

Int. Cl.:

A61B

CONCEDIDA

14 OCT. 1976

MEMORIA DESCRIPTIVA

correspondiente a la solicitud de concesión de un...

PATENTE DE INVENCION

SOLICITANTE: SHIONOGI & CO., LTD.

RESIDENCIA: 12, 3-chome Dosho-machi, Higashi-ku

OSAKA, Japón.

ENUNCIADO: UN METODO PARA LA PRODUCCION DE UN

APARATO DE DIAGNOSIS

Prioridad: Patente S. japonesas n.º 05805/1974 - 9.1.74
27298/1974 - 8.3.74

1 COMPOSICIONES DIAGNOSTICAS, INSTRUMENTOS PARA DIAGNOSIS

Y METODOS PARA PREPARARLOS

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

5 La composición diagnóstica contiene como cromógeno un derivado de diamino bifenilo en el que por lo menos uno de los átomos de hidrógeno de sus grupos amino se sustituye por un radical alquilo inferior mediante reacción con un agente de alquilación. El instrumento de diagnosis se prepara por impregnación de un soporte poroso absorbente en una disolu-
10 ción que contiene la composición diagnóstica y opcionalmen- te una oxidasa sacárida, peroxidasa, y un guayaco, y, si es necesario, un tampón, un tensoactivo, un colorante regulador de fondo y/o un agente para aumentar la viscosidad de la composición. Este instrumento de diagnosis se puede manejar
15 de modo sencillo y cómodo y se puede utilizar para identi- ficar semicuantitativamente un sacárido en fluidos del cuerpo o heces de hombres o animales con fiabilidad.

La presente invención se refiere a una composición
diagnóstica, un instrumento de diagnosis y un método para
20 prepararlos. Mas particularmente se refiere a una composición diagnóstica en la cual un soporte poroso absorbente se in- preña para obtener un instrumento de diagnosis para utili- zar en la obtención de una diagnosis de trastornos o desa- rreglos de las condiciones fisiológicas de hombres o animales.
25 También se refiere a un método para preparar el instrumento de diagnosis.

El examen de los fluidos del cuerpo o de las heces de
hombres o animales, tales como sangre, orina o heces sólidas
juega un papel importante en la diagnosis de trastornos o
30 en el examen y evaluación de los efectos del tratamiento de

1 enfermedades en medicina. No obstante, para identificar los
componentes de una muestra de sangre es necesaria la separa-
ción de los eritrocitos de la muestra de sangre previa al
examen y el pretratamiento de separar los componentes del
5 plasma y suero de la muestra de sangre requiere el trabajo
hábil de personal experimentado y equipo extenso. En conse-
cuencia, se han anhelado hasta ahora composiciones diagnós-
ticas e instrumentos de diagnóstico que se puedan emplear y
manejar de modo sencillo y cómodo, y, además, den resultados
10 de ensayos de diagnóstico semicuantitativos con fiabilidad.
También ha sido deseado un método de preparación de tales
instrumentos de diagnóstico.

Se han hecho varios intentos para desarrollar un medio
sencillo y cómodo para utilizar en diagnósticos. Recientemen-
15 te se ha utilizado con este objeto un instrumento de diagno-
sis tal como una tira de ensayo que consta de una hoja de
papel de ensayo. Por ejemplo, La Patente Norteamericana
3.092.465, la Patente Británica 922.665, la Publicación de
Patente Japonesa Nº 14.573/1969, y la Publicación de Patente
20 Japonesa Nº 15.669/1970 revelan un instrumento tal que puede
ser utilizado para identificar y determinar glucosa, galac-
tosa, fenilalanina, o urea en una muestra de sangre. Alguno
de tales instrumentos se han comercializado, por ejemplo,
como Dextrostix (nombre comercial registrado de Laboratorios
25 Miles Inc.)

Los instrumentos de diagnóstico tales como una tira de
ensayo que se han empleado de modo ordinario para identifi-
car azúcares en urea o sangre se pueden preparar, por ejem-
plo, impregnando un soporte poroso, absorbente tal como un
30 papel de filtro en un sistema enzimático o un cromógeno

1 y secando luego el soporte impregnado. Es cómodo utilizar
una tira de ensayos de estas debido a que, cuando se sumer-
ge en la muestra líquida que se examina, la sustancia que
se identifica se detecta por la formación o cambio de color
5 de dicho sistema enzimático o cromógeno que se induce por
un producto de reacción formado cuando el sistema enzimáti-
co se pone en contacto con la sustancia en presencia de oxí-
geno. Sin embargo, es inevitable que la estabilidad del de-
sarrollo y el matiz del color que se produce por el cromó-
10 geno esté afectada por el pH de la muestra líquida o por
la cantidad de materias inhibidoras presentes en la muestra
haciendo difícil de este modo dar un resultado de ensayo
digno de confianza. Consecuentemente composiciones diagnos-
ticas e instrumentos de diagnosis convencionales que contie-
nen benzidina o un homólogo de esta tal como orto-tolidina
15 pueden alcanzar un éxito limitado para fines diagnosticos.

Para que un instrumento de diagnosis permita
una reacción enzimática fácil, por la que se lleve a cabo
una formación de color o cambio de color claro y estable de
un cromógeno allí presente es necesario mantener la estabi-
20 lidad del cromógeno en el sistema en el que se transforma
el cromógeno para producir un color y mantener el pH de la
muestra líquida en un intervalo particular. Con este objeto,
se requiere que el cromógeno sirva como dador de hidrógeno
25 a un sistema de reacción de oxidación-reducción, es decir,
en el que el cromógeno se transforma en un producto que fa-
cilmente puede actuar con sacáridos en la orina o catalasa
en heces sólidas para producir color. Al mismo tiempo, tam-
bien se requiere que el cromógeno actúe determinando por
30 lo menos semi-cuantitativamente una sustancia que se iden-

1 tifica en una muestra líquida por formación de o transforma-
ción en un color por autooxidación.

