

341579

Memoria descriptiva



71 MAY 1968

para solicitar PATENTE DE INVENCION por 20 años

a nombre de MILES LABORATORIES, INC.

entidad / ~~nacionalidad~~ norteamericana

con domicilio en 1127, Myrtle Street, Elkhart, Indiana, Estados Unidos de América.

por: "UN METODO Y UN DISPOSITIVO PARA DETECTAR UN COMPUESTO DE COPULACION" (Clase Internacional C096 B011).



5 Se este invento se refiere a la determinación de compuestos de copulación. En uno de sus aspectos más particulares, este invento se refiere a la determinación de compuestos hidroxílicos y amínicos aromáticos y otros compuestos que experimentan un cambio visible en reacciones de copulación con sales de diazonio.

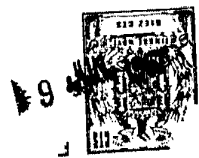
10 Se dispone de un cierto número de métodos para determinar compuestos de copulación. Estos incluyen métodos tanto instrumentales como químicos. En general, los métodos instrumentales son demasiado complejos de utilizar excepto para los que han tenido un entrenamiento formal en la utilización de los mismos. La mayor parte de los métodos químicos requieren también un grado de destreza relativamente alto.

15 Uno de los métodos químicos más populares para la determinación de este clase de compuestos es el que implica la copulación de una sal aromática de diazonio con compuestos de copulación reactivos, tales como, por ejemplo, fenoles o aminas aromáticas o compuestos que contienen grupos metileno activos o grupos metilo activos.

20 La utilización de este método hace posible la determinación de fenoles o aminas aromáticas por simples técnicas colorimétricas. Sin embargo, la reacción de diazonio es una de las que se debe llevar a cabo bajo condiciones cuidadosamente reguladas de temperatura y pH, y por lo tanto implica un grado correspondientemente alto de cuidado para llevar a cabo de manera satisfactoria la reacción.

25 De acuerdo con esto, es un objeto de este invento crear un método para determinar compuestos de copulación

341579



reactivos, que no implica ninguno de los inconvenientes de la técnica anterior.

5 Otro objeto de este invento es crear dicho método, que es conveniente de utilización y que no requiere un alto grado de entrenamiento y destreza en la manipulación de instrumentos analíticos, o la realización de reacciones químicas complejas.

10 Otro objeto de este invento es el de llevar a cabo la determinación antes mencionada en un tiempo muy corto y sin equipos especiales.

Otro objeto de este invento es crear un método para determinar compuestos de copulación reactivos cuando estos están presentes en concentraciones muy bajas.

15 Otros objetos y ventajas de este invento resultarán evidentes en el curso de la descripción detallada que sigue.

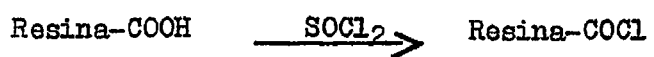
Se ha encontrado ahora que se puede crear un ensayo conveniente para compuestos de copulación reactivos, utilizando un revelador de color insoluble. Dicho revelador puede ser preparado diazotando un material polimérico que contiene grupos amínicos aromáticos libres.

20 El método más evidente para preparar grupos amínicos aromáticos libres unidos a un esqueleto polimérico es la nitración de unidades bencenoides unidas a un polímero tal como poliestireno, seguido por reducción de los grupos nitro resultantes o grupos amino. Los grupos amino aromáticos resultantes pueden ser diazotados entonces fácilmente por tratamiento con ácido nitroso u otro agente diazotador; usualmente por reacción con una solución diluida de nitrito de sodio y un ácido tal como ácido clorhídrico. Este método está descrito en la patente USA número



2.274.551 de William O. Kenyon, Louis M. Minsk y Georg P. Waugh. Este último método, sin embargo, está sometido a la desventaja de que la operación de nitración, que implica la utilización de un agente oxidante, causa una descoloración de los productos que no desaparece completamente por reducción y subsiguiente diazotación. En contraste con esto, el método del presente invento no implica la utilización de agentes oxidantes y dá como resultado la creación de sales de diazonio poliméricas, del mismo color que la amina de la que se derivan. Estas sales son susceptibles de ser utilizadas eficazmente como reveladores de color insolubles.

