una porción de la mezcla del sustrato para medir la actividad lipasa y el presente aceite de silicona modificado se mezcla con agua o una solución acuosa

- 25 La cantidad de sustrato para medir la actividad lipasa mezclada en el momento de la primera mezcla se establece en W_s (representada en gramos). El volumen final (por ejemplo, el volumen ajustado al nivel designado) después de mezclar agua o una solución acuosa en el momento de la segunda mezcla se establece en V_f (representado en ml). El peso molecular del sustrato para medir la actividad lipasa se establece en MWs . Un % (en peso o en volumen) de la mezcla en el momento de la primera mezcla se mezcla con agua o una solución acuosa en el momento de la segunda mezcla. En este caso, la concentración C_s (representada en mM) del sustrato para medir la actividad lipasa después de la segunda mezcla se puede expresar mediante la siguiente ecuación.

$$C_s = (W_s \times 10^6) \times (A / 100) / (V_f \times MWs) = (W_s \times A \times 10^4) / (V_f \times MWs).$$

- 35 Dado que el peso molecular MWs del sustrato para medir la actividad lipasa (DGGMR) es 752,05, la ecuación anterior se puede expresar como sigue.

$$C_s = (W_s \times A \times 10^4) / (V_f \times 752,05).$$

- 40 En dicho caso, la cantidad W_s (representada en gramos) del sustrato para medir la actividad lipasa mezclada en el momento de la primera mezcla se puede expresar como sigue.

$$W_s = (C_s \times V_f \times MWs) / (A \times 10^4).$$

- 45 Esto es, $W_s = (C_s \times V_f \times 752,05) / (A \times 10^4)$.

(3) Cantidad del presente aceite de silicona modificado mezclado

- 50 En el paso de mezclar DGGMR como sustrato para medir la actividad lipasa con el presente aceite de silicona modificado para preparar una mezcla, la cantidad del presente aceite de silicona modificado para mezclar no está particularmente limitada.

- 55 La concentración del presente aceite de silicona modificado es, preferentemente, 0,01 % (p/v) o superior después de la segunda mezcla con el fin de producir la solución de emulsión compuesta por partículas micelares estables y uniformes.

Después de la segunda mezcla, la concentración del presente aceite de silicona modificado es, más preferentemente, 0,05 % (p/v) o mayor, y, aún más preferentemente, 0,1 % (p/v) o mayor en vista de la finalidad anterior.

- 60 Después de la segunda mezcla, la concentración del presente aceite de silicona modificado es, preferentemente, 20 % (p/v) o inferior en vista de la finalidad anterior.

Después de la segunda mezcla, la concentración del presente aceite de silicona modificado es, más preferentemente, 10 % (p/v) o inferior y, aún más preferentemente, 5 % (p/v) o inferior en vista de la finalidad anterior.

- 65 La concentración preferente del presente aceite de silicona modificado después de la segunda mezcla es como se ha

descrito anteriormente.

La cantidad de DGGMR y la del presente aceite de silicona modificado mezclado entre sí en el momento de la primera mezcla puede determinarse adecuadamente, para ajustar la concentración del presente aceite de silicona modificado al nivel descrito anteriormente después de la segunda mezcla. Esto es preferente a la luz del procedimiento de producción.

Con respecto a la cantidad del presente aceite de silicona modificado y la concentración del mismo, por ejemplo, se pueden considerar los siguientes casos (a) y (b).

(a) Caso en el que toda la mezcla del sustrato para medir la actividad lipasa y el presente aceite de silicona modificado se mezcla con agua o una solución acuosa

La cantidad del presente aceite de silicona modificado mezclado en el momento de la primera mezcla se establece en W_p (representado en gramos). El volumen final (por ejemplo, el volumen ajustado al nivel designado) después de mezclar agua o una solución acuosa en el momento de la segunda mezcla se establece en V_f (representado en ml). La concentración C_p (representada en % (p/v)) del presente aceite de silicona modificado después de la segunda mezcla puede expresarse mediante la siguiente ecuación.

$$C_p = (W_p \times 100) / V_f.$$

En este caso, la cantidad W_p (representada en gramos) del presente aceite de silicona modificado mezclado en el momento de la primera mezcla puede expresarse como sigue.

$$W_p = (C_p \times V_f) / 100.$$

(b) Caso en el que una porción de la mezcla del sustrato para medir la actividad lipasa y el presente aceite de silicona modificado se mezcla con agua o una solución acuosa

La cantidad del presente aceite de silicona modificado mezclado en el momento de la primera mezcla se establece en W_p (representado en gramos). El volumen final (por ejemplo, el volumen ajustado al nivel designado) después de mezclar agua o una solución acuosa en el momento de la segunda mezcla se establece en V_f (representado en ml). Un % (en peso o en volumen) de la mezcla en el momento de la primera mezcla se mezcla con agua o una solución acuosa en el momento de la segunda mezcla. En este caso, la concentración C_p (representada en % (p/v)) del presente aceite de silicona modificado después de la segunda mezcla puede expresarse mediante la siguiente ecuación.

$$C_p = (W_p \times 100) \times (A / 100) / V_f = (W_p \times A) / V_f.$$

En dicho caso, la cantidad W_p (representada en gramos) del presente aceite de silicona modificado mezclado en el momento de la primera mezcla puede expresarse como sigue.

$$W_p = (C_p \times V_f) \times m / A.$$

(4) Procedimiento de mezcla

En la etapa de mezclar DGGMR con el presente aceite de silicona modificado para preparar una mezcla, el DGGMR puede mezclarse con el presente aceite de silicona modificado por cualquier método sin limitación particular, siempre que DGGMR se mezcle con el presente aceite de silicona modificado.

No es necesario realizar la mezcla de la siguiente manera: el DGGMR se mezcla en una solución que contiene un disolvente orgánico (por ejemplo, un alcohol) y el presente aceite de silicona modificado; se añade, gota a gota, un líquido que contiene DGGMR y se mezcla en una solución que contiene el presente aceite de silicona modificado; se inyecta a chorro un líquido que contiene DGGMR en una solución que contiene el presente aceite de silicona modificado; una solución que contiene DGGMR y el presente aceite de silicona modificado se agita usando un mezclador fuerte a alta velocidad; una solución que contiene DGGMR y el presente aceite de silicona modificado se somete a ultrasonidos; o similares. Por consiguiente, la mezcla no requiere un procesamiento engorroso o especial de manera que se requiera habilidad, o no necesita un aparato u otros elementos especiales. Se puede usar un mezclador común para mezclar a una velocidad típica. De manera análoga, se puede utilizar un procedimiento habitual para la mezcla. De esta forma, se puede preparar la mezcla del DGGMR y el presente aceite de silicona modificado.

(5) Temperatura en el momento de la mezcla

En la etapa de mezclar DGGMR con el presente aceite de silicona modificado para preparar una mezcla, la temperatura a la que se mezcla DGGMR con el presente aceite de silicona modificado no está particularmente limitada. Sin embargo, es preferente que esta etapa se lleve a cabo a una temperatura cercana o inferior al punto de

enturbiamiento del presente aceite de silicona modificado utilizado con el fin de producir una solución de emulsión compuesta por partículas micelares estables y uniformes.

En un punto de enturbiamiento, las micelas de un tensioactivo no iónico, etc., no se puede formar cuando aumenta la temperatura de una solución acuosa que contiene un tensioactivo no iónico. El punto de enturbiamiento es una temperatura a la cual la solución acuosa se enturbia. Diferentes tensioactivos tienen diferentes puntos de enturbiamiento.

La temperatura en o cerca del punto de enturbiamiento del presente aceite de silicona modificado significa una temperatura dentro de un intervalo más o menos 25 °C desde el punto de enturbiamiento del presente aceite de silicona modificado.

La temperatura en o cerca del punto de enturbiamiento del presente aceite de silicona modificado es, preferentemente, una temperatura dentro de un intervalo más o menos 15 °C desde el punto de enturbiamiento del presente aceite de silicona modificado, más preferentemente, una temperatura dentro de un intervalo más o menos 10 °C desde el punto de enturbiamiento del presente aceite de silicona modificado, y, aún más preferentemente, una temperatura dentro de un intervalo más o menos 5 °C desde el punto de enturbiamiento del presente aceite de silicona modificado.

Una etapa de mezclar DGGMR con el presente aceite de silicona modificado para preparar una mezcla también se lleva a cabo, preferentemente, a una temperatura cercana o inferior al punto de enturbiamiento del presente aceite de silicona modificado o inferior.

Por ejemplo, KF-351A, que es el presente aceite de silicona modificado, tiene un punto de enturbiamiento de 52 °C (un valor automedido), KF-355A tiene un punto de enturbiamiento de 67 °C (un valor automedido) y KF-6011 tiene un punto de enturbiamiento de 64 °C (un valor automedido).

Dado que KF-354L no alcanzó un punto de enturbiamiento incluso a 77 °C, que es el límite superior de la temperatura preestablecida de un baño de agua del termostato utilizado para medir el punto de enturbiamiento, el punto de enturbiamiento supera los 77 °C.

En vista de la finalidad anterior, la etapa de mezclar DGGMR con el presente aceite de silicona modificado para preparar una mezcla se lleva a cabo, preferentemente, a una temperatura dentro de un intervalo más o menos 25 °C desde el punto de enturbiamiento del presente aceite de silicona modificado usado o inferior, más preferentemente a una temperatura dentro de un intervalo más o menos 15 °C desde el punto de enturbiamiento del punto de silicona modificado utilizado o inferior, , aún más preferentemente, a una temperatura dentro de un intervalo más o menos 10 °C desde el punto de enturbiamiento del presente polímero usado o más bajo, y, aún más preferentemente, a una temperatura dentro de un intervalo más o menos 5 °C desde el punto de enturbiamiento del presente polímero usado o inferior.

En la etapa de mezclar DGGMR con el presente aceite de silicona modificado para preparar una mezcla, DGGMR se mezcla preferente con el presente aceite de silicona modificado a una temperatura igual o mayor que el punto de fusión de cada uno de DGGMR y el presente aceite de silicona modificado, con el fin de producir una solución de emulsión compuesta por partículas micelares estables y uniformes.

En vista de la finalidad anterior, la etapa de mezclar DGGMR con el presente aceite de silicona modificado para preparar una mezcla se lleva a cabo más preferentemente a 2 °C o más, más preferentemente a 5 °C o más y, aún más preferentemente, a 10 °C o más.

(6) Duración de la mezcla

En la etapa de mezclar DGGMR con el presente aceite de silicona modificado para preparar una mezcla, la duración de mezclar DGGMR con el presente aceite de silicona modificado no está particularmente limitada, siempre que el DGGMR se pueda mezclar uniformemente con el presente aceite de silicona modificado.

Normalmente, la mezcla se lleva a cabo, preferentemente, durante 5 minutos o más con el fin de producir una solución de emulsión compuesta por partículas micelares estables y uniformes. En general, una duración de 5 minutos es suficiente.

La duración requerida para mezclar DGGMR con el presente aceite de silicona modificado no tiene un límite superior particular. Por ejemplo, la mezcla puede llevarse a cabo durante varias horas. A la luz de la idea de que el tiempo es coste, la duración generalmente puede ser de 10 minutos incluso si la mezcla se realiza con cuidado.

3. Etapa de mezclar la mezcla de DGGMR con el presente aceite de silicona modificado con agua o una solución acuosa

A continuación, se describe "la etapa de mezclar toda o una parte de la mezcla preparada en la etapa (b) descrita en

el apartado 1 anterior (es decir, la etapa de mezclar DGGMR con el presente aceite de silicona modificado para preparar una mezcla) con agua o una solución acuosa" con detalle.

(1) Agua o solución acuosa

5 En la etapa (b) descrita en el apartado 1 anterior; es decir, la etapa de mezclar toda o una parte de la mezcla preparada en la etapa (a) en el apartado 1 anterior con agua o una solución acuosa, el agua o la solución acuosa no está particularmente limitada.

10 Los ejemplos del agua incluyen, pero sin limitarse particularmente a los mismos, agua pura, agua destilada y agua purificada.

Además, esta solución acuosa no está particularmente limitada siempre que se use agua como disolvente. Los ejemplos incluyen soluciones acuosas que contienen al menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste en

15 un promotor de lipasa, un activador de lipasa, una colipasa y un tampón.

(a) Promotor de lipasa

20 El promotor de lipasa que puede estar contenido en la solución acuosa anterior puede ser una sustancia que puede promover la actividad lipasa. Los ejemplos incluyen, pero sin limitarse particularmente a los mismos, ácido biliar y una sal del mismo.

El ácido biliar o la sal del mismo como promotor de la lipasa es como se describe en la sección "(1) Promotor de la lipasa" en II. 3 anterior.

25 Después de la segunda mezcla, la concentración del promotor de lipasa es, preferentemente, del 0,2 % (p/v) o superior.

Después de la segunda mezcla, la concentración del promotor de la lipasa es, más preferentemente, del 0,4 % (p/v) o mayor, y, aún más preferentemente, del 1 % (p/v) o mayor.

30 Después de la segunda mezcla, la concentración del promotor de lipasa es, preferentemente, del 20 % (p/v) o inferior.

Después de la segunda mezcla, la concentración del promotor de lipasa es, más preferentemente, del 10 % (p/v) o inferior y, aún más preferentemente, del 5 % (p/v) o inferior.

35 La concentración preferente del promotor de lipasa después de la segunda mezcla es como se ha descrito anteriormente.

40 Al tener en cuenta la proporción de mezclar la "mezcla de DGGMR y el presente aceite de silicona modificado" con la solución acuosa, el promotor de lipasa puede introducirse, preferentemente, en la solución acuosa a una concentración adecuada, para ajustar la concentración del promotor de lipasa después de la segunda mezcla al nivel descrito anteriormente.

(b) Activador de lipasa

45 Un activador de lipasa que puede estar contenido en la solución acuosa no está particularmente limitado, siempre que pueda activar una lipasa. Los ejemplos de los mismos incluyen un ion o sal de un metal alcalinotérreo.

50 El ion o la sal de un metal alcalinotérreo como activador de la lipasa es como se describe en II. 4 "(1) Activador de lipasa" anterior.

Después de la segunda mezcla, la concentración del activador de lipasa es, preferentemente, 0,1 mM o superior.

55 Después de la segunda mezcla, la concentración del activador de lipasa es, más preferentemente, 1 mM o mayor y, aún más preferentemente, 5 mM o mayor.

Después de la segunda mezcla, la concentración del activador de lipasa es, preferentemente, de 100 mM o inferior.

60 Después de la segunda mezcla, la concentración del activador de lipasa es, más preferentemente, 50 mM o inferior y, aún más preferentemente, 25 mM o inferior.

La concentración preferente del activador de lipasa después de la segunda mezcla es como se ha descrito anteriormente.

65 Al tener en cuenta la proporción de mezclar la "mezcla de DGGMR y el presente aceite de silicona modificado" con la solución acuosa, el activador de lipasa puede introducirse, preferentemente, en la solución acuosa a una concentración

adecuada, para ajustar la concentración del activador de lipasa después de la segunda mezcla al nivel descrito anteriormente.

(c) Colipasa

5 Una colipasa que puede estar contenida en una solución acuosa no está particularmente limitada, siempre que tenga el efecto, función o actividad de una colipasa.

La colipasa es como se describe en II. 5 "(1) Colipasa" anteriormente.

10 Después de la segunda mezcla, el valor de la actividad de la colipasa es, preferentemente, 15K Unidad/l o mayor.

Después de la segunda mezcla, el valor de la actividad de la colipasa es, más preferentemente, de 150 K unidad/l o más alto y, aún más preferentemente, de 750 K unidad/l o más alto.

15 Después de la segunda mezcla, El valor de la actividad de la colipasa es, preferentemente, 7.500 K Unidad/l o inferior.

Después de la segunda mezcla, el valor de la actividad de la colipasa es, más preferentemente, de 3.750 K Unidad/l o inferior y, aún más preferentemente, 2.250 K Unidad/l o inferior.

20 El valor de la actividad preferente de la colipasa después de la segunda mezcla es como se ha descrito anteriormente.

Al tener en cuenta la proporción de mezclar la "mezcla de DGGMR y el presente aceite de silicona modificado" con la solución acuosa, la colipasa puede introducirse, preferentemente, en la solución acuosa a un valor de actividad adecuado, para ajustar el valor de la actividad de la colipasa después de la segunda mezcla al nivel descrito anteriormente.

25

(d) pH

30 En la presente invención, el DGGMR utilizado como sustrato para medir la actividad lipasa es estable a pH 4 o cerca del mismo.

Después de la segunda mezcla, en consecuencia, el pH del mismo está, preferentemente, dentro de un cierto intervalo con respecto al pH 4.

35 En vista de la estabilidad de DGGMR, de manera específica, el pH después de la segunda mezcla es, preferentemente, de 2 a 7, más preferente de 3 a 5, y, aún más preferentemente, de 3,5 a 4,5 (los valores de pH se miden a 20 °C).

El nivel de pH después de la segunda mezcla es como se ha descrito anteriormente.

40 Para ajustar el nivel de pH después de la segunda mezcla al nivel descrito anteriormente, el pH de la solución acuosa se ajusta, preferentemente, a un nivel adecuado.

(e) Tampón

45 La solución acuosa puede contener, según sea necesario, un tampón con capacidad de tamponamiento dentro del intervalo de pH anterior, para mantener el nivel de pH después de la segunda mezcla dentro del intervalo de pH descrito en (d) anteriormente.

50 El tampón es como se describe en II. 8 "(1) Tampón" anteriormente.

La concentración del tampón en esta solución acuosa que contiene tampón (es decir, una solución tampón) no está particularmente limitada, siempre que la capacidad de amortiguación se pueda ejercer dentro de un intervalo de pH prescrito.

55 Por ejemplo, después de la segunda mezcla, la concentración del tampón es, preferentemente, 5 mM o superior, más preferentemente 10 mM o superior y, aún más preferentemente, 30 mM o superior.

60 Además, después de la segunda mezcla, la concentración del tampón es, preferentemente, 500 mM o inferior, más preferentemente 100 mM o inferior y, aún más preferentemente, 50 mM o inferior.

La concentración preferente del tampón después de la segunda mezcla es como se ha descrito anteriormente.

65 Es preferente que la solución acuosa contenga el tampón a una concentración adecuada, para ajustar la concentración del tampón después de la segunda mezcla al nivel descrito anteriormente.

(2) Mezclar la mezcla de DGGMR y el presente aceite de silicona modificado con agua o solución acuosa

En la etapa de mezclar la totalidad o una parte de la mezcla preparada en la etapa (b) descrita en el apartado 1 anterior (es decir, la etapa de mezclar DGGMR con el presente aceite de silicona modificado para preparar una mezcla) con agua o una solución acuosa, la totalidad o una parte de la "mezcla de DGGMR con el presente aceite de silicona modificado" se mezcla con el "agua o solución acuosa".

La etapa de mezclar toda o una parte de la mezcla preparada mezclando DGGMR como sustrato para medir la actividad lipasa con el presente aceite de silicona modificado con agua o una solución acuosa no está particularmente limitada. Por ejemplo, toda o una parte de "la mezcla preparada mezclando DGGMR con el presente aceite de silicona modificado" se puede añadir y mezclar con "agua o una solución acuosa". Como alternativa, puede añadirse agua o una solución acuosa y mezclarse con toda o una parte de la mezcla preparada mezclando DGGMR con el presente aceite de silicona modificado. La etapa de mezcla se puede llevar a cabo mediante otros medios.

La proporción de mezclar "la mezcla de DGGMR con el presente aceite de silicona modificado" con "agua o una solución acuosa" no está particularmente limitada, y la proporción puede determinarse adecuadamente.

La mezcla de "la mezcla de DGGMR con el presente aceite de silicona modificado" con "el agua o la solución acuosa" puede considerarse en vista de los siguientes aspectos (i) y (ii).

(i) En vista de la concentración de DGGMR

Como se describe con detalle en la sección 2 anterior. "(2) Cantidad de DGGMR mezclado", después de la segunda mezcla, la concentración de DGGMR es, preferentemente, 0,05 mM o superior, más preferentemente 0,1 mM o superior y, aún más preferentemente, 0,2 mM o superior, en vista de la finalidad anterior.

Como se describe con detalle en la sección 2 anterior. "(2) Cantidad de DGGMR mezclado", también, después de la segunda mezcla, la concentración de DGGMR es, preferentemente, 2 mM o inferior, más preferentemente 1 mM o inferior, y, aún más preferentemente, 0,8 mM o inferior, en vista de la finalidad anterior.

Con respecto a la relación entre la concentración preferente de DGGMR y el volumen final después de mezclar agua o una solución acuosa en el momento de la segunda mezcla, por ejemplo, se pueden considerar los siguientes casos (a) y (b).

