



tumor, aunque usualmente es benigno, es un tumor medular de la cápsula suprarrenal y generalmente muestra ser fatal si no es tratado. La rápida detección y eliminación de este tumor puede realizar una inversión completa, o al menos parcial, de cualquier cambio estructural temporal que pueda haber aparecido en el sistema circulatorio. Un sintoma cardinal del feocromocitoma es la hipertensión con todas sus manifestaciones asociadas. Sin embargo, la simple hipertensión es un estado común que aparece en la práctica médica diario. Se requiere usualmente un tratamiento continuado para reprimir apropiadamente la hipertensión. Dicho tratamiento de la hipertensión afectará solamente a los síntomas y no a la causa, si el paciente sufre de feocromocitoma. Por este, es importante que se efectue un diagnóstico temprano y exacto del feocromocitoma con el fin de que las personas afectadas de este estado puedan recibir una pronta terapia correctora.

Hasta ahora, la detección de feocromocitoma se efectuaba al menos por tres métodos convencionales. Un método de la técnica anterior empleaba agentes de bloqueo ganglionar para producir una elevación o disminución en la presión sanguínea. Dichos cambios en la presión sanguínea ayudaban al diagnóstico del feocromocitoma, pero este método era insatisfactorio ya que exponía al paciente a los riesgos físicos que acompañan a la elevación y disminución, inducidas por drogas, de la presión sanguínea. Otro método de la técnica anterior comprendía medios cuantitativos para estimar la secreción urinaria de catecolaminas (aminas hipertensoras), tales como epinefrina (adrenalina) y nor-epinefrina (nor-adrenalina) que aumentan en la presencia tumor-



res con secreción activa. Desafortunadamente, las minuscú-
las cantidades de epinefrina y nor-epinefrina presentes en
fluidos corporales, tales como orina y plasma, necesitaban
la utilización de ensayos biológicos complejos y muy tec-
5 nicos, o de técnicas fluorimétricas para su determinación.
Las catecolaminas son también inestables en la orina, y
su descomposición con el tiempo puede conducir a resulta-
dos de ensayo equívocos e inexactos. Otro medio de diagnos-
tico de la técnica anterior comprendía un ensayo clorimé-
10 trico para estimar el contenido en ácido vanilmandelico en
la orina. El ácido vanilmandelico está presente en cantida-
des detectables en la orina de pacientes afectados de feo-
cromocitoma. El ensayo de diagnostico del ácido vanilmande-
lico implica también poner en juego un alto grado de adies-
15 tramiento científico, procedimientos largos y tediosos y
la preparación y utilización de reactivos muy estables.'

Se efectuó un avance significativo en un ensayo
útil en el diagnostico del feocromocitoma. Las investigacio-
nes habian mostrado que existe un marcado aumento de meta-
20 bolitos de catecolomina tales como metanefrina y nor-metan-
nefrina, en fluidos corporales de personas con feocromoci-
toma. Dichos compuestos de amina fenolicos se producen por
el metabolismo de catecolaminas que fueron producidas ori-
ginalmente por la células de tumor de las glandulas supra-
25 rrenales. Estos metabolitos pueden estar presentes en la
forma hidroxilica (no conjugada) o en la forma de ester
(conjugada). Se descubrió que cuando una muestra de ensayo
de fluido corporal era puesta en contacto con un medio de
intercambio de iones capaz de adsorber metabolitos no con-
30 jugados de catecolamina, dichos metabolitos, si estaban en



la muestra, serian adsorbidos selectivamente por el medio de intercambio de iones. El medio de intercambio de iones era tratado entonces con agentes alcalinizantes débiles para eliminar sustancias contaminadoras y cualquier sustancia indeseable que pudiera interferir con el subsiguiente desarrollo de color. Esto mejoraba la concentración de metabolitos deseados en una zona del material de intercambio de iones y concentraba las sustancias contaminadoras en zonas diferentes del material de intercambio de iones. El medio de intercambio de iones era tratado entonces con un revelador de color que realizaba una formación de color visible en la presencia de metabolitos no conjugados de catecolamina adsorbidos. La formación de un color discernible indicaba un ensayo positivo para estos metabolitos no conjugados de catecolamina, y si estos estaban presentes en cantidades suficientes se efectuaba un ensayo claramente positivo del feocromocitoma. La sensibilidad de este ensayo era tal que la intensidad de color producida por el revelador de color podia ser correlacionada en con la concentración de metabolitos no conjugados de catecolamina presentes. Una comparación de color producido con colores obtenidos de muestras que contenian cantidades conocidas de metabolitos no conjugados de catecolamina hacia posible efectuar con rapidez y exactitud una determinación cuantitativa. Este ensayo no requiere personal muy adiestrado para realizarlo.