Con el fin de preparar dichas sales de diazonio poliméricas, se parte de un material polimérico que contiene grupos ácidos, tales como grupos de ácido carboxílico, sulfónico o fosfórico. Dichos materiales están disponibles comercialmente en la forma de una amplia variedad de resinas de intercambio de iones catiónicas. Estas resinas pueden ser hechas reaccionar con un agente halogenador, por ejemplo un halogenuro de tionilo tal como SOCl_2 , o un halogenuro de fósforo tal como PCl_3 ó PCl_5 . Alternativamente, las sales de sodio o potasio de dichas resinas pueden ser hechas reaccionar con POCl_3 o SO_2Cl_2 . Por ejemplo, en el caso de una resina de intercambio de cationes de ácido carboxílico, la reacción con cloruro de tionilo produce el cloruro de acilo de la resina tal como se muestra en la siguiente ecuación:

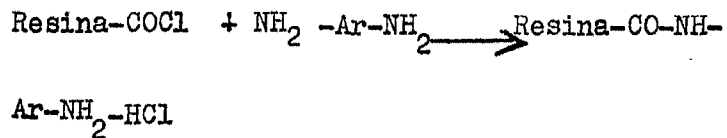


30
3.6.67

341579



El halogenuro de resina puede ser hecho reaccionar entonces con una poliamina aromática en agua o en un disolvente orgánico anhidro, con el fin de proporcionar una amida de resina en la cual permanece libre al menos un grupo amino aromático. Por ejemplo, utilizando poliaminas aromáticas tales como bencidina, orto-toluidina, orto-dianisidina, las fenileno-diaminas (orto, meta o para), el halogenuro de resina es convertido en una amida de resina que contiene un grupo amino aromático libre de acuerdo con la siguiente ecuación:



en que Ar representa el núcleo aromático al que están unidos los dos grupos amino mostrados. Dicho núcleo aromático puede ser monocíclico, es decir bencenoide, o policíclico, tal como en el caso de derivados de naftaleno, bifenilo, antraceno o fenantreno.

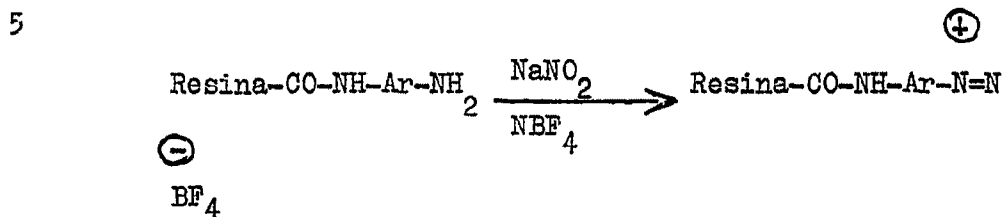
La amida de resina resultante que contiene un grupo amino aromático libre puede ser diazotada para producir sales de diazonio de resina, que pueden reaccionar con compuestos de copulación para dar productos azoicos coloreados.

La diazotación se puede realizar, por ejemplo, haciendo reaccionar la amida de resina con nitrito de sodio en presencia de un ácido tal como ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico o ácido fluobórico, dando como resultado la formación de una sal de diazonio polimérica. Esta sal de diazonio es muy insoluble a causa

341579



de su naturaleza polimérica, y es estable a causa de la presencia en la resina de grupos ácidos que no han reaccionado. Esta reacción puede ser ilustrada de la siguiente manera:

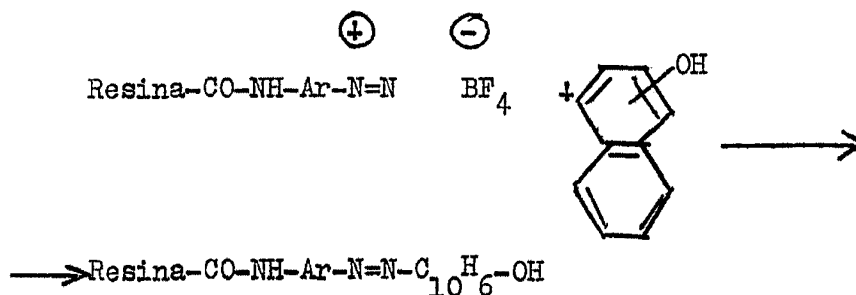


10 Estas sales de diazonio poliméricas pueden ser almacenadas durante extensos periodos de tiempo, y utilizadas en solución acuosa para ensayos en cuanto a cualquier compuesto que se copule con ellas. En particular, estas sales de diazonio poliméricas son útiles como reveladores de color insolubles en el análisis de compuestos hidroxílicos y amínicos aromáticos y otros compuestos que se copulan con sales de diazonio para producir derivados azoicos que están muy coloreados.