5 Dichos instrumentos de diagnosis convencionales se pre-
paran de manera que se recubra la superficie de la tira de en-
sayo de diagnosis con una película de revestimiento fina, -
traslúcida o de un material repelente de agua o hidrófobo con
al fin de que la hemoglobina o eritrocitos de la muestra de
sangre no penetren en su soporte poroso cuando se sumergen en
una muestra de ensayo de modo que la hemoglobina que queda so-
10 bre la superficie de esta se pueda lavar facilmente vertiendo
agua durante un periodo de tiempo particular después que la
tira de ensayo se sumerge en la muestra que se examina. Dichos
instrumentos de diagnosis convencional son cómodos en este es-
pacio. Sin embargo, es difícil revestir uniformemente el sopor-
15 te con un material repelente del agua. Y la falta de uniformidad
de tal revestimiento sobre la superficie de la tira de en-
sayo puede producir irregularidades en la determinación de la
sustancia que se identifica o dificultan en realizar un aná-
lisis semi-cuantitativo con resultados dignos de confianza -
20 debido a que el estado de revestimiento puede afectar la fia-
bilidad de la determinación e identificación.

25 Por ello, es objeto de la presente invención proporcionar
una composición diagnostica que pueda producir la formación o
el cambio de color estable, o cambio de color un matiz del
color producido por transformación de un cromógeno. Otro -
objetivo de la presente invención es proporcionar una compo-
sición diagnostica que pueda dar un resultado de ensayo
semicuantitativo digno de confianza en la determinación e -
30 identificación de un sacarido en los fluidos del cuerpo

1 o en las heces de hombres o animales. Otra característica
de la presente invención es un instrumento de diagnóstico
que contiene una composición diagnóstica que se puede uti-
lizar y manejar de modo sencillo y cómodo y permite el ana-
5 lisis semi-cuantitativo de un sacario en fluidos del cuer-
po o heces de hombres o animales con fiabilidad. Un ulterior
aspecto de la presente invención es un método para preparar
tal instrumento de diagnóstico. Otros objetivos, aspectos
y ventajas de la presente invención resultarán evidentes
10 durante el curso de la descripción de la especificación
y de las reivindicaciones.

Se ha encontrado que se puede proporcionar una com-
posición diagnóstica que puede evitar las desventajas y di-
ficultades que tienen dichas composiciones diagnósticas or-
15 dinarias, que contiene un derivado de diamino bifenilo en
el que por lo menos uno de los átomos de hidrógeno en los
grupos amino de este está sustituido por un radical alqui-
lo inferior por tratamiento con un agente alquilante. Tam-
bien se ha descubierto que los alquil diamino bifenilo dan
20 el producto oxidado correspondiente que se puede transfor-
mar para desarrollar y producir un color transparente y que
también pueden dar un tono más estable en un intervalo de
pH más alto que los derivados de diamino bifenilo que no
tienen sustitución alquímica en ambos de sus grupos amino.

25 Los alquil diaminobifenilo se pueden obtener por trata-
miento de los derivados de diamino bifenilo que no tienen
sustitución alquímica en sus grupos amino con un agente
alquilante. La reacción se puede llevar a cabo a temperatu-
ra ambiente o a temperatura elevada. El derivado de diamino
30 bifenilo que se utiliza como producto de partida es benci-

1 dina y un homólogo de esta que tiene por lo menos un sus-
tituyente de la serie de alquilos o alcoxi con uno o dos
átomos de carbono e incluye, por ejemplo, bencidina, toli-
dina, diánisidina, siendo preferidos bencidina ó-tolidina y
5 c-dianisidina. El agente alquilante que se puede utilizar
con este objeto puede ser cualquier agente que usualmente
se pueda emplear para alquilar un radical amino y que tam-
bien pueda producir el derivado de diamino bifenilo en el
que por lo menos uno de los átomos de hidrógeno en sus gru-
10 pos amino ha de estar sustituido por un radical alquilo in-
ferior que tiene de uno a cuatro átomos de carbono y prefe-
riblemente de uno a dos átomos de carbono. Ejemplos ilus-
trativos de agentes alquilantes son un sulfato de dialquilo
tal como por ejemplo, sulfato de dimetilo y sulfato de dieti-
15 lilo, un halogenuro de alquilo tal como, por ejemplo; clo-
ruro de metilo, bromuro de metilo, yoduro de metilo, cloru-
ro de etilo, bromuro de etilo, y yoduro de etilo, y un sul-
fóxido de dialquilo tal como, por ejemplo, sulfóxido de di-
metilo, sulfóxido de dietilo y sulfoxido de metil-etilo.

20 La alquilación de los derivados de diamino bifenilo por tre-
tamiento con dicho agente de alquilación puede producir or-
dinariamente un producto de reacción en el que por lo menos
uno de los átomos de hidrógeno en sus grupos amino está sus-
tituido por un radical alquilo inferior. Y dicha alquilación
25 también puede producir una mezcla de dialquil diamino bife-
nilos en los que los dos grupos aminos están alquilados ca-
da uno con hasta dos radicales alquilo. Además, la reacción
de alquilación ordinariamente da los productos de reacción
que tienen un grado diferente de sustitución alquímica mez-
30 clados con el producto de partida. Sin embargo, la utiliza-

1 ción de tal mezcla no afecta desfavorablemente el diagnosti-
co, de modo que no es necesario separar el producto de reac-
ción alquilado que tiene la misma sustitución alquímica de
5 los de diferentes sustituciones alquímicas o separar la mez-
cla de los productos de reacción alquilados del producto
de partida que queda sin reaccionar en la mezcla de reacción.
En vista de la dificultad técnica de separar el producto de
partida sin reaccionar de la mezcla de productos alquilados
es mas bien aconsejable desde el punto de vista práctico uti-
10 lizar una mezcla total que contiene al producto de partida
y los distintos productos alquilados .