Incluso aunque el ensayo antes descrito constituía un avance significativo en la técnica, se reconoció que la sensibilidad, especialmente con bajos niveles de metabolitos no conjugados de catecolamina, podia ser objeto de algu-



na mejora. Se encontró entonces que si se utilizaba un material fuertemente básico, tal como hidroxido de sodio, como agente alcalinizante en el procedimiento antes descrito, aumentaba la sensibilidad del ensayo de manera que era posible detectar un valor mínimo de aproximadamente 1 microgramo de metabolitos no conjugados de catecolamina por ml de fluido corporal, en lugar de un valor mínimo de aproximadamente 2 microgramos por ml, detectable cuando se utilizan agentes alcalinizantes débiles. Sin embargo, estudios clínicos recientes han mostrado la necesidad de un ensayo todavía más sensible para detectar el feocromocitoma.

La presente forma del ensayo, que utiliza agentes alcalinizantes fuertes, emplea una gota de fluido corporal tal como orina. Se sugirió utilizar una mayor cantidad de fluido corporal en el ensayo proporcionando de esta manera una mayor cantidad de metabolitos no conjugados de catecolamina a detectar. Por ejemplo la cantidad de fluido corporal en ensayo podría ser aumentada hasta 10 gotas y la cantidad resultante de metabolitos no conjugados de catecolamina determinada por el ensayo sería dividida por 10 para poner los resultados cuantitativos indicados por el desarrollo de color sobre la misma base que el precedente ensayo que utiliza sólo una gota. Cuando se ensayó intento esto, sin embargo, la sensibilidad total del ensayo disminuyó en la realidad. Cuando se utilizaron mayores cantidades de fluido corporal, no solamente aumentaban las cantidades de metabolitos no conjugados de catecolamina disponibles para el ensayo sino que aumentaban también las cantidades de sustancias que intererian. Sales, tales como cloruro de sodio, presentes en el fluido corporal pueden disminuir la sensi-



bilidad de este procedimiento de ensayo.

Por lo tanto, un objeto del presente invento es el de crear un pocedimiento para detectar metabolitos no conjugados de catecolamina en fluidos corporales en los que el procedimiento tiene una mejorada sensibilidad.

Un nuevo objeto del presente invento es el de crear un procedimiento para detectar metabolitos no conjue gados de catecolamina en el que se hace mínima la interfe- rencia de la sal.

Es otro objeto del presente invento crear un pro- cedimiento mejorado de intercambio de iones útil en el diag- nostico del feocromocitoma.

De acuerdo con el presente invento, se crea un procedimiento para la detección de metabolitos no conjuga- dos de catecolamina en flúidos que contienen sal, que com- prende las operaciones de poner en contacto al flúido a en- sayar con un primer medio de intercambio de iones capaz de adsorber selectivamente los metabolitos no conjugados de ca- tecolamina sin adsorber una cantidad apreciable de la sal; separar el flúido que contiene sal que está exento de meta- bolitos no conjugados de catecolamina del primer medio de intercambio de iones; tratar dicho primer medio de intercam- bio de iones con un material alcalinizante fuerte para eluir los metabolitos no conjugados de catecolamina del primer medio de intercambio de iones y para formar un eluato alcalino de metabolito no conjugado de catecolamina; poner en contacto dicho eluato con un segundo medio de intercambio de iones capaz de adsorber los metabolitos no conjugados de catecolamina; y añadir a dicho segundo mediode intercam- bio de iones un revelador de color que realiza una formación

26011



de color visible en la presencia de metabolitos no conjugados de catecolamina adsorbidos.

5 Se puede emplear cualquier material apropiado de intercambio de iones como primer medio de intercambio de iones en el procedimiento de este invento siempre que sea capaz de retener los metabolitos no conjugados de catecolamina deseados para utilización futura o ulterior, sin re-
10 tener ninguna cantidad apreciable de sales. Cuando se han de detectar metanefrina y/o nor-metanefrina no conjugadas cationicas, se prefieren intercambiadores de cationes. Los intercambiadores de cationes mas útiles son las resinas de ácido fosfónico y la celulosa modificada con fosfato, moderadamente ácidas y las resinas, fuertemente ácidas, tales como resinas de ácido sulfónico y celulosa modificada con sulfonato. Los materiales de intercambio de cationes se
15 utilizan también preferiblemente en la forma ácida (de hidrógeno) en lugar de la forma de sal (de sodio). Se prefieren los intercambiadores de cationes fuertemente ácidos.

