

P - 43.566

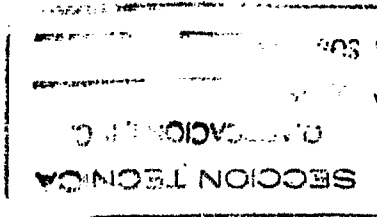
U.S. Ser. No 799.928

374872



SECCION TECNICA
CLASIFICACION INTERNACIONAL
CLASE G 01
SUBCLASE N

Memoria descriptiva



374872

para solicitar PATENTE DE INVENCION por 20 años

a nombre de MILES LABORATORIES, INC.

entidad ~~de~~ nacionalidad norteamericana

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

por: "PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR UN DISPOSITIVO DE ENSA
YO, ESTABLE" (Clase Internacional G01n)

18.12.69



La presente invención se refiere a un dispositivo estable de ensayo, que experimenta un rápido cambio de color cuando entra en contacto con un compuesto diazo copulable. La invención se refiere también a un método
5 para preparar y usar tal dispositivo de ensayo. Más en particular, la invención se refiere a un dispositivo estable de ensayo que comprende un soporte en el que se incorpora el residuo seco de una solución de sal de diazonio, y a un procedimiento para preparar dicha solución.

10 Muchos compuestos, particularmente aquellos que se encuentran en fluidos del cuerpo tales como sangre u orina, son detectables por una reacción de color que tiene lugar cuando son copulados con un compuesto diazo. Uno de
15 tales compuestos, que tiene particular interés en la determinación del estado físico de una persona, es la bilirrubina.

La detección de bilirrubina en fluidos del cuerpo se ha venido efectuando desde aproximadamente 1883, cuando Ehrlich introdujo la reacción diazo para detectar
20 bilirrubina en la orina. Desde entonces se han usado muchos sistemas líquidos empleando la reacción diazo, para determinar bilirrubina en orina y suero. Estos sistemas han introducido muchas variaciones en cuanto a los compuestos diazo y otros reactivos usados en la determinación.
25 Sin embargo, tales sistemas dependen primordialmente del color rojo-violeta de azobilirrubina que se forma cuando la bilirrubina reacciona con una sal de diazonio, el cual color puede ser medido visual o espectrofotométricamente.

Aunque estos sistemas líquidos producen determinaciones muy exactas de bilirrubina, son generalmente
30



difíciles de usar, debido a que en estos sistemas las so-
luciones de sal de diazonio son inestables, y por tanto
necesitan una preparación reciente para cada tanda de
fluido a ensayar. Además, el tiempo requerido para com-
pletar el cambio de color indicativo es bastante largo,
siendo el más corto aproximadamente 30 min, y requirien-
do algunos algo así como horas. Por tanto, los resultados
del ensayo no están disponibles con la rapidez deseada,
particularmente cuando se determina bilirrubina en niños.

Muchas de estas dificultades son aliviadas por
un producto conocido comercialmente como Ictotest^(R) (mar-
ca registrada), que está en forma de tableta seca, para
determinar bilirrubina según se describe en la patente
EE.UU. nº 2.854.317. En el Ictotest^(R), la tableta com-
prende una sal de diazonio, ácido sulfosalicílico y bi-
carbonato sódico. Para usar este ensayo se ponen 5 gotas
de orina en una compresa especial muy absorbente. Luego
se pone la tableta del reactivo Ictotest^(R) en el centro
del área humedecida, y se hacen fluir sobre la tableta dos
gotas de agua. Si hay bilirrubina presente, aparece sobre
la compresa una reacción coloreada dentro de aproximada-
mente 30 seg. Aunque el Ictotest proporciona un sistema
relativamente rápido y estable para determinar bilirru-
bina, se requiere un número múltiple de componentes para
completar la reacción de indicación.