(a) Caso en el que toda la mezcla del sustrato para medir la actividad lipasa y el presente aceite de silicona modificado se mezcla con agua o una solución acuosa

La cantidad de sustrato para medir la actividad lipasa mezclada en el momento de la primera mezcla se establece en W_s (representada en gramos). El volumen final (por ejemplo, el volumen ajustado al nivel designado) después de mezclar agua o una solución acuosa en el momento de la segunda mezcla se establece en V_f (representado en ml). El peso molecular del sustrato para medir la actividad lipasa se establece en MW_s . En dicho caso, la concentración C_s (representada en mM) del sustrato para medir la actividad lipasa después de la segunda mezcla se puede expresar mediante la siguiente ecuación.

$$C_s = (W_s \times 10^6) / m (V_f \times MW_s)$$

Dado que el peso molecular MW_s del sustrato para medir la actividad lipasa (DGGMR) es 752,05, la ecuación anterior se puede expresar como sigue.

$$C_s = (W_s \times 10^6) / (V_f \times 752.05)$$

En este caso, en consecuencia, el volumen final V_f (representado en ml) después de mezclar agua o una solución acuosa en el momento de la segunda mezcla se puede expresar como sigue.

$$V_f = (W_s \times 10^6) / (C_s \times MW_s)$$

Esto es, $V_f = (W_s \times 10^6) / (C_s \times 752.05)$.

En el momento de la segunda mezcla, en consecuencia, se puede mezclar agua o una solución acuosa para alcanzar el volumen V_f (representado en ml) calculado usando la ecuación anterior. Por lo tanto, se puede obtener una solución de sustrato para medir la actividad lipasa que comprende el sustrato para medir la actividad lipasa (DGGMR) a una concentración deseada.

(b) Caso en el que una porción de la mezcla del sustrato para medir la actividad lipasa y el presente aceite de silicona modificado se mezcla con agua o una solución acuosa

La cantidad de sustrato para medir la actividad lipasa mezclada en el momento de la primera mezcla se establece en W_s (representada en gramos). El volumen final (por ejemplo, el volumen ajustado al nivel designado) después de mezclar agua o una solución acuosa en el momento de la segunda mezcla se establece en V_f (representado en ml). El peso molecular del sustrato para medir la actividad lipasa se establece en MWs . Un % (en peso o en volumen) de la mezcla en el momento de la primera mezcla se mezcla con agua o una solución acuosa en el momento de la segunda mezcla. En este caso, la concentración C_s (representada en mM) del sustrato para medir la actividad lipasa después de la segunda mezcla se puede expresar mediante la siguiente ecuación.

$$C_s = (W_s \times 10^6) \times (A/100) / (V_f \times MWs) = (W_s \times A \times 10^4) / (V_f \times MWs)$$

Dado que el peso molecular MWs del sustrato para medir la actividad lipasa (DGGMR) es 752,05, la ecuación anterior se puede expresar como sigue.

$$C_s = (W_s \times A \times 10^4) / (V_f \times 752,05)$$

En este caso, en consecuencia, el volumen final V_f (representado en ml) después de mezclar agua o una solución acuosa en el momento de la segunda mezcla se puede expresar como sigue.

$$V_f = (W_s \times A \times 10^4) / (C_s \times MWs)$$

Esto es, $V_f = (W_s \times A \times 10^4) / (C_s \times 752,05)$.

En el momento de la segunda mezcla, en consecuencia, se puede mezclar agua o una solución acuosa para alcanzar el volumen V_f (representado en ml) calculado usando la ecuación anterior. Por lo tanto, se puede obtener una solución de sustrato para medir la actividad lipasa que comprende el sustrato para medir la actividad lipasa (DGGMR) a una concentración deseada.

(ii) En vista de la concentración del presente aceite de silicona modificado

Como se describe con detalle en la sección 2 anterior. "(3) Cantidad del presente aceite de silicona modificado mezclado", la concentración del presente aceite de silicona modificado después de la segunda mezcla es, preferentemente, del 0,01 % (p/v) o superior, más preferentemente del 0,05 % (p/v) o superior, y, aún más preferentemente, del 0,1 % (p/v) o superior, en vista de la finalidad anterior.

Como se describe con detalle en la sección 2 anterior. "(3) Cantidad del presente aceite de silicona modificado mezclado", también, después de la segunda mezcla, la concentración del presente aceite de silicona modificado es, preferentemente, del 20 % (p/v) o inferior, más preferentemente, del 10 % (p/v) o inferior, y, aún más preferentemente, 5 % (p/v) o inferior, en vista de la finalidad anterior.

Con respecto a la relación entre la concentración preferente del presente aceite de silicona modificado y el volumen final después de mezclar agua o una solución acuosa en el momento de la segunda mezcla, por ejemplo, se pueden considerar los siguientes casos (a) y (b).

(a) Caso en el que toda la mezcla del sustrato para medir la actividad lipasa y el presente aceite de silicona modificado se mezcla con agua o una solución acuosa

La cantidad del presente aceite de silicona modificado mezclado en el momento de la primera mezcla se establece en W_p (representado en gramos). El volumen final (por ejemplo, el volumen ajustado al nivel designado) después de mezclar agua o una solución acuosa en el momento de la segunda mezcla se establece en V_f (representado en ml). La concentración C_p (representada en % (p/v)) del presente aceite de silicona modificado después de la segunda mezcla puede expresarse mediante la siguiente ecuación.

$$C_p = (W_p \times 100) / V_f$$

En este caso, en consecuencia, el volumen final V_f (representado en ml) después de mezclar agua o una solución acuosa en el momento de la segunda mezcla se puede expresar como sigue.

$$V_f = (W_p \times 100) / C_p$$

En el momento de la segunda mezcla, en consecuencia, se puede mezclar agua o una solución acuosa para alcanzar el volumen V_f (representado en ml) calculado usando la ecuación anterior. Por lo tanto, se puede obtener una solución de sustrato para medir la actividad lipasa que contiene el presente aceite de silicona modificado a una concentración deseada.

(b) Caso en el que una porción de la mezcla del sustrato para medir la actividad lipasa y el presente aceite de silicona modificado se mezcla con agua o una solución acuosa

La cantidad del presente aceite de silicona modificado mezclado en el momento de la primera mezcla se establece en W_p (representado en gramos). El volumen final (por ejemplo, el volumen ajustado al nivel designado) después de mezclar agua o una solución acuosa en el momento de la segunda mezcla se establece en V_f (representado en ml).
 5 Un % (en peso o en volumen) de la mezcla en el momento de la primera mezcla se mezcla con agua o una solución acuosa en el momento de la segunda mezcla. En este caso, la concentración C_p (representada en % (p/v)) del presente aceite de silicona modificado después de la segunda mezcla puede expresarse mediante la siguiente ecuación.

$$10 \quad C_p = (W_p \times 100) \times (A/100)/V_f = (W_p \times A)/V_f$$

En este caso, en consecuencia, el volumen final V_f (representado en ml) después de mezclar agua o una solución acuosa en el momento de la segunda mezcla se puede expresar como sigue.

$$15 \quad V_f = (W_p \times A)/C_p$$

En el momento de la segunda mezcla, en consecuencia, se puede mezclar agua o una solución acuosa para alcanzar el volumen V_f (representado en ml) calculado usando la ecuación anterior. Por lo tanto, se puede obtener una solución de sustrato para medir la actividad lipasa que contiene el presente aceite de silicona modificado a una concentración deseada.
 20

La etapa de mezclar toda o una parte de la mezcla preparada mezclando DGGMR sustrato para medir la actividad lipasa y el presente aceite de silicona modificado con agua o una solución acuosa puede llevarse a cabo a través de dos o más pasos (etapas).
 25

Esta etapa se lleva a cabo, preferentemente, a través de una pluralidad de pasos (etapas) con el propósito de producir una solución de emulsión compuesta por partículas micelares estables y uniformes.

El procedimiento en el que esta etapa se lleva a cabo a través de una pluralidad de etapas no está particularmente limitado. Por ejemplo, se pueden emplear procedimientos llevados a cabo a través de las siguientes etapas <A> y .
 30

Etapas <A> en la que se mezcla una cierta cantidad de agua o una solución acuosa con toda o una parte de la mezcla preparada mezclando DGGMR y el presente aceite de silicona modificado.
 35

Etapas en la que una cierta cantidad adicional de agua o una solución acuosa se mezcla con el líquido mixto después de que el agua o solución acuosa anterior se mezcle con la mezcla obtenida en la etapa <A> (es decir, la mezcla de DGGMR con el presente aceite de silicona modificado).

En este caso, el volumen (volumen fijo) del "agua o solución acuosa" mezclada con "toda o una parte de la mezcla preparada mezclando DGGMR con el presente aceite de silicona modificado" en la etapa <A> se establece en V_a (representado en ml). El volumen final después de "una cierta cantidad adicional de agua o una solución acuosa" se mezcla con el líquido mixto en la etapa (es decir, el volumen final después de mezclar el agua o una solución acuosa se mezcla en el momento de la segunda mezcla) (por ejemplo, el volumen ajustado al nivel designado) se establece en V_f (representado en ml). Con el fin de producir una solución de emulsión compuesta por partículas micelares estables y uniformes, la relación (V_f/V_a) calculada dividiendo V_f por V_a es, preferentemente, de 1 a 500.
 40
 45

Específicamente, los valores de V_a y V_f (volúmenes) se seleccionan preferentemente, para ajustar la relación (V_f/V_a) calculada dividiendo V_f por V_a dentro de un intervalo de 1 a 500, en vista de la finalidad anterior.
 50

En vista de la finalidad anterior, también, la relación (V_f/V_a) calculada dividiendo V_f por V_a está, más preferentemente en un intervalo de 2 a 200 y, aún más preferiblemente dentro de un intervalo de 5 a 100.

En vista de la finalidad anterior, de manera específica, los valores de V_a y V_f (volúmenes) se seleccionan de modo que la relación (V_f/V_a) calculada dividiendo V_f por V_a sea, más preferentemente, ajustada dentro de un intervalo de 2 a 200 y, aún más preferentemente dentro de un intervalo de 5 a 100.
 55

Etapas <A> en la que se mezcla una cierta cantidad de agua o una solución acuosa con toda o una parte de la mezcla preparada mezclando DGGMR y el presente aceite de silicona modificado no está particularmente limitado. Por ejemplo, toda o una parte de "la mezcla preparada mezclando DGGMR el presente aceite de silicona modificado" se puede añadir y mezclar con una cierta cantidad de "agua o una solución acuosa". Como alternativa, puede añadirse una cierta cantidad de "agua o una solución acuosa" y mezclarse con toda o una parte de "la mezcla preparada mezclando DGGMR con el presente aceite de silicona modificado". La etapa <A> se puede llevar a cabo mediante otros medios.
 60

Etapas en la que una cierta cantidad adicional de agua o una solución acuosa se mezcla con el líquido mixto
 65

después de que el agua o solución acuosa anterior se mezcle con la mezcla obtenida en la etapa <A> (es decir, la mezcla de DGGMR con el presente aceite de silicona modificado) no está particularmente limitada. Por ejemplo, "una mezcla obtenida mezclando la mezcla obtenida en la etapa <A> (es decir, la mezcla de DGGMR con el presente aceite de silicona modificado) y agua o una solución acuosa" se puede añadir y mezclar con una determinada cantidad de "agua o una solución acuosa". Como alternativa, una determinada cantidad de "agua o una solución acuosa" se puede añadir y mezclar con "una mezcla obtenida mezclando la mezcla obtenida en la etapa <A> (es decir, la mezcla de DGGMR con el presente aceite de silicona modificado) y agua o una solución acuosa". La etapa se puede llevar a cabo mediante otros medios.

(3) Procedimiento de mezcla

En la etapa de mezclar toda o una parte de la mezcla preparada mezclando DGGMR como sustrato para medir la actividad lipasa y el presente aceite de silicona modificado con agua o una solución acuosa, un método para mezclar toda o una parte de la mezcla con agua o una solución acuosa no está particularmente limitado, siempre que la mezcla se pueda mezclar con el agua o la solución acuosa.

No es necesario realizar la mezcla de la siguiente manera: el sustrato para medir la actividad lipasa se mezcla en una solución que contiene un disolvente orgánico (por ejemplo, un alcohol); gota a gota se añade un líquido que contiene el sustrato para medir la actividad lipasa y se mezcla en una solución; un líquido que contiene el sustrato para medir la actividad lipasa se inyecta por chorro en una solución; una solución de sustrato para medir la actividad lipasa se agita usando un mezclador fuerte a alta velocidad; una solución de sustrato para medir la actividad lipasa se somete a ultrasonidos; o similares. Por consiguiente, la mezcla no requiere un procesamiento engorroso o especial de manera que se requiera habilidad, o no necesita un aparato u otros elementos especiales. Se puede usar un mezclador común para mezclar a una velocidad típica. De manera análoga, se puede utilizar un procedimiento habitual para la mezcla. De esta forma, la totalidad o una parte de la mezcla de DGGMR como sustrato para medir la actividad lipasa y el presente aceite de silicona modificado se puede mezclar con agua o una solución acuosa.

(4) Temperatura en el momento de la mezcla

En la etapa de mezclar toda o una parte de la mezcla preparada mezclando DGGMR como sustrato para medir la actividad lipasa y el presente aceite de silicona modificado con agua o una solución acuosa, la temperatura a la que se mezcla toda o una parte de la mezcla con agua o una solución acuosa no está particularmente limitada. Sin embargo, es preferente que esta etapa se realice a una temperatura igual o inferior al punto de enturbiamiento del presente aceite de silicona modificado utilizado, con el fin de producir una solución de emulsión compuesta por partículas micelares estables y uniformes.

La etapa de mezclar toda o una parte de la mezcla preparada mezclando DGGMR y el presente aceite de silicona modificado con agua o una solución acuosa se lleva a cabo, más preferentemente, a una temperatura que es 10 °C más baja que el punto de enturbiamiento del presente aceite de silicona modificado o inferior y, aún más preferentemente, se lleva a cabo a una temperatura de 25 °C o inferior, en vista de la finalidad anterior.

La etapa de mezclar toda o una parte de la mezcla preparada mezclando DGGMR y el presente aceite de silicona modificado con agua o una solución acuosa se lleva a cabo, preferentemente, a una temperatura igual o mayor que el punto de fusión de cada DGGMR y el presente aceite de silicona modificado, con el fin de producir una solución de emulsión compuesta por partículas micelares estables y uniformes.

La etapa de mezclar toda o una parte de la mezcla preparada mezclando DGGMR y el presente aceite de silicona modificado con agua o una solución acuosa se lleva a cabo, más preferentemente, a 10 °C o superior y, aún más preferentemente, a 15 °C o superior, en vista de la finalidad anterior.

(5) Duración de la mezcla

En la etapa de mezclar toda o una parte de la mezcla preparada mezclando DGGMR como sustrato para medir la actividad lipasa y el presente aceite de silicona modificado con agua o una solución acuosa, la duración de mezclar toda o una parte de la mezcla con agua o una solución acuosa no está particularmente limitada, siempre que la mezcla de DGGMR con el presente aceite de silicona modificado se pueda mezclar uniformemente con el agua o una solución acuosa.

Normalmente, la mezcla se lleva a cabo, preferentemente, durante 5 minutos o más con el fin de producir una solución emulsionada de un sustrato para medir la actividad lipasa compuesta por partículas micelares estables y uniformes. En general, una duración de 5 minutos es suficiente.

La duración requerida para mezclar la mezcla de DGGMR con el presente aceite de silicona modificado con agua o una solución acuosa no tiene un límite superior particular. Por ejemplo, la mezcla puede llevarse a cabo durante varias horas. A la luz de la idea de que el tiempo es coste, la duración generalmente puede ser de 10 minutos incluso si la mezcla se realiza con cuidado.

[2] El reactivo para medir la actividad lipasa

I. Descripción general

El reactivo para medir la actividad lipasa comprende una solución de sustrato para medir la actividad lipasa que comprende una solución de emulsión que comprende partículas micelares de éster de (6'-metilresorufina) de ácido 1,2-o-dilauril-rac-glicero-3-glutárico (DGGMR) y aceite de silicona modificado de tipo modificado con poliéter no reactivo de tipo cadena lateral (la solución de emulsión y la solución de sustrato para medir la actividad lipasa son como se describe con detalle en la sección "[1] Solución de sustrato para medir la actividad lipasa").

El reactivo para medir la actividad lipasa es excelente en términos de estabilidad de almacenamiento debido a la constitución descrita anteriormente.

II. Reactivo para medir la actividad lipasa

1. Constitución de un reactivo para medir la actividad lipasa, etc.

El reactivo para medir la actividad lipasa puede consistir en la solución de sustrato para medir la actividad lipasa o puede comprender la solución de sustrato para medir la actividad lipasa y otros miembros reactivos (por ejemplo, un kit de reactivos).

Por los motivos (a) y (b) descritos a continuación, el reactivo para medir la actividad lipasa está, preferentemente, en forma de un kit de reactivos que comprende la solución de sustrato para medir la actividad lipasa de la presente invención y otros miembros reactivos.

(a) El sustrato para medir la actividad lipasa (DGGMR) según la presente invención es estable a pH 4 o cercano a él. Por el contrario, la actividad de la lipasa es óptima a pH 8 o cercano a él. Esto es, los intervalos de pH adecuados son diferentes.

(b) Cuando un reactivo todo en uno contiene el sustrato para medir la actividad lipasa (DGGMR) de acuerdo con la presente invención, una colipasa y, como promotor de lipasa, ácido biliar o una sal del mismo, el sustrato para medir la actividad lipasa (DGGMR) se vuelve inestable.

Por lo tanto, el kit de reactivos comprende, preferentemente, la solución de sustrato para medir la actividad lipasa y otros miembros reactivos. En este caso, Un reactivo que contiene el sustrato para medir la actividad lipasa (DGGMR) tiene, preferentemente, un pH de 4 o cercano a él. Al menos uno de los otros miembros reactivos a combinar con el reactivo anterior tiene, preferentemente, un pH de 8 o superior. Además, es preferente que el sustrato para medir la actividad lipasa (DGGMR), una colipasa y, como promotor de lipasa, el ácido biliar o una sal del mismo no se incluyan en un reactivo.

Preferentemente, el reactivo para medir la actividad lipasa es un kit de reactivos de dos componentes que consiste en la solución de sustrato para medir la actividad lipasa de acuerdo con la presente invención y otro miembro reactivo.

En este caso, es más preferente que se use otro miembro reactivo como el primer reactivo y la solución de sustrato para medir la actividad lipasa se use como el segundo reactivo.

En este caso, es aún más preferente que otro miembro reactivo tenga un pH de 8 o más y la solución de sustrato para medir la actividad lipasa tiene un pH de 4 o cercano a él.

Además, es preferente que la solución de sustrato para medir la actividad lipasa no comprenda simultáneamente "la colipasa" y "el ácido biliar o la sal del mismo como un promotor de la lipasa", y que el otro miembro reactivo comprenda al menos uno de "la colipasa" y "el ácido biliar o la sal del mismo como un promotor de la lipasa".

El reactivo para medir la actividad lipasa puede usarse para llevar a cabo la medición mediante un método de punto final. Como alternativa, el reactivo puede usarse para llevar a cabo la medición mediante un método de velocidad de reacción (un método de velocidad). Si bien se puede seleccionar un método adecuado según las necesidades, la medición se lleva a cabo, preferentemente, mediante el método de velocidad de reacción (el método de velocidad).

Con respecto al reactivo para medir la actividad lipasa, el sustrato para medir la actividad lipasa (DGGMR) se pone en contacto con la muestra para permitir que la reacción continúe y se generan 1,2-o-dilauril-rac-glicerol y éster de (6'-metilresorufina) de ácido glutárico como resultado de la hidrólisis catalizada por la lipasa. Sin embargo, el éster de (6'-metilresorufina) de ácido glutárico es inestable y, por lo tanto, se hidroliza de forma fácil y naturalmente para dar 6'-metilresorufina ($\lambda_{\text{máx}}$: 580 nm).

Por consiguiente, se mide un aumento en la 6'-metilresorufina resultante leyendo la absorbancia a un valor de 580 nm o cerca del mismo y luego se puede determinar el valor de la actividad lipasa contenida en la muestra. En dicho caso,

se puede emplear un método de longitud de onda única o un método de dos longitudes de onda.

Cuando el reactivo para medir la actividad lipasa se somete a medición, la temperatura puede ajustarse a, por ejemplo, 30 °C o 37 °C, para que la reacción de medición pueda continuar y un componente de reacción, tal como una enzima implicada en la reacción de medición, no se inactive, desnaturalice o modifique debido al calor.

La reacción de medición que implica el uso del reactivo para medir la actividad lipasa puede iniciarse por, por ejemplo, añadiendo el sustrato para medir la actividad lipasa (DGGMR) o añadiendo la muestra.

La reacción de medición que implica el uso del reactivo para medir la actividad lipasa puede realizarse manualmente o usando un dispositivo (por ejemplo, un analizador automático).

Asimismo, todos o parte de los miembros reactivos del reactivo para medir la actividad lipasa pueden ser líquidos.

La solución de sustrato para medir la actividad lipasa por sí misma, puede comercializarse y usarse para medir la actividad lipasa en una muestra.

La solución de sustrato para medir la actividad lipasa puede comercializarse en combinación con otro miembro reactivo u otros reactivos y usarse para medir la actividad lipasa en una muestra.

Los ejemplos de otro miembro reactivo y otros reactivos incluyen: un tampón; un diluyente de muestra; un diluyente reactivo; un reactivo que contiene una sustancia utilizada para la calibración; y un reactivo que contiene una sustancia utilizada para el control de calidad.

2. Ejemplos específicos del reactivo para medir la actividad lipasa

A continuación se describen ejemplos específicos del reactivo para medir la actividad lipasa.