Los primeros medios de intercambio de iones se
20 pueden utilizar en forma granular, apilados en una columna. El fluido a ensayar es dejado entonces circular hacia abajo a través de la columna. Cualquier cantidad de metabolitos no conjugados de catecolamina en el fluido de ensayo es adsorbida por el material de intercambio de iones. El efluen-
25 te de la columna, que contiene sal, es entonces desechados. El material de intercambio de iones se emplea preferiblemente en la forma de papel de intercambio de iones. Dicho papel puede ser preparado directamente a partir de materiales de intercambio de iones, tales como celulosa que contiene
30 puntos reactivos para intercambio de iones. Alternativamente, puede ser preparado impregnando un material de intercam-



bio de iones con pasta de papel antes de la formación de
papel a partir de dicha parte. Una manera conveniente de
utilizar el papel de intercambio de iones es el de adherir
una pequeña hoja de papel de intercambio de iones transver-
5 salmente por completo a la abertura en un extremo de un tu-
bo de vidrio u organoplastico. Entonces el tubo es coloca-
do en una dirección generalmente vertical con el papel en
el fondo o parte inferior. El flúido a ensayar es introdu-
cido entonces en el tubo y es puesto en contacto con el pa-
10 pel de intercambio de iones. Cualquier cantidad de metabo-
litos no conjugados de catecolamina en el flúido de ensayo
es adsorbida por el papel de intercambio de iones mientras
que el efluente que contiene sal es desechado. El papel de
intercambio de iones podría también ser empleado sumergien-
15 dolo en el flúido de ensayo y dejando pasar al flúido den-
tro del papel por absorción y acción capilar. De esta mane-
ra, los metabolitos no conjugados de catecolamina podrían
ser separados selectivamente del resto del fluido de ensa-
yo que contiene sal.

20 El primer medio de intercambio de iones es enton-
ces aclarado o enjuagado con agua y el efluente del enjua-
gado es desechado juntamente con el resto del fluido de en-
sayo que contiene sal.

Los metabolitos no conjugados de catecolamina ad-
25 sorbidos son eluidos entonces desde el primer intercambia-
dor de iones por medio de un material alcalinizante fuerte.
Los materiales alcalinizantes fuerte útiles en el presente
invento están ilustrados por hidróxidos de metal alcalino
e hidróxidos de metal alcalino térreo, tales como hidróxido
30 de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de bario, hidróxi-



do de litio y similares. Dichos materiales alcalinizantes fuertes se utilizan preferiblemente en la forma de soluciones acuosas que tienen un valor de pH mayor de aproximadamente 12,0 y una concentración que puede variar dependiendo del material alcalinizante fuerte específico empleado. Se utiliza preferiblemente el hidróxido de sodio en concentraciones desde aproximadamente 1,0 N a aproximadamente 2,0 N, mientras que el hidróxido de bario se utiliza preferiblemente aproximadamente 0,2 N. La elución antes descrita se lleva a cabo convenientemente haciendo pasar una solución acuosa del material alcalinizante fuerte a través del intercambiador de iones. El eluato alcalino de metabolito no conjugado de catecolamina es puesto en contacto entonces con un segundo medio de intercambio de iones.

En el procedimiento de este invento se puede emplear cualquier material apropiado de intercambio de iones como segundo medio de intercambio de iones, siempre que sea capaz de retener los metabolitos no conjugados de catecolamina deseados para el tratamiento subsiguiente con un revelador de color para producir un cambio de color positivo deseado. Cuando se han de detectar metanefrina y/o nor-metanefrina no conjugadas catiónicas, se prefieren intercambiadores de cationes. Intercambiadores de cationes ilustrativos son las resinas de ácidos carboxílicos debilmente ácidas, la carboximetil celulosa debilmente ácida, las resinas de ácido fosfónico moderadamente ácidas, la celulosa modificada con fosfato moderadamente ácida las resinas de ácido sulfónico y la celulosa modificada con sulfonato fuertemente ácidas, Los intercambiadores de cationes mas útiles son de los tipos debilmente ácidos y moderadamente ácidos. Los mate-



riales de intercambio de cationes se utilizan también preferiblemente en la forma de sal (de sodio o de amonio) en lugar de en la forma de ácido (de hidrógeno). Se prefieren los intercambiadores de cationes moderadamente ácidos.