15

Esta reacción de copulación puede ser ilustrada con alfa naftol o beta naftol por medio de la siguiente ecuación:

20



30 Las sales de diazonio poliméricas de este invento reaccionan con un gran número de compuestos de copula-

341579



5 ción tales como aminas aromáticas, fenoles y naftoles, derivados de ácidos naftoicos, derivados nitrados de amina y fenoles, nitroparafinas, sustancias con grupos metilo y metilo reactivos tales como ésteres acetoacéticos, ácido beta-oxo-glutérico o derivados de 5-pirazolona, derivados de ácido sulfónico de fenol y naftol, y derivadas de ácido sulfónico de aminas aromáticas.

10 La reacción de copulación para formar el compuesto azoico coloreado es generalmente una cuantitativa, es decir que una cierta cantidad de sal de diazonio polimérica reaccionará con una cantidad fija de un compuesto de copulación bajo condiciones apropiadas. Debido a esto, las sales de diazonio poliméricas de este invento se pueden utilizar comoreveladores de color insolubles para la
15 determinación cuantitativa o semicuantitativa de compuestos de copulación de diversas formas.

Estos reveladores de color insolubles son particularmente útiles cuando se utilizan en tiras de reactivo. Por ejemplo, el revelador de color insoluble puede
20 recubrir hojas de un material celulósico absorbente, tal como papel de filtro, para proporcionar hojas que contienen zonas de revelador de color.

En lugar de recubrir simplemente hojas celulósicas, un método especialmente conveniente y elegante implica la formación de hojas reveladoras de color fibrosas
25 a partir de una mezcla acuosa homogeneizada de revelador de color insoluble y material fibroso celulósico. Estas hojas reveladoras de color fibrosas pueden ser utilizadas entonces para preparar tiras o discos de revelador de color.
30 lor.

341579



Los reveladores de color insolubles de este invento pueden ser utilizados también en forma de tabletas que se pueden preparar mezclando el revelador de color insoluble con materiales apropiados para formación de tabletas, por ejemplo celulosa pulverizada y similares.

Las tiras pueden ser de tipo continuo o discontinuo, es decir las zonas que contienen revelador de color pueden ser continuas o estar alternadas con zonas inertes. Por ejemplo las tiras continuas pueden estar formadas por una zona reactiva global fijada a un soporte tal como papel, cartón, madera, fibra de vidrio o plástico. Las escalas graduadas que se refieren a las cantidades del producto que se ha de determinar pueden ser impresas sobre dicho soporte. En el tipo discontinuo, las zonas reactivas están alternadas con zonas no reactivas.

Para el ensayo, cuando se utilizan tiras, se adopta una técnica cromatográfica ascendente o descendente. Una cantidad previamente determinada de la solución a ensayar en cuanto al compuesto de copulación es absorbida en las tiras y las tiras son entonces lavadas con agua. El compuesto de copulación, en contacto con el revelador de color insoluble, genera un color, ya que la reacción de copulación es una cuantitativa, la intensidad de color estará determinada por la composición química de la zona reactiva, es decir por la cantidad de revelador de color insoluble presente en la tira, mientras que la extensión de la zona coloreada, medida por medio de las graduaciones impresas antes mencionadas, será proporcional a la cantidad del compuesto de copulación que entra en contacto con la zona reactiva.

341579



La concentración del producto de copulación puede ser determinada en la tira continua de una única zona por medio de las graduaciones impresas antes mencionadas. En la tira de zonas múltiples de tipo discontinuo, el número de las zonas en que se revela un color indicará la concentración del compuesto de copulación que se determina. Por ejemplo, utilizando una serie de tres zonas que contienen el revelador de color fijado a un soporte absorbente, es posible determinar la cantidad de compuestos de copulación presentes por la extensión en la que el frente de disolventes en avance del medio de ensayo arrastra el compuesto de copulación a lo largo de la tira. Es decir, una menor concentración de compuesto de copulación puede reaccionar con el revelador de color presente en la primera zona, pero no con el presente en la segunda o en la tercera zona. Una concentración algo mayor puede reaccionar con el revelador presente en las dos primeras zonas, y una concentración todavía mayor puede reaccionar con el revelador presente en las tres zonas.

Cuando se utilizan discos, una cantidad previamente determinada del líquido bajo examen es absorbida en el disco. La reacción entre el revelador de color y cualquier compuesto de copulación presente tiene lugar en el disco, y se desarrolla o revela un color, cuya intensidad es proporcional a la cantidad de compuesto de copulación presente. El color obtenido es comparado con una carta de colores apropiada, y se determina la cantidad de compuesto de copulación presente en la solución bajo examen. Las tabletas se utilizan de una manera similar.