(1) Ejemplo 1

(a) Primer reactivo (una solución acuosa (pH 8,3 a 20 °C) que contiene los siguientes componentes reactivos a las concentraciones respectivas que se describen a continuación).

Desoxicolato de sodio (un promotor de lipasa) al 2 % (p/v)
 Cloruro de calcio (un activador de lipasa) 5 mM
 Colipasa (derivada de páncreas porcino; Roche Diagnostics K. K. (Japón) 375K Unidad/l (5 mg/l)
 Bicina (un tampón) 40 mM

(b) Segundo reactivo (una solución de sustrato para medir la actividad lipasa (una solución acuosa (pH 4,0 a 20 °C) que contiene los siguientes componentes reactivos a las concentraciones respectivas descritas a continuación)

éster de (6'-metilresorufina) de ácido 1,2-o-dilauril-rac-glicero-3-glutámico (DGGMR) (Roche Diagnostics K. K. (Japón)) (un sustrato para medir la actividad lipasa) 0,3 mM
 Aceite de silicona modificado de tipo modificado con poliéter no reactivo de tipo cadena lateral al 0,3 % (p/v)
 Ácido L-tartárico (un tampón) 40 mM

(2) Ejemplo 2

(a) Primer reactivo (la solución acuosa (pH 8,4 a 20 °C) que contiene los siguientes componentes reactivos a las concentraciones respectivas descritas a continuación)

Taurodesoxicolato de sodio (un promotor de lipasa) al 2% (p/v)
 Desoxicolato de sodio (un promotor de lipasa) al 0,2 % (p/v)
 Cloruro de calcio (un activador de lipasa) 5 mM
 Colipasa (derivada de páncreas porcino; Roche Diagnostics K. K. (Japón) 150K Unidad/l (2 mg/l)
 Tris(hidroximetil)aminometano (Tris) (un tampón) 40 mM

(b) Segundo reactivo (la solución de sustrato para medir la actividad lipasa (una solución acuosa que contiene los siguientes componentes reactivos a las concentraciones respectivas descritas a continuación)

éster de (6'-metilresorufina) de ácido 1,2-o-dilauril-rac-glicero-3-glutámico (DGGMR) (Roche Diagnostics K. K. (Japón)) (un sustrato para medir la actividad lipasa) 0,6 mM
 Aceite de silicona modificado de tipo modificado con poliéter no reactivo de tipo cadena lateral al 0,3 % (p/v)
 Taurodesoxicolato de sodio (un promotor de lipasa) al 2% (p/v)

[3] El método para medir la actividad lipasa en una muestra

I. Descripción general

El método para medir la actividad de la lipasa en una muestra implica el uso de una solución de sustrato para medir la actividad lipasa que comprende una solución de emulsión que comprende partículas micelares de éster (6'-metilresorufina) de ácido 1,2-o-dilauril-rac-glicero-3 -glutárico (DGGMR) y aceite de silicona modificado de tipo modificado con poliéter no reactivo de tipo cadena lateral, midiendo así la actividad lipasa en una muestra (la solución de emulsión y la solución de sustrato para medir la actividad lipasa se describen con detalle en la sección "[1] Solución de sustrato para medir la actividad lipasa. El reactivo para medir la actividad lipasa también se describe con detalle en el [2] Reactivo para medir la actividad lipasa como se ha descrito anteriormente).

El método para medir la actividad lipasa en una muestra puede proporcionar valores medidos con precisión durante un largo período de tiempo debido a la constitución como se ha descrito anteriormente.

II. Método para medir la actividad lipasa

1. Método para medir la actividad lipasa en una muestra

Cuando la actividad lipasa en una muestra se mide por el método para medir la actividad lipasa en una muestra, dicha medición puede llevarse a cabo mediante un método de punto final. Como alternativa, la medición puede realizarse mediante un método de velocidad de reacción (un método de velocidad). Si bien se puede seleccionar un método adecuado según las necesidades, la medición se lleva a cabo, preferentemente, mediante el método de velocidad de reacción (el método de velocidad).

Cuando la actividad lipasa en una muestra se va a medir mediante el método para medir la actividad lipasa en una muestra, se puede seleccionar un método de una etapa en el que la medición se realiza a través de una etapa o un método de varias etapas en el que la medición se realiza a través de dos o más etapas, para llevar a cabo la medición.

Cuando el reactivo para medir la actividad lipasa utilizado para medir la actividad lipasa en una muestra está compuesto por el primer reactivo, el segundo reactivo y otro(s) reactivo(s) (uno o más reactivos); es decir, cuando dicho reactivo está compuesto por tres o más reactivos, la reacción de medición se puede realizar a través del número de etapas necesarias para la medición utilizando estos reactivos (dos o más etapas o tres o más etapas, según necesidad), para medir la actividad lipasa en la muestra.

En el método para medir la actividad lipasa en una muestra, el sustrato para medir la actividad lipasa (DGGMR) se pone en contacto y se deja reaccionar con la muestra, y se genera 1,2-o-dilauril-rac-glicerol y éster de (6'-metilresorufina) de ácido glutárico como resultado de la hidrólisis catalizada por una lipasa. Este éster de (6'-metilresorufina) de ácido glutárico es inestable y, por lo tanto, se hidroliza de forma fácil y naturalmente para dar 6'-metilresorufina ($\lambda_{\text{máx}}$: 580 nm).

Por consiguiente, se puede medir un aumento en la 6'-metilresorufina resultante leyendo la absorbancia a 580 nm o cerca de ella y se puede determinar el valor de la actividad lipasa contenida en la muestra. En dicho caso, se puede emplear un método de longitud de onda única o un método de dos longitudes de onda.

El valor de actividad lipasa contenida en la muestra puede calcularse en función de la absorbancia (o transmitancia) medida o un cambio en la absorbancia (o transmitancia) mediante un método seleccionado de manera apropiada. Por ejemplo, el valor de la actividad puede calcularse en función de la absorbancia (o transmitancia) medida sobre la base del coeficiente de absorción molar de 6'-metilresorufina, o el valor de la actividad puede calcularse en comparación con la absorbancia (o transmitancia) de un material de referencia (por ejemplo, una solución patrón o suero de referencia) con el valor de actividad de lipasa conocido.

El valor de actividad de la lipasa contenida en la muestra se calcula, preferentemente, restando un valor de blanco de reactivo de la absorbancia (o transmitancia) obtenida midiendo la muestra.

En el método para medir la actividad lipasa en una muestra, la temperatura durante la medición puede establecerse en, por ejemplo, 30 °C o 37 °C, que está dentro de un intervalo de temperatura, de modo que la reacción de medición pueda continuar y los componentes de reacción como una enzima implicada en la reacción de medición no se inactiven, desnaturalicen o modifiquen debido al calor.

En el método para medir la actividad lipasa en una muestra, la reacción de medición puede iniciarse con la adición de, por ejemplo, el sustrato para medir la actividad lipasa o con la adición de la muestra.

En el método para medir la actividad lipasa en una muestra, la medición puede realizarse de forma manual o utilizando un dispositivo (por ejemplo, un analizador automático).

2. Ejemplos específicos del método para medir la actividad lipasa en una muestra

A continuación, se proporcionan ejemplos específicos del método para medir la actividad lipasa en una muestra.

(1) Reactivo para medir la actividad lipasa

(a) Primer reactivo

El primer reactivo descrito en la sección anterior [2] II. 2 (1) (a) se usó como el primer reactivo en este ejemplo específico con respecto a la medición.

(b) Segundo reactivo

El segundo reactivo descrito en la sección anterior [2] II. 2 (1) (b) se usó como el segundo reactivo en este ejemplo específico con respecto a la medición.

(2) Muestra

Se usó suero humano como muestra.

(3) Medición

(a) Primera etapa

La muestra de (2) y el primer reactivo de (1) (a) se mezclan para preparar un líquido mixto.

La cantidad de cada uno de la muestra y el primer reactivo a mezclar puede determinarse adecuadamente dependiendo de la cantidad del segundo reactivo, el valor de actividad de la lipasa contenida en la muestra y otras condiciones.

Por ejemplo, la cantidad de la muestra está, preferentemente, dentro de un intervalo de 0,5 a 100 µl, y la cantidad del primer reactivo está, preferentemente, dentro de un intervalo de 20 a 1.000 µl, en general.

Después de preparar un líquido mixto, el líquido mixto resultante se somete después a incubación.

El período de incubación no está particularmente limitado. En general, está, preferentemente, en un rango de 20 minutos, más preferentemente en un rango de 10 minutos y, aún más preferentemente, en un rango de 5 minutos.

La incubación puede realizarse a una temperatura superior a la temperatura a la que se congela el líquido mixto anterior.

En el momento de la medición, en general, a medida que aumenta la temperatura, aumenta la velocidad de reacción. Por consiguiente, es preferente una temperatura más alta.

Si la temperatura es demasiado alta, sin embargo, los componentes (por ejemplo, una enzima) que participan en la reacción de medición se desnaturalizan o inactivan. Por consiguiente, Es necesario que la incubación se realice a una temperatura inferior a la temperatura a la que los componentes (por ejemplo, una enzima) implicados en la reacción de medición se desnaturalizan o inactivan.

En general, la incubación se lleva a cabo preferente a una temperatura de 2 °C a 70 °C, más preferentemente, de 20°C a 37°C e incluso más preferentemente de 30°C a 37°C.

Si los componentes (por ejemplo, una enzima) implicados en la reacción de medición son componentes resistentes al calor (por ejemplo, una enzima termoestable), la temperatura puede ser mucho más alta.

Al preparar un líquido mixto de la muestra y el primer reactivo y someter el líquido mixto a incubación, la lipasa contenida en la muestra se pone en contacto con los componentes reactivos del primer reactivo y, a continuación, la lipasa es estimulada y activada por dichos componentes.

(b) Segunda etapa

El "líquido mixto de la muestra y el primer reactivo" preparado en la primera etapa se mezcla con el segundo reactivo de (1) (b) anterior. El resultante se designa como la solución de reacción final.

La cantidad del segundo reactivo a mezclar puede determinarse adecuadamente dependiendo de la cantidad de la muestra, la cantidad del primer reactivo, el valor de actividad de la lipasa contenida en la muestra, los ajustes de un analizador utilizado y otras condiciones.

Por ejemplo, la cantidad del segundo reactivo está, preferentemente, dentro de un intervalo de 10 a 1.000 μ l, en general.

5 Después de preparar la solución de reacción final, el líquido mixto resultante se somete después a incubación.

El período de incubación no está particularmente limitado. En general, está, preferentemente, en un rango de 20 minutos, más preferentemente en un rango de 10 minutos y, aún más preferentemente, en un rango de 5 minutos.

10 La incubación se puede llevar a cabo a una temperatura superior a la temperatura a la que se congela la solución de reacción final anterior.

En el momento de la medición, en general, a medida que aumenta la temperatura, aumenta la velocidad de reacción. Por consiguiente, es preferente una temperatura más alta.

15 Si la temperatura es demasiado alta, sin embargo, los componentes (por ejemplo, una enzima) implicados en la reacción de medición se desnaturalizan o se inactivan. Por consiguiente, Es necesario que la incubación se realice a una temperatura inferior a la temperatura a la que los componentes (por ejemplo, una enzima) implicados en la reacción de medición se desnaturalizan o inactivan.

20 En general, la incubación se lleva a cabo, preferentemente, a una temperatura de 2 °C a 70 °C, más preferentemente, de 20°C a 37°C e incluso más preferentemente de 30°C a 37°C.

25 Si los componentes (por ejemplo, enzimas) implicados en la reacción de medición son componentes resistentes al calor (por ejemplo, enzimas termoestables), la temperatura puede ser mucho más alta.

Como resultado de la preparación e incubación de la solución de reacción final, la actividad lipasa es estimulada y activada en la primera etapa, la reacción de medición se inicia en la segunda etapa y, a continuación, se procede a la reacción para la medición de la actividad lipasa contenida en la muestra.

30 De acuerdo con la presente divulgación específicamente, el segundo reactivo (la solución de sustrato para medir la actividad lipasa), que es una solución de sustrato emulsionada compuesta por partículas micelares estables y uniformes, se pone en contacto con la lipasa contenida en la muestra en la segunda etapa. Como resultado de la hidrólisis catalizada por la lipasa, se generan 1,2-o-dilauril-rac-glicerol y éster de (6'-metilresorufina) de ácido glutámico a partir del sustrato para medir la actividad lipasa (DGGMR).

Este éster de (6'-metilresorufina) de ácido glutámico es inestable y, por lo tanto, se hidroliza de forma fácil y naturalmente para dar 6'-metilresorufina ($\lambda_{\text{máx}}$: 580 nm).

40 La longitud de onda de absorción máxima ($\lambda_{\text{máx}}$) de la 6'-metilresorufina resultante es de 580 nm. La absorbancia (o transmitancia) de la solución de reacción final derivada de esta 6'-metilresorufina se mide leyendo la absorbancia (o transmitancia) en o cerca de 580 nm.

45 Posteriormente, el valor de actividad de la lipasa contenida en la muestra se calcula en función de la absorbancia (o transmitancia) medida o un cambio en la absorbancia (o transmitancia).

El valor de la actividad puede calcularse en función de la absorbancia (o transmitancia) medida sobre la base del coeficiente de absorción molar de 6'-metilresorufina, o el valor de la actividad puede calcularse en comparación con la absorbancia (o transmitancia) de un material de referencia (por ejemplo, una solución patrón o suero de referencia)

50 con el valor de actividad de lipasa conocido.

El valor de actividad de la lipasa contenida en la muestra se calcula, preferentemente, en función de la diferencia en la absorbancia ($\Delta\text{Abs.}$) determinada restando un valor de un blanco reactivo de la absorbancia (o transmitancia) de la solución de reacción final obtenida midiendo la muestra.

55 [4] La solución de emulsión

La solución de emulsión del uso de la presente invención comprende partículas micelares de éster de (6'-metilresorufina) de ácido 1,2-o-dilauril-rac-glicero-3-glutámico y aceite de silicona modificado de tipo modificado con poliéter no reactivo de tipo cadena lateral. (La solución de emulsión y la solución de sustrato para medir la actividad lipasa son como se describe con detalle en la sección "[1] Solución de sustrato para medir la actividad lipasa". El reactivo para medir la actividad lipasa es como se describe con detalle en la sección "[2] Reactivo para medir la actividad lipasa". El método para medir la actividad lipasa en una muestra es como se describe con detalle en la sección "[3] Método para medir la actividad lipasa en una muestra".

65 La solución de emulsión es excelente en términos de estabilidad de almacenamiento debido a la constitución descrita

anteriormente.

[5] Uso de acuerdo con la invención de una composición para estabilizar la solución de sustrato para medir la actividad lipasa de la presente invención

El uso para estabilizar la solución de sustrato para medir la actividad lipasa con el uso de éster de (6'-metilresorufina) de ácido 1,2-o-dilauril-rac-glicero-3-glutámico (DGGMR) como sustrato para medir la actividad lipasa de acuerdo con la presente invención se caracteriza por que la solución de sustrato comprende el aceite de silicona modificado de tipo modificado con poliéter no reactivo de tipo cadena lateral junto con éster de (6'-metilresorufina) de ácido 1,2-o-dilauril-rac-glicero-3-glutámico. (La solución de emulsión y la solución de sustrato para medir la actividad lipasa son como se describe con detalle en la sección "[1] Solución de sustrato para medir la actividad lipasa". El reactivo para medir la actividad lipasa es como se describe con detalle en la sección "[2] Reactivo para medir la actividad lipasa". El método para medir la actividad lipasa en una muestra es como se describe con detalle en la sección "[3] Método para medir la actividad lipasa en una muestra".

El uso para estabilizar la solución de sustrato para medir la actividad lipasa de la presente invención es capaz de mejorar la estabilidad de almacenamiento de la solución de sustrato para medir la actividad lipasa debido a la constitución descrita anteriormente.

[6] Uso de acuerdo con la invención de una composición para estabilizar la solución de emulsión

El uso para estabilizar la solución de emulsión que comprende partículas micelares de éster de (6'-metilresorufina) de ácido 1,2-o-dilauril-rac-glicero-3-glutámico (DGGMR) de acuerdo con el presente documento se caracteriza por que la solución de emulsión comprende el aceite de silicona modificado de tipo modificado con poliéter no reactivo de tipo cadena lateral junto con éster de (6'-metilresorufina) de ácido 1,2-o-dilauril-rac-glicero-3-glutámico. (La solución de emulsión y la solución de sustrato para medir la actividad lipasa son como se describe con detalle en la sección "[1] Solución de sustrato para medir la actividad lipasa". El reactivo para medir la actividad lipasa es como se describe con detalle en la sección "[2] Reactivo para medir la actividad lipasa". El método para medir la actividad lipasa en una muestra es como se describe con detalle en la sección "[3] Método para medir la actividad lipasa en una muestra".

El uso de la composición para estabilizar la solución de emulsión del presente documento es capaz de mejorar la estabilidad de almacenamiento de la solución de emulsión debido a la constitución descrita anteriormente.

Ejemplos

A continuación, la presente invención se describe con más detalle con referencia a los ejemplos, aunque la presente invención no se limita a estos ejemplos.

[Ejemplo 1] (Verificación de los efectos de la solución de sustrato para medir la actividad lipasa -1)

Se inspeccionaron los efectos de la solución de sustrato para medir la actividad lipasa con respecto a la estabilidad de almacenamiento.

1. Preparación de reactivos

Se preparó la solución de sustrato para medir la actividad lipasa (es decir, la solución de sustrato para medir la actividad lipasa que comprende la solución de emulsión).

Por separado, se preparó una solución de sustrato de control para medir la actividad lipasa.

Además, se preparó una solución tampón.

[1] Preparación de la solución de sustrato para medir la actividad lipasa

(1) Una porción (0,09 g) del sustrato para medir la actividad lipasa; es decir, éster de (6'-metilresorufina) de ácido 1,2-o-dilauril-rac-glicero-3-glutámico (DGGMR) distribuidor: Roche Diagnostics K. K. (Japón)), se fraccionó en un vaso de precipitados (volumen: 10 ml).

(2) Posteriormente, una porción (4,0 g) del aceite de silicona modificado no reactivo de tipo cadena lateral (tipo modificado con poliéter); KF-351A (distribuidor: Shin-Etsu Chemical Co., Ltd., Japón)), se fraccionó y se añadió al vaso de precipitados de (1).

(3) Después de la adición (2) anterior, el contenido del vaso de precipitados se agitó a temperatura ambiente (25 °C) para mezclar el sustrato para medir la actividad lipasa (DGGMR) y el presente aceite de silicona modificado (KF-351A) en el vaso de precipitados.

Este proceso de mezcla (agitación) se realizó durante 5 minutos para preparar una "mezcla del sustrato para medir la actividad lipasa (DGGMR) y el presente aceite de silicona modificado".

La agitación se realizó montando el vaso de precipitados sobre un agitador múltiple (modelo: M-3; distribuidor: AS

ONE Corporation (Japón)) y haciendo girar una barra magnética en el vaso de precipitados mientras ajusta el dial de una unidad de control del agitador múltiple en "3".

(4) Posteriormente, se añadió una "cierta cantidad (4,0 ml) de solución acuosa de taurodesoxicolato de sodio al 2 % (p/v)" a (toda) la "mezcla del sustrato para medir la actividad lipasa (DGGMR) y el presente aceite de silicona modificado" en el vaso de precipitados de (3) con agitación a temperatura ambiente (25 °C) con el uso de una micropipeta.

Después de la adición, la agitación continuó a temperatura ambiente (25 °C) durante 5 minutos. De esta forma, (toda) la "mezcla preparada mezclando el sustrato para medir la actividad lipasa (DGGMR) y el presente aceite de silicona modificado" se mezcló con la "cierta cantidad (4,0 ml) de solución acuosa de taurodesoxicolato de sodio al 2 % (p/v)".

La agitación se realizó montando el vaso de precipitados sobre un agitador múltiple (modelo: M-3; distribuidor: AS ONE Corporation (Japón)) y haciendo girar una barra magnética en el vaso de precipitados mientras ajusta el dial de una unidad de control del agitador múltiple en "3".

(5) Posteriormente, una cierta cantidad de solución acuosa de taurodesoxicolato de sodio al 2 % (p/v) se añadió adicionalmente al "líquido mixto preparado mezclando la mezcla (es decir, la mezcla del sustrato para medir la actividad lipasa (DGGMR) y el presente aceite de silicona modificado) y una cierta cantidad de solución acuosa de taurodesoxicolato de sodio al 2 % (p/v) "obtenida en (4) anterior, para llevar el volumen final de la solución a 200 ml.

(6) A través del procedimiento descrito anteriormente, se preparó la solución de sustrato para medir la actividad lipasa (el sustrato para medir la actividad lipasa: DGGMR; el presente aceite de silicona modificado: KF-351A).

En la solución de sustrato para medir la actividad lipasa, la concentración del sustrato para medir la actividad lipasa (DGGMR) fue de 0,6 mM y la del presente aceite de silicona modificado (KF-351A) fue del 2,0 % (p/v).

Además, no se observó gradiente de concentración ni fuerte turbidez en la solución de sustrato para medir la actividad lipasa. Se confirmó visualmente que la solución de sustrato se había mezclado uniformemente.