Los dispositivos de ensayo del tipo de immer-
sión y lectura, en los que se combinan reactivos especia-
lizados de reacción rápida con un soporte adecuado, son
ampliamente utilizados, particularmente en el campo de la
medicina. Tales dispositivos son usados comúnmente para

374872



determinar pH y detectar glucosa, proteina y similares en fluidos del cuerpo. Sin embargo, los sistemas de ensayo conocidos para detectar bilirrubina fueron combinados con un soporte adecuado, para formar un dispositivo del tipo
5 po de inmersión y lectura, el dispositivo resultante fue inestable y produjo resultados en los que no se podía tener confianza.

Por tanto, un objeto de la invencion es proporcionar un dispositivo estable de ensayo, que experimenta
10 un rápido cambio de color cuando entra en contacto con un compuesto diazo copulable.

Otro objeto de la invención es proporcionar un dispositivo estable de ensayo, que es adecuado para detectar bilirrubina en una solución.

15 Otro objeto de la invención es proporcionar un método para preparar un dispositivo unitario de ensayo, que se puede usar en la detección de bilirrubina en una solución.

Otros objetos adicionales de la invención serán
20 evidentes por la descripción siguiente.

La invención se realiza como un nuevo dispositivo estable de ensayo que experimenta un cambio de color cuando entra en contacto con un compuesto diazo copulable. Este dispositivo comprende un soporte impregnado
25 de un residuo seco de una solución de sal de diazonio, que comprende un producto de reacción formado combinando un disolvente polar organico, una arilamina copulable, agua, un nitrito soluble, un estabilizador, y un ácido sulfónico.

30 La invención se realiza tambien en un procedi-



miento para preparar el dispositivo de ensayo, que comprende poner en contacto un soporte, preferiblemente absorbente, con una solución de sal de diazonio, y secar el soporte.

5 Para preparar la solución de sal de diazonio se usa un disolvente polar. Preferiblemente, la composición está constituida por agua y un disolvente polar orgánico, tal como alcohol, una cetona, un éster y similares. Ventajosamente se usa un alcohol tal como metanol, etanol y 2-
10 propanol, en proporción de al menos aproximadamente 4 partes de disolvente orgánico por 1 parte de agua. La proporción entre disolvente orgánico y agua se elige de manera que no haya sustancialmente nada de precipitado en la solución de sal de diazonio formada. Además es deseable una
15 alta proporción de un disolvente orgánico que se evapore rápidamente, para reducir el tiempo de secado de un soporte puesto en contacto con la solución.

 Para mayores beneficios, se añade primero al disolvente una arilamina copulable, que puede estar diazotada. Tal arilamina se elige ventajosamente de entre 2,4-dicloro
20 anilina, 4'4-metilén-bis-(N,N-dimetil-anilina), p-nitroanilina, p-cloroanilina, 2,5-dicloroanilina, 4-cloro-o-anisidina, 3,3'-dimetoxibenzidina y 2-metoxi-5-nitroanilina. Otras de tales arilaminas, que son capaces de formar com-
25 puestos de diazonio, pueden también ser usadas, y se consideran dentro del ámbito de la invención.

 Luego se añade a la solución un nitrito soluble adecuado, que formará ácido nitroso en medio acuoso ácido. Para mayor beneficio, el nitrito soluble es nitrito sódico, ni-
30 trito potásico o nitrito cálcico.

374872



En la solución se incluye también un compuesto estabilizador. Se ha hallado que tal estabilizador es beneficioso porque cualquier precipitado que aparezca al formarse la sal de diazonio se forma como precipitado fino que se disuelve fácilmente. Además se ha hallado que el estabilizador añade estabilidad química al dispositivo final de ensayo. El estabilizador se puede elegir de un amplio grupo de compuestos, tales como sales de ácido sulfónico, sulfatos o sulfonatos, aromáticos o alifáticos. Entre los ejemplos de tales estabilizadores se incluyen el ácido 1,5-naftalen-disulfónico, sal disódica; ácido 2-naftalensulfónico, sal sódica; ácido 4,4'-diamino-2,2'-bifenildisulfónico, sal disódica y laurilasulfato sódico.