El alquil diamino bifenilo que se utiliza en la presen-
te invención puede proporcionar su propio tono de color par-
ticular de acuerdo con el número y/o la posición de susti-
15 tución alquímica en sus grupos amino. Consecuentemente,
un instrumento de diagnosis particular y deseado que consta
del derivado de diamino bifenilo con una cantidad adecuada
de sustitución alquímica en una posición adecuada de sus gru-
pos amino puede ser elegido de acuerdo con la clase y natu-
20 raleza de la sustancia que se identifica y el líquido que
se examina.

Se ha encontrado que un instrumento de diagnosis que
consta de dicho compuesto alquilado, un soporte poroso, ab-
sorbente y un indicador de oxidación-reducción capaz de reaccio-
25 nar con un ~~ácido~~ tal como glucosa, estando impregnado el
soporte de una disolución que contiene dicho compuesto alqui-
lado y con ello una película fina, transluciente o un agente
repelente de agua o hidrófobo que se forma en la superfi-
cie del mismo, puede disminuir las desventajas y las dificult-
30 tades concernientes a dichos instrumentos de diagnosis con-

1 vencionõnales. El instrumento de diagnosis de la presente
invenci3n contiene dicho alquil diamino bifanilo, y, cuando
se d3see y preferiblemente, junto con una oxidasa de sac3ri-
do, peroxidasa y guayaco sobre un soporte poroso, absorben-
5 te.

El t3rmino "oxidasa" de sac3rido" mencionado aqu3 signi-
fica cualquier enzina que posee la capacidad de oxidar un -
sac3rico tal como por ejemplo, glucosa y galactosa y que -
puede identificar el sac3rico que se identifica en una mues-
10 tra l3quida al menos simicuantativamente. La oxidosa del -
sac3rido incluye, por ejemplo, oxidasa de glucosa y oxidasa
de galactosa.

Un guayaco, uno de los componentes utilizados en el ins-
trumento de diagnosis de la presente invenci3n, en gene-
15 ral puede ser de origen natural. Es dif3cil identificar -
exactamente su composici3n, pero el guayaco que se utiliza
con el objeto presente puede estar en forma de un polvo amor-
fo castaño amarillento y comprende el 3cido α -guayac3nico -
($C_{22}H_{26}O_6$) o el 3cido β -guayac3nico ($C_{21}H_{26}O_5$): La frac-
20 ci3n de guayaco soluble en cloroformo de la que se dispone
en el mercado se puede utilizar normalmente para la presen-
te invenci3n simplemente por comodidad de disponibilidad.

El soporte poroso, absorbente que se utiliza para el
instrumento de diagnosis de la presente invenci3n en gene-
25 ral puede ser un papel de filtro, particularmente papel de
filtro endurecido, siendo m3s preferidos Whatman no. 50, What-
man no. 52, Whatman no, 54, Whatman no. 540, Whatman No. 541,
Whatman No. 542, y Whatman DE-81, Whatman No. 54. Tambi3n se
pueden utilizar con este objeto un material de vidrio aglu-
30 tinado poroso o materiales pl3sticos que pueden llevar un

1 adsorbente en sus finos huecos o cavidades.

La composición diagnóstica y el instrumento de diagnóstico de la presente invención poseen excelentes propiedades para la formación y el desarrollo de un color con estabilidad y en no ser alterados por materiales inhibidores presentes en la muestra líquida que se examina. También pueden mejorar la homogeneidad de la reacción cromogénica o de la coloración que tiene lugar en el instrumento de diagnóstico y aumentar la sensibilidad del cromógeno con exactitud.

10 Los alquil diamino Bifenilo que se utilizan para la presente invención están en forma de aceites, mientras que el diamino bifenilo no sometido a alquilación que se utiliza como producto de partida para la preparación de los compuestos alquílicos de la presente invención está en forma de
15 cristales. Si el producto de partida queda sin reaccionar en la mezcla de reacción y se encuentra con los productos de alquilación aceitosos, tal mezcla puede permanecer en forma de un material aceitoso. Además, el material de partida que queda sin reaccionar en la mezcla de reacción no se deposita
20 en la superficie del soporte como sólidos, de modo que las desventajas esperadas de los sólidos depositados en su superficie están eliminadas. Una mezcla tal también es compatible con el guayaco en la composición diagnóstica de la presente invención, que actúa evitando que la hemoglobina presente en
25 el fluido del cuerpo o muestra de heces entre en el soporte poroso.

La composición diagnóstica de la presente invención puede contener cualquier componente que ordinariamente pueda ser utilizado con este objeto, tal como un tampón, un tenso-
30 activo, un colorante regulador de fondo y/o un agente para

1 aumentar la viscosidad de la composición. El tampón consta ,
por ejemplo de una disolución acuosa de ácido ftálico, un
fosfato o ácido cítrico. El tensoactivo consta, por ejemplo
de una mezcla compleja de éteres de polioxietileno de ésteres
5 mixtos de ácidos grasos, por ejemplo Tween 20 (nombre
comercial registrado). El colorante regulador de fondo es,
por ejemplo, tartrazina. El agente para aumentar la visco-
sidad es, por ejemplo, un coloide protector que se emplea
en general para estabilización de enzimas, tal como polialqui-
10 lenglicol y alcohol polivinílico.