[2] Preparación de una solución de sustrato de control para medir la actividad lipasa

(1) Una porción (0,09 g) del sustrato para medir la actividad lipasa; es decir, éster de (6'-metilresorufina) de ácido 1,2-o-dilauril-rac-glicero-3-glutámico (DGGMR) distribuidor: Roche Diagnostics K. K. (Japón)), se fraccionó en un vaso de precipitados (volumen: 10 ml).

(2) Posteriormente, una porción (1,0 g) de un tensioactivo no iónico (NIKKOL BT-7; polioxietilenéter de alquilo secundario (7); distribuidor: Nikko Chemicals Co., Ltd., Japón)), se fraccionó y se añadió al vaso de precipitados de (1).

(3) Después de la adición (2) anterior, el contenido del vaso de precipitados se agitó a temperatura ambiente (25 °C) para mezclar el sustrato para medir la actividad lipasa (DGGMR) y el tensioactivo en el vaso de precipitados. Este proceso de mezcla (agitación) se realizó durante 5 minutos para preparar una "mezcla del sustrato para medir la actividad lipasa (DGGMR) y el tensioactivo".

La agitación se realizó montando el vaso de precipitados sobre un agitador múltiple (modelo: M-3; distribuidor: AS ONE Corporation (Japón)) y haciendo girar una barra magnética en el vaso de precipitados mientras ajusta el dial de una unidad de control del agitador múltiple en "3".

(4) Posteriormente, se añadió una "cierta cantidad (4,0 ml) de solución acuosa de taurodesoxicolato de sodio al 2 % (p/v)" a (toda) la "mezcla del sustrato para medir la actividad lipasa (DGGMR) y el tensioactivo" en el vaso de precipitados de (3) con agitación a temperatura ambiente (25 °C) con el uso de una micropipeta.

Después de la adición, la agitación continuó a temperatura ambiente (25 °C) durante 5 minutos. De esta forma, (toda) la "mezcla preparada mezclando el sustrato para medir la actividad lipasa (DGGMR) y el presente tensioactivo" se mezcló con la "cierta cantidad (4,0 ml) de solución acuosa de taurodesoxicolato de sodio al 2 % (p/v)".

La agitación se realizó montando el vaso de precipitados sobre un agitador múltiple (modelo: M-3; distribuidor: AS ONE Corporation (Japón)) y haciendo girar una barra magnética en el vaso de precipitados mientras ajusta el dial de una unidad de control del agitador múltiple en "3".

(5) Posteriormente, una cierta cantidad de solución acuosa de taurodesoxicolato de sodio al 2 % (p/v) se añadió adicionalmente al "líquido mixto preparado mezclando la mezcla (es decir, la mezcla del sustrato para medir la actividad lipasa (DGGMR) y el tensioactivo) y una cierta cantidad de solución acuosa de taurodesoxicolato de sodio al 2 % (p/v) "obtenida en (4) anterior, para llevar el volumen final de la solución a 200 ml.

(6) A través del procedimiento descrito anteriormente, se preparó una solución de sustrato de control para medir la actividad lipasa (es decir, una solución de sustrato para medir la actividad lipasa (el sustrato para medir la actividad lipasa: DGGMR; tensioactivo: NIKKOL BT-7)).

En la solución de sustrato de control para medir la actividad lipasa, la concentración del sustrato para medir la actividad lipasa (DGGMR) es 0,6 mM y la del tensioactivo es 0,5 % (p/v).

Además, no se observó gradiente de concentración ni fuerte turbidez en la solución de sustrato para medir la actividad lipasa. Se confirmó visualmente que la solución de sustrato se había mezclado uniformemente.

[3] Preparación de la solución tampón

El componente reactivo siguiente se disolvió a la concentración designada en agua pura y el nivel de pH se ajustó a 8,4 (20 °C) para preparar la solución tampón.

Bicina (un tampón) 40 mM

2. Almacenamiento de reactivo

- (1) La solución de sustrato para medir la actividad lipasa preparada en 1 [1] anterior se almacenó a 25 °C en oscuridad durante 30 días.
- (2) La solución de sustrato de control para medir la actividad lipasa preparada en 1 [2] anterior se almacenó a 25 °C en oscuridad durante 30 días.

3. Medición de la cantidad de degradación del sustrato

- (1) La solución tampón del día en que se produjo en 1 [3] anterior se designó como el primer reactivo y la solución de sustrato para medir la actividad lipasa se almacenó a 25 °C (en oscuridad) durante 30 días como se describe en 2 (1) anterior se designó como el segundo reactivo.
- (2) El segundo reactivo (960 µl) se añadió a 1.600 µl del primer reactivo para preparar un líquido mixto. Se midió la curva de absorción del líquido mixto obtenido en el punto (1) anterior. La curva de absorción se midió con el uso del espectrofotómetro de la serie DU-7500 (distribuidor: Beckman Coulter, Inc. (Japón)).
- (3) Los procedimientos descritos en los puntos (1) y (2) anteriores se realizaron de la misma manera, excepto que la solución de sustrato para medir la actividad lipasa como el segundo reactivo en el punto (1) anterior se reemplazó con la solución de sustrato de control para medir la actividad lipasa almacenada a 25 °C (en oscuridad) durante 30 días en 2 (2) anterior. La curva de absorción del líquido mixto cuando se usó la solución de sustrato de control para medir la actividad lipasa de 2 (2) anterior como se midió el segundo reactivo.

4. Resultados de la medición

La figura 1 muestra la curva de absorción del líquido mixto cuando la solución de sustrato para medir la actividad lipasa de 2 (1) anterior se usó como el segundo reactivo medido en 3 anterior.

La figura 2 muestra la curva de absorción del líquido mixto cuando la solución de sustrato de control para medir la actividad lipasa de 2 (2) anterior se usó como el segundo reactivo medido en 3 anterior.

En las figuras 1 y 2, el eje horizontal indica la longitud de onda (representada en nm) y el eje vertical indica la absorbancia (representada en Abs).

5. Análisis

- (1) Durante el almacenamiento de una solución de emulsión que comprende partículas micelares de DGGMR y una solución de sustrato para medir la actividad lipasa que implica el uso de DGGMR como sustrato para medir la actividad lipasa, el DGGMR se hidroliza gradualmente. Como resultado de la degradación de DGGMR, se genera 6'-metilresorufina al final. La 6'-metilresorufina tiene una longitud de onda de absorción máxima a 580 nm. En función de la altura del pico (la extensión del aumento) a 580 nm que indica la generación de 6'-metilresorufina en las curvas de absorción que se muestran en las figuras 1 y 2, respectivamente, se determinó la cantidad de 6'-metilresorufina generada; es decir, la cantidad de DGGMR degradado (la cantidad de hidrólisis).
- (2) Como resultado, la cantidad de DGGMR degradado como resultado del almacenamiento de la solución de sustrato para medir la actividad lipasa (Fig. 1) a 25 °C (en oscuridad) durante 30 días fue del 4,8 %. Por el contrario, la cantidad de DGGMR degradado como resultado del almacenamiento de la solución de sustrato de control para medir la actividad lipasa (Fig. 2) a 25 °C (en oscuridad) durante 30 días fue del 8,9 %.
- (3) Más específicamente, la cantidad de DGGMR degradado como resultado del almacenamiento de la solución de sustrato para medir la actividad lipasa es tan pequeña como del 54 % de la cantidad de DGGMR degradado como resultado del almacenamiento de la solución de sustrato de control para medir la actividad lipasa.
- (4) Por lo tanto, se descubrió que las soluciones eran capaces de suprimir eficazmente la degradación de DGGMR, una estabilidad de almacenamiento excelente y capaz de realizar mediciones precisas durante un largo período de tiempo.

[Ejemplo 2] (Verificación de los efectos de la solución de sustrato para medir la actividad lipasa - 2)

Se reexaminaron los efectos de la solución de sustrato para medir la actividad lipasa con respecto a la estabilidad de almacenamiento.

1. Reactivo

Se preparó una solución de sustrato para medir la actividad lipasa (es decir, una solución de sustrato para medir la actividad lipasa que comprende la solución de emulsión).

Como control, se usó una solución de sustrato de un reactivo disponible en el mercado.

También se preparó una solución tampón.

[1] Preparación de la solución de sustrato para medir la actividad lipasa

(1) Una porción (0,045 g) del sustrato para medir la actividad lipasa; es decir, éster de (6'-metilresorufina) de ácido 1,2-o-dilauril-rac-glicero-3-glutámico (DGGMR) distribuidor: Roche Diagnostics K. K. (Japón)), se fraccionó en un vaso de precipitados (volumen: 10 ml).

(2) Posteriormente, una porción (0,6 g) del aceite de silicona modificado no reactivo de tipo cadena lateral (tipo modificado con poliéter); KF-355A (distribuidor: Shin-Etsu Chemical Co., Ltd., Japón)), se fraccionó y se añadió al vaso de precipitados de (1).

(3) Después de la adición (2) anterior, el contenido del vaso de precipitados se agitó a 67 °C para mezclar el sustrato para medir la actividad lipasa (DGGMR) y el presente aceite de silicona modificado (KF-355A) en el vaso de precipitados.

Este proceso de mezcla (agitación) se realizó durante 5 minutos para preparar una "mezcla del sustrato para medir la actividad lipasa (DGGMR) y el presente aceite de silicona modificado".

La agitación se realizó montando el vaso de precipitados sobre un agitador múltiple (modelo: M-3; distribuidor: AS ONE Corporation (Japón)) y haciendo girar una barra magnética en el vaso de precipitados mientras ajusta el dial de una unidad de control del agitador múltiple en "3".

(4) Posteriormente, se añadió una "cierta cantidad (4,0 ml) de tampón de L-tartrato de sodio 40 mM (pH 4,0 a 20 °C)" (toda) la "mezcla del sustrato para medir la actividad lipasa (DGGMR) y el presente aceite de silicona modificado" en el vaso de precipitados de (3) con agitación a temperatura ambiente (25 °C) con el uso de una micropipeta.

Después de la adición, la agitación continuó a temperatura ambiente (25 °C) durante 5 minutos. De esta forma, la "cierta cantidad (4,0 ml) de tampón de L-tartrato de sodio 40 mM (pH 4,0 a 20 °C)" se mezcló con (toda) la "mezcla preparada mezclando el sustrato para medir la actividad lipasa (DGGMR) y el presente modificado aceite de silicona".

La agitación se realizó montando el vaso de precipitados sobre un agitador múltiple (modelo: M-3; distribuidor: AS ONE Corporation (Japón)) y haciendo girar una barra magnética en el vaso de precipitados mientras ajusta el dial de una unidad de control del agitador múltiple en "3".

(5) Posteriormente, se añadió adicionalmente una cierta cantidad de tampón de L-tartrato de sodio 40 mM (pH 4,0 a 20 °C) al "líquido mixto preparado mezclando la mezcla (es decir, la mezcla del sustrato para medir la actividad lipasa (DGGMR) y el presente aceite de silicona modificado) y una cierta cantidad de tampón de L-tartrato de sodio 40 mM (pH 4,0 a 20 °C)" de

(4) anterior, para llevar el volumen final a 200 ml.

(6) A través del procedimiento descrito anteriormente, la solución de sustrato para medir la actividad lipasa (el sustrato para medir la actividad lipasa: DGGMR; se preparó el presente aceite de silicona modificado: KF-355A).

En la solución de sustrato para medir la actividad lipasa, la concentración del sustrato para medir la actividad lipasa (DGGMR) fue 0,3 mM y la del presente aceite de silicona modificado (KF-355A) del mismo fue del 0,3 % (p/v).

Además, no se observó gradiente de concentración ni fuerte turbidez en la solución de sustrato para medir la actividad lipasa. Se confirmó visualmente que la solución de sustrato se había mezclado uniformemente.

[2] Reactivo de control disponible en el mercado

Se usó un reactivo disponible en el mercado para medir la actividad lipasa (un kit de reactivos para medir la actividad lipasa); es decir, Liquitech Lipase Color II (distribuidor: Roche Diagnostics K. K. (Japón)), como reactivo de control.

El "Liquitech Lipase Color II" (en adelante, en ocasiones denominado "reactivo de control disponible en el mercado") comprende un primer reactivo (es decir, una solución tampón) y un segundo reactivo (es decir, una solución de sustrato) (comprende DGGMR como sustrato para medir la actividad lipasa a 0,27 mM).

En este ejemplo se usó una "solución de sustrato" del "reactivo de control disponible en el mercado".

[3] Preparación de la solución tampón

El componente reactivo a continuación se disolvió a la concentración designada en agua pura y el nivel de pH se ajustó a 8,4 (20 °C) para preparar una solución tampón.

Bicina (un tampón) 40 mM

2. Almacenamiento de reactivo

- 5 (1) La solución de sustrato para medir la actividad lipasa preparada en 1 [1] anterior se almacenó a 30 °C en oscuridad durante 35 días.
 (2) La solución de sustrato del reactivo de control disponible en el mercado preparado en 1 [2] anterior se almacenó a 30 °C en oscuridad durante 35 días.

10 3. Medición de la cantidad de degradación del sustrato

- (1) La solución tampón del día en que se produjo en 1 [3] arriba designado como el primer reactivo y la solución de sustrato para medir la actividad lipasa almacenada a 30 °C (en oscuridad) en 2 (1) anterior designado como segundo reactivo se sometieron a la medición que se describe a continuación.
- 15 La medición se realizó el día del inicio del almacenamiento de la solución de sustrato para medir la actividad lipasa (Día 0), 7 días después del inicio del almacenamiento, 15 días después del inicio del almacenamiento, 21 días después del inicio del almacenamiento y 35 días después del inicio del almacenamiento con el uso de la solución de sustrato para medir la actividad lipasa almacenada durante el período de tiempo designado.
- 20 Al principio, se añadieron 960 µl del segundo reactivo a 1.600 µl del primer reactivo para preparar un líquido mixto.
- (2) Posteriormente, la absorbancia del líquido mixto obtenido en (1) anterior se midió a 580 nm con el uso del espectrofotómetro de la serie DU-7500 (distribuidor: Beckman Coulter, Inc. (Japón)).
- (3) Posteriormente, la absorbancia de la solución tampón del día en que se produjo en 1 [3] anterior se midió a 580 nm como una prueba del blanco con el uso del espectrofotómetro de la serie DU-7500 (distribuidor: Beckman Coulter, Inc. (Japón)).
- 25 (4) Posteriormente, la diferencia en la absorbancia se determinó restando la absorbancia medida en (3) anterior (es decir, un valor del blanco) de la absorbancia medida en (2) anterior.
- (5) Posteriormente, la diferencia en la absorbancia determinada en (4) anterior se dividió por el coeficiente de absorción molar de 6'-metilresorufina a 580 nm (es decir, 60,65 (representado en $\text{cm} \times \mu\text{mol}^{-1}$)), para calcular la concentración de 6'-metilresorufina generada tras la degradación de DGGMR durante el almacenamiento
- 30 (representado en mM).
- (6) Posteriormente, la concentración de 6'-metilresorufina (representada en mM) generada tras la degradación durante el almacenamiento determinado en (5) anterior se dividió por la concentración de DGGMR (0,3 mM) de la solución de sustrato para medir la actividad lipasa de 1 [1] anterior, para calcular la relación de la concentración de 6'-metilresorufina generada en relación con la concentración de DGGMR (1 mM) (representada en %).
- 35 Específicamente, se calculó la relación de DGGMR degradado durante el almacenamiento del reactivo en relación con la concentración de DGGMR (1 mM) en el reactivo" (es decir, la relación de degradación de DGGMR) (representada en %).
- (7) Los procedimientos descritos en (1) a (6) anteriores se realizaron de la misma manera, excepto porque la solución de sustrato para medir la actividad lipasa como segundo reactivo en (1) anterior se sustituyó por la solución de sustrato del reactivo de control disponible en el mercado almacenado a 30 °C (en oscuridad) durante 35 días
- 40 en 2 (2) anterior y la concentración (0,3 mM) de DGGMR en la solución de sustrato para medir la actividad lipasa en (6) se sustituyó por la concentración (0,27 mM) de DGGMR en la solución de sustrato del reactivo de control disponible en el mercado de 1 [2] anterior, por lo que para calcular la relación de la concentración de 6'-metilresorufina generada en relación con la concentración de DGGMR (1 mM) cuando la solución de sustrato del
- 45 reactivo de control disponible en el mercado de 2 (2) anterior se usó como segundo reactivo (representado en %).

Específicamente, se calculó la relación de DGGMR degradado durante el almacenamiento del reactivo en relación con la concentración de DGGMR (1 mM) en el reactivo (la relación de degradación de DGGMR) (representada en %).

50 4. Resultados de la medición

La tabla 1 y la figura 3 muestran "la relación de DGGMR degradado durante el almacenamiento del reactivo con respecto a la concentración de DGGMR (1 mM) en el reactivo" (es decir, la relación de degradación de DGGMR) (representado en %) cuando se usó el sustrato para medir la actividad lipasa de 2(1) anterior como segundo reactivo,

55 que se determinó en 3 anterior.

La tabla 1 y la figura 3 también muestran "la relación de DGGMR degradado durante el almacenamiento del reactivo en relación con la concentración de DGGMR (1 mM) en el reactivo" (es decir, la relación de degradación de DGGMR) (representada en %) cuando la solución de sustrato del reactivo de control disponible en el mercado de 2 (2) anterior se usó como segundo reactivo, que se determinó en 3 anterior.

60

La tabla 1 y la figura 3 muestran "la relación de degradación de DGGMR" determinada con el tiempo en relación con "la relación de degradación de DGGMR" designada como "0" el día del inicio del almacenamiento (Día 0).

65 En la figura 3, el eje horizontal indica la duración del almacenamiento de reactivos (representado en el número de días) y el eje vertical indica la relación de degradación de DGGMR (representada en %).

En la figura 3, "la relación de degradación de DGGMR" de la solución de sustrato para medir la actividad lipasa está representada por el símbolo "■" y "la relación de degradación de DGGMR" de la solución de sustrato del reactivo de control disponible en el mercado está representada por el símbolo "▲".

5

Tabla 1

Duración del almacenamiento de reactivos	Relación de degradación de DGGMR	
	Solución de sustrato para medir la actividad lipasa	Solución de sustrato de reactivo de control disponible en el mercado
0 días	0,0 %	0,0 %
7 días	0,1 %	0,6 %
15 días	0,2 %	1,4 %
21 días	0,2 %	2,0 %
35 días	0,4 %	3,3 %

5. Análisis

- 10 (1) La tabla 1 y la figura 3 demuestran que, como resultado del almacenamiento a 30 °C durante 15 días, "la relación de degradación de DGGMR" de la solución de sustrato para medir la actividad lipasa es del 0,2 % y "la relación de degradación de DGGMR" de la solución del sustrato del reactivo de control disponible en el mercado es del 1,4 %.
- 15 Específicamente, "la relación de degradación de DGGMR" de la solución de sustrato para medir la actividad lipasa es tan baja como del 14 % de "la relación de degradación de DGGMR" de la solución de sustrato del reactivo de control disponible en el mercado.
- 20 (2) La tabla 1 y la figura 3 demuestran que, como resultado del almacenamiento a 30 °C durante 35 días, "la relación de degradación de DGGMR" de la solución de sustrato para medir la actividad lipasa es del 0,4 % y "la relación de degradación de DGGMR" de la solución de sustrato del reactivo de control disponible en el mercado es del 3,3 %.
- Específicamente, "la relación de degradación de DGGMR" de la solución de sustrato para medir la actividad lipasa es tan baja como del 12 % de "la relación de degradación de DGGMR" de la solución de sustrato del reactivo de control disponible en el mercado.
- 25 (3) Sobre la base de los resultados obtenidos en este ejemplo, en consecuencia, las soluciones encontradas son capaces de suprimir efectivamente la degradación de DGGMR, una estabilidad de almacenamiento excelente y capaz de realizar mediciones precisas durante un largo período de tiempo.

[Ejemplo 3] (Verificación de los efectos de la solución de sustrato para medir la actividad lipasa - 3)

- 30 Se reexaminaron los efectos de la solución de sustrato para medir la actividad lipasa con respecto a la estabilidad de almacenamiento.

1. Reactivo

- 35 En total, se prepararon cuatro tipos de soluciones de sustrato para medir la actividad lipasa (las soluciones de sustrato para medir la actividad lipasa que comprende la solución de emulsión).

Como control, se usó una solución de sustrato de un reactivo disponible en el mercado.

- 40 También se preparó una solución tampón.

[1] Preparación de la solución de sustrato para medir la actividad lipasa

- 45 (1) Una porción (0,09 g) del sustrato para medir la actividad lipasa; es decir, éster de (6'-metilresorufina) de ácido 1,2-o-dilauryl-rac-glicero-3-glutárico (DGGMR) distribuidor: Roche Diagnostics K. K. (Japón)), se fraccionó en cada uno de los 4 vasos de precipitados (volumen: 10 ml).

(2) Posteriormente, una porción (4,0 g) de cada uno de los cuatro tipos de aceite de silicona modificado no reactivo de tipo de cadena lateral (tipo modificado con poliéter) (a) a (d) a continuación se fraccionó y se añadió por separado a cada uno de los vasos de precipitados de (1).