Se incluye en la composición un ácido orgánico preferiblemente un ácido sulfónico orgánico, para proporcionar el pH apropiado para la formación de un compuesto de diazonio y para la subsiguiente copulación de este compuesto de diazonio con el compuesto copulable. El ácido sulfónico orgánico utilizado se puede elegir beneficiosamente de entre ácido sulfosalicílico, ácido sulfámico, ácido hexámico y p-toluensulfónico, y similares. Se entiende que dentro del ámbito de la invención se pueden usar otros ácidos sulfónicos y ácidos orgánicos conocidos.

Estos reactivos, un disolvente polar, una arilamina, agua, nitrito soluble, un estabilizador, y un ácido sulfónico, son combinados para formar la solución deseada de sal de diazonio. Preferiblemente, estos reactivos se combinan en el orden de que han sido mencionados, aunque no se considera crítico el orden de combinación del disol-



vente polar, arilamina, agua, nitrito soluble y estabilizador. Además, si se usa más de un estabilizador, el segundo estabilizador puede ser añadido después del ácido sulfónico.

5 Se han preparado tintes diazo usando un sistema reactivo similar al antes descrito. Los tintes diazo preparados en los sistemas de la técnica anterior se formaban como precipitados de partículas grandes, que eran deseables por sus propiedades de no formación de polvo. Tales compuestos se formaban a temperaturas reducidas, aproximadamente 0°C. Se ha hallado ahora, sorprendentemente, que con el método de la invención se puede formar una solución de sal de diazonio a temperatura ambiente (aproximadamente 23°C), y se puede conservar en una solución que está sustancialmente exenta de precipitados a tal temperatura, con reactivos similares a los de los sistemas de la técnica anterior. Además, se ha descubierto que cuando se pone un soporte en contacto con esta solución de sal de diazonio, y luego se seca tal soporte, el residuo de la solución de sal de diazonio se forma en pequeñas partículas que son retenidas fácilmente por el soporte.

10
15
20
25 Las proporciones de reactivos usadas para formar la solución de sal de diazonio están preferiblemente comprendidas dentro de los intervalos siguientes, que se expresan en tanto por ciento en peso/volumen, de la forma apropiada:

30	Disolvente polar	de 10 a 90%
	Arilamina	de 0,02 a 0,5%
	Agua	de 10 a 90%
	Nitrito soluble	de 0,01 a 0,25%



Estabilizador de 0,25 a 5%
Acido sulfónico de 0,2 a 5%

5 Como se ha mencionado anteriormente, la relación entre disolvente y agua se mantiene ventajosamente en 4:1 o más, para conservar la sal de diazonio en solución y promover el secado del soporte. Además, la relación en peso entre ácido y compuesto de arilemina se mantiene preferiblemente en aproximadamente 10:1.

10 Se puede utilizar un soporte adecuado que sea capaz de retener el residuo seco de la solución de sal de diazonio incorporada con el soporte. Este soporte está preferiblemente montado de tal manera que puede ser puesto fácilmente en contacto con un fluido en el que se sospecha que está incluido el compuesto copulable a detectar.

15 El soporte del dispositivo de ensayo puede ser parte integrante de una porción mayor que sirve como mango, o puede ser una parte separada que se fije a un mango o dispositivo de manipulación más grande. Tal vehículo puede comprender un material absorbente que se sumerge o se pone de otra

20 forma en contacto con la solución de sal de diazonio, y subsiguientemente se seca. Entre los soportes adecuados se incluye, por ejemplo, un material poroso tal como papel de filtro, papel de fibra de vidrio, o una masa afieltrada de polipropileno, El soporte puede comprender también

25 un gel polímero que se haya mezclado previamente con la solución de ensayo y se seque, de manera que se forme una estructura de membrana semipermeable. El gel se puede formar por evaporación de disolvente, y puede incluir un agente de reticulación.

30 La estructura global del dispositivo de ensayo



no se considera crítica, siempre que se proporcionen medios adecuados para poner en contacto el área que incluye el residuo seco de la solución de sal de diazonio, con el fluido a someter a ensayo.

