

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 626 231**

21 Número de solicitud: 201630070

51 Int. Cl.:

**G01N 33/50** (2006.01)

**C07D 311/84** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

22 Fecha de presentación:

**21.01.2016**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**24.07.2017**

Fecha de la concesión:

**16.01.2018**

45 Fecha de publicación de la concesión:

**23.01.2018**

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE BURGOS (100.0%)  
C/ Hospital del Rey  
09090 Burgos (Burgos) ES**

72 Inventor/es:

**TORROBA PÉREZ, Tomás;  
GARCÍA HERBOSA, Gabriel ;  
CUEVAS VICARIO, José Vicente y  
GARCÍA CALVO, Víctor**

54 Título: **Detección por fluorescencia de aminas terciarias**

57 Resumen:

Detección por fluorescencia de aminas terciarias.

La presente invención se refiere a un método para la determinación por fluorescencia de aminas terciarias a través de reactivos que utilizan pigmentos basados en xantenos halogenados. Además, la invención comprende un kit que comprende los reactivos necesarios para llevar a cabo el método de la invención.

ES 2 626 231 B2

**Detección por fluorescencia de aminas terciarias****DESCRIPCIÓN**

5 La presente invención se refiere a un método para la determinación por fluorescencia de aminas terciarias a través de reactivos que utilizan pigmentos basados en xantenos halogenados. Además, la invención comprende un kit que comprende los reactivos necesarios para llevar a cabo el método de la invención.

**10 ESTADO DE LA TÉCNICA**

El consumo abusivo de drogas es un serio problema de salud siendo la causa de millones de enfermedades graves o lesiones, y muchos de los principales problemas sociales, tales como la conducción bajo sus efectos, violencia, estrés y abuso infantil.

15 Además, la adicción derivada de este consumo es una enfermedad crónica, caracterizada por la búsqueda compulsiva de drogas y su uso a pesar de las consecuencias negativas asociadas al mismo.

Entre las drogas más adictivas se encuentra la heroína, un opioide derivado de la morfina, y que administrada vía intravenosa es entre dos y cuatro veces más potente que la ésta. Tanto esta droga, como el resto de compuestos pertenecientes a la familia de los opiáceos, como de forma más general, las aminas terciarias, tienen muy variadas aplicaciones tales como fármacos, pesticidas y surfactantes, y por lo tanto el desarrollo de métodos analíticos sensibles para su determinación, especialmente en disolución acuosa, es un aspecto deseable.

Las trialkilaminas, y los compuestos relacionados, son problemáticos para su detección ya que no presentan buena absorción en la región UV/VIS del espectro, mostrando bajas absorptividades molares, y son muy difíciles de derivatizar. Desde los primeros trabajos de Noffsinger y Danielson (Noffsinger, J. B.; Danielson, N. D. *Journal of Chromatography* **1987**, 387, 520), la detección y determinación analítica de aminas terciarias depende de la electroluminiscencia de  $[\text{Ru}(\text{bipy})_3]^{3+}$ , como se ha revisado y tratado en detalle (Yuan, Y.; Han, S.; Hu, L.; Parveen, S.; Xu, G. *Electrochimica Acta* **2012**, 82, 484). La reacción de detección se basa en la oxidación de  $[\text{Ru}(\text{bipy})_3]^{2+}$  a  $[\text{Ru}(\text{bipy})_3]^{3+}$  en el electrodo, y la posterior transferencia electrónica entre  $[\text{Ru}(\text{bipy})_3]^{3+}$  y el dador de electrones (amina terciaria). Tal transferencia

electrónica habitualmente ocurre con emisión de luz (electroquimioluminiscencia, ECL). Sin embargo, uno de los inconvenientes del método es la baja selectividad debido al alto número de especies que pueden actuar como dadores de electrones hacia  $[\text{Ru}(\text{bipy})_3]^{3+}$ . Así, las aminas primarias, secundarias y terciarias dan ECL aunque su intensidad de luminiscencia decrece en el orden terciaria>secundaria>primaria.

En particular, hay muchos métodos de determinación descritos para la cuantificación de heroína. Entre todos, la cromatografía de gases acoplada con detección de ionización de llama (GC-FID) continúa siendo la elección ideal dado que es rápida y versátil. Alternativamente, la cuantificación de la heroína también es posible con cromatografía de gases con detección de masas (GC-MS) y en menor medida, a través de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), reflectancia difusa por espectroscopia de infrarrojo cercano (DR-NIR) y cromatografía capilar micelar electrocinética (MECC). Asimismo, el inmunoensayo enzimático para opiáceos en orina se ha descrito para la determinación cuantitativa de derivados de morfina en fluidos biológicos (Schneide.Rs; Lindquis.P; Tonginwo.E; Rubenste.Ke; Ullman, E. F. *Clinical Chemistry* **1973**, 19, 821).

Sin embargo, la mayor parte de las pruebas comerciales para la detección de opiáceos dan apreciable reacción cruzada con los metabolitos principales de la heroína (6-monoacetilmorfina, morfina, morfina-3-glucurónido y morfina-6-glucurónido), así como con otros productos de su biotransformación. Es por eso, que se requieren nuevos métodos para la determinación rápida y precisa de aminas terciarias, incluyendo opiáceos y heroína, que permita la discriminación de tales drogas y opere en un amplio rango de concentraciones, no sea susceptible de interferir con otras drogas de aminas no terciarias y evite técnicas de extracción incómodas.

### DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

30

En la presente invención se describe un método y reactivos para la determinación de aminas terciarias basado en la fluorescencia emitida por una muestra desaireada que contiene el analito y los reactivos basados en pigmentos tipo-xanteno halogenados, al ser iluminada con una lámpara halógena.

35

Esta iluminación de la muestra provoca una reacción entre las aminas terciarias y el estado excitado del pigmento tipo-xanteno halogenado, que resulta en la producción de fluoresceína. Esta reacción de deshalogenación requiere una transferencia electrónica entre el estado excitado del pigmento (el aceptor) y la amina (el dador de electrones).

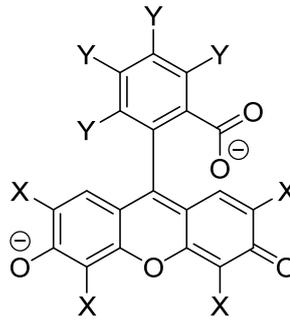
La deshalogenación fotoquímica de la eosina y otros pigmentos tipo-xanteno halogenados ya ha sido descrita con anterioridad (Oster et al. *Journal of Physical Chemistry*, 1962, 66, 2514; Eisenberg, R. *Journal of the American Chemical Society* **2009**, 131, 9192; McCormick et al. *Journal of the American Chemical Society* **2010**, 132, 15480; Han, Z. J. ET AL. *Angewandte Chemie-International Edition* **2012**, 51, 1667). En todos los casos mencionados, el dador de electrones está en gran exceso con respecto al pigmento.

En este sentido, los investigadores han desarrollado un método de detección y cuantificación de aminas terciarias hasta un intervalo de concentración de 0.1 a 5.0 ppm en el que la iluminación de los pigmentos tipo xantenos halogenados en presencia de estas aminas provoca una fluorescencia intensa en el rango de 510-535nm ( $\lambda_{exc} = 495nm$ ), detectable por medios fluorimétricos, tales como un espectrofluorímetro, cuya intensidad de emisión se correlaciona con la concentración de las aminas terciarias.

Adicionalmente, el método se lleva cabo en medio acuoso y utiliza reactivos estables por lo que es válido para la determinación *in situ* de sustancias como heroína y opiáceos, en muestras de orina y saliva.

Por lo tanto, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método para la detección y/o cuantificación fluorimétrica de aminas terciarias, caracterizado por que comprende las siguientes etapas:

- a) preparación de una disolución reactiva que comprende poner en contacto la muestra a analizar con al menos un pigmento tipo xanteno halogenado de fórmula general I



donde X se selecciona de entre hidrógeno, flúor, cloro, bromo y iodo, e Y se selecciona de entre H y Cl, o cualquiera de sus sales;

- 5
- b) ajustar el pH de la disolución de la etapa (a) entre 8 y 13;
  - c) desairar la disolución de la etapa (b) e iluminar con luz visible;
  - d) detectar y/o cuantificar la señal fluorescente producida.

Opcionalmente, puede llevarse a cabo la cuantificación de las aminas terciarias mediante la curva de calibrado de acuerdo con la ecuación

10

$$I_f = A(1 - 10^{-BC})$$

donde  $I_f$  es la variación de intensidad antes y después de iluminar la muestra a una longitud de onda determinada, y C es la concentración de amina terciaria que hay en la muestra.

- 15
- Con el método proporcionado por la presente invención es posible detectar aminas terciarias independientemente de la procedencia de las muestras.

En una realización preferida, la muestra a analizar o muestra diana procede de un fluido fisiológico o tejido derivado de un organismo (humano o animal), como por ejemplo: orina, sangre, suero, plasma sanguíneo, sudor, fluido oral (saliva) o cabello.

En una realización aún más preferida, la detección y cuantificación de las aminas terciarias se realiza en muestras de orina o saliva.

En otra realización preferida, la disolución reactiva de la etapa a) puede prepararse a diferentes concentraciones, ya que se ha encontrado que ciertas concentraciones son las más adecuadas para según qué aplicaciones.

Preferiblemente la concentración de pigmento tipo-xanteno halogenado se encuentra en el intervalo de  $10^{-7}$  M a  $10^{-2}$  M. Más preferiblemente, una concentración de  $10^{-6}$  M de reactivo es la elección adecuada para cuantificar aminas con una concentración de entre  $10^{-7}$  M y  $10^{-5}$  M.

30

En otra realización preferida la disolución se lleva a cabo en un disolvente polar que comprende agua y opcionalmente un disolvente orgánico polar. Preferiblemente, la proporción máxima del disolvente orgánico polar es del 50% y se selecciona de entre el grupo que comprende: alcoholes monohídricos como metanol, etanol, 1- propanol, 5 2-propanol, 1-butanol, 1-hexanol, 1 -octanol, y trifluoroetanol, alcoholes polihídricos como el propilenglicol, PEG 400, y 1 ,3-propanediol, y cetonas como la acetona, cetona etil metílica, y cetona isobutílica metílica. En una realización más preferida, el disolvente orgánico es metanol, etanol o acetona.

10 En una realización más preferida, el disolvente es agua.

En otra realización preferida, el pigmento tipo xanteno halogenado de fórmula general I son compuestos comercialmente, disponibles en disolución acuosa o en estado sólido. En una realización más preferida estos pigmentos se seleccionan de entre 15 eosina Y, floxina, eritrosina, y rosa bengal, o cualquiera de sus sales, y más preferiblemente el pigmento es eosina Y, o cualquiera de sus sales. Se entiende por cualquiera de sus sales las comercialmente disponibles, como por ejemplo la sal sódica de la eosina Y.