50

(a) KF-351A (distribuidor: Shin-Etsu Chemical Co., Ltd., Japón))

(b) KF-354A (distribuidor: Shin-Etsu Chemical Co., Ltd., Japón))

(c) KF-355A (distribuidor: Shin-Etsu Chemical Co., Ltd., Japón))

(d) KF-6011 (distribuidor: Shin-Etsu Chemical Co., Ltd., Japón))

(3) Después de la adición (2) anterior, el contenido de cada vaso de precipitados se agitó a 67 °C para mezclar el sustrato para medir la actividad lipasa (DGGMR) y el presente aceite de silicona modificado en el vaso de precipitados.

Este proceso de mezcla (agitación) se realizó durante 5 minutos para preparar una "mezcla del sustrato para medir la actividad lipasa (DGGMR) y el presente aceite de silicona modificado".

La agitación se realizó montando el vaso de precipitados sobre un agitador múltiple (modelo: M-3; distribuidor: AS ONE Corporation (Japón)) y haciendo girar una barra magnética en el vaso de precipitados mientras ajusta el dial de una unidad de control del agitador múltiple en "3".

(4) Posteriormente, se añadió una "cierta cantidad (4,0 ml) de agua pura" a (toda) la "mezcla del sustrato para medir la actividad lipasa (DGGMR) y el presente aceite de silicona modificado" en el vaso de precipitados de (3) con agitación a temperatura ambiente (25 °C) con el uso de una micropipeta.

Después de la adición, la agitación continuó a temperatura ambiente (25 °C) durante 5 minutos. De esta forma, la "cierta cantidad (4,0 ml) de agua pura" se mezcló con (todos) la "mezcla preparada mezclando el sustrato para medir la actividad lipasa (DGGMR) y el presente aceite de silicona modificado".

La agitación se realizó montando el vaso de precipitados sobre un agitador múltiple (modelo: M-3; distribuidor: AS ONE Corporation (Japón)) y haciendo girar una barra magnética en el vaso de precipitados mientras ajusta el dial de una unidad de control del agitador múltiple en "3".

(5) Posteriormente, se añadió además una cierta cantidad de agua pura al "líquido mixto preparado mezclando la mezcla (es decir, la mezcla del sustrato para medir la actividad lipasa (DGGMR) y el presente aceite de silicona modificado) y una cierta cantidad de agua pura" (4) anterior, para llevar el volumen final a 200 ml.

(6) A través del procedimiento descrito anteriormente, se preparó un total de cuatro tipos de soluciones de sustrato para medir la actividad de lipasa (A) a (D) a continuación.

En estas soluciones de sustrato para medir la actividad lipasa (cuatro tipos en total), la concentración del sustrato para medir la actividad lipasa (DGGMR) fue 0,6 mM y la del presente aceite de silicona modificado fue del 2,0 % (p/v).

Además, no se observó gradiente de concentración ni turbidez fuerte en estas soluciones de sustrato para medir la actividad lipasa (cuatro tipos en total). Se confirmó visualmente que las soluciones de sustrato se habían mezclado uniformemente.

(A) Una solución de sustrato para medir la actividad lipasa-A (el sustrato para medir la actividad lipasa: DGGMR; el presente aceite de silicona modificado: KF-351A)

(B) Una solución de sustrato para medir la actividad lipasa-B (el sustrato para medir la actividad lipasa: DGGMR; el presente aceite de silicona modificado: KF-354A)

(C) Una solución de sustrato para medir la actividad lipasa-C (el sustrato para medir la actividad lipasa: DGGMR; el presente aceite de silicona modificado: KF-355A)

(D) Una solución de sustrato para medir la actividad lipasa-D (el sustrato para medir la actividad lipasa: DGGMR; el presente aceite de silicona modificado: KF-6011)

[2] Reactivo de control disponible en el mercado

Un reactivo disponible en el mercado para medir la actividad lipasa (un kit de reactivos para medir la actividad lipasa); es decir, Liquitech Lipase Color II (distribuidor: Roche Diagnostics K. K. (Japón)), se usó como reactivo de control.

El "Liquitech Lipase Color II" (en adelante, en ocasiones denominado "reactivo de control disponible en el mercado") comprende un primer reactivo (es decir, una solución tampón) y un segundo reactivo (es decir, una solución de sustrato) (comprende DGGMR como sustrato para medir la actividad lipasa a 0,27 mM).

En este ejemplo se usó una "solución de sustrato" del "reactivo de control disponible en el mercado".

[3] Preparación de la solución tampón

El componente reactivo siguiente se disolvió a la concentración designada en agua pura y el nivel de pH se ajustó a 8,4 (20 °C) para preparar la solución tampón.
Bicina (un tampón) 40 mM

2. Almacenamiento de reactivo

(1) Los cuatro tipos de soluciones de sustrato para medir la actividad de lipasa (A) a (D) descritas en 1 [1] (6) anteriores se almacenaron a 25 °C en oscuridad durante 31 días.

(2) La solución de sustrato del reactivo de control disponible en el mercado de 1 [2] anterior se almacenó a 25 °C en oscuridad durante 32 días.

3. Medición de la cantidad de degradación del sustrato

(1) La solución tampón del día en que se produjo en 1 [3] anterior designada como el primer reactivo y la "(A) la solución de sustrato para medir la actividad lipasa-A" almacenada a 25 °C (en oscuridad) en 2 (1) anterior designada como segundo reactivo se sometieron a la medición descrita a continuación.

La medición se realizó el día del inicio del almacenamiento de la solución de sustrato para medir la actividad lipasa (Día 0), 5 días después del inicio del almacenamiento, 23 días después del inicio del almacenamiento y 31 días después del inicio del almacenamiento con el uso de "(A) la solución de sustrato para medir la actividad lipasa-A" almacenada durante el período de tiempo designado.

Al principio, se añadieron 960 µl del segundo reactivo a 1.600 µl del primer reactivo para preparar un líquido mixto.

(2) Posteriormente, la absorbancia del líquido mixto obtenido en (1) anterior se midió a 580 nm con el uso del espectrofotómetro de la serie DU-7500 (distribuidor: Beckman Coulter, Inc. (Japón)).

(3) Posteriormente, la absorbancia de la solución tampón del día en que se produjo en 1 [3] anterior se midió a 580 nm como una prueba del blanco con el uso del espectrofotómetro de la serie DU-7500 (distribuidor: Beckman Coulter, Inc. (Japón)).

(4) Posteriormente, la diferencia en la absorbancia se determinó restando la absorbancia medida en (3) anterior (es decir, un valor del blanco) de la absorbancia medida en (2) anterior.

(5) Posteriormente, la diferencia en la absorbancia determinada en (4) anterior se dividió por el coeficiente de absorción molar de 6'-metilresorufina a 580 nm (es decir, 60,65 (representado en $\text{cm} \times \mu\text{mol}^{-1}$)), para calcular la concentración de 6'-metilresorufina generada tras la degradación de DGGMR durante el almacenamiento (representado en mM).

(6) Posteriormente, la concentración de 6'-metilresorufina (representada en mM) generada tras la degradación durante el almacenamiento determinado en (5) anterior se dividió por la concentración de DGGMR (0,6 mM) de "(A) la solución de sustrato para medir la actividad de lipasa-A" de 1 [1] (6) anterior, para calcular la relación de la concentración de 6'-metilresorufina generada en relación con la concentración de DGGMR (1 mM) (representada en %).

Específicamente, se calculó "la relación de DGGMR degradado durante el almacenamiento del reactivo en relación con la concentración de DGGMR (1 mM) en el reactivo" (es decir, la relación de degradación de DGGMR) (representada en %).

(7) Los procedimientos descritos en (1) a (6) anteriores se realizaron de la misma manera, excepto que "(A) la solución de sustrato para medir la actividad lipasa A" como segundo reactivo en el punto (1) anterior se reemplazó con "(B) la solución de sustrato de control para medir la actividad lipasa B" almacenada a 25 °C (en oscuridad) durante 31 días en 2 (1) anterior, por lo que para calcular la relación de la concentración de 6'-metilresorufina generada en relación con la concentración de DGGMR (1 mM) cuando "(B) la solución de sustrato para medir la actividad lipasa B" de 2 (1) anterior se utilizó como segundo reactivo (representado en %).

Específicamente, se calculó "la relación de DGGMR degradado durante el almacenamiento del reactivo en relación con la concentración de DGGMR (1 mM) en el reactivo" (es decir, la relación de degradación de DGGMR) (representada en %).

(8) Los procedimientos descritos en (1) a (6) anteriores se realizaron de la misma manera, excepto que "(A) la solución de sustrato para medir la actividad de lipasa A" como segundo reactivo en (1) anterior se reemplazó con "(C) la solución de sustrato para medir la actividad lipasa C" almacenada a 25 °C (en oscuridad) durante 31 días en 2 (1) anterior, por lo que para calcular la relación de la concentración de 6'-metilresorufina generada en relación con la concentración de DGGMR (1 mM) cuando "(C) la solución de sustrato para medir la actividad lipasa C" de 2 (1) anterior se usó como segundo reactivo (representado en %).

Específicamente, se calculó "la relación de DGGMR degradado durante el almacenamiento del reactivo en relación con la concentración de DGGMR (1 mM) en el reactivo" (representada en %).

(9) Los procedimientos descritos en (1) a (6) anteriores se realizaron de la misma manera, excepto que "(A) la solución de sustrato para medir la actividad lipasa A" como segundo reactivo en (1) anterior se reemplazó con "(D) la solución de sustrato para medir la actividad lipasa D" almacenada a 25 °C (en oscuridad) durante 31 días en 2 (1) anterior, por lo que para calcular la relación de la concentración de 6'-metilresorufina generada en relación con la concentración de DGGMR (1 mM) cuando "(D) la solución de sustrato para medir la actividad lipasa C" de 2 (1) anterior se usó como segundo reactivo (representado en %).

Específicamente, se calculó "la relación de DGGMR degradado durante el almacenamiento del reactivo en relación con la concentración de DGGMR (1 mM) en el reactivo" (es decir, la relación de degradación de DGGMR) (representada en %).

(10) Asimismo, los procedimientos descritos en (1) a (6) anteriores se realizaron de la misma manera, excepto que "(A) la solución de sustrato para medir la actividad lipasa A" como segundo reactivo en (1) anterior se reemplazó con la solución de sustrato del reactivo de control disponible en el mercado almacenado a 25 °C (en oscuridad) durante 32 días en 2 (2) anterior, la medición en (1) se realizó el día del inicio del almacenamiento (día 0), 8 días después del inicio del almacenamiento, 15 días después del inicio del almacenamiento, 21 días después del inicio del almacenamiento, 29 días después del inicio del almacenamiento y 32 días después del inicio del almacenamiento, y la concentración de DGGMR (0,6 mM) en "(A) la solución de sustrato para medir la actividad lipasa A" en (6) fue reemplazada por la concentración de DGGMR (0,27 mM) en la solución de sustrato del reactivo de control disponible en el mercado de 1 [2] anterior, por lo que para calcular la relación de la concentración de 6'-metilresorufina generada en relación con la concentración de DGGMR (1 mM) cuando la solución de sustrato del reactivo de control disponible en el mercado de 2 (2) anterior se usó como segundo reactivo (representado en %).

Específicamente, se calculó "la relación de DGGMR degradado durante el almacenamiento del reactivo en relación con la concentración de DGGMR (1 mM) en el reactivo" (es decir, la relación de degradación de DGGMR) (representada en %).

5 4. Resultados de la medición

la tabla 2 y la figura 4 muestran "la relación de DGGMR degradado durante el almacenamiento del reactivo en relación con la concentración de DGGMR (1 mM) en el reactivo" (es decir, la relación de degradación de DGGMR) (representada en %) cuando los cuatro tipos de las soluciones de sustrato para medir la actividad lipasa (A) a (D) de 2 (1) anteriores se usaron como segundos reactivos, que se determinó en 3 anterior.

La tabla 2 y la figura 4 también muestran "la relación de DGGMR degradado durante el almacenamiento del reactivo en relación con la concentración de DGGMR (1 mM) en el reactivo" (es decir, la relación de degradación de DGGMR) (representada en %) cuando la solución de sustrato del reactivo de control disponible en el mercado de 2 (2) anterior se usó como segundo reactivo, que se determinó en 3 anterior.

La tabla 2 y la figura 4 muestran "la relación de degradación de DGGMR" determinada con el tiempo en relación con "la relación de degradación de DGGMR" designada como "0" el día del inicio del almacenamiento (Día 0).

En la figura 4, el eje horizontal indica la duración del almacenamiento de reactivos (representado en el número de días) y el eje vertical indica la relación de degradación de DGGMR (representada en %).

En la figura 4, "la relación de degradación DGGMR" de la solución de sustrato para medir la actividad lipasa (es decir, "(A) la solución de sustrato para medir la actividad lipasa A") está representada por el símbolo "*", "la relación de degradación DGGMR" de "(B) la solución de sustrato para medir la actividad lipasa B" para medir la actividad lipasa B" está representada por el símbolo "♦", "la relación de degradación de DGGMR" de "(C) la solución de sustrato para medir la actividad lipasa C" está representada por el símbolo "■", "la relación de degradación de DGGMR" de "(D) la solución de sustrato para medir la actividad lipasa D" está representada por el símbolo "●", Y "la relación de degradación DGGMR" de "(B) la solución de sustrato para medir la actividad lipasa B" está representada por el símbolo "▲".

Tabla 2

Duración del almacenamiento de reactivos	Relación de degradación de DGGMR			
	Solución de sustrato para medir la actividad lipasa A	Solución de sustrato para medir la actividad lipasa B	Solución de sustrato para medir la actividad lipasa C	Solución de sustrato para medir la actividad lipasa D
0 días	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %
5 días	0,0 %	0,1 %	0,1 %	0,1 %
23 días	0,2 %	0,3 %	0,6 %	0,4 %
31 días	0,3 %	0,4 %	0,8 %	0,5 %

Duración del almacenamiento de reactivos	Relación de degradación de DGGMR
	Solución de sustrato de reactivo de control disponible en el mercado
0 días	0,0 %
8 días	0,4 %
15 días	0,7 %
21 días	0,9 %
29 días	1,2 %
32 días	1,4 %

35 5. Análisis

(1) La tabla 2 y la figura 4 demuestran que, como resultado del almacenamiento a 25 °C durante 31 días, "la relación de degradación de DGGMR" de la solución de sustrato para medir la actividad lipasa (es decir, "(A) la solución de sustrato para medir la actividad lipasa A") es 0,3 %, "la relación de degradación DGGMR" de "(B) la solución de sustrato para medir la actividad lipasa-B" es 0,4 %, "la relación de degradación de DGGMR" de "(C) la solución de sustrato para medir la actividad lipasa C" es del 0,8 % y "la relación de degradación de DGGMR" de "(D) la solución de sustrato para medir la actividad lipasa D" es del 0,5 %.

La tabla 2 y la figura 4 también demuestran que, como resultado del almacenamiento a 25 °C durante 32 días, "la relación de degradación de DGGMR" de la solución de sustrato del reactivo de control disponible en el mercado es del 1,4 %.

Específicamente, "la relación de degradación de DGGMR" de cualquiera de los cuatro tipos de soluciones de sustrato para medir la actividad lipasa (A) a (D) es significativamente menor que "la relación de degradación de DGGMR" de la solución de sustrato del reactivo de control disponible en el mercado.

(2) Sobre la base de los resultados obtenidos en este ejemplo, en consecuencia, se descubrió que las soluciones eran capaces de suprimir eficazmente la degradación de DGGMR, una estabilidad de almacenamiento excelente y capaz de realizar mediciones precisas durante un largo período de tiempo.

[Ejemplo 4] (Verificación de los efectos de la solución de sustrato para medir la actividad lipasa - 4)

Se reexaminaron los efectos de la solución de sustrato para medir la actividad lipasa con respecto a la estabilidad de almacenamiento.

1. Reactivo

Se preparó la solución de sustrato para medir la actividad lipasa (es decir, la solución de sustrato para medir la actividad lipasa que comprende la solución de emulsión).

Como control, se usó una solución de sustrato de un reactivo disponible en el mercado.

También se preparó una solución tampón.

[1] Preparación de la solución de sustrato para medir la actividad lipasa

(1) Una porción (0,045 g) del sustrato para medir la actividad lipasa, es decir, éster de (6'-metilresorufina) de ácido 1,2-o-dilaúril-rac-glicero-3-glutárico (DGGMR) distribuidor: Roche Diagnostics K. K. (Japón)), se fraccionó en un vaso de precipitados (volumen: 10 ml).

(2) Posteriormente, una porción (0,6 g) del aceite de silicona modificado no reactivo de tipo cadena lateral (tipo modificado con poliéter); KF-355A (distribuidor: Shin-Etsu Chemical Co., Ltd., Japón)), se fraccionó y se añadió al vaso de precipitados de (1).

(3) Después de la adición (2) anterior, el contenido del vaso de precipitados se agitó a 67 °C para mezclar el sustrato para medir la actividad lipasa (DGGMR) y el presente aceite de silicona modificado (KF-355A) en el vaso de precipitados.

Este proceso de mezcla (agitación) se realizó durante 5 minutos para preparar una "mezcla del sustrato para medir la actividad lipasa (DGGMR) y el presente aceite de silicona modificado".

La agitación se realizó montando el vaso de precipitados sobre un agitador múltiple (modelo: M-3; distribuidor: AS ONE Corporation (Japón)) y haciendo girar una barra magnética en el vaso de precipitados mientras ajusta el dial de una unidad de control del agitador múltiple en "3".

(4) Posteriormente, se añadió una "cierta cantidad (4,0 ml) de tampón de L-tartrato de sodio 40 mM (pH 4,0 a 20 °C)" (toda) la "mezcla del sustrato para medir la actividad lipasa (DGGMR) y el presente aceite de silicona modificado" en el vaso de precipitados de (3) con agitación a temperatura ambiente (25 °C) con el uso de una micropipeta.

Después de la adición, la agitación continuó a temperatura ambiente (25 °C) durante 5 minutos. De esta forma, la "cierta cantidad (4,0 ml) de tampón de L-tartrato de sodio 40 mM (pH 4,0 a 20 °C)" se mezcló con (toda) la "mezcla preparada mezclando el sustrato para medir la actividad lipasa (DGGMR) y el presente modificado aceite de silicona".

La agitación se realizó montando el vaso de precipitados sobre un agitador múltiple (modelo: M-3; distribuidor: AS ONE Corporation (Japón)) y haciendo girar una barra magnética en el vaso de precipitados mientras ajusta el dial de una unidad de control del agitador múltiple en "3".

(5) Posteriormente, se añadió adicionalmente una cierta cantidad de tampón de L-tartrato de sodio 40 mM (pH 4,0 a 20 °C) al "líquido mixto preparado mezclando la mezcla (es decir, la mezcla del sustrato para medir la actividad lipasa (DGGMR) y el presente aceite de silicona modificado) y una cierta cantidad de tampón de L-tartrato de sodio 40 mM (pH 4,0 a 20 °C)" de (4) anterior, para llevar el volumen final a 200 ml.

(6) A través del procedimiento descrito anteriormente, se preparó la solución de sustrato para medir la actividad lipasa (el sustrato para medir la actividad lipasa: DGGMR; el presente aceite de silicona modificado: KF-355A).

En la solución de sustrato para medir la actividad lipasa, la concentración del sustrato para medir la actividad lipasa (DGGMR) fue de 0,3 mM y la del presente aceite de silicona modificado (KF-355A) fue del 0,3 % (p/v).

Además, no se observó gradiente de concentración ni fuerte turbidez en la solución de sustrato para medir la actividad lipasa. Se confirmó visualmente que la solución de sustrato se había mezclado uniformemente.

[2] Reactivo de control disponible en el mercado

Un reactivo disponible en el mercado para medir la actividad lipasa (un kit de reactivos para medir la actividad lipasa); es decir, Liquitech Lipase Color II (distribuidor: Roche Diagnostics K. K. (Japón)), se usó como control.

"Liquitech Lipase Color II" (en adelante, en ocasiones denominado "reactivo de control disponible en el mercado") está compuesto por un primer reactivo (solución tampón) y un segundo reactivo (solución de sustrato), que comprende, como sustrato para medir la actividad lipasa, DGGMR a 0,27 mM

La "solución de sustrato" del "reactivo de control disponible en el mercado" se sometió a discusión en este ejemplo.

[3] Preparación de la solución tampón

El componente reactivo siguiente se disolvió a la concentración designada en agua pura y el nivel de pH se ajustó a 8,4 (20 °C) para preparar la solución tampón.

Bicina (un tampón) 40 mM

2. Almacenamiento de reactivo

(1) La solución de sustrato para medir la actividad lipasa preparada en 1 [1] anterior se almacenó a 30 °C en oscuridad durante 35 días.

(2) La solución de sustrato del reactivo de control disponible en el mercado preparado en 1 [2] anterior se almacenó a 30 °C en oscuridad durante 35 días.

3. Medición de la cantidad de degradación del sustrato

(1) La solución tampón del día en que se produjo en 1 [3] arriba designado como el primer reactivo y la solución de sustrato para medir la actividad lipasa almacenada a 30 °C (en oscuridad) en 2 (1) anterior designado como segundo reactivo se sometieron a la medición que se describe a continuación.

La medición se realizó el día del inicio del almacenamiento de la solución de sustrato para medir la actividad lipasa (Día 0), 7 días después del inicio del almacenamiento, 15 días después del inicio del almacenamiento, 21 días después del inicio del almacenamiento y 35 días después del inicio del almacenamiento con el uso de la solución de sustrato para medir la actividad lipasa almacenada durante el período de tiempo designado.