Además de utilizar el revelador de color inso-

341579



luble de este invento para detectar compuestos de copu-
lación reactivos, es posible también detectar sistemas
que sean capaces de producir compuestos de copulación
reactivos. Ya que una gran variedad de sistemas de enzi-
5 mas son capaces de catalizar la liberación de compuestos
de copulación por parte de sus precursores, estos siste-
mas pueden ser detectados fácilmente utilizando el reve-
lador de color insoluble de este invento junto con un
procurador del compuesto de copulación apropiado, como
10 substrato para la enzima que se ha de detectar. Ejemplos
representativos de estas reacciones enzimáticas son los
siguientes:

a) lipasa: el substrato utilizado puede ser
laurato, miristato o caprilato de naftilo. La lipasa hi-
15 droliza al substrato liberando al naftol, que es el com-
puesto específico que se ha de determinar.

b) Acetil esterasa: el substrato utilizado pue-
de ser acetil naftol o acetil-naftil-amina. La hidrólisis
enzimática libera naftol o naftil-amina, que son compues-
20 tos de copulación reactivos.

c) N-acetil beta glucosaminidasa: utilizando
como abstrato naftil-beta-acetil glucosamina, la reac-
ción enzimática libera naftol.

d) Transaminasa (GOT): en transaminaciones-GOT
25 se forma L-glutamato + alfa-oxalacetato a partir de L-
aspartatos + alfa-oxoglutarato. El alfa-oxalacetato for-
mado en esta reacción puede ser determinado por medio
de los reveladores de color insolubles de este invento
a causa de que su grupo metileno activo reacciona con sae
30 les de diazonio.

341579



e) Leucina-amino peptidasa: utilizando L-leucil beta-naftil-amida como substrato, la reacción enzimática libera beta-naftil amina.

5 f) fosfatasa ácidas y básicas: las diversas fosfatasa catalizan la hidrólisis de fosfatos aromáticos a los correspondientes compuestos hidroxílicos aromáticos, que entonces pueden ser detectados fácilmente por medio del revelador de color de este invento.

10 Se pueden utilizar muchos métodos convenientes para detectar estos sistemas. Por ejemplo, un substrato apropiado para dicho sistema de enzimas puede ser impregnado en una zona de un vehículo absorbente a la que está unida una zona de revelador de color. Cuando la zona de substrato es humedecida con una solución que contiene una
15 fosfatasa, la reacción enzimática transcurre dando como resultado la liberación de un compuesto hidroxílico aromático. El lavado con agua pone al último en contacto con el revelador de color insoluble en la zona adyacente, produciendo un color.

20 Otro método conveniente de utilizar el revelador de color insoluble de este invento para la detección de un sistema de enzima proporciona el substrato de enzima en la forma de tableta, que puede ser añadida a la solución que está siendo ensayada en cuanto a la presencia de la
25 enzima. El revelador de color en la forma de una tira o tableta absorbente puede ser humedecido entonces con la solución resultante para hacer que tenga lugar la reacción de color deseada, si la enzima está presente. Dicho método de ensayo es conveniente, por ejemplo, para ensayar leche en
30 cuanto a la presencia de fosfatasa con el fin de controlar

341579



la pasteurización. Es bien conocido que la pasteurización destruye temporalmente la fosfatasa en la leche, y que la presencia de fosfatasa en leche pasteurizada poco después de una pasterización es un signo de una temperatura inadecuada de pasterización o de la presencia de leche cruda.

Este invento será comprendido mejor haciendo referencia a los siguientes ejemplos, que se pretende que sean ilustrativos del concepto del invento y que no han de ser considerados como limitativos del alcance del invento, que está definido en las reivindicaciones anejas.

Ejemplo 1.- Una resina de intercambio de cationes polimetacrílica (tipo Amberlite IRA 64) en la forma ácida, fué desmunuzada hasta la forma de un polvo fino (tamaño de partículas variable dentro del margen de 20 a 50 micras) y fué secada. 50 g. del polvo obtenido fueron calentados bajo reflujo en 200 ml de cloruro de tionilo bajo agitación durante 6 horas. Entonces la megcla de reacción fué filtrada y la resina clorada resultante fué lavada con tolueno anhidro y secada en alto vacío. La resina clorada así obtenida contenía 0,98 miliequivalentes de -COCl por gramo.