5 También se puede preparar un dispositivo de ensayo impregnando un trozo de papel de filtro, que actúa como soporte, con la solución de sal de diazonio, y secándolo. El papel impregnado se seca preferiblemente a una temperatura moderada, de aproximadamente 65 a 70°C, en aire en movimiento. Ventajosamente, la temperatura no es elevada excesivamente, ya que se cree que esto tiene efecto perjudicial sobre los compuestos de diazonio. Luego se puede dividir el soporte seco en pequeñas porciones, y se puede fijar a un mango más grande, para más fácil manipulación.

10

15

La invención se describirá más en los siguientes ejemplos, que se pretende que sean ilustrativos, y que no han de ser considerados como limitaciones del ámbito de la invención.

20

Ejemplo 1

Se preparó una solución combinando en un recipiente de vidrio, en el orden relacionado, y con mezcla continua, los siguientes compuestos:

25	Metanol	20,0 ml
	2,4-dicloroanilina	0,20 g.
	Agua destilada	20,0 ml
	Nitrito sódico	1,0 g
30	Sal disódica del ácido 1,5-naftalendisulfónico	0,6 g.



Laurilsulfato sódico 1,5 g
Acido sulfosalicílico 1,0 g
Metanol 60,0 ml

5 Los compuestos, cuando fueron combinados, es-
taban a temperatura ambiente (aproximadamente 23°C), y
la temperatura de la solución permaneció a aproxima-
mente la temperatura ambiente, sin control adicional de
temperatura, durante toda la formación de la solución.

10 Ejemplo 2

Se preparó una solución como se ha descrito
en el ejemplo 1, salvo en que se usaron 0,05 g de 2,4-diclo-
roanilina y 0,5 g de ácido sulfosalicílico. Se observó
que esta solución tenía sustancialmente las mismas pro-
15 piedades que la solución del ejemplo 1.

Ejemplo 3

Se preparó una solución como se ha descrito en
el ejemplo, 1, salvo en que se usaron 0,5 g de 2,4-diclo-
20 roanilina y 5,0 g de ácido sulfosalicílico. Se observó
que esta solución tenía sustancialmente las mismas pro-
piedades que la solución del ejemplo 1.

Ejemplos 4 a 10

Se prepararon soluciones separadas como se des-
25 cribe en el ejemplo 1, salvo en que se sustituyó la 2,4-
dicloroanilina por uno de los siguientes compuestos:

4,4'-metilén-bis(N,N-dimetilanilina)
p-nitroanilina
p-cloroanilina
30 2,5-dicloroanilina



- 4-cloro-o-anisidina
- 3,3'-dimetoxibenzidina
- 2-metoxi-5-nitroanilina

5 Se observó que las propiedades de las soluciones resultantes eran sustancialmente las mismas que las de la solución del ejemplo 1.

Ejemplo 11

10 Se preparó una solución como se ha descrito en el ejemplo 1, salvo en que se usó ácido hexámico en vez de ácido sulfosalicílico. Se observó que la solución resultante tenía sustancialmente las mismas propiedades que la solución del ejemplo 1.

Ejemplo 12

15 Se preparó una solución como se ha descrito en el ejemplo 1, salvo en que se usó ácido sulfámico en vez de ácido sulfosalicílico. Se observó que la solución resultante tenía sustancialmente las mismas propiedades que la solución del ejemplo 1.

20

Ejemplo 13.

25 Se preparó una solución como se ha descrito en el ejemplo 1, salvo en que se usó ácido p-toluensulfónico en vez de ácido sulfosalicílico. Se observó que la solución resultante tenía sustancialmente las mismas propiedades que la solución del ejemplo 1.

Ejemplo 14

30 Una tira de papel de filtro (Eaton and Dickman



nº 641) fué sumergida en la solución del ejemplo 1, y retirada inmediatamente. Este papel fue secado a entre aproximadamente 65 y 70°C durante aproximadamente de 8 a 10 min, con movimiento de aire sobre la superficie del papel. El papel seco tenía un color blanco crema.