20 En otra realización preferida, el pH de la etapa b) se ajusta a un rango de entre 10 y 12, y más preferiblemente de entre 11 y 12.

En otra realización preferida, para la iluminación de la etapa c) se puede utilizar una fuente de luz visible como por ejemplo luz solar, o cualquier dispositivo que emita a 25 longitudes de onda de entre 400 y 700 nm. En una realización preferida se emplea una bombilla halógena de 12 V y 50 W de potencia.

En otra realización preferida, las aminas terciarias son drogas como opiáceos y/o sus derivados. En una realización más preferida, el método de la invención se emplea 30 para la detección y/o cuantificación de heroína.

En la presente invención se entiende por opiáceos tanto a los alcaloides naturales procedentes del opio, como la morfina, codeína y tebaína, entre otros; como a sus derivados semi-sintéticos como heroína y oxicodona, entre otros; y a los opioides 35 completamente sintéticos, tales como petidina y metadona, entre otros.

- En un segundo aspecto, la invención también se refiere a un kit o dispositivo para la detección y/o cuantificación de aminas terciarias que comprende los reactivos necesarios para llevar a cabo el método descrito anteriormente. Esto incluye, sin ningún tipo de limitación, la disolución reactiva que comprenda al menos un pigmento tipo xanteno halogenado de fórmula general I, tampones o soluciones reguladoras del pH en un rango de entre 8 y 13, una fuente de luz visible, entre otros. Por otro lado, este kit puede incluir todos los soportes y recipientes necesarios para su puesta en marcha y optimización.
- 5
- 10 En una realización preferida, el kit o dispositivo comprende un pigmento tipo xanteno halogenado de fórmula general I que se selecciona de entre eosina Y, floxina, eritrosina, y rosa bengal, o cualquiera de sus sales; y más preferiblemente eosina Y, o cualquiera de sus sales.
- 15 En otra realización preferida, el kit o dispositivo se emplea para la detección y/o cuantificación de drogas como opiáceos y/o sus derivados. En una realización más preferida, este kit o dispositivo se emplea para la detección y/o cuantificación de heroína.
- 20 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y
- 25 no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

**FIG. 1.** Ilustra como la fluorescencia inicial de un pigmento tipo-xanteno halogenado (eosina Y) cambia y crece y se desplaza hacia la izquierda durante 10 minutos de iluminación en presencia de una amina terciaria (trietanolamina) en concordancia con la presente invención.

30

**FIG. 2.** Ilustra como la intensidad de la fluorescencia (medida por el área de la curva) de una mezcla iluminada de eosina Y ( $10^{-6}$ M) y una amina terciaria (trietanolamina) alcanza el máximo valor tras 50 segundos de iluminación. La curva superior

35

corresponde a una relación amina/eosina Y de 5/1. La curva inferior corresponde a una relación amina/eosina Y de 1/1.

5 **FIG. 3.** Compara la intensidad de la fluorescencia dependiendo del pigmento ( $10^{-6}$  M) en presencia de una amina terciaria (trietanolamina  $5 \cdot 10^{-6}$ M).

**FIG. 4.** Compara la intensidad de la fluorescencia (eosina Y  $10^{-6}$ M) dependiendo de la amina ( $5 \cdot 10^{-6}$ M).

10 **FIG. 5.** Ilustra los efectos en la concentración de heroína sobre la fluorescencia de eosina Y ( $10^{-6}$ M) a 518 nm tras 10 minutos de iluminación con una bombilla halógena comercial de 12 V y 50 W de potencia de acuerdo con la presente invención.

### EJEMPLOS

15

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la efectividad del producto de la invención.

20

A menos que se indique lo contrario, los diferentes materiales, concentraciones, y similares especificados en este documento son solo ilustrativos y no deben interpretarse como limitantes del alcance de la invención.

#### Ejemplo 1. Calibrado de las aminas terciarias

25

El calibrado necesario antes de medir las muestras problema se lleva a cabo mediante la preparación de varias disoluciones con distintas concentraciones de amina cada una, a las cuales se les añade el colorante y el medio básico, y se miden según el procedimiento aquí expuesto, dando cada una su correspondiente señal.

30

La gráfica resultante de estas medidas se ajusta a la siguiente ecuación:

$$I_f = A(1 - 10^{-BC})$$

donde  $I_f$  es la variación de intensidad antes y después de iluminar la muestra a una longitud de onda determinada, y  $C$  es la concentración de amina terciaria que hay en la muestra.

35

La Figura 4 muestra las curvas de calibrado para diferentes aminas terciarias.

### Ejemplo 2. Preparación de las muestras

Se prepararon alícuotas de 1,0 ml que contenían muestras de amina terciaria con un intervalo de concentraciones desde 0 a 10 ppm. Cada alícuota fue añadida a una cubeta y a continuación se añadió 1,0 ml de eosina Y  $1 \mu\text{M}$  a un pH de 12. Para mezclar los reactivos, las cubetas fueron invertidas. En este punto se desairearon las muestras burbujeando nitrógeno o argón durante 10 minutos. A continuación, las muestras fueron iluminadas con una bombilla halógena comercial de 12 V y 50 W de potencia manteniendo una distancia de 10 cm entre la cubeta y la bombilla. La muestra fue entonces analizada mediante espectroscopia de fluorescencia.