El método de preparación del instrumento de diagnosis
de la presente invención comprende la impregnación del cita-
do soporte poroso absorbente en una disolución que contiene
el alquil diamino bifenilo de la presente invención. El mé-
15 todo de preparación del instrumento de diagnosis de la pre-
sente invención puede variar dependiendo del propósito para
el cual se emplee. En el caso en que opcionalmente se pueda
añadir a la disolución de impregnación una oxidasa de sacá-
rido, peroxidasa y un guayaco, la impregnación se puede e-
20 fectuar preferiblemente en dos etapas, y el instrumento de
diagnosis así preparado puede proporcionar una ejecución
completamente buena para propósitos de diagnósticos. La pri-
mera etapa comprende la impregnación de dicho soporte poro-
so, absorbente en una disolución que contiene una oxidasa
25 de sacárido y peroxidasa y secado del soporte impregnado. Y
la segunda etapa supone la impregnación del soporte seco,
anteriormente impregnado, en otra disolución que contiene
el alquil diamino bifenilo y guayaco y secado del soporte
dos veces impregnado. El método de acuerdo con la presente
30 invención no se limita a la citada incorporación específica

1 para llevar a cabo la presente invención y se debe interpre-
tar incluyendo otra incorporación en la que una mezcla de
los cuatro componentes citados está formada por todos juntos
o en combinación de unos con otros. Los citados tampón, ten-
5 soactivo, colorante regulador de fondo y/o agente para au-
mentar la viscosidad también se pueden añadir a las disolu-
ciones de impregnación en la etapa que se quiera. En algunos
casos el instrumento de diagnóstico de la presente invención
se puede preparar por impregnación del citado soporte poro-
10 so, absorbente, en una disolución que contiene el alquil dia-
mino bifenilo y, cuando se quiera, los citados tampón, ten-
soactivo, colorante regulador de fondo y/o agente para au-
mentar la viscosidad. Los instrumentos de diagnóstico prepara-
dos por el método de la presente invención también pueden
15 presentar una excelente cualidad en el control e impedimento
de la penetración de la hemoglobina de una muestra líquida
que ha de ser examinada.

Los instrumentos de diagnóstico de la presente invención
se pueden emplear de manera ordinaria. Una gotita de una
20 muestra de sangre se coloca en la superficie de una tira de
ensayo y la muestra de sangre que queda encima se lava con
agua en un periodo de tiempo particular para la resolución
del ensayo. Los instrumentos de diagnóstico de la presente in-
vención pueden permitir la fácil eliminación de una mancha
25 producida por la muestra de sangre que afecta desfavorable-
mente la realización del ensayo, puesto que dichas tiras de
ensayo ordinarias son incapaces de eliminar la mancha hasta
el punto de que la mancha no perjudique la reacción de color
de modo que se alcance la exactitud de los resultados del
30 ensayo. De este modo, los instrumentos de diagnóstico de la

1 presente invención pueden dar un resultado de ensayo exacto
y digno de confianza sin sufrir el efecto desfavorable de
la mancha que de otro modo disminuye la exactitud del ensa-
yo. Estas ventajosas características de los instrumentos de
5 diagnóstico de la presente invención pueden conducir a subor-
dinación a aplicación práctica pueden permitirles identifi-
car y determinar una sustancia que se identifica por lo me-
nos de modo semicuantitativo y pueden ocasionar que la reac-
ción de coloración sobre su superficie tenga lugar de modo
10 estable. Los instrumentos de diagnóstico de la presente inven-
ción pueden identificar semicuantitativamente un sacárido
en fluidos del cuerpo o heces de hombres o animales por ejem-
plo glucosa en cantidad de 0 a aproximadamente 500 mg por
dl. Sin duda se debe indicar que cuando se utiliza la oxida-
15 sa de otro sacárido, por ejemplo, oxidasa de galactosa, en
vez de oxidasa de glucosa, los instrumentos de diagnóstico de
la presente invención pueden dar sustancialmente los mismos
resultados que los obtenidos con dicho instrumento de diag-
nosis cuando se emplea oxidasa de glucosa.

20 Las siguientes referencias y ejemplos ilustran la pre-
sente invención con mas detalle sin que, no obstante, la li-
miten. Se debe comprender que la cantidad de componentes con
que un soporte se recubre no debe estar limitada a las can-
tidades de éstos descritas en los ejemplos que siguen y, par-
25 ticularmente, las cantidades de los N- (y/o N'-) metil o etil
diamino bifenilo y el guayaco que son los componentes mayo-
ritarios de la disolución que se utiliza para la citada se-
gunda etapa de impregnación se debe interpretar que son ca-
paces de ser alteradas y variadas en general dentro del in-
30 tervalo de tolerancias de mas o menos un 50 por cien relativo

1 a las cantidades descritas en cualquiera de los siguientes
ejemplos de la consideración de la estabilidad de la enzi-
ma particular que se utilice y del intervalo en el cual la
determinación se efectua con fiabilidad. Además, las cantida-
5 des de la oxidasa de sacárido que se pueden utilizar prefe-
riblemente para la disolución de la primera etapa de impreg-
nación se puede variar y alterar en proporción a la varia-
ción de las cantidades de los componentes de la disolución
para la segunda etapa de impregnación.

10 Los siguientes ejemplos de referencia incluyen la pre-
paración de los alquil derivados.

Ejemplo de Referencia 1

15 A una disolución de 0,1 g de o-tolidina en 2,0 ml de
benceno se añaden 0,6 g de sulfato de dimetilo, 1 mol, y la
mezcla se deja en reposo a temperatura ambiente durante 30
minutos. El compuesto de amina se fuerza a pasar a la capa
de benceno añadiendo a la mezcla 10 ml de una disolución a-
cuosa de hidróxido sódico al 10 por cien. La capa de benceno
se lava con agua y el benceno se separa por destilación para
20 obtener un producto aceitoso que contiene el material de par-
tida y una mezcla de las cinco clases de los productos de
reacción que tienen un diferente grado de sustitución metí-
lica.

