

342386

27 JUN.



MEMORIA DESCRIPTIVA
de una PATENTE DE INVENCION a favor de C.F.
BOEHRINGER & SOEHNE GmbH, de nacionalidad alemana,
domiciliada en MANNHEIM-WALDHOF (Alemania)
por PROCEDIMIENTO DE OBTENCION DE UN MEDIO
DE DIAGNOSIS PARA EL RECONOCIMIENTO DE GLUCO
COSA".

Desde hace tiempo es sabido que se puede reconocer la glucosa en
líquidos fisiológicos (sobre todo en la orina) por el sistema glucosa-oxidasa +
peroxidasa + cromógeno (método GOD/POD). Unos medios de diagnóstico al efecto,
en los que un soporte absorbente (por ejemplo papel filtro) se impregna con
el mencionado sistema, se describen en la patente alemana nº 1.075.869.

Asimismo es sabido que en el reconocimiento de glucosa por el méto
do GOD/POD, los ácidos reductores (ácido ascórbico, ácido úrico, ácido gluco
rónico) existentes en la orina tienen a veces efecto perturbador. Según sea la
concentración de estas sustancias perturbadoras pueden en parte resultar completa
mente erróneas las concentraciones en glucosa obtenidas. Desde el punto de -

5

10



vista médico es de todo punto necesario que semejante medio de diagnóstico permita en todos los casos hacer una apreciación bastante segura y reproducible de la cantidad de glucosa en la orina; una concentración de 30 mg% y más debería poderse reconocer siempre con exactitud, dado que a esta concentración tiene lugar un cambio de glucosuria fisiológica a patológica. Sin embargo con los papeles indicadores de glucosa usados corrientemente hasta ahora, no siempre es posible un cambio con este límite de reconocimiento. Según han revelado nuestras propias investigaciones, en ocasiones se dan incluso orinas en las que unas concentraciones de 200 mg% de glucosa no dan ninguna indicación positiva. Otras, en cambio, acusan concentraciones demasiado escasas, por lo que o los diabéticos no son reconocidos como tales o se observa y se somete a una terapéutica un estado de metabolismo que no responde a las condiciones reales. La terapéutica por vitamina C se ha extendido hoy días hasta tal punto, que siempre hay que contar de nuevo con estas posibilidades perturbadoras; esto es válido también, por supuesto, para el caso de una aportación aumentada de frutas y verduras que contienen vitamina C.

Se ha descubierto ahora que pueden evitarse estas indicaciones erróneas si el papel indicador de glucosa 1) se combina con un papel intercambiador de aniones 2) de tal modo, que el líquido a ensayar los atraviese por el orden 2) --> 1). El medio de diagnóstico sugerido por el invento consiste, por consiguiente, en un soporte absorbente 1) que está impregnado con glucosaoxidasa + peroxidasa + cromógeno, y en un soporte absorbente 2) que contiene un intercambiador de aniones.

En la siguiente tabla se han recopilado los resultados obtenidos en algunas orinas seleccionadas (así como en las correspondientes soluciones acuosas). Como se desprende de ella, con el medio de diagnóstico sugerido por el invento se puede reconocer glucosa en solución acuosa en el mismo margen de concentración que con los papeles indicadores conocidos hasta ahora, o sea a partir de 20 a 30 mg%. Las soluciones acuosas examinadas contenían cloruro sódico, fosfato y urea



en las mismas concentraciones que se dan en las muestras de orina. Si a las muestras de orina humana y animal se agrega glucosa, con el papel indicador según el invento se vuelve a encontrar siempre exactamente la cantidad de glucosa; en las muestras examinadas de orina de diabéticos se obtienen también resultados susceptibles de una valoración sensiblemente mejor, si el papel indicador de glucosa se combina con un papel intercambiador de aniones, facilitándose así dar un diagnóstico perfecto y también controlar el estado de metabolismo. Llaman particularmente la atención los diferentes resultados de las muestras de orina conteniendo ácido -
5 ascórbico empleadas en este caso: sólo haciendo uso del medio de diagnóstico sugerido por el invento se obtienen siempre resultados de confianza, mientras que con el
10 papel indicador de glucosa habitual fueron negativas prácticamente todas las muestras de orina examinadas, es decir, que se diagnosticó erróneamente una aglucosuria.