Particularmente, la Figura 1 muestra las medidas de una disolución (2,5 mL) que contiene de eosina Y  $10^{-6}\text{M}$ ,  $10^{-3}\text{M}$  de NaOH y  $5 \cdot 10^{-5}\text{M}$  de trietanolamina. Tras eliminar el aire, se lleva la muestra al fluorímetro para obtener su espectro de fluorescencia. Después se ilumina 10 segundos con la lámpara de 50W de luz visible y se repiten las medidas cada 10 segundos obteniendo las distintas curvas que muestran cómo la eosina Y se va deshalogenando hasta fluoresceína.

Por otro lado, las curvas de la Figura 2 recogen el máximo de intensidad a cada tiempo para una disolución de eosina Y  $10^{-6}\text{M}$ ,  $10^{-3}\text{M}$  de NaOH y  $5 \cdot 10^{-5}\text{M}$  ó  $10^{-6}\text{M}$  de trietanolamina.

Estas mismas medidas se llevaron a cabo para los colorantes floxina, eritrosina, y rosa bengal a una concentración  $10^{-6}\text{M}$ ,  $10^{-3}\text{M}$  de NaOH y  $5 \cdot 10^{-5}\text{M}$ , en total un volumen de 2,5 mL. Las curvas resultantes se recogen en la Figura 3, lo que permite compararlos entre sí.

Específicamente, las muestras se colocaron en un espectrofluorímetro Hitachi F7000 FL en el intervalo 300-700 nm, con celdas de cuarzo de 1 cm de camino óptico termostatadas a  $25^\circ\text{C}$  y se realizaron las medidas de fluorescencia. La longitud de onda de excitación utilizada fue 495 nm y los espectros se registraron en el rango 450-650 nm.

### Ejemplo 3. Análisis de morfina-3-glucurónido en orina

35

Se probaron muestras que contenían morfina-3-glucurónido en orina. Para ello se añadieron 25  $\mu\text{L}$  de una disolución de morfina-3-glucurónido  $10^{-4}$  M en 2,5 mL de orina. Se añadió una pequeña cantidad de carbón activado y se filtró esta mezcla con un filtro Millipore MillexGP 0,22  $\mu\text{m}$ . La disolución resultante fue extraída con un cartucho Strata X-C 25  $\mu\text{m}$  Polymeric Strong Cation de Phenomenex. El cartucho cargado fue eluído con 9 mL de metanol (1% de amoniaco) y la disolución fue evaporada. Se añadieron 25  $\mu\text{L}$  de eosina Y ( $10^{-4}$  M), 25  $\mu\text{L}$  de NaOH ( $10^{-1}$  M) y 2,45 mL de agua al residuo resultante. La disolución obtenida fue desaireada, iluminada y la fluorescencia se midió siguiendo la metodología descrita en el Ejemplo 2.

10

#### Ejemplo 4. Análisis de morfina-3-glucurónido en saliva

Se probaron muestras de morfina-3-glucurónido contenidas en disoluciones de saliva. Para ello se añadieron a 2,45 mL de saliva, 125  $\mu\text{L}$  de una disolución de morfina-3-glucurónido  $10^{-4}$  M y esta mezcla se filtró con un filtro Millipore MillexGP 0.22  $\mu\text{m}$ . Se añadieron 25  $\mu\text{L}$  de eosina Y ( $10^{-4}$  M), 25  $\mu\text{L}$  de NaOH ( $10^{-1}$  M) a la disolución resultante, se desaireó, se iluminó y se midió la fluorescencia siguiendo la metodología descrita en el Ejemplo 2.

15

#### Ejemplo 5. Determinación de heroína.

Para llevar a cabo el calibrado inicial, se usaron disoluciones con las concentraciones que aparecen en la siguiente tabla y se siguió el procedimiento previamente descrito (1 $\mu\text{M}$  de eosina Y, pH 11, cantidad de amina correspondiente de cada muestra, 2,5 mL de agua. Las alícuotas se desairean burbujeando nitrógeno). Estas muestras se midieron en el fluorímetro antes y después de iluminar.

25

Tabla 1

[Heroína], M	$\Delta I_f$
0,0000002	188,64
0,0000004	283,54
0,0000006	355,65
0,0000008	383,46

0,000001	425,29
0,000002	475,97
0,000004	494,23

5 Esta tabla muestra los valores de variación de la intensidad de fluorescencia ( $\Delta I_f$ ) en función de la concentración de heroína, tomados a 518 nm. Esta variación corresponde a la diferencia de intensidades a 518 nm entre el valor de intensidad después de iluminar y antes de iluminar las disoluciones. La representación de estos valores corresponde a la gráfica correspondiente a la Figura 5.

10 Ajustando la curva a la ecuación de calibrado indicada en el Ejemplo 1 se obtienen los siguiente valores de A y B (Tabla 2), necesarios para poder introducir las medidas de muestras problemas y determinar su concentración.

Tabla 2

<b>A</b>	483,74854	$\pm 8,32331$
<b>B</b>	950471,42935	$\pm 49254,76452$

A continuación se miden las muestras problema de heroína con el método de la invención.

15 Además, se ha llevado a cabo una medida simultánea de las muestras a través de un método de análisis estándar y oficial para este tipo de muestras (espectrometría de masas) para comparar los resultados (Tabla 3).