5
10
15
20
25
30

El segundo medio de intercambio de iones puede estar en las formas granular o de papel antes descritas para el primer medio de intercambio de iones. Preferiblemente, el segundo medio de intercambio de iones es un papel de intercambio de iones y puede ser utilizado de diversas maneras. Un anillo de barrera producido a partir de cera, parafina u otro material hidrofóbico, puede ser formado sobre la superficie de una hoja de papel de intercambio de iones pero no se debe extender a través del papel. Este anillo de barrera superficial tiene preferiblemente un diámetro interno generalmente de aproximadamente 3 a 13 mm y se emplea para evitar que gotas de líquido colocadas sobre el papel dentro de este anillo circulen a lo largo de la superficie del papel. En esta forma del ensayo, se colocan sucesivamente dentro del anillo de barrera gotas de eluato del primer medio de intercambio de iones y de revelador de color. Estas gotas son absorbidas entonces por el papel y los líquidos se introducen en el papel y después radialmente hacia afuera a través del papel más allá del anillo de barrera. Cuando los metabolitos no conjugados de catecolamina están presentes en cantidades detectables, aparecerá un anillo coloreado visible sobre el papel. Este anillo coloreado será generalmente concéntrico con el anillo de barrera y de mayor diámetro que él. La cantidad de metabolitos no conjugados de catecolamina en la muestra de ensayo puede ser determinada comparando la intensidad del anillo coloreado

26 D!



do con colores normalizados obtenidos de muestras que contienen cantidades conocidas de metabolitos no conjugados de catecolamina.

5 Cuando el primer medio de intercambio de iones soportado o sujeto en el extremo de un tubo, tal como se describe anteriormente, y este tubo es puesto en contacto con el segundo medio de intercambio de iones antes de la elución de los metabolitos no conjugados de catecolamina adsorbidos con material alcalizante fuerte, se puede eliminar el anillo de barrera superficial. El contacto de la superficie del disco de papel en la salida del tubo con la superficie del segundo medio de intercambio de iones en forma de papel al fluido circular a lo largo de la superficie del segundo papel de intercambio de iones y de esta
10 manera logra el mismo efecto que el anillo de barrera, Entonces el revelador de color puede ser hecho pasar, mediante el primer medio de intercambio de iones, dentro del segundo medio de intercambio de iones para producir el color de ensayo deseado.

15 Como revelador de color son apropiadas soluciones acuosas de diversas sales. Reveladores de color ilustrativos son tetrafluoroborato de para-nitrobenceno-diazonio; para-toluenosulfonato de para-nitrobenceno-diazonio; ácido para-diazobenceno sulfónico; N, 2, 6-tricloro-p-benzoquina-4-imina; fluoroborato de 4-diazo-2-metil-N-etil anilina; fluoroborato de 4-diazo-N,N-dietyl anilina; 4-diazol-N-etil-N-(benta-hidroxietyl) anilina y similares. El revelador de color preferido es tetrafluoroborato de para-nitrobenceno-diazonio. En lugar de añadir el revelador de color al
20 papel de intercambio de iones, tal como se describe anterior-
25
30



mente, un procedimiento alternativo implica pulverizar sobre el papel una mezcla por ejemplo de para-nitroanilina diazotada y carbonato de potasio.

5 El procedimiento del presente invento hace posible utilizar mayores cantidades de fluidos de ensayo que contienen sal, comparado con los procedimientos de la técnica anterior, para detectar concentraciones relativamente menores de metabolitos no conjugados de catecolamina en este fluido de ensayo. Hace posible alcanzar dicha sensibilidad mejorada por el hecho de que elimina los contaminantes de sal indeseables desde la etapa de revelado de color del procedimiento.