Ejemplo de Referencia 2

25 Se repite el Ejemplo de Referencia 1 excepto que se
añaden 10 ml de metanol y 1,5 g de yoduro de etilo, 2 moles,
en vez de 2,0 ml de benceno y 0,6 g de sulfato de dimetilo,
respectivamente, y la reacción se lleva a cabo durante una
hora. La mezcla de reacción se extrae con 20 ml de benceno
30 y se trata de la misma manera que anteriormente para obtener

1 una mezcla del producto de partida y cinco clases de los
productos de reacción que tienen diferente grado de sustitución
etilica.

Ejemplo de Referencia 3

5 A una disolución de 1,0 g de bencidina en 40 ml de benceno
se añaden 1,4 g de sulfato de dimetilo, 2 moles, y la mezcla
se deja en reposo a temperatura ambiente durante 30 minutos.
Después de añadir a esto 30 ml de una disolución acuosa de
10 hidróxido sódico al 10 por ciento caliente, la disolución
se hace neutra y se fracciona. A continuación se lava la capa
de benceno con agua, y el benceno se separa por destilación
para obtener los productos de reacción con una mezcla de
derivados metílicos de la bencidina. También queda sin
reaccionar una pequeña cantidad del producto de partida.
15

Ejemplo de Referencia 4

Se repite el procedimiento del Ejemplo de Referencia 3
excepto que se utilizan 20 ml de metanol y 1,5 g de yoduro
de metilo, 2 moles, y la mezcla se agita durante una hora
a temperatura ambiente. Se neutraliza la mezcla con 1 g de
20 hidróxido sódico granulado, y se separa por destilación el
metanol. El producto resultante se extrae con una mezcla de
100 ml de benceno y 20 ml de agua y el extracto se fracciona
y trata de la misma manera que anteriormente para obtener
25 productos similares a los productos anteriores.

Se debe indicar que la proporción de los componentes en la
mezcla de compuestos depende de las operaciones y condiciones
de la reacción. Por ejemplo, la proporción de los compuestos
del Ejemplo de la Referencia 1 se determina midiendo los
30 picos obtenidos por cromatografía gaseosa y se

1 encuentra que son como sigue:

	<u>Compuestos</u>	<u>Cantidades en tanto por ciento</u>
	orto-tolidina	37,9
	N-monometilada	43,4
5	N,N'-dimetilada	7,5
	N,N-dimetilada	8,6
	N,N,N'-trimetilada	2,6
	N,N,N',N'-tetrametilada	trazas

10 Las tablas siguientes muestran los colores obtenidos por reacción de colores de los derivados alquilamino. La Tabla 1 indica el ejemplo de la reacción de colores de la o-tolidina y sus distintos derivados metilados obtenidos en el Ejemplo de Referencia 1, y la Tabla 2 muestra la reacción de colores de la bencidina y sus distintos derivados metilados en el Ejemplo de Referencia 3.

15 Tabla 1

	<u>Compuestos</u>	<u>Colores</u>
	orto-tolidina	Azul
	N-nonometilada	Azul verdoso suave
20	N,N-dimetilada	Sin desarrollo de color
	N,N'-dimetilada	Verde azulado
	N,N,N'-trimetilada	Verde
	N,N,N'-N'-tetrametilada	Verde (el desarrollo de color es tardío)

25 Todas las metil bencidinas pueden ser transformadas en los correspondientes productos oxidados que pueden producir un desarrollo de color más estable en un intervalo de pH más amplio que la propia o-tolidina.

30 Tabla 2

	<u>Compuestos</u>	<u>Colores</u>
	Bencidina	Azul oscuro

1	N-monometilada	Azul oscuro
	N,N-dimetilada	Verde azulado
	N,N,N'-trimetilada	Verde
	N,N,N'-N'-tetrametilada	Verde amarillento

5 La mezcla de los derivados etilados de la o-tolidina obtenida en el Ejemplo de Referencia 2 se desarrolla en un cromatograma de capa fina y se examina la reacción de coloración, dando lugar a casi la misma reacción de coloración que la producida con la mezcla de los derivados metilados del Ejemplo de Referencia 1.

10

Los siguientes Ejemplos ilustran la preparación de los instrumentos de diagnóstico de la presente invención.

Ejemplo 1

15 Se preparan de manera ordinaria dos clases diferentes de disoluciones de impregnación que tienen las siguientes composiciones.

La composición de la disolución que se utiliza para la primera etapa de impregnación es como sigue:

	<u>Composición</u>	<u>Cantidades</u>
20	Disolución tampón de ácido ftálico 0,5 M (pH: 5,3)	13 ml
	Oxidasa de glucosa	1.000 unidades
	Peroxidasa	6 mg
	Tartrazina	4,2 mg
25	Alcohol polivinílico	200 mg

La disolución para el segundo proceso de impregnación tiene la composición siguiente:

	<u>Composición</u>	<u>Cantidades</u>
30	Mezcla de o-tolidinas metiladas (producto del Ejemplo de Referencia 1)	80 mg

1 Guayaco (fracción soluble en cloroformo) 100 mg
Etanol 13 ml

5 Se prepara una tira de ensayo sumergiendo un trozo de papel de filtro Whatman No 54 en la citada disolución para la primera etapa de impregnación, secando el papel impregnado, sumergiendo de nuevo el papel seco en la disolución indicada para la segunda etapa de impregnación y secando el papel impregnado por segunda vez. El trozo de papel de filtro seco se corta con un ancho de 5 mm y se guarda en un lugar en el que no reciba luz y se mantenga una humedad baja.