5

Se prepararon soluciones de ensayo de bilirrubina con una muestra de orina patológica obtenida de un paciente que mostraba signos de ictericia. La orina obtenida del paciente fue tratada con Ictotest, y se observó una reacción muy grande, que indicó una alta concentración de bilirrubina. Esta orina fue también determinada por una modificación del método de H.E. Malloy y K.A. Malloy para la bilirrubina y se halló que tenía aproximadamente 1 mg % de bilirrubina. La orina patológica fue diluída más con orina normal, hasta concentraciones de 0,5, 0,25 y 0,1 mg%. Cada solución fue ensayada con dispositivos de ensayo de la presente invención, preparados como antes, y se observaron gradaciones de rosa. Con las soluciones de mayores concentraciones se observó un rosa más oscuro, aproximándose al rosa-lavanda.

10

15

20

Análogamente, se obtuvieron sueros de sangre humana de pacientes normales y de pacientes que mostraban ictericia. El contenido de bilirrubina en estos sueros, según se determinó con un Auto Analyzer (marca registrada) estaba comprendido entre 0,1 y 18 mg%. Se pusieron en contacto con los sueros dispositivos de ensayo, preparados como antes, y se observaron colores que variaban entre rosa y lavanda, para concentraciones de 1,0 mg % y mayores. El cambio de color fue proporcional a la concentración de bilirrubina en las soluciones.

25

30

374872



Ejemplo 15

Se trataron unas tiras de papel de fibra de vidrio (Gelman tipo A-1306 y tipo E-748) en vez de papel de filtro, según el método del ejemplo 14. El papel de fibra de vidrio seco resultante tenía un aspecto sustancialmente igual que el papel del ejemplo 14. Cuando se puso en contacto con las soluciones de ensayo del ejemplo 14, se observaron cambios de color como se indica en el ejemplo 14.

5

10

Ejemplo 16

En este ejemplo se siguió el método del ejemplo 14, salvo en que se usó una masa afieltrada de polipropileno (polipropileno MDSE n° Po-8110, de American Felt Company), en vez de papel de filtro. La matriz seca tenía sustancialmente los mismos aspectos de color y reacción de color a las soluciones de ensayo que se observaron en el ejemplo 14.

15

20

Ejemplo 17

Se preparó una solución según las proporciones del ejemplo 1. Una hoja de 10 cm de anchura, de papel de filtro Eaton & Dikeman n° 641 fue pasada a través de esta solución, y secada a de 65 a 70°C, durante aproximadamente 10 min, con circulación de aire. Tras secar, el papel fue puesto en contacto con una superficie adhesiva, sensible a la presión, de una cinta adhesiva reforzada de fibra celulósica, de doble cara sensible a la presión, fue escindida longitudinalmente en tiras de 5 mm de anchura, y fue enrollada en rodillos. Luego se montó un rodi-

25

30

18.12.69

- 13 -

374872



llo sobre un eje, y se retiró un soporte o forro de pa-
pel de cera de la superficie adhesiva exterior de la cin-
ta de doble cara sensible a la presión unida al papel.
La superficie expuesta de la cinta sensible a la presión
5 fue unida continuamente, en toda la longitud del rodillo,
a una superficie de una hoja de película de poliestireno
de 83 mm de anchura y 0,25 mm de espesor. La cinta sen-
sible a la presión fué unida de forma segura a la peli-
cula. El estratificado fue cortado a través de la longi-
10 tud de la tira, en tiras de 5 mm de longitud. El dispo-
sitivo así formado fue puesto en contacto con las solucio-
nes de ensayo del ejemplo 14, y se observó un cambio de
color, como en el ejemplo 14.

Esta solicitud que corresponde a la presentada
15 en Estados Unidos de América, con fecha 17 de Febrero de
1.969, bajo el Nº 799.928, se acoge a los beneficios del
artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Indus-
trial.

20

N O T A

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

1.- Dispositivo estable de ensayo que presenta
un cambio de color cuando es puesto en contacto con un
30 compuesto diazo copulable, comprendiendo dicho dispositivo



un soporte en el que está incorporado un residuo seco de una solución estable de sal de diazonio, que comprende un producto de reacción formado combinando un disolvente orgánico polar, una arilamina, agua, un nitrito soluble, un estabilizador y un ácido sulfónico.