10 El invento será descrito más aún en los siguientes ejemplos:

Ejemplo 1.- Varios cilindros formados por tubos de polietileno de 20 mm de largom y 9 mm de diámetro exterior estaban todos ellos cerrados herméticamente por un extremo con un disco de 10 mm de diámetro de papel de filtro Whatman número 1. Se utilizó un lubricante de organosiloxano como adhesivo para fijar el papel de filtro al tubo de polietileno. Entonces los cilindros fueron colocados verticalmente sobre almohadillas absorbentes de celulosa en con los discos de papel de filtro en los fondos o partes inferiores de los cilindros. Una resina de intercambio de cationes fuertemente ácida que contenía grupos de ácido sulfónico en la forma de sal de sodio, fué colocada en cada uno de los cilindros hasta una profundidad de 2 mm. Esta resina es vencida con el nombre registrado de Rexyn CG 50, por Fisher Scientific Company. Se prepararon varias soluciones acuosas de matefrina. Una solución contenía 0,5 microgramos de matefrina por ml. Una segunda solución contenía 0,5 microgramos de



metanefrina por ml más 10 mg de cloruro de sodio por ml. Una tercera solución contenía 5 microgramos de metanefrina por ml, y una cuarta solución contenía 5 microgramos de metanefrina po ml más 10 mg de cloruro de áodio por ml.

5 Una hoja de papel de intercambio de cationes mo-
deradamente acida de fosfato de celulosa en la forma de
sal de sodio (de aproximadamente 38 mm de lado fue coloca-
da sobre la parte superior de una mesa. Este papel es ven-
dido en la forma de sal de amonio bajo el nombre registra-
do de "Whatman Cellulose Phosphate P 81" por H. Reeve Angel
10 and Company y fué convertido en la forma de sal de sodio
para ser utilizado en este ejemplo. Una hoja de papel ence-
rado fué colocado entonces en la parte superior de la hoja
de fosfato de celulosa. El extremo recubierto con plastico
de un tubo metálico de aproximadamente 13 mm de diámetro
15 exterior fué apretado contra la superficie superior de pa-
pel encerado y fué hecho girar para formar un anillo de
cera de aproximadamente 13 mm de diámetro exterior y apro-
ximadamente 0,8 mm de anchura sobre la superficie superior
de la hoja de fosfato de celulosa. Se repitió este procedi-
miento para preparar varias hojas de papel de fosfato de
20 celulosa que tenían todas ellas un único anillo de cera so-
bre su superficie. Se introdujeron 10 gotas de la primera
solución antes descrita en el tubo de polietileno y a tra-
ves de la resina de intercambio de cationes fuertemente a-
cida. El fluido procedente del material de intercambio de
25 iones paso a la almohadilla absorbente. Cinco gotas de agua
de ejuagado fueron hechas pasar entonces a través del mate-
rial de intercambio de iones y dentro de la almohadilla
30 absorbente.



Entonces la almohadilla fué desechea y el tubo que contenía el intercambio de iones fué colocado sobre una hoja de papel de intercambio de iones de fosfato de celulosa dentro del anillo de barrera de cera superficial. Dos gotas de solución de celulosa dentro del anillo de barrera de cera superficial. Solución acuosa 1,0N de hidroxido de sodio fueron introducidas entonces en el tubo a través del material de intercambio de iones contenido y dentro del papel de intercambio de iones. Se desecharon entonces el tubo y el material de intercambio de iones contenido. Se añadió entonces una gota de solución acuosa al 0,03% en peso de tetrafluoroborato de para-nitrobenzenodiazonio al papel de fosfato de celulosa en el centro del anillo superficial de cera. Apareció pronto un delgado anillo de color purpura que tenía un diámetro mayor que el anillo de cera. Se repitió el mismo procedimiento con un nuevo cilindro y una nueva hoja de papel de intercambio de iones utilizando 10 gotas de segunda solución antes descrita. Esto se repitió también separadamente con nuevos cilindros y hojas de papel de intercambio de iones utilizando separadamente una gota de la tercera solución antes descrita y una gota de la cuarta solución antes descrita.

Se cambió entonces el procedimiento para reproducir el procedimiento de la técnica anterior. Una gota de la primera solución antes descrita fué colocada sobre una hoja de papel de intercambio de iones de fosfato de celulosa dentro del anillo superficial, de cera. Esto fué seguido sucesivamente por una gota de agua, una gota de hidroxido de sodio acuoso 1,0 N y una gota de tetrafluoroborato



de para-nitrobenzenodiazonio acuoso al 0,03% en peso. Se repitió este procedimiento de la técnica anterior con nuevas hojas de papel de intercambio de iones utilizando separadamente una gota de la segunda solución antes descrita, una gota de la tercera solución antes descrita y una gota de la cuarta solución antes descrita. Los colores revelados fueron comparados con colores normalizados previamente preparados empleando muestras de una gota que tienen niveles de metanefrina de 0,2 5 y 10 microgramos por ml. Los resultados de ensayo se muestran seguidamente.