10 Para utilizar la tira de ensayo preparada anteriormente para identificación y determinación de glucosa en una muestra de sangre, por ejemplo, se deposita una gotita de la muestra de sangre en la superficie de la tira de ensayo y la hemoglobina que queda en la misma se lava haciendo circular agua durante un minuto por la superficie de la tira de ensayo, La tira de ensayo da la reacción de coloración en proporción a la concentración de glucosa en las muestras de sangre, A continuación se hace que tenga lugar el desarrollo de color y se compara con un índice de matices de color patrón para llevar a cabo el análisis comparativo semicuantitativo. El índice de matices de color se prepara desarrollando y determinado un color en proporción a la cantidad de glucosa específica en una muestra de sangre. En las tiras de ensayo de la presente invención, no se observa deterioro del color 5 minutos después que se lavan con distintas cantidades de agua como normalmente se ve respecto de las citadas tiras de ensayo ordinarias comercialmente disponibles.

Ejemplo 2

30 Se prepara una tira de ensayo sustancialmente del mis-

1 mo modo que en el Ejemplo 1 excepto por el empleo de la mez-
cla de etil o-tolidinas preparada en el Ejemplo de Referen-
cia 2 en vez de los derivados metilados de o-tolidina en la
segunda disolución. Se encuentra que la tira de ensayo mues-
5 tra casi los mismos resultados que con la tira de ensayo
preparada en el Ejemplo 1.

Ejemplo comparativo

Se prepara una tira de ensayo sustancialmente de la
misma manera que en el Ejemplo 1 excepto que se emplea o-to-
10 lidina sin reaccionar en vez de la mezcla de o-tolidinas me-
tilladas. La tira de ensayo, cuando se emplea para propósitos
diagnósticos, no es uniforme en la reacción de coloración
y además es incapaz de eliminar la hemoglobina adherida a
la superficie de la tira de ensayo, de modo que los resulta-
15 dos del ensayo no son satisfactorios comparados con las ti-
ras de ensayo preparadas en los Ejemplos 1 y 2.

Ejemplo 3

Se preparan las tiras de ensayo de la misma manera
que en el Ejemplo 1 excepto que se emplea cloroformo, clo-
20 ruro de metileno tetracloruro de carbono o dicloroetano en
vez de etanol en la disolución para la segunda etapa de im-
pregnación. Estas tiras de ensayo también se encuentran que
dan casi los mismos resultados que las tiras de ensayo obte-
nidas en el Ejemplo 1.

25 Los ejemplos que siguen ilustran la preparación de las
tiras de ensayo útiles para identificar y determinar sacári-
dos y la hemorragia oculta en la orina, respectivamente.

Ejemplo 4

30 Las distintas disoluciones de impregnación se obtienen
utilizando la composición siguiente:

	<u>Composición</u>	<u>Cantidades</u>
1	Mezcla de los productos de reacción a partir de o-tolidina o bencidina (como se preparan en los Ejemplos de Referencia)	20-100 mg
	Etanol de 95 %	4-6 ml.
5	Disolución tampón de ácido cítrico. 0,1-0,5 M (pH: 4-6)	2-3 ml
	Oxidasa de glucosa	500-2.000 unidades
	Tartrazina	0,5-15 mg
	Tween 20 (10%)	0-0,1 ml
10	Peroxidasa	1-10 mg

Disoluciones que tienen dichas composiciones se preparan, por ejemplo, disolviendo 60 mg de una mezcla de dichos productos de reacción en 6 ml de etanol, añadiendo a ésta 3 ml de la disolución tampón; disolviendo una mezcla de 1.000 unidades de oxidasa de glucosa, 1 mg de peroxidasa y 10 mg de tartrazina en 4 ml de tampón; mezclando las dos disoluciones citadas una con otra; y añadiendo a esto 0,1 ml de Tween 20.

Para propósitos comparativos se preparan de la misma manera que anteriormente disoluciones que contienen o-tolidina o bencidina sin reaccionar.

A continuación se prepara una tira de ensayo sumergiendo un soporte tal como un papel de filtro en dicha disolución y secando el papel impregnado fluyendo una corriente de aire que tiene una temperatura de 70°C durante 3 minutos. Las tiras de ensayo preparadas como se indicó son como sigue:

Tira de ensayo A: Esta tira de ensayo contiene los productos de reacción obtenidos en el Ejemplo de referencia 1 o una mezcla de los productos de reacción obtenidos en el Ejemplo de referencia 2.

1 Tira de ensayo B: La tira de ensayo contiene la o-to-
lidina que no ha reaccionado con ningún agente de alquila-
ción y se utiliza como control.

5 Tira de ensayo C: Esta contiene una mezcla de deriva-
dos metilados de bencidina obtenidos en el Ejemplo de refe-
rencia 3 o en el Ejemplo de Referencia 4.

Tira de ensayo D: La tira de ensayo contiene bencidi-
na no tratada y se emplea como control.

10 Estas tiras de ensayo se prueban sumergiendo cada una
de ellas en una disolución que se ajusta de modo que una
cantidad particular de orina de un adulto humano tenga una
cantidad de glucosa según se describe en la tabla que sigue
y sacándola de la muestra, líquida inmediatamente después que
15 se ha sumergido en él. A continuación el tono de color de
las tiras de ensayo sometidas a prueba se compara en 60 a
120 segundos y se determina por referencia al índice de mati-
ces de color patrón. Los resultados se muestran como sigue:

Tabla 3

Tiras de ensayo	Concentración de glucosa, tanto por cien			
	0,1	0,25	0,5	2,0
20 A	Verde ama- rillento	Verde	Azul ver- doso	Azul os- curo
B	Verde ama- rillento	Pardo ver- doso	Pardo ver- de azulado	Pardo azu- lado
C	Verde am- rillento	Verde	Azul ver- doso	Azul
25 D	Pardo ama- rillento	Pardo ver- doso	Pardo ver- doso oscu- ro	Azul par- duzo

 Nota: Las tiras de ensayo B y D se vuelven pardas in-
mediatamente después que se extraen de la muestra de ensayo.