Ejemplo 2.- La forma fina de resina antes mencionada, que tenía un tamaño de partículas de 20 a 50 micras, fué clorada bajo las mismas condiciones durante 3 horas. La resina clorada resultante contenía 0,66 miliequivalentes por gramo.

Ejemplo 3.-La forma fina de resina ya mencionada que tenía un tamaño de partículas de 20 a 50 micras, fué clorada bajo las mismas condiciones durante 9 horas y la resina contenía, 1,4 miliequivalentes de -COCl por gramo.

341579



5 Ejemplo 4.- Una resina de intercambio de cationes polimetacrílica (tipo Amberlite IRA 64) en la forma ácida fué reducida, por trituración, hasta la forma de un polvo fino (tamaño de partículas 1 a 5 micras), y después fué sacada. La cloración tuvo lugar de acuerdo con el procedimiento indicado en el Ejemplo 1 durante un tiempo de 3 horas. La resina clorada resultante contenía 0,84 miliequivalentes por gramo.

10 Ejemplo 5.- Una resina de intercambio de cationes polimetacrílica (tipo Amberlite IRA 64) fué convertida a la sal de sodio y fué reducida por trituración, hasta la forma de un polvo fino (tamaño de partículas variable entre 50 y 70 micras), y después fué secada. Una cantidad de 50 g. de sal de sodio de resina fué calentada a
15 reflujo durante 6 horas en 100 ml de tetracloruro de carbono anhidro y 100 ml de cloruro de sulfurilo. La resina fué filtrada y lavada con tetracloruro de carbono y después fué secada. La resina clorada resultante contenía 0,56 miliequivalentes de $-COCl$ por gramo.

20 Ejemplo 6.- Una cantidad de 10 g. de resina clorada, preparada de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 1, fué vertida en una solución de orto-dianisidina (3,3 g) en 75 ml de tolueno seco. La suspensión resultante fué calentada a $85^{\circ}C$ durante 5 horas con agitación. La
25 mezcla fué filtrada y la resina fué lavada de manera discontinua con etanol (100 ml), a partir del cual fué posible recuperar el exceso de amina que no había reaccionado. Entonces la resina fué colocada en una columna cromatográfica y fué lavada con HBF_4 2 N (200 ml) y después con agua
30 en el punto neutro del líquido saliente. La amina acilada

341579



de resina resultante, analizada en cuanto a nitrógeno susceptible de diazotarse, mostró 47 mg de orto-dianisidina mono-enlazada por gramo.

5 Ejemplo 7.- Una cantidad de 10 g de resina clorada, preparada de acuerdo con el Ejemplo 1, fué vertida en una solución de orto-dianisidina (3,3 g) y trietilamina (10 g) en 75 ml de tolueno seco. La suspensión resultante fué calentada a 85°C durante 6 horas, con agitación. La resina fué lavada de acuerdo con el Ejemplo 6, y después
10 secada. En la amina acilada de resina resultante, analizada en cuanto a nitrógeno susceptible de diazotarse, estaban presentes 61 mg de orto-dianisidina mono-enlazada por gramo.

15 Ejemplo 8.- Una solución de diclorhidrato de orto-dianisidina (4,3 g) en 200 ml de agua fué refrigerada hasta una temperatura de 0,5°C. A esta solución se añadió una cantidad de 10 g de la resina clorada del Ejemplo 1. Se continuaron la agitación y la refrigeración, al mismo tiempo que se añadían lentamente 30 ml de NaOH al
20 20% hasta un valor de pH de 11-12. Después de 14 horas de agitación y refrigeración, la suspensión fué centrífuga y el precipitado fué lavado con metanol. Los líquidos de lavado fueron recogidos para la subsiguiente recuperación de amina que no había reaccionado. Entonces la resina fué
25 lavada con HBF_4 y fué secada de acuerdo con el ejemplo 6. La amina acilada de resina resultante, analizada en cuanto a nitrógeno susceptible de diazotarse, mostró una cantidad de 7,20 mg de orto-dianisidina mono-enlazada por gramo.

30 Ejemplo 9.- Una solución de diclorhidrato de

341579



meta-fenileno diamina (1,8 g) en 50 ml de agua fué refri-
gerada hasta una temperatura de 0 a 5° C. A esta solución
se añadió una cantidad de 10 gramos de la resina clorada,
preparada como en el Ejemplo 1, y se añadieron lentamente
5 24 ml de NaOH al 20% hasta un valor de pH de 11-12, al
mismo tiempo que la mezcla era agitada y refrigerada. Des-
pués de 14 horas, la resina fué filtrada y lavada de acuer-
do con el Ejemplo 8. Cuando fué analizada, la amina acila-
da de resina resultante mostró 15,9 mg de meta-fenileno-
10 diamina monoenlazada por gramo.