Al principio, se añadieron 960 µl del segundo reactivo a 1.600 µl del primer reactivo para preparar un líquido mixto. (2) Posteriormente, la absorbancia del líquido mixto obtenido en (1) anterior se midió a 580 nm con el uso del espectrofotómetro de la serie DU-7500 (distribuidor: Beckman Coulter, Inc. (Japón)).

(3) Posteriormente, la absorbancia del tampón del día en que se produjo en 1 [3] anterior se midió a 580 nm como una prueba del blanco con el uso del espectrofotómetro de la serie DU-7500 (distribuidor: Beckman Coulter, Inc. (Japón)).

(4) Posteriormente, la diferencia en la absorbancia se determinó restando la absorbancia medida en (3) anterior (es decir, un valor del blanco) de la absorbancia medida en (2) anterior.

(5) Posteriormente, la diferencia en la absorbancia determinada en (4) anterior se dividió por el coeficiente de absorción molar de 6'-metilresorufina a 580 nm (es decir, 60,65 (representado en $\text{cm} \times \mu\text{mol}^{-1}$)), para calcular la concentración de 6'-metilresorufina generada tras la degradación de DGGMR durante el almacenamiento (representado en mM).

(6) Posteriormente, la concentración de 6'-metilresorufina (representada en mM) generada tras la degradación durante el almacenamiento determinado en (5) anterior se dividió por la concentración de DGGMR (0,3 mM) de la solución de sustrato para medir la actividad lipasa de 1 [1] anterior, para calcular la relación de la concentración de 6'-metilresorufina generada en relación con la concentración de DGGMR (1 mM) (representada en %).

Específicamente, se calculó "la relación de DGGMR degradado durante el almacenamiento del reactivo en relación con la concentración de DGGMR (1 mM) en el reactivo" (es decir, la relación de degradación de DGGMR) (representada en %).

(7) Los procedimientos descritos en (1) a (6) anteriores se realizaron de la misma manera, excepto que la solución de sustrato para medir la actividad lipasa como segundo reactivo en (1) anterior se reemplazó con la solución de sustrato del reactivo de control disponible en el mercado almacenado a 30 °C (en oscuridad) durante 35 días en 2 (2) anterior, la medición en (1) se realizó el día del inicio del almacenamiento (día 0), 7 días después del inicio del almacenamiento, 15 días después del inicio del almacenamiento, 21 días después del inicio del almacenamiento y 35 días después del inicio del almacenamiento, y la concentración de DGGMR (0,3 mM) en la solución de sustrato para medir la actividad lipasa de (6) anterior se reemplazó con la concentración de DGGMR (0,27 mM) en la solución de sustrato del reactivo de control disponible en el mercado de 1 [2] anterior, por lo que para calcular la relación de la concentración de 6'-metilresorufina generada en relación con la concentración de DGGMR (1 mM) cuando la solución de sustrato del reactivo de control disponible en el mercado de 2 (2) anterior se usó como segundo reactivo (representado en %).

Específicamente, se calculó "la relación de DGGMR degradado durante el almacenamiento del reactivo en relación con la concentración de DGGMR (1 mM) en el reactivo" (es decir, la relación de degradación de DGGMR) (representada en %).

4. Resultados de la medición

La tabla 3 y la figura 5 muestran "la relación de DGGMR degradado durante el almacenamiento del reactivo con respecto a la concentración de DGGMR (1 mM) en el reactivo" (es decir, la relación de degradación de DGGMR) (representado en %) cuando se usó la solución de sustrato para medir la actividad lipasa de 2(1) anterior como segundo reactivo, que se determinó en 3 anterior.

La tabla 3 y la figura 5 también muestran "la relación de DGGMR degradado durante el almacenamiento del reactivo en relación con la concentración de DGGMR (1 mM) en el reactivo" (es decir, la relación de degradación de DGGMR) (representada en %) cuando la solución de sustrato del reactivo de control disponible en el mercado de 2 (2) anterior se usó como segundo reactivo, que se determinó en 3 anterior.

La tabla 3 y la figura 5 muestran "la relación de degradación de DGGMR" determinada con el tiempo en relación con "la relación de degradación de DGGMR" designada como "0" el día del inicio del almacenamiento (Día 0).

En la figura 5, el eje horizontal indica la duración del almacenamiento de reactivos (representado en el número de días) y el eje vertical indica la relación de degradación de DGGMR (representada en %).

En la figura 5, "la relación de degradación de DGGMR" de la solución de sustrato para medir la actividad lipasa está representada por el símbolo "■" y "la relación de degradación de DGGMR" de la solución de sustrato del reactivo de control disponible en el mercado está representada por el símbolo "▲".

Tabla 3

Duración del almacenamiento de reactivos	Relación de degradación de DGGMR	
	Solución de sustrato para medir la actividad lipasa	Solución de sustrato de reactivo de control disponible en el mercado
0 días	0,0 %	0,0 %
7 días	0,1 %	0,6 %
15 días	0,2 %	1,4 %
21 días	0,2 %	2,0 %
35 días	0,4 %	3,3 %

5. Análisis

(1) La tabla 3 y la figura 5 demuestran que, como resultado del almacenamiento a 30 °C durante 35 días, "la relación de degradación de DGGMR" de la solución de sustrato para medir la actividad lipasa es del 0,4 %

La tabla 3 y la figura 5 también demuestran que, como resultado del almacenamiento a 30 °C durante 35 días, "la relación de degradación de DGGMR" de la solución de sustrato del reactivo de control disponible en el mercado es del 3,3 %.

Específicamente, "la relación de degradación DGGMR" de la solución de sustrato para medir la actividad lipasa es significativamente menor que "la relación de degradación de DGGMR" de la solución de sustrato del reactivo de control disponible en el mercado.

(2) Sobre la base de los resultados obtenidos en este ejemplo, en consecuencia, se descubrió que las soluciones eran capaces de suprimir eficazmente la degradación de DGGMR, una estabilidad de almacenamiento excelente y capaz de realizar mediciones precisas durante un largo período de tiempo.

[Ejemplo 5] (Verificación de los efectos de la solución de sustrato para medir la actividad lipasa -5)

Se reexaminaron los efectos de la solución de sustrato para medir la actividad lipasa con respecto a la estabilidad de almacenamiento.

1. Reactivo

Se preparó la solución de sustrato para medir la actividad lipasa (es decir, la solución de sustrato para medir la actividad lipasa que comprende la solución de emulsión).

Como control, se usó una solución de sustrato de un reactivo disponible en el mercado.

También se preparó una solución tampón.

[1] Preparación de la solución de sustrato para medir la actividad lipasa de la presente invención

(1) Una porción (0,045 g) del sustrato para medir la actividad lipasa, es decir, éster de (6'-metilresorufina) de ácido 1,2-o-dilauril-rac-glicero-3-glutárico (DGGMR) distribuidor: Roche Diagnostics K. K. (Japón)), se fraccionó en un vaso de precipitados (volumen: 10 ml).

(2) Posteriormente, una porción (0,6 g) del aceite de silicona modificado no reactivo de tipo cadena lateral (tipo modificado con poliéter); KF-355A (distribuidor: Shin-Etsu Chemical Co., Ltd., Japón)), se fraccionó y se añadió al vaso de precipitados de (1).

(3) Después de la adición (2) anterior, el contenido del vaso de precipitados se agitó a 67 °C para mezclar el sustrato para medir la actividad lipasa (DGGMR) y el presente aceite de silicona modificado (KF-355A) en el vaso de precipitados.

Este proceso de mezcla (agitación) se realizó durante 5 minutos para preparar una "mezcla del sustrato para medir la actividad lipasa (DGGMR) y el presente aceite de silicona modificado".

La agitación se realizó montando el vaso de precipitados sobre un agitador múltiple (modelo: M-3; distribuidor: AS ONE Corporation (Japón)) y haciendo girar una barra magnética en el vaso de precipitados mientras ajusta el dial de una unidad de control del agitador múltiple en "3".

(4) Posteriormente, se añadió una "cierta cantidad (4,0 ml) de tampón de L-tartrato de sodio 40 mM (pH 4,0 a 20 °C)" (toda) la "mezcla del sustrato para medir la actividad lipasa (DGGMR) y el presente aceite de silicona modificado" en el vaso de precipitados de (3) con agitación a temperatura ambiente (25 °C) con el uso de una micropipeta.

Después de la adición, la agitación continuó a temperatura ambiente (25 °C) durante 5 minutos. De esta forma, la "cierta cantidad (4,0 ml) de tampón de L-tartrato de sodio 40 mM (pH 4,0 a 20 °C)" se mezcló con (toda) la "mezcla preparada mezclando el sustrato para medir la actividad lipasa (DGGMR) y el presente modificado aceite de silicona".

La agitación se realizó montando el vaso de precipitados sobre un agitador múltiple (modelo: M-3; distribuidor: AS ONE Corporation (Japón)) y haciendo girar una barra magnética en el vaso de precipitados mientras ajusta el dial de una unidad de control del agitador múltiple en "3".

(5) Posteriormente, se añadió adicionalmente una cierta cantidad de tampón de L-tartrato de sodio 40 mM (pH 4,0 a 20 °C) al "líquido mixto preparado mezclando la mezcla (es decir, la mezcla del sustrato para medir la actividad lipasa (DGGMR) y el presente aceite de silicona modificado) y una cierta cantidad de tampón de L-tartrato de sodio 40 mM (pH 4,0 a 20 °C)" de

(4) anterior, para llevar el volumen final a 200 ml.

(6) A través del procedimiento descrito anteriormente, se preparó la solución de sustrato para medir la actividad lipasa (el sustrato para medir la actividad lipasa: DGGMR; el presente aceite de silicona modificado: KF-355A).

En la solución de sustrato para medir la actividad lipasa, la concentración del sustrato para medir la actividad lipasa (DGGMR) fue de 0,3 mM y la del presente aceite de silicona modificado (KF-355A) fue del 0,3 % (p/v).

Además, no se observó gradiente de concentración ni fuerte turbidez en la solución de sustrato para medir la actividad lipasa. Se confirmó visualmente que la solución de sustrato se había mezclado uniformemente.

[2] Reactivo de control disponible en el mercado

Un reactivo disponible en el mercado para medir la actividad lipasa (un kit de reactivos para medir la actividad lipasa); es decir, Liquitech Lipase Color II (distribuidor: Roche Diagnostics K. K. (Japón)), se usó como reactivo de control.

El "Liquitech Lipase Color II" (en adelante, en ocasiones denominado "reactivo de control disponible en el mercado") comprende un primer reactivo (es decir, un tampón) y un segundo reactivo (es decir, una solución de sustrato) (comprende DGGMR como sustrato para medir la actividad lipasa a 0,27 mM).

En este ejemplo se usó una "solución de sustrato" del "reactivo de control disponible en el mercado".

[3] Preparación de la solución tampón

El componente reactivo siguiente se disolvió a la concentración designada en agua pura y el nivel de pH se ajustó a 8,4 (20 °C) para preparar la solución tampón.

Bicina (un tampón) 40 mM

2. Almacenamiento de reactivo

(1) La solución de sustrato para medir la actividad lipasa preparada en 1 [1] anterior se almacenó a 10 °C en oscuridad durante 390 días.

(2) La solución de sustrato del reactivo de control disponible en el mercado preparado en 1 [2] anterior se almacenó a 5 °C en oscuridad durante 300 días.

3. Medición de la cantidad de degradación del sustrato

(1) El tampón del día en que se produjo en 1 [3] anterior designado como el primer reactivo y la solución de sustrato para medir la actividad lipasa almacenada a 10 °C (en oscuridad) en 2 (1) anterior designado como segundo reactivo se sometieron a la medición que se describe a continuación.

La medición se realizó el día del inicio del almacenamiento de la solución de sustrato para medir la actividad lipasa (Día 0), 90 días después del inicio del almacenamiento, 180 días después del inicio del almacenamiento, 270 días después del inicio del almacenamiento, 360 días después del inicio del almacenamiento y 390 días después del inicio del almacenamiento con el uso de la solución de sustrato para medir la actividad lipasa almacenada durante el período de tiempo designado.

Al principio, se añadieron 960 µl del segundo reactivo a 1.600 µl del primer reactivo para preparar un líquido mixto.

(2) Posteriormente, la absorbancia del líquido mixto obtenido en (1) anterior se midió a 580 nm con el uso del espectrofotómetro de la serie DU-7500 (distribuidor: Beckman Coulter, Inc. (Japón)).

(3) Posteriormente, la absorbancia del tampón del día en que se produjo en 1 [3] anterior se midió a 580 nm como una prueba del blanco con el uso del espectrofotómetro de la serie DU-7500 (distribuidor: Beckman Coulter, Inc. (Japón)).

(4) Posteriormente, la diferencia en la absorbancia se determinó restando la absorbancia medida en (3) anterior (es decir, un valor del blanco) de la absorbancia medida en (2) anterior.

(5) Posteriormente, la diferencia en la absorbancia determinada en (4) anterior se dividió por el coeficiente de absorción molar de 6'-metilresorufina a 580 nm (es decir, 60,65 (representado en $\text{cm} \times \mu\text{mol}^{-1}$)), para calcular la concentración de 6'-metilresorufina generada tras la degradación de DGGMR durante el almacenamiento (representado en mM).

(6) Posteriormente, la concentración de 6'-metilresorufina (representada en mM) generada tras la degradación durante el almacenamiento determinado en (5) anterior se dividió por la concentración de DGGMR (0,3 mM) de la solución de sustrato para medir la actividad lipasa de 1 [1] anterior, para calcular la relación de la concentración de 6'-metilresorufina generada en relación con la concentración de DGGMR (1 mM) (representada en %).

Específicamente, se calculó "la relación de DGGMR degradado durante el almacenamiento del reactivo en relación con la concentración de DGGMR (1 mM) en el reactivo" (es decir, la relación de degradación de DGGMR) (representada en %).

(7) Los procedimientos descritos en (1) a (6) anteriores se realizaron de la misma manera, excepto que la solución de sustrato para medir la actividad lipasa como segundo reactivo en (1) anterior se reemplazó con la solución de sustrato del reactivo de control disponible en el mercado almacenado a 5 °C (en oscuridad) durante 300 días en 2 (2) anterior, la medición en (1) se realizó el día del inicio del almacenamiento (día 0), 90 días después del inicio del almacenamiento, 150 días después del inicio del almacenamiento y 300 días después del inicio del almacenamiento, y la concentración de DGGMR (0,3 mM) en la solución de sustrato para medir la actividad lipasa de (6) anterior se reemplazó con la concentración de DGGMR (0,27 mM) en la solución de sustrato del reactivo de control disponible en el mercado de 1 [2] anterior, por lo que para calcular la relación de la concentración de 6'-metilresorufina generada en relación con la concentración de DGGMR (1 mM) cuando la solución de sustrato del reactivo de control disponible en el mercado de 2 (2) anterior se usó como segundo reactivo (representado en %).

Específicamente, se calculó "la relación de DGGMR degradado durante el almacenamiento del reactivo en relación con la concentración de DGGMR (1 mM) en el reactivo" (es decir, la relación de degradación de DGGMR) (representada en %).

4. Resultados de la medición

La tabla 4 y la figura 6 muestran "la relación de DGGMR degradado durante el almacenamiento del reactivo con respecto a la concentración de DGGMR (1 mM) en el reactivo" (es decir, la relación de degradación de DGGMR) (representado en %) cuando se usó la solución de sustrato para medir la actividad lipasa de 2(1) anterior como segundo reactivo, que se determinó en 3 anterior.

La tabla 4 y la figura 6 también muestran "la relación de DGGMR degradado durante el almacenamiento del reactivo en relación con la concentración de DGGMR (1 mM) en el reactivo" (es decir, la relación de degradación de DGGMR) (representada en %) cuando la solución de sustrato del reactivo de control disponible en el mercado de 2 (2) anterior se usó como segundo reactivo, que se determinó en 3 anterior.

La tabla 4 y la figura 6 muestran "la relación de degradación de DGGMR" determinada con el tiempo en relación con "la relación de degradación de DGGMR" designada como "0" el día del inicio del almacenamiento (Día 0).

En la figura 6, el eje horizontal indica la duración del almacenamiento de reactivos (representado en el número de días) y el eje vertical indica la relación de degradación de DGGMR (representada en %).

En la figura 6, "la relación de degradación de DGGMR" de la solución de sustrato para medir la actividad lipasa está representada por el símbolo "■" y "la relación de degradación de DGGMR" de la solución de sustrato del reactivo de control disponible en el mercado está representada por el símbolo "▲".

Tabla 4

Duración del almacenamiento de reactivos	Relación de degradación de DGGMR
	Solución de sustrato para medir
0 días	0,0 %
90 días	0,1 %
180 días	0,3 %
270 días	0,4 %
360 días	0,6 %
390 días	0,6 %

Duración del almacenamiento de reactivos	Relación de degradación de DGGMR
	Solución de sustrato de reactivo de control disponible en el mercado
0 días	0,0 %
90 días	0,6 %
150 días	1,2 %
300 días	2,1 %

5. Análisis

5

(1) La tabla 4 y la figura 6 demuestran que, como resultado del almacenamiento a 10 °C durante 390 días, "la relación de degradación de DGGMR" de la solución de sustrato para medir la actividad lipasa es del 0,6 %

10

La tabla 4 y la figura 6 también demuestran que, como resultado del almacenamiento a 5 °C durante 300 días, "la relación de degradación de DGGMR" de la solución de sustrato del reactivo de control disponible en el mercado es del 2,1 %.

Específicamente, "la relación de degradación DGGMR" de la solución de sustrato para medir la actividad lipasa es significativamente menor que "la relación de degradación de DGGMR" de la solución de sustrato del reactivo de control disponible en el mercado.

15

(2) Sobre la base de los resultados obtenidos como resultado de la refrigeración en este ejemplo, en consecuencia, se descubrió que las soluciones eran capaces de suprimir eficazmente la degradación de DGGMR, una estabilidad de almacenamiento excelente y capaz de realizar mediciones precisas durante un largo período de tiempo.

[Ejemplo 6] (Verificación de los efectos de la solución de sustrato para medir la actividad lipasa -6)

20

Se reexaminaron los efectos de la solución de sustrato para medir la actividad lipasa con respecto a la estabilidad de almacenamiento.

1. Reactivo

25

En total, se prepararon tres lotes de soluciones de sustrato para medir la actividad lipasa (es decir, las soluciones de sustrato para medir la actividad lipasa que comprende la solución de emulsión.

30

(1) Una porción (0,045 g) del sustrato para medir la actividad lipasa, es decir, éster de (6'-metilresorufina) de ácido 1,2-o-dilauril-rac-glicero-3-glutárico (DGGMR) distribuidor: Roche Diagnostics K. K. (Japón)), se fraccionó en un vaso de precipitados (volumen: 10 ml).

(2) Posteriormente, una porción (0,6 g) del aceite de silicona modificado no reactivo de tipo cadena lateral (tipo modificado con poliéter); KF-355A (distribuidor: Shin-Etsu Chemical Co., Ltd., Japón)), se fraccionó y se añadió al vaso de precipitados de (1).

35

(3) Después de la adición (2) anterior, el contenido del vaso de precipitados se agitó a 67 °C para mezclar el sustrato para medir la actividad lipasa (DGGMR) y el presente aceite de silicona modificado (KF-355A) en el vaso de precipitados.

Este proceso de mezcla (agitación) se realizó durante 5 minutos para preparar una "mezcla del sustrato para medir la actividad lipasa (DGGMR) y el presente aceite de silicona modificado".

40

La agitación se realizó montando el vaso de precipitados sobre un agitador múltiple (modelo: M-3; distribuidor: AS ONE Corporation (Japón)) y haciendo girar una barra magnética en el vaso de precipitados mientras ajusta el dial de una unidad de control del agitador múltiple en "3".

(4) Posteriormente, se añadió una "cierta cantidad (4,0 ml) de tampón de L-tartrato de sodio 40 mM (pH 4,0 a 20 °C)" (toda) la "mezcla del sustrato para medir la actividad lipasa (DGGMR) y el presente aceite de silicona

modificado" en el vaso de precipitados de (3) con agitación a temperatura ambiente (25 °C) con el uso de una micropipeta.

Después de la adición, la agitación continuó a temperatura ambiente (25 °C) durante 5 minutos. De esta forma, la "cierta cantidad (4,0 ml) de tampón de L-tartrato de sodio 40 mM (pH 4,0 a 20 °C)" se mezcló con (toda) la "mezcla preparada mezclando el sustrato para medir la actividad lipasa (DGGMR) y el presente modificado aceite de

silicona". La agitación se realizó montando el vaso de precipitados sobre un agitador múltiple (modelo: M-3; distribuidor: AS ONE Corporation (Japón)) y haciendo girar una barra magnética en el vaso de precipitados mientras ajusta el dial de una unidad de control del agitador múltiple en "3".

(5) Posteriormente, se añadió adicionalmente una cierta cantidad de tampón de L-tartrato de sodio 40 mM (pH 4,0 a 20 °C) al "líquido mixto preparado mezclando la mezcla (es decir, la mezcla del sustrato para medir la actividad lipasa (DGGMR) y el presente aceite de silicona modificado) y una cierta cantidad de tampón de L-tartrato de sodio 40 mM (pH 4,0 a 20 °C)" de (4) anterior, para llevar el volumen final a 200 ml.