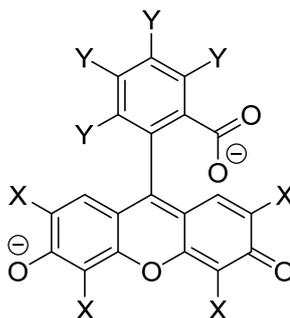
Tabla 3

<b>Muestra</b>	<b>Intensidad</b>	<b>Concentración (M)</b>	<b>Pureza %</b>	<b>Pureza masas %</b>
M1	367,2	$6,5 \cdot 10^{-7}$	14,9	$17,4 \pm 5$
M2	331,5	$5,3 \cdot 10^{-7}$	12,1	$15,8 \pm 5$

## REIVINDICACIONES

1. Un método para la detección y/o cuantificación fluorimétrica de aminas terciarias, caracterizado por que comprende las siguientes etapas:

- 5 a) preparación de una disolución reactiva que comprende poner en contacto la muestra a analizar con al menos un pigmento tipo xanteno halogenado de fórmula general I



10 donde X se selecciona de entre hidrógeno, flúor, cloro, bromo y yodo e Y se selecciona de entre H y Cl, o cualquiera de sus sales;

- b) ajustar el pH de la disolución de la etapa (a) entre 8 y 13;  
 c) desairar la disolución de la etapa (b) e iluminar con luz visible;  
 d) detectar y/o cuantificar la señal fluorescente producida.

15 2. Método según la reivindicación 1 donde se lleva a cabo la cuantificación de aminas terciarias mediante la curva de calibrado de acuerdo con la ecuación

$$I_f = A(1 - 10^{-BC})$$

20 donde  $I_f$  es la variación de intensidad antes y después de iluminar la muestra a una longitud de onda determinada, y C es la concentración de amina terciaria que hay en la muestra.

3. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde la muestra a analizar se selecciona de entre orina, sangre, suero, plasma sanguíneo, sudor, saliva, y cabello.

25

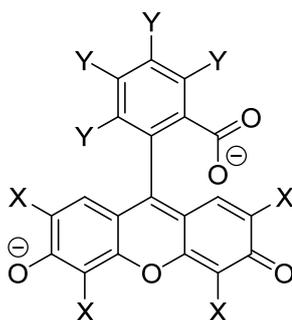
4. Método según la reivindicación 3 donde la muestra a analizar procede de orina o saliva.

5. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde la concentración de pigmento tipo xanteno halogenado de fórmula general I en la disolución de la etapa (a) es de  $10^{-7}$  M a  $10^{-2}$  M.
- 5 6. Método según la reivindicación 5 donde la concentración de pigmento de fórmula I en la disolución de la etapa (a) es de  $10^{-6}$  M.
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde el disolvente de la disolución de la etapa (a) es agua.
- 10 8. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que el pigmento tipo xanteno halogenado de fórmula general I se seleccionan de entre eosina Y, floxina, eritrosina, y rosa bengal.
- 15 9. Método según la reivindicación 8 en el que el pigmento tipo xanteno halogenado de fórmula general I es eosina Y.
10. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que el pH de la etapa b) se ajusta a un rango de entre 10 y 12.
- 20 11. Método según la reivindicación 10 en el que el pH se ajusta a un rango de entre 11 y 12.
12. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que para la iluminación de la etapa c) se utiliza una fuente de luz visible.
- 25 13. Método según la reivindicación 12 donde la fuente de luz visible se selecciona de entre luz solar y un dispositivo que emita a longitudes de onda de entre 400 y 700 nm.
- 30 14. Método según la reivindicación 13 donde el dispositivo es una bombilla halógena de 12 V y 50 W de potencia.
15. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde las aminas terciarias son drogas.
- 35 16. Método según la reivindicación 15 donde las drogas son opiáceos y/o sus derivados.

17. Método según la reivindicación 16 donde la droga es heroína.

5 18. Kit o dispositivo para la detección y/o cuantificación de aminas terciarias que comprende:

- a. Una disolución reactiva que comprenda al menos un pigmento tipo xanteno halogenado de fórmula general I



10

donde X se selecciona de entre hidrógeno, flúor, cloro, bromo y iodo e Y se selecciona de entre H y Cl, o cualquiera de sus sales;

- b. tampón o solución reguladora del pH a un rango de entre 8 y 13; y  
c. una fuente de luz visible.

15

19. Kit o dispositivo según la reivindicación 18 en el que el pigmento tipo xanteno halogenado de fórmula general I que se selecciona de entre eosina Y, floxina, eritrosina, y rosa bengal.

20 20. Kit o dispositivo según la reivindicación 19 en el que el pigmento tipo xanteno halogenado de fórmula general I es eosina Y.

21. Uso del kit o dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 20 para la detección y/o cuantificación de drogas.