Ejemplo 10.- Una cantidad de 10 g. de resina clo-
rada, preparada de acuerdo con el Ejemplo 3, fué vertida
en una solución de orto-dianisidina (5,25 g) en 75 ml de
tolueno seco calentado hasta 80°C. La suspensión obtenida
15 fué calentada hasta 80°C durante 14 horas. Después de este
tiempo, la suspensión fué filtrada y la resina resultante
fué lavada como en el Ejemplo 8. La amina acilada de resi-
na así obtenida mostró una cantidad de 63 mg de orto-dia-
nisidina monoenlazada.

20 Ejemplo 11. Una cantidad de 10 g. de resina clo-
rada, obtenida como en el Ejemplo 3, y una cantidad de
5,95 g de diclorhidrato de orto-toluidina, fueron hechas
reaccionar de acuerdo con las condiciones indicadas en el
Ejemplo 9. La amina acilada de resina resultante contenía
25 11,8 mg de orto-toluidina monoenlazada por gramo.

Ejemplo 12.- Una cantidad de 10 g de resina clo-
rada obtenida como en el Ejemplo 3 y una cantidad de 5,3
g de diclorhidrato de bencidina fueron hechas reaccionar
de acuerdo con las condiciones del Ejemplo 9. La amina
30 acilada de resina obtenida contenía 45 mg de ortotoluidina

341579



monoenzimada por gramo.

Ejemplo 13.- Una cantidad de 3 g de la amina acilada de resina del ejemplo 6 fué suspendida en 10 ml de HBF_4 3 N y fué enfriada hasta una temperatura de 0 a 5°C. La suspensión resultante fué agitada mientras se añadían gota a gota 10 ml de NaNO_2 1 N. Se continuó la agitación y se mantuvo la temperatura durante 4 horas. Entonces la mezcla fué centrífuga y la sal de diazonio de amina acilada de resina aislada Resina-CO-NH-Ar-N⁺=N⁻BF₄⁻, fué secada en vacío. Este procedimiento se podría extender a todas las aminas aciladas de resina, preparadas de acuerdo con los ejemplos 6 a 12, que se refieren a aminas aciladas de resina.

Ejemplo 14.- Sales de diazonio de amina acilada de resina fueron hechas reaccionar con alfa-naftol con el fin de determinar la actividad de copulación y observar el color revelado. Los resultados cuando se utilizan sales de diazonio de amina acilada de resina, preparadas a partir de cada una de las aminas aciladas de resina de los ejemplos 6 a 12, están mostrados en la tabla 1.

TABLA 1

Ejemplo	Tipo de resina de amina	alfa-naftol fijado, mg/g de sal de diazonio acilada de resina	Color revelado
6	Resina-orto-dianisidina	27,21	Púrpura-rojo medio
7	Resina-orto-dianisidina	36,00	Púrpura-rojo oscuro
8	Resina-orto-dianisidina	4,25	Púrpura claro
9	Resina-meta-fenileno-diamina	21,4	naranja

341579

TABLA I (continuación)



Ejemplo	Tipo de resina de amina	alfa-naftol fijado, mg/g de sal de diazonio acilada de resina	color revelado
5			
10	Resina-orto-dianisidina	29,2	purpura rojo-medio
	Resina-orto-toluidina	8,1	rojo
	Resina-bencidina	35,6	rojo ladrillo

15 Ejemplo 15 Una mezcla de 8 gr. de fibras de celulosa (cortadas hasta una longitud de aproximadamente 3 mm) y 2 g de Resina-CO-NH-Ar-N= N [⊕] ₄ [⊙] del Ejemplo 13, fué homogeneizada en 5 litros de agua a un PH de 3 a 4. La mezcla homogeneizada fué dejada sedimentar y la capa de resina de celulosa que se formó fué moldeada por compresión a una hoja de 25 cm, que poseía una actividad de copulación con compuesto diazoico igual a 1/5 de la de la sal de diazonio de amina acilada de la resina original.