(6) A través del procedimiento descrito anteriormente, se preparó la solución de sustrato para medir la actividad lipasa (el sustrato para medir la actividad lipasa: DGGMR; el presente aceite de silicona modificado: KF-355A). El resultante se designó como el primer lote.

(7) Los procedimientos descritos en (1) a (6) anteriores se repitieron dos veces para preparar por separado las soluciones de sustrato para medir la actividad lipasa (el sustrato para medir la actividad lipasa: DGGMR; el presente aceite de silicona modificado: KF-355A).

Los resultantes se designaron como el segundo lote y el tercer lote, respectivamente.

(8) En todo el primer lote, el segundo lote y el tercer lote de soluciones de sustrato para medir la actividad lipasa preparadas en (1) a (7) anteriores, la concentración del sustrato para medir la actividad lipasa (DGGMR) fue de 0,3 mM y la del presente aceite de silicona modificado (KF-355A) fue del 0,3 % (p/v).

Además, no se observó gradiente de concentración ni fuerte turbidez en estas soluciones de sustrato para medir la actividad lipasa. Se confirmó visualmente que las soluciones de sustrato se habían mezclado uniformemente.

2. Almacenamiento de reactivo

El primer lote, el segundo lote y el tercer lote de las soluciones de sustrato para medir la actividad lipasa preparadas en 1 anterior se almacenaron por separado a 10 °C en oscuridad durante 16 meses.

3. Medición del diámetro de las micelas en la emulsión de la solución de sustrato para medir la actividad lipasa

El primer lote, el segundo lote y el tercer lote de las soluciones de sustrato para medir la actividad lipasa almacenada en 2 anterior se sometieron a la medición de los diámetros de las micelas en sus emulsiones.

La medición se realizó el día del inicio del almacenamiento de la solución de sustrato para medir la actividad lipasa (Día 0) y 16 meses después del inicio del almacenamiento con el uso de la solución de sustrato para medir la actividad lipasa almacenada durante el período de tiempo designado.

(1) El primer lote, el segundo lote y el tercer lote de las soluciones de sustrato para medir la actividad lipasa almacenadas a 10 °C (en oscuridad) durante 16 meses en 2 anterior se introdujeron en celdas de plástico separadas en cantidades de 2 ml cada una.

(2) Posteriormente, una sonda óptica (fibra óptica) de un analizador dinámico de distribución del tamaño de partícula con dispersión de luz (modelo: Nanotrak UPA-EX250; distribuidor: Nikkiso Co., Ltd. (Japón)) se insertó en cada celda de plástico una por una. Se midieron los diámetros (tamaños de partícula) de las micelas en una emulsión de cada uno del primer lote, el segundo lote y el tercer lote de las soluciones de sustrato para medir la actividad lipasa en cada celda de plástico. La medición se realizó a temperatura ambiente (25 °C).

4. Resultados de la medición

La figura 7 muestra la distribución de los diámetros (tamaños de partícula) de las micelas en una emulsión del primer lote de la solución de sustrato para medir la actividad lipasa medida en el punto 3 anterior, La figura 8 muestra la distribución de los diámetros (tamaños de partículas) de las micelas en una emulsión del segundo lote de la solución de sustrato para medir la actividad lipasa y la figura 9 muestra la distribución de los diámetros (tamaños de partículas) de las micelas en una emulsión del tercer lote de la solución de sustrato para medir la actividad lipasa.

La figura 7, la figura 8 y la figura 9 muestran el diámetro promedio (tamaño de partícula) en una emulsión de la solución de sustrato para medir la actividad lipasa.

En la figura 7, la figura 8 y la figura 9, el eje horizontal indica el diámetro (tamaño de partícula) de las micelas en una emulsión (el promedio, representado μm) en el eje vertical indica la frecuencia (representado en %).

En la figura 7, la figura 8 y la figura 9, una línea discontinua representa los resultados de la medición el día de inicio del almacenamiento (día 0) y una línea continua representa los resultados de la medición 16 meses después del inicio

del almacenamiento.

5. Análisis

5 La figura 7, la figura 8 y la figura 9 demuestran que la distribución de los diámetros (tamaños de partícula) de las micelas en las emulsiones de cualquiera del primer lote, el segundo lote y el tercer lote de las soluciones de sustrato para medir la actividad lipasa está dentro de un intervalo de 100 nm a 200 nm (0,1 µm a 0,2 µm) y en las proximidades del mismo en función de los resultados de las mediciones obtenidas el día de inicio del almacenamiento (día 0) y 16 meses después del inicio del almacenamiento.

10 La figura 7, la figura 8 y la figura 9 también demuestran que la distribución de los diámetros (tamaños de partícula) de las micelas en las emulsiones de cualquiera del primer lote, el segundo lote y el tercer lote de las soluciones de sustrato para medir la actividad lipasa determinada el día de inicio del almacenamiento (Día 0) es sustancialmente la misma que la determinada 16 meses después del inicio del almacenamiento.

15 Tal como se ha descrito anteriormente, el diámetro (tamaño de partícula) de las micelas en una emulsión de la solución de sustrato para medir la actividad lipasa está dentro de un intervalo de 80 nm a 600 nm, de modo que la velocidad de reacción con la lipasa es alta, una emulsión es estable y una solución de sustrato para medir la actividad lipasa puede almacenarse y usarse durante un largo período de tiempo. En realidad, se confirmó que la distribución de los diámetros (tamaños de partícula) de las micelas en una emulsión se mantuvo estable durante un largo período de tiempo (es decir, durante 16 meses).

[Ejemplo 7] (Verificación de los efectos del reactivo para medir la actividad lipasa)

25 Se examinaron los efectos del reactivo para medir la actividad lipasa con respecto a la estabilidad de almacenamiento (el reactivo que comprende la solución de sustrato para medir la actividad lipasa).

1. El reactivo para medir la actividad lipasa

30 Se prepararon el primer reactivo y el segundo reactivo para medir la actividad lipasa.

[1] Primer reactivo

35 Los componentes reactivos siguientes se disolvieron a la concentración designada en agua pura y el nivel de pH se ajustó a 8,4 (20 °C) para preparar el primer reactivo para medir la actividad lipasa
Desoxicolato de sodio (un promotor de lipasa) al 2 % (p/v)
Cloruro de calcio (un activador de lipasa) 20 mM
Colipasa (derivada de pancreasa porcina; distribuidor: Roche Diagnostics K. K. (Japón)) 750K Unidad/l (10 mg/l)
Bicina (un tampón) 80 mM

40 El primer reactivo se preparó por separado (tres veces en total) y los resultantes se designaron como el primer lote, el segundo lote y el tercer lote de los primeros reactivos de los reactivos para medir la actividad lipasa.

[2] Segundo reactivo

45 En total, se prepararon tres lotes de los segundos reactivos de los reactivos para medir la actividad lipasa.

(1) Una porción (0,045 g) del sustrato para medir la actividad lipasa, es decir, éster de (6'-metilresorufina) de ácido 1,2-o-dilauril-rac-glicero-3-glutárico (DGGMR) distribuidor: Roche Diagnostics K. K. (Japón)), se fraccionó en un vaso de precipitados (volumen: 10 ml).

50 (2) Posteriormente, una porción (0,6 g) del aceite de silicona modificado no reactivo de tipo cadena lateral (tipo modificado con poliéter); KF-355A (distribuidor: Shin-Etsu Chemical Co., Ltd., Japón)), se fraccionó y se añadió al vaso de precipitados de (1).

(3) Después de la adición (2) anterior, el contenido del vaso de precipitados se agitó a 67 °C para mezclar el sustrato para medir la actividad lipasa (DGGMR) y el presente aceite de silicona modificado (KF-355A) en el vaso de precipitados.

55 Este proceso de mezcla (agitación) se realizó durante 5 minutos para preparar una "mezcla del sustrato para medir la actividad lipasa (DGGMR) y el presente aceite de silicona modificado".

La agitación se realizó montando el vaso de precipitados sobre un agitador múltiple (modelo: M-3; distribuidor: AS ONE Corporation (Japón)) y haciendo girar una barra magnética en el vaso de precipitados mientras ajusta el dial de una unidad de control del agitador múltiple en "3".

60 (4) Posteriormente, se añadió una "cierta cantidad (4,0 ml) de tampón de L-tartrato de sodio 40 mM (pH 4,0 a 20 °C)" (toda) la "mezcla del sustrato para medir la actividad lipasa (DGGMR) y el presente aceite de silicona modificado" en el vaso de precipitados de (3) con agitación a temperatura ambiente (25 °C) con el uso de una micropipeta.

65 Después de la adición, la agitación continuó a temperatura ambiente (25 °C) durante 5 minutos. De esta forma, la "cierta cantidad (4,0 ml) de tampón de L-tartrato de sodio 40 mM (pH 4,0 a 20 °C)" se mezcló con (toda) la "mezcla

preparada mezclando el sustrato para medir la actividad lipasa (DGGMR) y el presente modificado aceite de silicona".

La agitación se realizó montando el vaso de precipitados sobre un agitador múltiple (modelo: M-3; distribuidor: AS ONE Corporation (Japón)) y haciendo girar una barra magnética en el vaso de precipitados mientras ajusta el dial de una unidad de control del agitador múltiple en "3".

(5) Posteriormente, se añadió adicionalmente una cierta cantidad de tampón de L-tartrato de sodio 40 mM (pH 4,0 a 20 °C) al "líquido mixto preparado mezclando la mezcla (es decir, la mezcla del sustrato para medir la actividad lipasa (DGGMR) y el presente aceite de silicona modificado) y una cierta cantidad de tampón de L-tartrato de sodio 40 mM (pH 4,0 a 20 °C)" de

(4) anterior, para llevar el volumen final a 200 ml.

(6) A través del procedimiento descrito anteriormente, se preparó la solución de sustrato para medir la actividad lipasa (el sustrato para medir la actividad lipasa: DGGMR; el presente aceite de silicona modificado: KF-355A).

El resultante se designó como el primer lote del segundo reactivo para medir la actividad lipasa.

(7) Los procedimientos descritos en (1) a (6) anteriores se repitieron dos veces para preparar por separado las soluciones de sustrato para medir la actividad lipasa (el sustrato para medir la actividad lipasa: DGGMR; el presente aceite de silicona modificado: KF-355A).

Los resultantes se designaron como el segundo lote y el tercer lote de los segundos reactivos para medir la actividad lipasa, respectivamente. (8) En todo el primer lote, el segundo lote y el tercer lote de soluciones de sustrato para medir la actividad lipasa preparadas en (1) a (7) anteriores, la concentración del sustrato para medir la actividad lipasa (DGGMR) fue de 0,3 mM y la del presente aceite de silicona modificado (KF-355A) fue del 0,3 % (p/v).

Además, no se observó gradiente de concentración ni fuerte turbidez en estas soluciones de sustrato para medir la actividad lipasa. Se confirmó visualmente que las soluciones de sustrato se habían mezclado uniformemente.

2. Almacenamiento de reactivo

(1) El primer lote, el segundo lote y el tercer lote de los primeros reactivos para medir la actividad lipasa preparados en 1 [1] anterior se almacenaron por separado a 10 °C en oscuridad durante 13 meses.

(2) El primer lote, el segundo lote y el tercer lote de los segundos reactivos para medir la actividad lipasa preparados en 1 [2] anterior se almacenaron a 10 °C en oscuridad durante 13 meses.

3. Muestra

Los siguientes "(1) suero de control 1" "(2) suero de control 2" y "(3) suero de control 3" se usaron como muestras.

(1) Suero de control 1

Un suero de control disponible en el mercado para el control de calidad (es decir, Aalto Control IM; distribuidor: Shino-Test Corporation (Japón)) se mezcló con la misma cantidad de un "prototipo" de un suero de control para el control de calidad (es decir, Aalto Control II; distribuidor: Shino-Test Corporation (Japón)). La mezcla resultante se usó como el "suero de control 1".

(2) Suero de control 2

Un "prototipo" de un suero de control para el control de calidad (es decir, Aalto Control II; Shino-Test Corporation (Japón)) se utilizó como el "suero de control 2".

(3) Suero de control 3

Un suero de control disponible en el mercado para el control de calidad "QAP troll 2X" (número de producción: QL-215; distribuidor: Sysmex Corporation (Japón)) se utilizó como el "suero de control 3".

4. Medición de la actividad lipasa en una muestra

Con el uso del primer reactivo y el segundo reactivo para medir la actividad lipasa almacenados a 10 °C (en oscuridad) durante 13 meses en 2 anterior, la actividad lipasa en las muestras de 3 anterior se midió usando un analizador clínico 7180 (distribuidor: Hitachi High-Technologies Corporation (Japón)).

La medición se llevó a cabo el día del inicio del almacenamiento del primer reactivo y el segundo reactivo para medir la actividad lipasa (Día 0), 3 meses después del inicio del almacenamiento, 6 meses después del inicio del almacenamiento, 9 meses después del inicio del almacenamiento, 12 meses después del inicio del almacenamiento y 13 meses después del inicio del almacenamiento con el uso del primer reactivo y el segundo reactivo para medir la actividad lipasa almacenada durante el período de tiempo designado.

(1) En el analizador clínico 7180, se añadieron 160 µl del primer lote del "primer reactivo" almacenado en 2 (1)

anterior como el primer reactivo a 2,6 µl de cada una de las muestras descritas en 3 anterior (es decir, (1) suero de control 1, (2) suero de control 2 y

(3) suero de control 3) y la reacción se dejó proceder a 37 °C.

(2) Posteriormente, entre el punto 16 (270,093 segundos después de la adición del primer reactivo) y el punto 17 (286,977 segundos después de la adición del primer reactivo), se añadieron 96 µl del primer lote del "segundo reactivo" almacenado en el punto 2 (2) anterior como el segundo reactivo y se permitió que la reacción prosiguiera a 37 °C.

(3) Posteriormente, se midió un cambio en la absorbancia desde el punto 20 (340,510 segundos después de la adición del primer reactivo) y el punto 24 (411,887 segundos después de la adición del primer reactivo) a una longitud de onda principal de 570 nm y otra longitud de onda de 700 nm (un cambio en la absorbancia se midió en función de un aumento en la concentración de 6'-metilresorufina generada en respuesta al valor de la actividad lipasa en una muestra).

(4) Como calibrador para la calibración, se usó un "calibrador II (C.f.a.s. II) para análisis automatizado" (Lote No. 167255-01; distribuidor: Roche Diagnostics K. K. (Japón)).

Los procedimientos (1) a (3) descritos anteriormente se realizaron de la misma manera, excepto porque este "calibrador II (C.f.a.s. II) para el análisis automatizado" se utilizó como muestra. Se determinó un cambio en la absorbancia cuando se usó el calibrador "calibrador II (C.f.a.s. II) para el análisis automatizado" para la medición (se midió un cambio en la absorbancia en función de un aumento de la concentración de 6'-metilresorufina generada en respuesta al valor de la actividad lipasa (valor conocido) en el calibrador).

(5) Se usó solución salina fisiológica para medir un reactivo blanco.

Los procedimientos (1) a (3) descritos anteriormente se realizaron de la misma manera, excepto porque se usó solución salina fisiológica como muestra y se determinó un cambio en la absorbancia cuando se midió la solución salina fisiológica (se midió un cambio en la absorbancia del reactivo blanco).

(6) Posteriormente, se calculó una "diferencia en un cambio en la absorbancia de la muestra" restando el cambio en la absorbancia del reactivo blanco entre los puntos anteriores calculados en (5) anterior con respecto al cambio en la absorbancia de cada muestra de 3 anterior entre los puntos anteriores calculados en (3) anterior.

Además, se calculó una "diferencia en un cambio en la absorbancia del calibrador" restando el cambio en la absorbancia del reactivo blanco entre los puntos anteriores calculados en (5) anterior con respecto al cambio en la absorbancia del calibrador (con un valor de actividad lipasa conocida) entre los puntos anteriores calculados en (4) anterior. Posteriormente, se compararon la "diferencia en el cambio en la absorbancia de la muestra", la "diferencia en el cambio en la absorbancia del calibrador" y el "valor de la actividad lipasa del calibrador" conocido. A continuación se calculó la proporción para determinar el valor de la actividad lipasa de cada muestra como se describe en 3 anterior.

(7) Los procedimientos descritos en (1) a (6) descritos anteriormente se realizaron de la misma manera, excepto porque el primer lote del "primer reactivo" almacenado en 2 (1) anterior como el primer reactivo en (1) anterior fue reemplazado por el segundo lote y el primer lote del "segundo reactivo" almacenado en 2 (2) anterior, ya que el segundo reactivo de (2) fue reemplazado por el segundo lote. Se determinó el valor de la actividad lipasa de cada muestra de 3 anterior cuando se usó el segundo lote del primer reactivo y se usó el segundo lote del segundo reactivo.

(8) Asimismo, los procedimientos (1) a (6) descritos anteriores se realizaron de la misma manera, excepto porque el primer lote del "primer reactivo" almacenado en 2 (1) anterior como el primer reactivo en (1) anterior fue reemplazado por el tercer lote y el primer lote del "segundo reactivo" almacenado en 2 (2) anterior, ya que el segundo reactivo de (2) fue reemplazado por el tercer lote. Se determinó el valor de la actividad lipasa de cada muestra de 3 anterior cuando se usó el tercer lote del primer reactivo y se usó el tercer lote del segundo reactivo.

5. Resultados de la medición

La tabla 5 muestra el valor de la actividad lipasa de cada muestra de 3 anterior medida en 4 anterior.

En la Tabla 5, la unidad del valor medido (el valor de la actividad lipasa de cada muestra) se representa en Unidad/l.

En la Tabla 5, un valor numérico entre paréntesis representa un valor calculado dividiendo el valor medido (el valor de la actividad lipasa) por el valor medido (el valor de la actividad lipasa) de cada muestra el día del inicio del almacenamiento (Día 0) en porcentaje.

La Figura 10 muestra el valor de la actividad lipasa de cada muestra de 3 anterior determinada con el uso del primer lote del primer reactivo y el primer lote del segundo reactivo en 4 anterior.

La Figura 11 muestra el valor de la actividad lipasa de cada muestra de 3 anterior determinada con el uso del segundo lote del primer reactivo y el segundo lote del segundo reactivo en 4 anterior.

La Figura 12 muestra el valor de la actividad lipasa de cada muestra de 3 anterior determinada con el uso del tercer lote del primer reactivo y el tercer lote del segundo reactivo en 4 anterior.

En la figura 10, la figura 11 y la figura 12, el eje horizontal indica la duración del almacenamiento de reactivo (representado en el número de meses) y el eje vertical indica el valor medido (el valor de la actividad lipasa de cada

muestra) (representado en Unidad/l).

En la figura 10, la figura 11 y la figura 12, el valor medido se representa con el símbolo "●" cuando la muestra es "(1) suero de control 1", el valor medido se representa con el símbolo "▲" cuando la muestra es "(2) suero de control 2" y el valor medido se representa con el símbolo "■" cuando la muestra es "(3) suero de control 3".

5

Tabla 5

Duración del almacenamiento de reactivos	Valor medido (valor de la actividad de lipasa de la muestra)		
	Primer reactivo/Segundo reactivo: Primer lote		
	Suero de control 1	Suero de control 2	Suero de control 3
Inicio del almacenamiento	74,8 [100 %]	127,5 [100 %]	31,5 [100 %]
3 meses	73,4 (98 %)	127,3 (100 %)	31,7 (101 %)
6 meses	75,0 (100 %)	128,8 (101 %)	31,6 (100 %)
9 meses	73,4 (98 %)	129,1 (101 %)	31,7 (101 %)
12 meses	74,1 (99 %)	128,9 (101 %)	30,9 (98 %)
13 meses	75,1 (100 %)	128,7 (101 %)	31,3 (99 %)

[Unidad de valor medido: Unidad/l]

Duración del almacenamiento de reactivos	Valor medido (valor de la actividad de lipasa de la muestra)		
	Primer reactivo/Segundo reactivo: Segundo lote		
	Suero de control 1	Suero de control 2	Suero de control 3
Inicio del almacenamiento	74,7 [100 %]	127,3 [100 %]	31,5 [100 %]
3 meses	73,8 (99 %)	127,4 (100 %)	31,9 (101 %)
6 meses	75,0 (100 %)	128,7 (101 %)	31,6 (100 %)
9 meses	73,2 (98 %)	128,9 (101 %)	32,7 (104 %)
12 meses	74,0 (99 %)	128,5 (101 %)	30,4 (97 %)
13 meses	75,3 (101 %)	128,9 (101 %)	31,4 (100 %)

[Unidad de valor medido: Unidad/l]

10

Duración del almacenamiento de reactivos	Valor medido (valor de la actividad de lipasa de la muestra)		
	Primer reactivo/Segundo reactivo: Tercer lote		
	Suero de control 1	Suero de control 2	Suero de control 3
Inicio del almacenamiento	74,9 [100 %]	127,9 [100 %]	31,4 [100 %]
3 meses	73,7 (98 %)	128,1 (100 %)	31,8 (101 %)

(continuación)

Duración del almacenamiento de reactivos	Valor medido (valor de la actividad de lipasa de la muestra)		
	Primer reactivo/Segundo reactivo: Tercer lote		
	Suero de control 1	Suero de control 2	Suero de control 3
6 meses	75,1 (100 %)	128,8 (101 %)	31,5 (100 %)
9 meses	73,4 (98 %)	129,4 (101 %)	32,6 (104 %)
32 meses	74,4 (99 %)	129,1 (101 %)	31,3 (100 %)
13 meses	75,3 (101 %)	128,8 (101 %)	31,1 (99 %)

[Unidad de valor medido: Unidad/l]

6. Análisis

5

(1) La tabla 5 y la figura 10 demuestran que, cuando se utilizan el primer lote del primer reactivo y el primer lote del segundo reactivo para medir la actividad lipasa, el valor medido durante el almacenamiento del reactivo es del 98 % al 100 % en el caso de "(1) suero de control 1", es del 100 % al 101 % en el caso de "(2) suero de control 2" y es del 98 % al 101 % en el caso de "(3) suero de control 3", en relación con el valor medido (el valor de la actividad lipasa) el día de inicio del almacenamiento (Día 0).