Tabla: Determinación de glucosa por el método GOD/POD (la concentración de glucosa señalada en la 2ª columna fué determinada por el método de hexo-
15 quinasa).

I = papel indicador según el invento

II = papel indicador corriente

∅ = ninguna coloración

20 (+) = débil coloración

+ = coloración claramente apreciable



Substrato	Conc. de glucosa (mg%)	Tiempo (min.)	Resultado (mg%)			
			con I	con II		
5	Glucosa en solución acuosa [± 2% urea, 0,9% cloruro sódico, 0,1 M amortiguador de fosfato SOERENSEN (pH 6)]	10	3	∅	∅	
		20	3	(+)	(+)	
		30	3	+	+	
		40	3	+	+	
		50	3	+	+	
10	idem, además 50 mg% de ácido ascórbico	100	3	+	+	
		10	3	∅	∅	
		20	3	(+)	∅	
		30	3	+	∅	
		40	3	+	∅	
15		50	3	+	∅	
		100	3	+	∅	
		150	3	+	∅	
		200	3	+	(+)	
		300	3	+	+	

20	Muestra de orina de CONEJO	1.	0	3	∅	∅
			50	3	50	25
			100	3	100	50
			200	3	200	100
25		2.	0	3	∅	∅
			50	3	50	∅
			100	3	100	∅
			200	3	200	∅ (trazas)
30		3.	0	3	∅	∅
			50	3	50	∅
			100	3	100	∅
			200	3	200	∅ (trazas)
35		4.	10	3	∅	∅
			20	3	∅	+
			30	3	(+)	+
			40	3	+	+
			50	3	+	+
40			100	3	+	+
			10	1	∅	∅
			20	1	∅	+
			30	1	(+)	+
			40	1	+	+
	50	1	+	+		
	100	1	+	+		



Continuación de la tabla

Substrato		Conc. de glucosa (mg%)	Tiempo (min.)	Resultado (mg%) con I	Resultado (mg%) con II
5 Muestra de orina de PERRO	1.	0	3	∅	∅
		50	3	50	∅
		100	3	100	∅
		200	3	200	∅
10	2.	0	3	∅	∅
		50	3	∅	∅
		100	3	50	∅
		200	3	150	∅
15	3.	0	3	∅	∅
		50	3	50	∅
		100	3	100	∅
		200	3	200	traza

20	1.	0	3	∅	∅
		50	3	50	traza
		100	3	100	50
		200	3	< 200	100
25	2.	0	3	∅	∅
		50	3	50	∅
		100	3	100	50
		200	3	< 200	~ 50
30	3.	0	3	∅	∅
		50	3	> 50	traza
		100	3	100	~ 25
		200	3	200	~ 50
35	4.	40	3	∅	∅
		50	3	> 50/100	~ 50
		100	3	100	< 100
		200	3	> 200	100
35	5.	0	3	∅	∅
		50	3	50	∅
		100	3	100	∅
		200	3	200	< 50



Continuación de la tabla

Substrato	Conc. de glucosa (mg%)	Tiempo (min.)	Resultado (mg%)	
			con I	con II
5 Muestra de orina HUMANA después de añadir 1 g de ácido ascórbico per os. (extracción de orina 2 h después de la administración)	1. 0	3	∅	∅
	50	3	trazas	∅
	100	3	100	∅
	200	3	> 100	∅
10 Muestra de orina HUMANA después de la administración)	2. 0	3	∅	∅
	50	3	trazas	∅
	100	3	100	∅
	200	3	200	trazas
15 Muestra de orina HUMANA después de la administración)	3. 0	3	∅	∅
	50	3	trazas	∅
	100	3	100	∅
	200	3	200	~50

20 Muestra de orina DIABETICA	1. 19,50	3	trazas	∅
	2. 21,40	3	< 50	∅
	3. 36,62	3	< 50	trazas
	4. 45,00	3	50	∅
	5. 56,70	3	< 100	< 100
	6. 59,00	3	100	∅

25 Es ya conocido que el ácido ascórbico y el ácido úrico de efecto inhibidor sobre el sistema enzimático GOD/POD pueden separarse de la orina con un intercambiador de iones de lecho combinado y que a continuación puede hacerse una determinación cuantitativa de glucosa en la orina con uno de los llamados "autoanalizadores" (cfr. Logan y Haight, Clinical Chemistry 11/1965, pag. 367-377). Por