25

22. Uso según la reivindicación 21 donde las drogas son opiáceos y/o sus derivados.

23. Uso según la reivindicación 22 donde la droga es heroína.

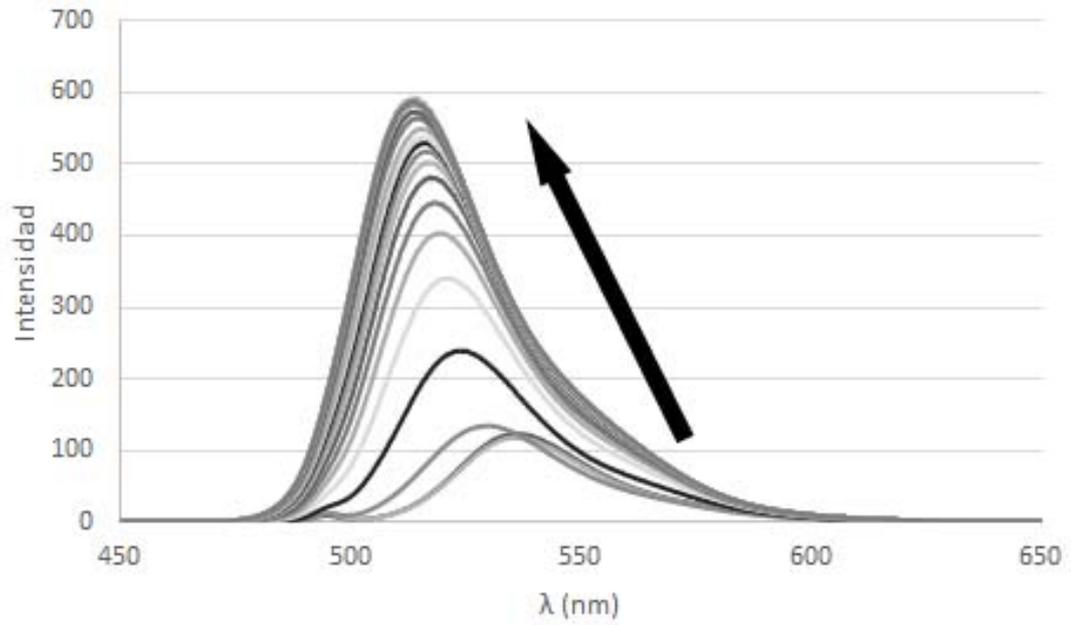


FIG. 1

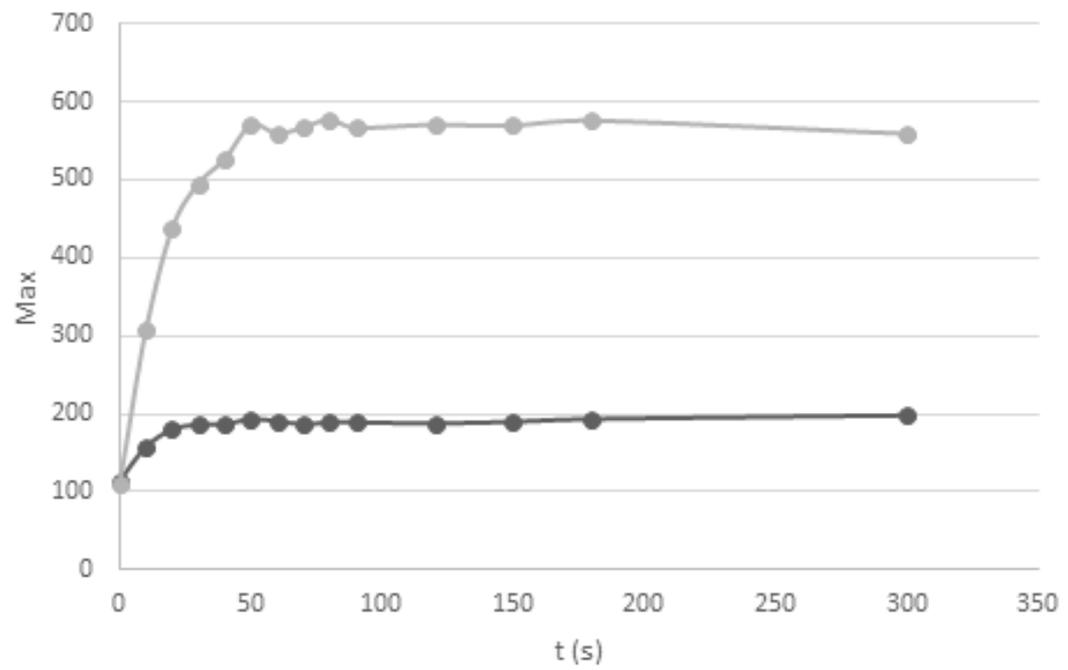
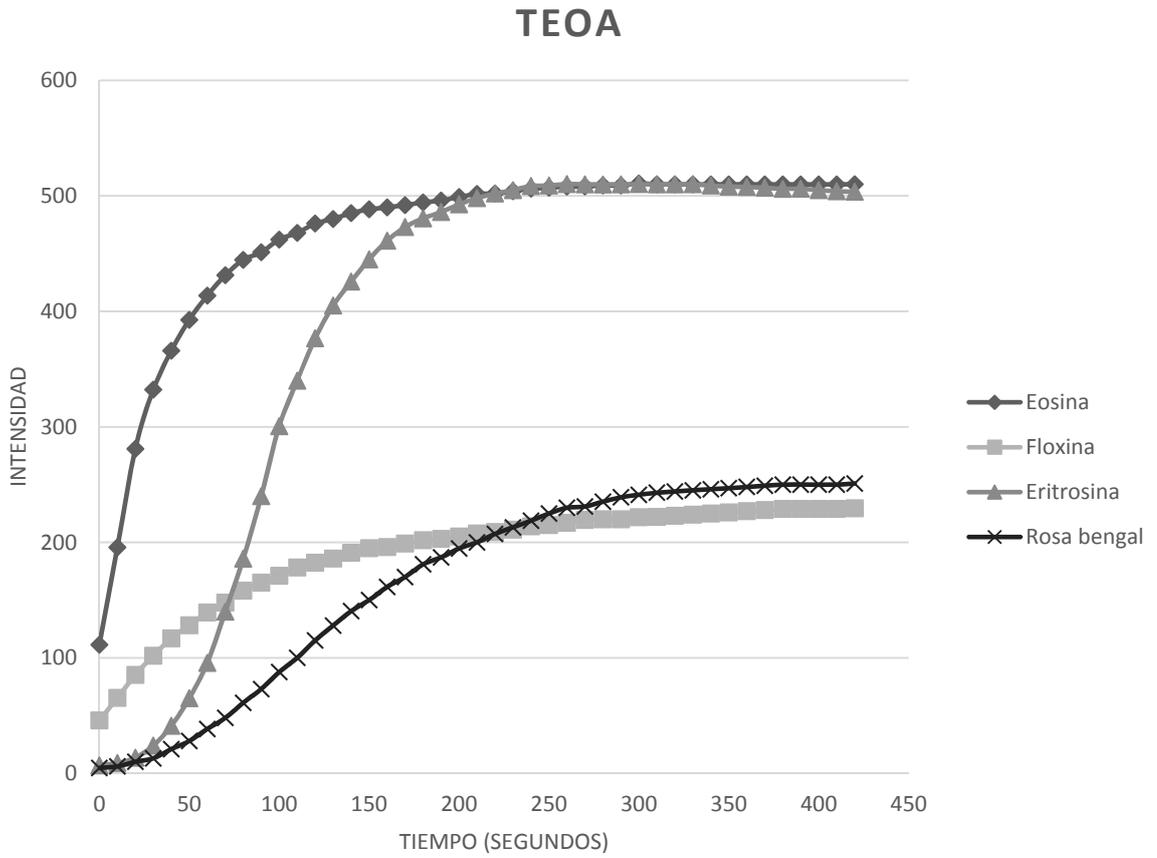
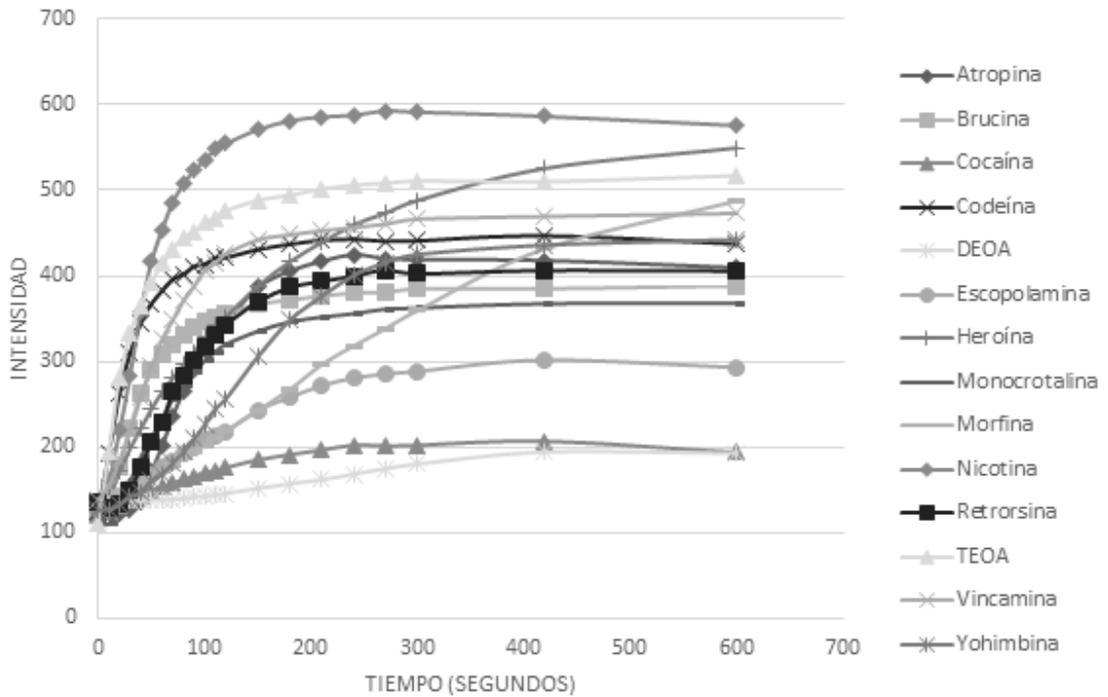