TABLA I

Ensayo núm.	Solución	Microgramos de Metanefrina por ml.	Mg de NaCl, por ml.	Volumen de muestra, gota.	Se utilizó cilindro de intercambio de iones	Análisis micrigramos por ml.
1	1	0,5	0	10	Si	0,5
2	2	0,5	10	10	Si	0,5
3	3	5	0	1	Si	5
4	4	5	10	1	Si	5
5	1	0,5	0	1	No	0
6	2	0,5	10	1	No	0
7	3	5	0	1	No	5
8	4	5	10	1	No	2

Se puede observar fácilmente a partir de los datos anteriores que el procedimiento de intercambio de iones de dos etapas del presente invento hace posible detectar con exactitud metabolitos no conjugados de catecolamina en concentraciones tan pequeñas como 0,5 microgramos por ml. En los dos primeros ensayos antes descritos, el total de meta-



nefrina detectada para muestras de 10 gotas era equivalente en el color revelado a 5 microgramos por ml para una muestra de una única gota. La concentración que se ha detectado es de esta manera equivalente a $5/10 = 0,5$ microgramos por ml. Los datos de los dos primeros ensayos muestran también que concentraciones de sal de aproximadamente 10 ml por ml no interfieren con la exactitud del procedimiento de intercambio de iones de dos etapas. El tercero y el cuarto ensayo antes descritos indican que el procedimiento de intercambio de iones de dos etapas es también exacto para volúmenes de muestra relativamente pequeños, cuando aumenta la concentración de la muestra. Los ensayos 5 y 6 indican que una muestra de una única gota no es detectada con exactitud en el procedimiento de la técnica anterior en concentraciones de metanefrina tan pequeñas como 0,5 microgramos por ml. Los ensayos 7 y 8 indican que el procedimiento de la técnica anterior es susceptible de error con mayores concentraciones de metanefrina cuando está presente la sal. El ensayo 7 dió un análisis exacto pero el ensayo 8 que empleaba sal en la muestra tenía un valor de análisis reducido incorrecto. El presente procedimiento del invento posibilita de esta manera que la sensibilidad del análisis sea aumentada y sea mantenida con exactitud en presencia de interferencia de sal.

Ejemplo 2.— Se repitieron los ensayos del ejemplo 1 empleando orina que no contenía cantidades detectables de metabolitos no conjugados de catecolamina en lugar de agua, en las muestras de ensayo. Los resultados de análisis eran los mismos que en el Ejemplo 1. No se añadió cloruro de sodio a estas muestras de orina ya que la orina ya con-



tenía sal.

Ejemplo 3.- se prepararon columnas de intercambio de iones similares a las descritas en el Ejemplo 1 utilizando otros materiales de resina de intercambio de cationes. Se prepararon columnas separadas a partir de una resina de intercambio de cationes moderadamente ácida que contenía grupos de ácido fosfónico, vendida bajo el nombre registrado de "Bio Rex 63", y resinas de intercambio de cationes fuertemente ácidas que contenían grupos de ácido sulfónico, vendidas bajo los nombres registrados de "AG 50 W-X2", "AG 50 W - X3" y "AG 50 W X16". Todas estas resinas son vendidas por Bio-Rad Laboratories. En todos los casos, se emplearon muestras de 10 gotas de una solución acuosa que contenía 0,5 microgramos de metanefrina por ml. Algunas de las muestras de ensayo contenían también 10 mg por ml de cloruro de sodio. En todos los casos, los colores revelados eran equivalentes a una concentración de 5 microgramos por ml de metanefrina para una muestra de una única gota. El ensayo de 10 gotas que empleaba un procedimiento de intercambio de iones de dos etapas, detectó de esta manera con exactitud la concentración de 0,5 microgramos por ml de metanefrina incluso en la presencia de sal.

Ejemplo 4.- Se repitieron los ensayos del ejemplo 3 empleando orina que no contenía cantidades detectables de metabolitos no conjugados de catecolamina, en lugar de agua, en las muestras de ensayo. Los resultados de análisis eran los mismos que en el Ejemplo 3. No se añadió cloruro de sodio a estas muestras de orina ya que la orina contenía ya sal.