30 lo tanto, en este procedimiento, las muestras de orina han de ser tratadas primero con una mezcla íntima de un intercambiador de cationes y un intercambiador de aniones fuertemente básico, antes de poder ser sometidas a la reacción de reconocimiento propiamente dicha. En cambio, con el medio de diagnóstico sugerido por el

35 invento no se emplea más que un soporte absorbente que contiene un intercambiador de aniones, y que está unido directamente al soporte del indicador; aquí la orina a examinar tiene que atravesar el papel intercambiador por el principio de un --



cromatograma ascendente con papel, produciéndose la reacción de color en el momento de llegar al papel reaccionante. No era de esperar tan sencillamente que por esta simple medida llegase a mejorar tan decisivamente el reconocimiento de glucosa del modo descrito más arriba, que resultase apropiado para diagnosticar la diabetes. Es sorprendente sobre todo con relación a la mencionada publicación anterior, la cual se ocupa exclusivamente de la determinación de glucosa en orinas patológicas, que con la tira de papel indicador sugerida por el invento se produzca una reacción de color que pueda reproducirse a partir de una determinada concentración de glucosa, siendo así tan sólo posible formular el diagnóstico de "diabetes".

El medio de diagnosis sugerido por el invento puede prepararse de modo sencillo combinando un soporte 1) absorbente corriente, que está impregnado con glucosaoxidasa + peroxidasa + cromógeno, con otro soporte absorbente 2) que contiene un intercambiador de aniones. Por ejemplo se pueden pegar entre sí dos tiras de papel filtro de tal modo, que el líquido a analizar pase por ellas en el orden 2) --> 1) (cfr. figura 1). Puede realizarse una manipulación particularmente cómoda e higiénica pegando o soldando las dos tiras de papel filtro, conforme al modelo de utilidad español nº 116.115 al borde de una lámina de plástico 3) (cfr. figura IIa y b) o según el modelo de utilidad alemán 1.852.316 sellándolas sobre una lámina de plástico 3) (cfr. figura III):

Las tiras indicadoras 1) de glucosa empleadas para el medio de diagnosis sugerido por el invento se confeccionan corrientemente por impregnación del soporte absorbente con una solución acuosa o alcohólica de glucosaoxidasa, peroxidasa, y un indicador colorante apropiado, por ejemplo o-tolidina, y eventualmente con un amortiguador (cfr. patente alemana 1.075.869).

Como soporte absorbente 2) pueden emplearse los papeles comerciales intercambiadores de aniones, incorporándose al efecto en la textura resinas finamente pulverizadas de intercambiadores con grupos de amonio cuaternario o grupos



amino primarios o secundarios (por ejemplo Amberlite IRA 400, Forma Cl^o, grado SB-2). No obstante los papeles intercambiadores de iones a base de celulosa - modificada con grupos amino terciarios también están indicados para la combinación sugerida por el invento (por ejemplo Whatman Paper Chromedia DE 81).

5 Para las láminas 3) pueden utilizarse sistemáticamente todos los plásticos insolubles en agua, por ejemplo, cloruro de polivinilo, éster politereftálico, éster politereftálico recubierto con capa de polietileno, polipropileno, superpoliamida. El factor decisivo para la elección del plástico apropiado es en primer lugar su buena soldabilidad y, naturalmente, también su precio. Por lo mismo se emplean de preferencia láminas de cloruro de polivinilo y ésteres politereftálicos recubiertos con capas de polietileno. La soldadura de las tiras de papel se hace, como es sabido, bien por el método de impulsos de calor o por el de contacto térmico o por alta frecuencia. Para destacar especialmente las reacciones de color, si se quiere se pueden teñir las láminas de plástico con colores de contraste. Se tiene también la posibilidad de emplear en lugar de las láminas, un papel forrado con plástico, con lo que las tiras reactivas tienen entonces un fondo opaco.

10

15

Además de papel filtro se pueden emplear también, por supuesto, otros soportes absorbentes, tales como papel amianto o barritas de material poroso; sin embargo los papeles filtro son los más prácticos y los que se manejan con mayor facilidad.

20

En el dibujo adjunto se muestran unas formas de realización preferentes del medio de diagnóstico sugerido por el invento.

Figura I: ejecución sencilla.