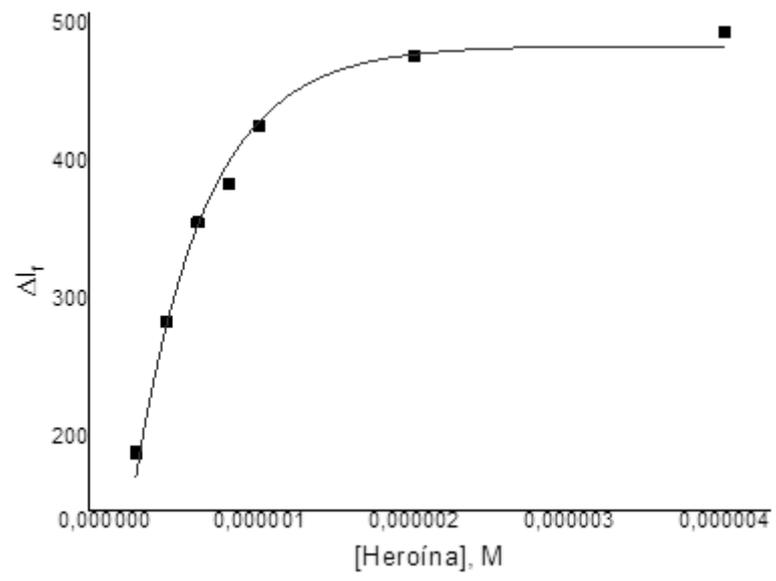
FIG. 2



**FIG. 3**  
**EOSINA Y**



**FIG. 4**



**FIG. 5**



21 N.º solicitud: 201630070

22 Fecha de presentación de la solicitud: 21.01.2016

32 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

51 Int. Cl.: **G01N33/50** (2006.01)  
**C07D311/84** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	56 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	OSTER, G. et al. "Extremely long-lived intermediates in photochemical reactions of dyes in non-viscous media". Journal of Physical Chemistry 1962, Vol. 66, N. 12, páginas 2514-2517. Ver resumen; introducción; Página 2515, columna 1, párrafo 2.	1-23
A	NOFFSINGER, J. B. et al. "Liquid chromatography of aliphatic trialkylamines with post-column chemiluminescent detection using tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(III)". Journal of Chromatography A, 1987, Vol. 387, Páginas 520-524. Ver resumen.	1-23
A	CATLIN, D. H. et al. "Urine testing: a comparison of five current methods for detecting morphine". American Journal of Clinical Pathology, 1973, Vol. 60, N. 5, páginas 719-728. Ver resumen; métodos.	1-23
A	MURILLO-PULGARIN, J. A. et al. "Simultaneous stopped-flow determination of morphine and naloxone by time-resolved chemiluminescence". Talanta, 2008, Vol. 74, páginas 1539-1546. Ver resumen; apartado 3.	1-23

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
16.09.2016

Examinador  
N. Martín Laso

Página  
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

G01N, C07D

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BD-TXT, NPL, XPESP, BIOSIS, CAS.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 16.09.2016

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-23	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-23	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	OSTER, G. et al. "Extremely long-lived intermediates in photochemical reactions of dyes in non-viscous media". Journal of Physical Chemistry 1962, Vol. 66, N. 12, páginas 2514–2517.	1962
D02	NOFFSINGER, J. B. et al. "Liquid chromatography of aliphatic trialkylamines with post-column chemiluminescent detection using tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(III)". Journal of Chromatography A, 1987, Vol. 387, páginas 520-524.	1987
D03	CATLIN, D. H. et al. "Urine testing: a comparison of five current methods for detecting morphine". American Journal of Clinical Pathology, 1973, Vol. 60, N. 5, páginas 719-728.	1973
D04	MURILLO-PULGARIN, J. A. et al. "Simultaneous stopped-flow determination of morphine and naloxone by time-resolved chemiluminescence". Talanta, 2008, Vol. 74, páginas 1539-1546.	02/10/2007

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

La solicitud se refiere a un método para la detección y/o cuantificación fluorimétrica de aminas terciarias que comprende el tratamiento de una muestra de aminas con un pigmento tipo xanteno halogenado de fórmula general I; a un kit o dispositivo que contiene una disolución reactiva del pigmento tipo xanteno y al uso de dicho kit para la detección y/o cuantificación de drogas.

El documento D01 divulga el proceso de deshalogenación de colorantes tipo xanteno halogenados (rosa bengal o eritrosina) con luz visible en presencia de aminas terciarias y la identificación de los intermedios producidos (trietanolamina) (resumen; introducción; página 2515, columna 1, párrafo 2).

Por otro lado, los documentos D02-D04 divulgan distintos métodos de detección/cuantificación de aminas terciarias, ninguno de ellos basados en el estudio fluorimétrico de muestras tratadas con xantenos halogenados como indicadores. Así el documento D02 divulga la detección de trialkilaminas alifáticas mediante estudio quimioluminiscente en columna cromatográfica de las aminas en presencia de rutenio-bipiridina (resumen). El documento D03 divulga la detección de morfina mediante diferentes métodos, radioinmunoensayo, inhibición de hemaglutinación y técnicas de ensayo de radicales libres (resumen; métodos). El documento D04 divulga un método de determinación de morfina y naloxano basado en la oxidación quimioluminiscente de dichos compuestos (resumen; apartado 3).

Aunque el documento D01, considerado el más cercano en el estado de la técnica, divulga el estudio espectrofotométrico de la deshalogenación de xantenos halogenados en presencia de aminas terciarias se considera que dicho documento no divulga ni dirigiría a un experto en la materia hacia un método fluorimétrico de detección/cuantificación de aminas terciarias presentes en muestras biológicas como el definido en la reivindicación 1 de la solicitud, basado en la medición de la fluorescencia de muestras que contienen aminas terciarias y que han sido tratadas con un xanteno halogenado a un determinado pH, seguido de comparación con la fluorescencia de determinadas muestras patrón.

Por lo tanto, la invención definida en las reivindicaciones 1-23 es nueva y posee actividad inventiva (Art. 6.1 y 8.1 LP 11/1986).