Ejemplo 5.- Varios cilindros formados por tubo de



5 polietileno de 20 mm de largo y 9 mm de diámetro exterior fueron cerrados cada uno por calor en un extremo con un disco de 10 mm de diámetro de papel de intercambio de iones que contenía una resina de intercambio de cationes fuertemente ácida, que tenía grupos de ácido sulfónico en la forma ácida. Este papel es vendido bajo el nombre registrado de "Amberlite SA-2" por H. Reeve Angel and Company. Cuatro soluciones acuosas fueron preparadas tal como se describe en el Ejemplo 1. Se prepararon también hojas de papel de intercambio de iones de fosfato de celulosa que tenían anillos superficiales de cera, tal como se describe en el Ejemplo 1. Las diversas soluciones de ensayo fueron utilizadas entonces tal como se describe en el Ejemplo 1. Los resultados de ensayo están mostrados seguidamente.

15

Tabla 2

Ensayo número	Solución	Microgramos de metanefrina por ml	Mg de NaCl por ml	Volúmen de la muestra gotas	Se utilizó el cilindro de intercambio de iones	Análisis microgramos por ml
20						
9	1	0,5	0	10	Si	0,5
10	2	0,5	10	10	Si	0,5
11	3	5	0	1	Si	5
12	4	5	10	1	Si	5
13	1	0,5	0	2	No	0
14	2	0,5	10	2	No	0
15	3	5	0	1	No	5
16	4	5	10	1	No	2

30

Se puede observar fácilmente a partir de los datos



anteriores que el procedimiento de intercambio de iones de dos etapas del presente invento que emplea papel de intercambio de iones en cada etapa posibilita detectar con exactitud la metanefrina en concentraciones tan pequeñas como 0,5 microgramos por ml, incluso en la presencia de sales que interfieren. En los ensayos anteriores 9 y 10 el color revelado para muestras de 10 gotas era equivalente al revelado para una concentración de metanefrina de 5 microgramos por ml para una muestra de una única gota. La concentración que se ha detectado es equivalente por lo tanto a $5/10 = 0,5$ microgramos por ml.

Ejemplo 6 .- Se repitieron los ensayos del ejemplo 5 empleando orina que no contenía cantidades detectables de metabolitos no conjugados de catecolamina en lugar de agua en las muestras de ensayo. Los resultados de análisis eran los mismos que en el Ejemplo 5. No se añadió cloruro de sodio a estas muestras de orina ya que la orina ya contenía sal.

Ejemplo 7.- Se preparó un cilindro de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 5, Diez gotas de una orina que contenía 0,5 microgramos por ml de metanefrina fueron introducidas en el papel de intercambio de iones seguido por 10 gotas de agua de enjuagado. El cilindro fue puesto entonces en contacto con una hoja de papel de intercambio de iones de fosfato de celulosa en la forma de sal de amonio. No había anillo de barrera superficial sobre este papel. Entonces se introdujeron sucesivamente dos gotas de hidróxido de sodio acuoso 1,0 N y dos gotas de tetrafluoroborato de para-nitrobencenodiazonio acuoso al 0,03% en peso, a través del cilindro y dentro del papel de fosfato de celu-



26014

5 losa. Se reveló un anillo de color púrpura que tenía el color indicativo de una concentración de 5 microgramos por ml de metanefrina (muestra de una única gota). Esto significa que la muestra de 10 gotas contenía $5/10 = 0,5$ microgramos por ml de metanefrina y era una análisis exacto.

10 En los anteriores ejemplos, los colores revelados con muestras de 10 gotas fueron comparados con colores normalizados preparados originalmente a partir de muestras de una única gota. Las determinaciones de color cuantitativas resultantes hubieron de ser divididas por 10 con el fin de ponerlas en un estado comparable con los resultados anteriores. Se sobreentiende, sin embargo, que se pueden utilizar también colores normalizados preparados a partir de muestras de 10 gotas. En este caso los resultados de análisis, obtenidos comparando los colores revelados de muestras no conocidas de 10 gotas con las normas de color de 15 10 gotas, no necesitan ser devididos por 10 para obtener los valores de análisis apropiados.

20 En los anteriores ejemplos el metabolito no conjugado de catecolamina que se detectaba era metanefrina. La experiencia ha mostrado, sin embargo, que se obtienen resultados identicos cuando el metabolito no conjugado de catecolamina es nor-metanefrina.

25 En resumen, este invento se refiere a un procedimiento de intercambio de iones mejorado para detectar y medir metabolitos no conjugados de catecolamina en fluidos que contienen sal, tales como orina. El procedimiento general comprende poner en contacto al fluido con un primer medio de intercambio de iones separar selectivamente los 30 metabolitos no conjugados de catecolamina del fluido que



5 contiene sal que es entonces desechado; eluir los metabolitos adsorbidos con un material alcalinizante fuerte; poner en contacto el eluato con un segundo medio de intercambio de iones para adsorber los metabolitos y añadir entonces al segundo medio de intercambio de iones un revelador de color para revelar un color indicativo de la cantidad de metabolitos adsorbidos. Este procedimiento hace posible mejorar la sensibilidad global para determinar los metabolitos de manera que se detecte metenefrina, proejemplo, en 10 cantidades tan pequeñas como 0,5 microgramos por ml.