30 Con las mismas tiras de ensayo anteriores se lleva a
cabo un ensayo utilizando una muestra de suero que contiene

1 glucosa en cantidad de 0 a 120 mg por dl. Los resultados del ensayo son casi los mismos que anteriormente.

Ejemplo 5

5 Se preparan distintas disoluciones de impregnación que contienen una combinación preferida de la siguiente composición:

	<u>Composición</u>	<u>Cantidades</u>
	Mezcla de los productos de la reacción a partir de o-tolidina (obtenida en el Ejemplo de Referencia 1 o 2)	20-100 mg
10	Etanol de 95 %	4-8 ml
	Disolución tampón de ácido cítrico 0,2 M pH 5,5	3-7 ml
	Tartrazina	0,1-0,5 mg
	Tween 20 al 10 %	0,05-0,5 ml

15 A una disolución de 60 mg de la citada mezcla de productos de reacción en 6 ml de etanol y 5 ml de la disolución tampón se añaden 0,2 mg de tartrazina y 0,05 ml de Tween 20 en este orden. Las tiras se preparan del mismo modo que en el Ejemplo 4.

20 Se preparan del mismo modo que anteriormente como disolución de control una disolución en la que se emplea o-tolidina sin tratar en vez de la citada mezcla de los productos de reacción

25 A continuación se comprueban las tiras de ensayo por el mismo procedimiento que en el Ejemplo 4. De estas se someten al ensayo la tira de ensayo que consta de un papel de filtro de 5x40 mm y contiene una mezcla de los productos de reacción obtenida en el Ejemplo de referencia 1 (citada mas abajo como tira de ensayo E) y otra que tiene las mismas dimensiones que la tira de ensayo E pero que contiene o-tolidi-

30

1 na sin reaccionar en vez de la citada mezcla (citada mas a-
bajo como tira de ensayo F): Cada una de las tiras de ensa-
yo se sumerge en una muestra líquida que se ajusta por adi-
ción de sangre humana a orina de un adulto humano sano de
5 modo que tenga una concentración como la descrita en la ta-
bla de mas abajo. A continuación las tiras de ensayo se ex-
traen de la muestra líquida inmediatamente después de su-
mergírlas y se gotea sobre su superficie una gota de una di-
solución de peróxido de hidrógeno al 3 por cien. Se determi-
10 na el tono de color de las tiras de ensayo 30 segundos des-
pués de la adición a las mismas de la disolución de peróxi-
do de hidrógeno. Los resultados se muestran como sigue:

Tabla 4

Tira de ensayo	Concentración de hemorragia oculta				
	1/100.000	1/20.000	1/10.000	1/2.000	1/1.000
E	Verde ama- rillento	Verde claro	Azul claro	Verde oscuro	Azul oscuro
F	Verde ama- rillento claro	Verde ama- rillento	Azul claro	Azul	Azul oscuro

20 Nota: El tono de color de la tira de ensayo E es mas
vivo y claro que el de la tira de ensayo F, de modo que se
hace mas fácil distinguir una concentración de la otra aun
si el color es de la misma categoría.

Ejemplo 6

25 Se prepara una tira de ensayo que consta de una hoja
de papel y las alquil o-tolidinas de la presente invención
para utilizar en el examen de hemorragia oculta en heces
sólidas.

30 Se prepara de manera ordinaria una disolución de im-
pregnación que tiene la composición siguiente:

1	<u>Composición</u>	<u>Cantidades</u>
	Mezcla de los productos de reacción obtenidos en el Ejemplo de Referencia 1	240 mg
	Alcohol etílico	13 ml
5	Guayaco	40 mg
	Fosfato monopotásico	180 mg
	Fosfato bisódico	340 mg
	Tartrazina	2 mg
	Agua	16 ml

10 Como disolución de impregnación sustitutiva se puede emplear la mezcla de los productos de reacción de las alquil ortotolidinas o benciđinas sin separar de la mezcla de reacción. Se prepara una disolución que contiene dicha mezcla:

15 1,0 g de o-tolidina se disuelve a 50°C en 20 ml de alcohol metílico (o alcohol etílico); se añaden 0,6 g de sulfato de dimetilo; y la mezcla resultante se deja en reposo durante 30 a 60 minutos a temperatura ambiente y se diluye con alcohol etílico a un volumen total de 54 ml. La disolución de impregnación tiene la siguiente composición:

20	<u>Composición</u>	<u>Cantidades</u>
	Disolución citada que contiene alquil o-tolidinas	13 ml
	Guayaco	40 ml
	Fosfato disódico potásico	180 mg
	Fosfato disódico	340 mg
25	Hidróxido sódico	0-46 mg
	Tartrazina	2 mg
	Agua	16 ml

30 Se preparan las tiras de ensayo por impregnación de un soporte tal como papel en cada una de las disoluciones de impregnación citadas y a continuación se seca el soporte

1 impregnado sin exponerlo a la luz.

Como control, se preparan también tiras de ensayo de la misma manera excepto que la disolución de impregnación se ajusta de modo que contenga derivados sin alquilación en las citadas disoluciones de impregnación en vez de los alquil derivados.

Las tiras de ensayo así preparadas se prueban para la reacción de coloración utilizando una disolución acuosa que contiene 5 por cien en peso de peróxido de hidrógeno y 35 por cien en peso de alcohol. Los resultados del ensayo muestran que la tira de ensayo de la presente invención es sensible a muestra de sangre humana fresca que se ha diluido a una concentración de 1/100.000, mientras que la tira de ensayo control es sensible hasta una dilución de 1/20.000 de la muestra de sangre con agua.

Ejemplo 7

Este ejemplo ilustra una tira de ensayo de la presente invención que es útil para el examen de galactosa en orina.

Se prepara una tira de ensayo sumergiendo una hoja de papel de filtro de dietilaminoetil celolosa Whatman DES1) en una disolución de impregnación y secándola a 40°C como primera etapa y sumergiendo el papel seco en otra disolución de impregnación y secándola a la misma temperatura como segunda etapa. La tira de ensayo así preparada se guarda a una temperatura baja sin que le dé la luz directa.