5

2.- Dispositivo estable de ensayo según la reivindicación 1, donde el soporte es un material absorbente.

10

3.- Dispositivo estable de ensayo según la reivindicación 1, donde el disolvente polar es un alcohol, un éter, una cetona o un éster.

15

4.- Dispositivo estable de ensayo según la reivindicación 1, donde la arilamina es 2,4-dicloroanilina, 4,4'-metilén-bis-(N,N-dimetilanilina), p-nitroanilina, p-cloroanilina, 2,5-dicloroanilina, 4-cloro-o-anisidina, 3,3'-dimetoxibenzidina o 2-metoxi-5-nitroanilina.

20

5.- Dispositivo estable de ensayo según la reivindicación 1, donde el nitrito soluble es nitrito potásico o nitrito cálcico.

25

6.- Dispositivo estable de ensayo según la reivindicación 1, donde el estabilizador se elige de entre sales de ácido sulfónico, sulfatos o sulfonatos, aromáticos o alifáticos.

30

7.- Dispositivo estable de ensayo según la reivindicación 6, donde la sal de ácido sulfónico aromático es un miembro elegido del grupo que consta de ácido 1,5-naftalendisulfónico, sal sodica; ácido 2-naftalendisulfónico, sal sodica; y ácido 4,4'-diamino-2,2'-bifenildisulfónico, sal disódica.

18.12.69

374872



vindicación 1, donde el estabilizador es laurilsulfato sódico.

5 9.- Dispositivo estable de ensayo según la reivindicación 1, donde el ácido sulfónico es un miembro elegido del grupo que consta de ácido sulfosalicílico, ácido sulfámico y ácido hexámico.

10 10.- Dispositivo estable de ensayo según la reivindicación 1, donde el disolvente polar es metanol; la arilamina es 2,4-dicloroanilina; el nitrito soluble es nitrito sódico; los estabilizadores son ácido 1,5-naftalendisulfónico, sal disódica, y laurilsulfato sódico; y el ácido sulfónico es ácido sulfosalicílico.

15 11.- Dispositivo estable de ensayo según la reivindicación 1, donde el soporte es un material absorbente; el disolvente polar es un alcohol, éter, cetona, o éster; la arilamina es 2,4-dicloroanilina, 4,4'-metilénbis-(N,N-dimetilanilina), p-nitroanilina, p-cloroanilina, 2,5-dicloroanilina, 4-cloro-o-anisidina, 3,3'-dimetoxibenzidina o 2-metoxi-5-nitroanilina; el nitrito soluble es
20 nitrito sódico; el estabilizador es ácido 1,5-naftalendisulfónico, sal disódica, ácido 2-naftalensulfónico, sal sódica, ácido 4,4'-diamino-2,2'-bifenildisulfónico, sal disódica, o laurilsulfato sódico; y el ácido sulfónico es ácido sulfosalicílico, ácido sulfámico o ácido hexámico.

25 12.- Procedimiento para detectar un compuesto diazo copulable en una solución, que comprende poner en contacto el dispositivo de ensayo de la reivindicación 11 con la solución, y observar el cambio de color del dispositivo de ensayo.

30 13.- Procedimiento según la reivindicación 12,



donde el compuesto diazo copulable a detectar es bilirrubina en solución acuosa.

5 14.- Procedimiento para preparar el dispositivo de ensayo de la reivindicación 1, que comprende mezclar en el orden indicado, un disolvente polar, una arilamina, un nitrito soluble, un estabilizador y un ácido sulfónico, para formar una solución estable de sal de diazonio; poner en contacto un soporte con la solución diazo; y secar el soporte, dejando un residuo seco de la solución de sal de diazonio sobre el mismo.

10 15.- Procedimiento para preparar un dispositivo de ensayo, estable.

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

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

Madrid, 23 DIC. 1969

P.A.

Alberto de Elzaburu
Por Poder

374872

18.12.69

AMC/