20 Ejemplo 16.- El material en forma de hojas del Ejemplo 15 fué cortado en tiras de 0,5 cm de anchura y similarmente se prepararon tiras no reactivas del mismo tamaño de papel filtro de Eaton-Dikeman 627-65. Las tiras

25 de los dos tipos diferentes de papel fueron unidas con cola a un soporte plástico impermeable al agua con el fin de obtener una hoja que tenía tres zonas reactivas que alternaban con dos zonas no reactivas, estando constituidas

30 la parte superior y la parte inferior de la hoja por dos tiras de papel de filtro de 3 cm de anchura. La hoja resul

341579



tante fué cortada en forma de tiras de 0,5 cm. cada una.

5 Ejemplo 17.- La hoja preparada de acuerdo con el procedimiento del ejemplo 15 fué cortada en forma de tiras de 3 mm. 30 mm. Estas fueron encoladas a un soporte plástico impermeable al agua que tenía una escala graduada. En la parte superior y en la inferior del soporte se fijaron dos tiras de 3 mm X 30 mm de papel de filtro.

10 Ejemplo 18.- Se prepararon tiras de acuerdo con los ejemplos 16 y 17 excepto que un extremo de papel de filtro de 3 cm fué reemplazado por papel de fibra de vidrio. Este extremo de fibra de vidrio fué sumergido en una solución que tenía la composición (por ml de solución acuosa) mostrada en la tabla 2.

15

TABLA 2

Ingredientes	Peso, mg
Tris (hidroximetil)amino metano	200
Fosfato de beta-o alfa-naftilo	20
Sulfato de magnesio	0,5
	pH = 10,3

25

Las tiras humedecidas fueron secadas en vacío.

30 Ejemplo 19.- Se siguió el procedimiento del Ejemplo 18 excepto que se utilizó la composición mostrada en la Tabla 3.

341579

TABLA 3



	Ingredientes	Peso, mg
5	Fumarato de sodio	100
	Fosfato de beta-o alfa-naftilo	20
	Sulfato de magnesio	0,5
10		pH = 5,05

Ejemplo 20.- La hoja preparada de acuerdo con el Ejemplo 12 fué encolada a un soporte de plástico y fué cortada a la forma de disco.

15 Ejemplo 21.- Se prepararon tabletas que contenían los ingredientes mostrados en la Tabla 4.

TABLA 4

20

	Ingredientes	Peso, mg
25	Tris (hidroximetil) amino metano	18
	Almidón	2
	Fosfato de beta-o alfa-naftilo	0,2
	Polioxietilen-glicol	2,8
30	Sulfato de magnesio	0,05

341579



Las tabletas tenían un peso que variaba entre 22 y 25 mg.

Ejemplo 22.- Se prepararon tabletas que contenían los ingredientes mostrados en la Tabla 5.

5

TABLA 5

	Ingredientes	Peso, mg
10	Fumarato de sodio	10
	Almidón	1
	Fosfato de beta-o alfa-naftilo	0,2
	Polioxietilen glicol	1
15		

Las tabletas tenían un peso que variaba entre 12 y 14 mg.

20

Ejemplo 23.- En un tubo de ensayo apropiado se introdujeron una tableta preparada de acuerdo con el ejemplo 21 y dos gotas de agua. Las tabletas se desintegraron en 10 a 15 minutos, dando como resultado una solución turbia. Se añadió entonces a la solución, en el tubo de ensayo un suero patológico sospechoso que se había de analizar, en una cantidad de 0,1 ml, y se agitó el tubo. Después de 25 10 minutos de incubación a una temperatura de 37°C, se añadió una gota de solución de ácido ortofosfórico al 10%.

25

Una tira de ensayo de tres zonas, preparada de acuerdo con el Ejemplo 16, fué sumergida en la solución

30



anterior y después de 5 minutos se observó que el color revelado era un rojo púrpura. La tres zonas habían sido invadidas por el color, indicando que el suero tenía un grado de actividad de fosfatasa del más alto nivel para el que había sido diseñada la tira de ensayo de tres zonas, es decir un valor patológico. Un suero normal tratado como anteriormente dió color solo a la primera de las tres zonas. Si un suero desconocido diese color a la primera y a la segunda zona, sería considerado como dudoso.

5

10

Ejemplo 24.- La tira continua preparada de acuerdo con el Ejemplo 17 fué introducida en la solución de ensayo del Ejemplo 23. 5 minutos más tarde se observó la extensión de la zona coloreada, y se registró el número que correspondía al nivel más alto de la zona coloreada en la tira calibrada. Datos o números de 1 a 3 indicaban un valor normal, entre 3 y 5 un valor dudoso, y mayores indicaban valores patológicos.