15 Esta solicitud que corresponde a la presentada en los Estados Unidos de América el 27 de diciembre de 1.965 con el número 516.748, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente estatuto sobre Propiedad Industrial.

20 N O T A

Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España, por VEINTE años son los siguientes:

25 1.- Un procedimiento para la detección de metabolitos no conjugados de catecolamina en fluidos que contienen sal, que comprende las operaciones de poner en contacto el fluido a ensayar con un primer medio de intercambio de iones capaz de adsorber selectivamente los metabolitos no conjugados de catecolamina sin adsorber una cantidad apreciable de la sal; separar el fluido que contiene sal el 30



5 cual está exento de metabolitos no conjugados de catecolamina del primer medio de intercambio de iones; tratar dicho primer medio de intercambio de iones con un material alcalinizante fuerte para eluir los metabolitos no conjugados de catecolamina desde el primer medio de intercambio de iones y para formar un eluato alcalino de metabolito no conjugado de catecolamina; poner en contacto dicho eluato con un segundomedio de intercambio de iones capaz de adsorber los metabolitos no conjugados de catecolamina; y añadir a 10 dicho segundo medio de intercambio de iones un revelador de color que efectúa una formación de color visible en la presencia de metabolitos no conjugados de catecolamina adsorbidos.

15 2.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en que el primer medio de intercambio de iones es un intercambiador de cationes moderadamente ácido o un intercambiador de cationes fuertemente ácido, el segundo medio de intercambio de iones es un intercambiador de cationes moderadamente ácido o un intercambiador de cationes 202 debilmente ácido, y los metabolitos no conjugados de catecolamina están seleccionados de la clase que consiste en metanefrina y nor-metanefrina.

25 3.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 en que el material alcalinizante fuerte, empleado para eluir los metabolitos no conjugados de catecolamina adsorbidos desde el primer medio de intercambio de iones, es hidróxido de sodio.

30 4.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 en que el primer medio de intercambio de iones es un intercambiador de cationes fuertemente ácido, el se-



gundo medio de intercambio de iones es un intercambiador de cationes moderadamente ácido y los metabolitos no conjugados de catecolamina están seleccionados de la clase que consiste en metanefrina y nor-metanefrina.

5 5.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 para la detección de metabolitos no conjugados de catecolamina catiónicos, seleccionados de la clase que consiste en metanefrina y nor-metanefrina, en flúidos que contienen sal, que comprende las operaciones sucesivas de (1)

10 poner en contacto al fluido a ensayar con un papel intercambiador de cationes fuertemente ácido en la forma ácida capaz de adsorber selectivamente los metabolitos no conjugados de catecolamina sin adsorber una cantidad apreciable de la sal; (2) separar el flúido que contiene sal que está

15 exento de metabolitos no conjugados de catecolamina del intercambiador de cationes fuertemente ácido; (3) tratar dicho intercambiador de cationes fuertemente ácido con una solución acuosa de hidróxido de sodio que tiene una concentración desde aproximadamente 1,0 N a aproximadamente 2,0

20 N para eluir los metabolitos no conjugados de catecolamina desde el intercambiador de cationes fuertemente ácido y para formar un eluato alcalino de metabolito no conjugado de catecolamina; (4) poner en contacto dicho eluato con un papel intercambiador de cationes moderadamente ácido en la

25 forma de sal capaz de adsorber los metabolitos no conjugados de catecolamina y (5) añadir a dicho papel intercambiador de cationes moderadamente ácido un revelador de color de tetrafluoroborato de para-nitrobenceno-diazonio que realiza una formación de color visible en la presencia de dichos metabolitos no conjugados de catecolamina adsorbidos.

30



26012
6.- Un procedimiento para la detección de meta-
bolitos no conjugados de catecolamina en fluidos que contie-
nen sal.

5 Tal y como se ha descrito en la Memoria que an-
tecede y para los fines que se han especificado.

Esta Memoria consta de veinticuatro hojas escri-
tas a máquina por una sola cara.

Madrid, 26 012 1953

P.A.

10