La disolución de impregnación para la primera etapa tiene la composición siguiente:

	<u>Composición</u>	<u>Cantidades</u>
30	Disolución tampón de ácido cítrico	0,3 M

1	(pH: 5,0)	6 ml
	Metil o-tolidinas	20 mg
	Alcohol etílico	6 ml
	Tartrazina	1 mg

5 La disolución siguiente se emplea para la segunda etapa:

	<u>Composición</u>	<u>Cantidades</u>
	Oxidasa de galactosa	1.500 unidades
	Peroxidasa	6 mg
10	Disolución tampón de fosfatos 0,1 M (pH: 7,0)	6 ml

Se encuentra que las tiras de ensayo son capaces de identificar semicuantitativamente galactosa en orina en una cantidad que oscila de 50 a 1.000 mg por dl.

15 Ejemplo 8

Este ejemplo describe una tira de ensayo que contiene las alquil o-tolidinas que se utilizan para la identificación de galactosa en sangre.

20 Se prepara una tira de ensayo de la misma manera que en el Ejemplo 7 excepto que se utilizan dos disoluciones de impregnación que tienen composiciones diferentes.

La composición de la disolución de impregnación para la primera etapa es como sigue:

	<u>Composición</u>	<u>Cantidades</u>
25	Disolución tampón de ácido ftálico 0,3 M (pH: 6,5)	2,5 ml
	Alcohol polivinílico	20 mg
	Oxidasa de galactosa	1.500 unidades
	Tartrazina	0,4 mg
	Peroxidasa	1 mg

30 La disolución de impregnación utilizada en la segunda

1 etapa tiene la composición siguiente:

	<u>Composición</u>	<u>Cantidades</u>
	Metil o-tolidinas	80 mg
	Guayaco	100 mg
5	Alcohol etílico	13 ml

La tira de ensayo así preparada se comprueba de la misma manera que anteriormente al ensayar glucosa en sangre y se encuentra que identifica semicuantitativamente galactosa en sangre en una concentración de 40 a 500 mg por dl.

10 También se encuentra que una tira de ensayo que se prepara de la misma manera pero empleando o-tolidina en vez de la citada mezcla de los derivados alquílicos es inferior en el análisis semicuantitativo de galactosa en sangre a la preparada como antes de acuerdo con la presente invención.

15 En resumen, la Patente de Invención que se solicita deberá recaer sobre las siguientes:

REIVINDICACIONES

20 1. Un método para la producción de un aparato de diagnóstico, que comprende la impregnación de un soporte poroso absorbente en una disolución que contiene un derivado de diamino bifenílo sustituido con por lo menos un grupo de alquilo que tiene de uno a cuatro átomos de carbono en cualquiera de sus grupos amino, separar el soporte de la disolución y secarlo,

25 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el derivado alquil diamino bifenílo es N-metil-, N,N'-dimetil-, N,N,N'-trimetil o N,N,N'-N'-tetrametil-o-tolidina.

30 3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el derivado alquil diamino bifenílo es N-etil-,N,N-die-

1 til-, N,N'-dietyl-, N,N,N'-trietil-, o N,N,N',N'-tetraétil-
o-tolidina.

4. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el
que el derivado alquil diamino bifenilo es N-metil-, N,N-
5 dimetil-, N,N'dimetil-, N,N,N'-trimetil-o-N,N,N-,N'-tetrametil
bencilina.

5. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el
que el derivado alquil diamino bifenilo es N-etil-, N,N-die-
til, N,N'-dietyl-, N,N,N'-trietil-, o N,N,N',N'-tetrametil
10 bencilina.

6. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el
que se añade una oxidasa de sacárido, peroxidasa y un guayaco

7. Un método de acuerdo con la reivindicación, 6, en el
que la oxidasa de sacárido es oxidasa de glucosa u oxidasa
15 de galactosa.

8. Un método de acuerdo con la reivindicación 6, en el
que el guayaco es ácido α -guayacónico o ácido β -guayacónico.

9. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el
que se añade un tampón, un tensoactivo, un colorante regula-
20 dor de fondo y/o un agente para aumentar la viscosidad.

10. Un método de acuerdo con la reivindicación 9, en el
que el tampón es una disolución acuosa de ácido ftético, un
fosfato o ácido cítrico.

11. Un método de acuerdo con la reivindicación 9, en el
25 que el colorante regulador de fondo es tartrazina.

12. Un método de acuerdo con la reivindicación 9, en el
que el agente para aumentar la viscosidad es un protector de
coloide.

13. Un método de acuerdo con la reivindicación 12, en
30 el que el protector de coloide es es polialquilen glicol o

1 alcohol polivinílico.

5 14. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el soporte poroso absorbente es papel de filtro, papel de filtro endurecido, material de vidrio poroso aglutinado o material plástico poroso aglutinado.

10 15. Un método según la reivindicación 1, caracterizado porque el soporte poroso, absorbente se impregna en una solución que contiene una oxidasa de sacárido y peroxidasa, separar el soporte de la disolución y secarlo previamente a la impregnación en una solución que contiene un derivado de diamino-bifenilo alquilatado.

15 16. Un método según la reivindicación 15, caracterizado porque la disolución contiene un derivado diamino-bifenilo alquilatado que contiene un guayaco.

17 Se reivindica por último como objeto sobre el que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita: UN METODO PARA LA PRODUCCION DE UN APARATO DE DIAGNOSIS.

20 Todo conforme queda descrito y reivindicado en la presente memoria descriptiva que consta de veintinueve páginas mecanografiada.

Madrid, 9 Enero de 1975

BERNARDO UNGRIA

P.P.



25

30