15

20

Ejemplo 25.- En un tubo de ensayo se introdujeron una tableta preparada de acuerdo con el Ejemplo 21 y tres gotas de leche que había de ser ensayada. Después de 10 minutos, una tira de ensayo de una única zona, preparada de acuerdo con el ejemplo 17 fué sumergida en la solución resultante. Cinco minutos más tarde, se leyó la concentración de fosfatasa basándose en el desarrollo de color de la tira. El desarrollo de color en leche adecuadamente pasterizada, por ejemplo, debería estar limitado al número valor 1 de la escala. Valores más altos indican una pasterización inadecuada o la presencia de leche cruda adulteradora.

25

30

Ejemplo 26.-Una tira de tres zonas preparada de

341579



5 acuerdo con el Ejemplo 10 fué humedecida en la parte extrema que contenía el substrato con 0,05 ml del suero que se había de ensayar. Después de 10 minutos, la tira fué lavada con agua de manera que el naftol liberado alcanzó la zona reveladora. Cinco minutos más tarde se leyó la concentración de fosfatasa, tal como se describe en el Ejemplo 23.

10 Ejemplo 27.-Una tira de una única zona preparada de acuerdo con el Ejemplo 18 fué humedecida en la parte extrema que contenía el substrato con 0,05 ml de la leche que había de ser ensayada. Después de 10 minutos, la tira fué lavada con agua de manera que el naftol liberado alcanzó la zona reveladora. Cinco minutos más tarde se leyó la concentración de fosfatasa, tal como se describe en el Ejemplo 25.

15 En resumen, este invento crea un revelador de color de sal de diazonio polimérico insoluble que se puede utilizar en la determinación de compuestos de copulación y sistemas de enzima relacionados.

20 Esta solicitud que corresponde a la presentada en Estados Unidos de América el 23 de Junio de 1.966, Nº 559.754, se acoge a los beneficios del artº 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

25

N O T A

30 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:

341579

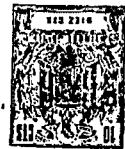


5 1.- Un método para detectar un compuesto de copulación que comprende añadir a un líquido, en el que se ha de detectar dicho compuesto de copulación, un revelador de color de sal de diazonio polimérico insoluble que comprende una poliamina aromática diazotada unida por un enlace de amida a una resina de intercambio de cationes, y observar cualquier desarrollo de color debido a la copulación diazónica entre dicho revelador de color de sal diazonio polimérico y cualquier compuesto de copulación que pueda estar presente.

10 2.- Un método para detectar un sistema de enzimas que catalizará la liberación de un compuesto de copulación a partir de un substrato para dicho sistema de enzimas, que comprende añadir a un medio líquido, en el que se ha de detectar dicho sistema de enzimas un substrato apropiado para dicho sistema de enzimas, añadir a la mezcla resultante un revelador de color de sal de diazonio polimérico insoluble que comprende una poliamina aromática diazotada unida por un enlace de amida a una resina de intercambio de cationes; y observar cualquier desarrollo de color debido a copulación diazoica que pueda tener lugar entre dicho revelador de color de sal de diazonio polimérico y el substrato hidrolizado.

15 20 25 3.- Un método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el sistema de enzimas está seleccionado entre el grupo que consiste en lipasa, acetil esterasa, N-acetil betaglucosaminidasa, transaminasa, leucina-aminopeptidasa, fosfatasa ácida y fosfatasa básica.

30 4.- Un método de acuerdo con la reivindicación 2, en que el substrato es un fosfato aromático.



5.- Un dispositivo de ensayo para ser utilizado en la detección de un compuesto de copulación que comprende un soporte absorbente que contiene un revelador de color de sal de diazonio polimérico insoluble, que comprende una poliamida aromática diazotada unida por un enlace de amina a una resina de intercambio de cationes.

6.- Un dispositivo de ensayo para ser utilizado en la detección de un sistema de enzimas que catalizará la liberación de un compuesto de copulación a partir de un sustrato para dicho sistema de enzimas que comprende un soporte absorbente que contiene una pluralidad de zonas no contiguas, conteniendo al menos una de dichas zonas un sustrato apropiado para dicho sistema de enzimas, y conteniendo al menos una de las zonas remanentes un revelador de color de sal de diazonio polimérico insoluble, que comprende una poliamina aromática diazotada unida por un enlace de amida a una resina de intercambio de cationes.

7.-Un método y un dispositivo para detectar un compuesto de copulación.

Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede, y con los fines que se han especificado.

Esta Memoria consta de veinticuatro hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid,
P. A.

17 MAY. 1968

Alberto de Eizabara

341579