10

(2) La tabla 5 y la figura 11 demuestran que, cuando se utilizan el segundo lote del primer reactivo y el segundo lote del segundo reactivo para medir la actividad lipasa, el valor medido durante el almacenamiento del reactivo es del 98 % al 101 % en el caso de "(1) suero de control 1", es del 100 % al 101 % en el caso de "(2) suero de control 2" y es del 97 % al 104 % en el caso de "(3) suero de control 3", en relación con el valor medido (el valor de la actividad lipasa) el día de inicio del almacenamiento (Día 0).

15

(3) Además, la tabla 5 y la figura 12 demuestran que, cuando se utilizan el tercer lote del primer reactivo y el tercer lote del segundo reactivo para medir la actividad lipasa, el valor medido durante el almacenamiento del reactivo es del 98 % al 101 % en el caso de "(1) suero de control 1", es del 100 % al 101 % en el caso de "(2) suero de control 2" y es del 99 % al 104 % en el caso de "(3) suero de control 3", en relación con el valor medido (el valor de la actividad lipasa) el día de inicio del almacenamiento (Día 0).

20

(4) Es decir, La tabla 5, La figura 10, la figura 11 y la figura 12 demuestran que el valor medido (el valor de la actividad lipasa) 13 meses después del inicio del almacenamiento (a 10 °C en oscuridad) es sustancialmente el mismo que el valor medido (el valor de la actividad lipasa) el día de inicio del almacenamiento (día 0) en cualquiera del primer lote, el segundo lote y el tercer lote de los primeros reactivos y los segundos reactivos para medir la actividad lipasa. De manera más específica, la capacidad del reactivo para medir la actividad lipasa se mantiene estable durante un largo período de tiempo (es decir, durante 13 meses).

25

(5) Sobre la base de los resultados examinados en este ejemplo, en consecuencia, se confirmó que las soluciones eran excelentes en estabilidad de almacenamiento y eran capaces de realizar mediciones precisas durante un largo período de tiempo.

REIVINDICACIONES

1. Uso de una composición que comprende un aceite de silicona modificado de tipo modificado con poliéter no reactivo de tipo cadena lateral junto con éster de (6'-metilresorufina) de ácido 1,2-o-dilauril-rac-glicero-3-glutárico para estabilizar una solución de sustrato para medir la actividad lipasa, que comprende éster de (6'-metilresorufina) de ácido 1,2-o-dilauril-rac-glicero-3-glutárico como sustrato para medir la actividad lipasa.
2. Uso de una composición que comprende un aceite de silicona modificada de tipo modificado con poliéter no reactivo de tipo cadena lateral con éster de (6'-metilresorufina) de ácido 1,2-o-dilauril-rac-glicero-3-glutárico para estabilizar una solución de sustrato para medir la actividad lipasa que comprende éster de (6'-metilresorufina) de ácido 1,2-o-dilauril-rac-glicero-3-glutárico como sustrato para medir la actividad lipasa.

Fig. 1

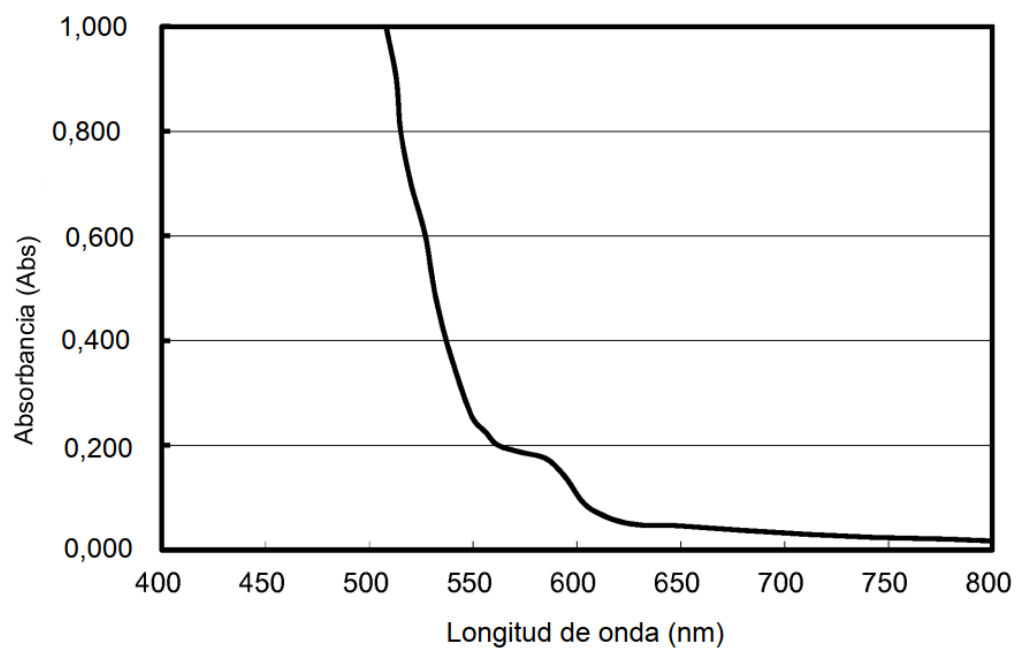


Fig. 2

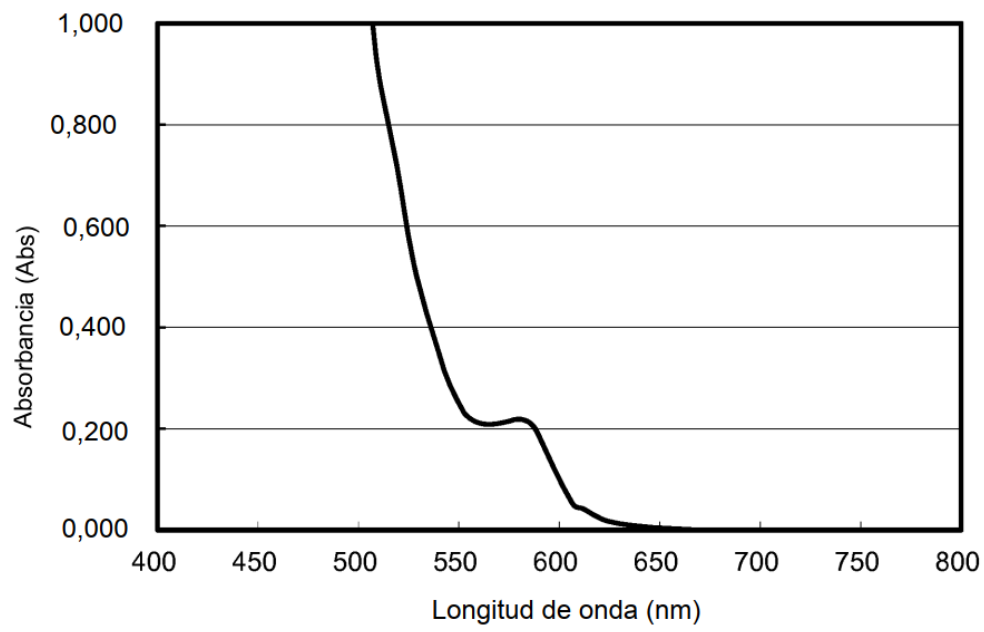


Fig. 3

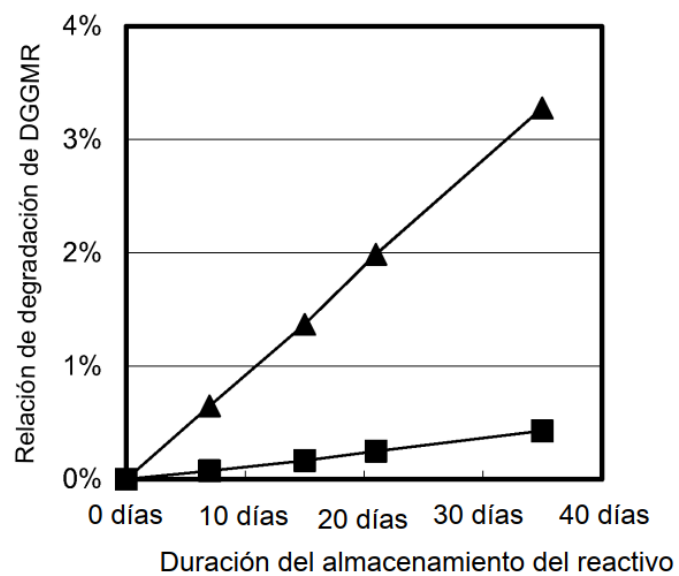


Fig. 4

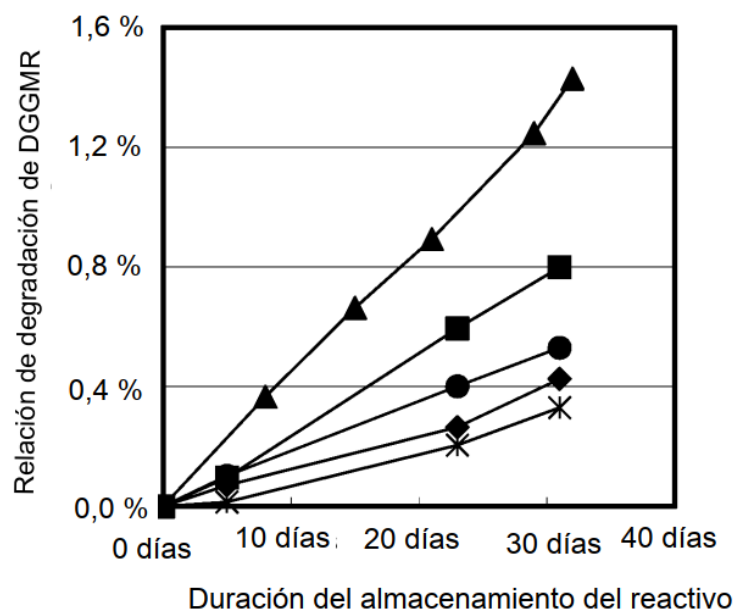


Fig. 5

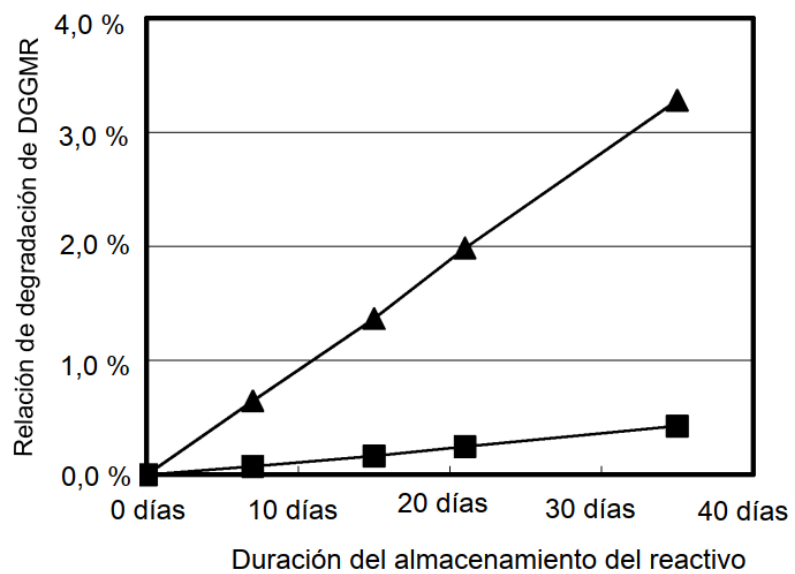


Fig. 6

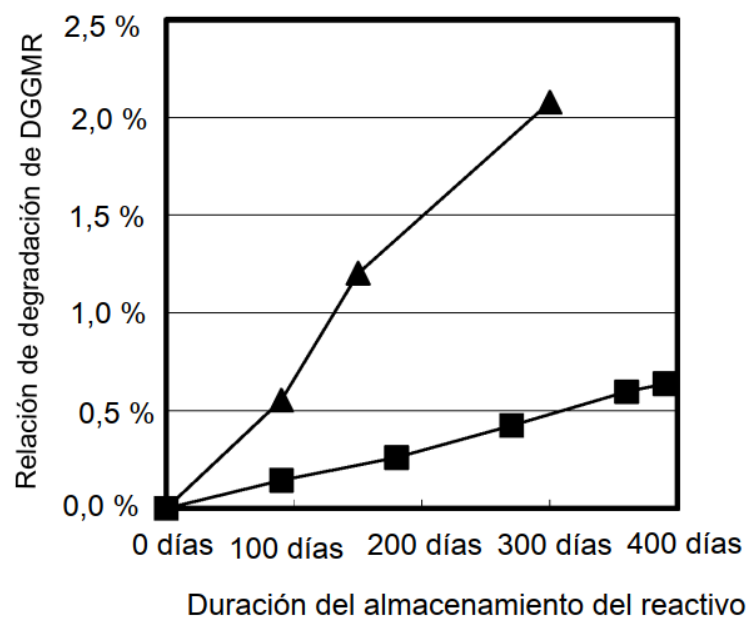


Fig. 7

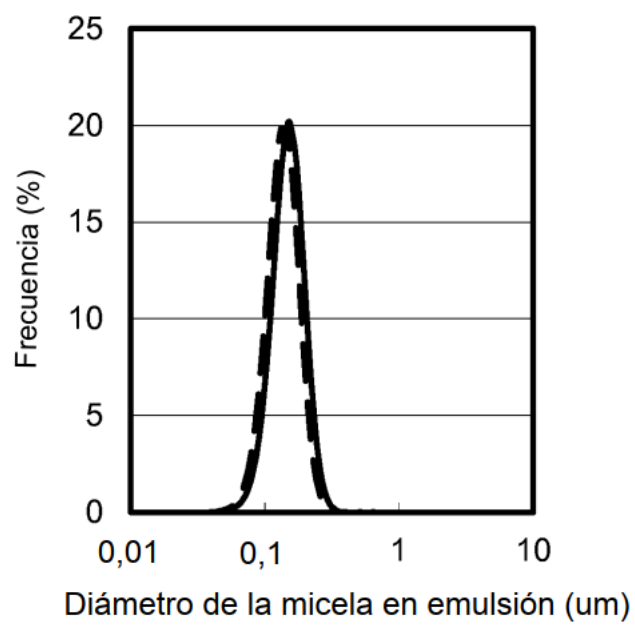


Fig. 8

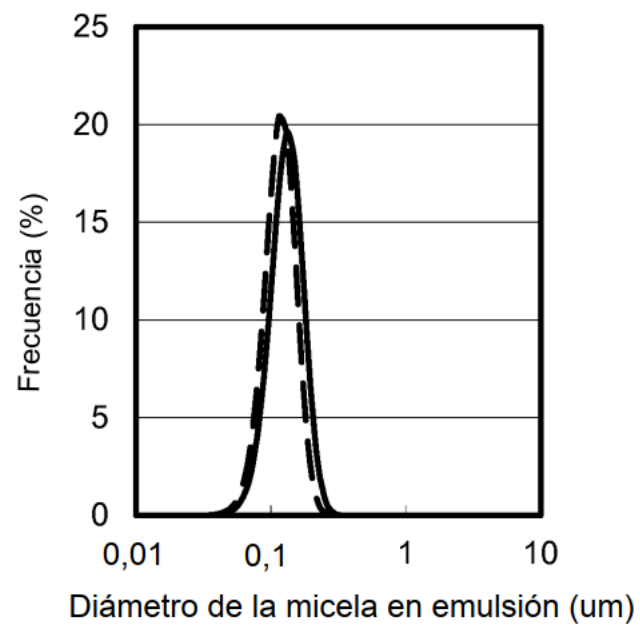


Fig. 9

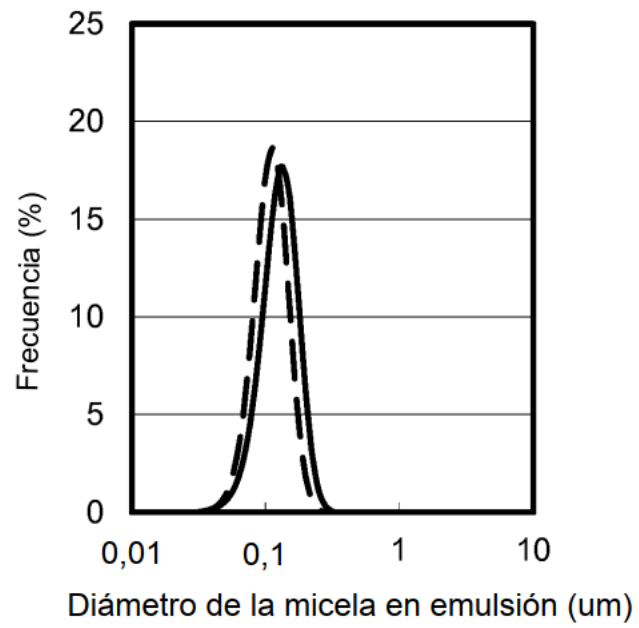


Fig. 10

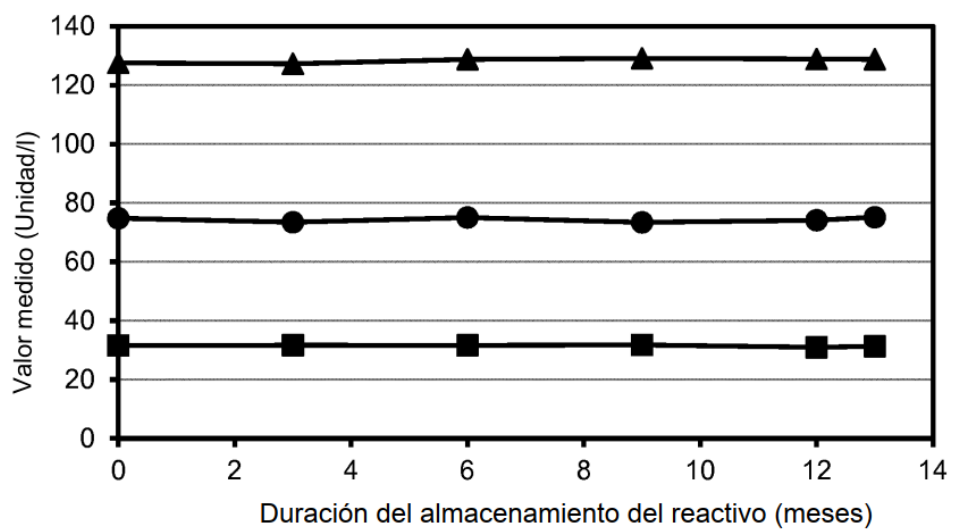


Fig. 11

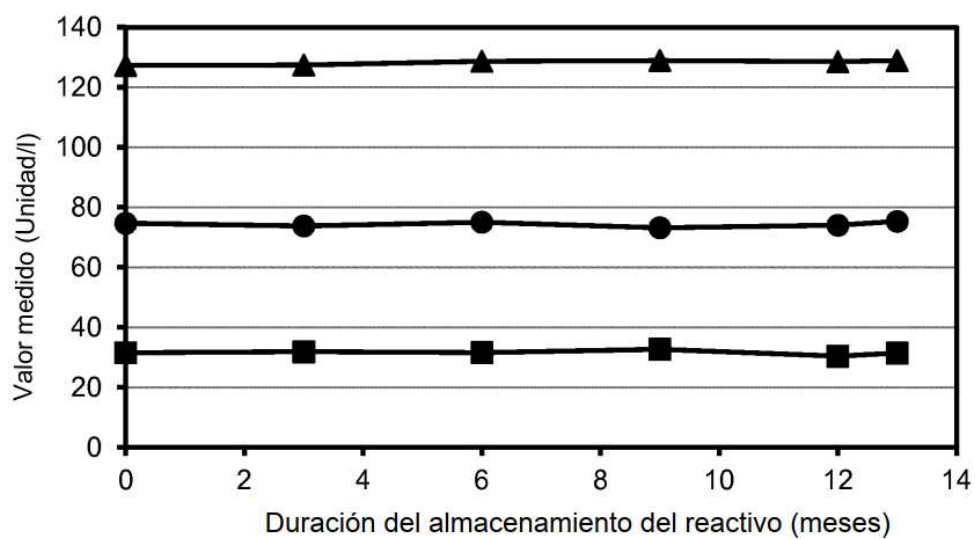


Fig. 12