Figuras IIa y b: modificación con lámina de plástico sellada a un lado.

25 Figura III: modificación con lámina de plástico sellada encima.

Significado de los signos:

1 = papel indicador de glucosa

2 = papel intercambiador de aniones

3 = lámina de plástico



27

=o=o=o= N O T A =o=o=o=

Se reivindica como nuevo y de propia invención:

5 1.- Procedimiento de obtención de un medio de diagnóstico para el reconocimiento de glucosa, caracterizado por la combinación de un soporte absorbente 1) que está impregnado con glucosa oxidasa + peroxidasa + cromógeno, y un soporte absorbente 2) que contiene intercambiadores de aniones.

2.- Procedimiento según lo reivindicado en el punto 1, caracterizado porque los dos soportes absorbentes 1) y 2) son tiras de papel filtro.

10 3.- Procedimiento según lo reivindicado en los puntos anteriores, caracterizado porque las dos tiras de papel filtro están unidas una a otra de tal modo, que el líquido a analizar las recorra por el orden 2) --> 1).

4.- Procedimiento según lo reivindicado en los puntos anteriores, caracterizado porque las dos tiras de papel filtro están soldadas o pegadas al borde de una lámina de plástico, o selladas sobre una lámina de plástico.

15 5.- PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN DE UN MEDIO DE DIAGNÓSTICO PARA EL RECONOCIMIENTO DE GLUCOSA.

Tal como se describe y reivindica en la Presente Memoria Descriptiva que consta de nueve hojas escritas a máquina por una sola cara y de sus correspondientes dibujos.

Madrid, 27 JUN. 1967

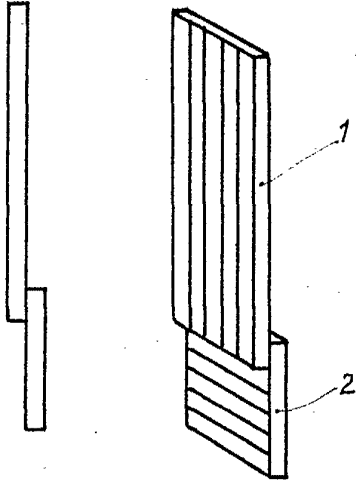


Fig. I

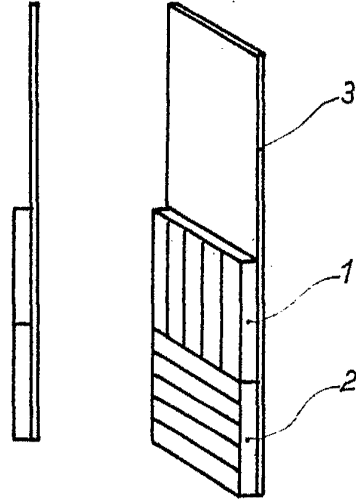


Fig. III

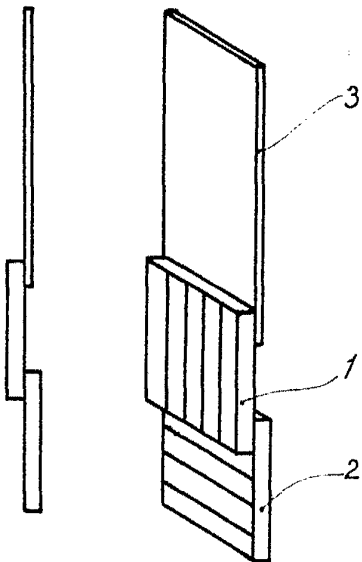


Fig. IIa
Escala variable

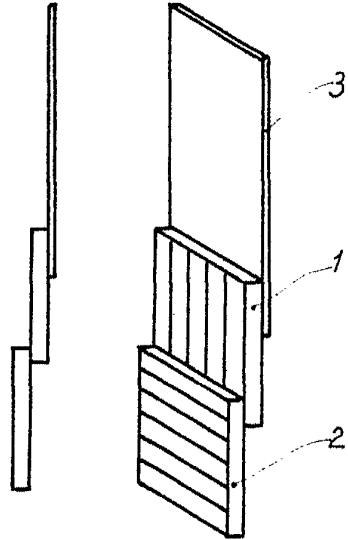


Fig. II b
Madrid, 27 Junio 1967

e. J. J. J.



27 JUN 1967