



19 ES	21	NUMERO	448871	A1
	22	FECHA DE PRESENTACION	15-6-76	

P. - 63.095
PATENTE DE INVENCION BD-9940-SP

30 PRIORIDADES:	32 FECHA	33 PAIS
31 NUMERO		
587.264	16-6-75	EE.UU.
27 ABR. 1977		

47 FECHA DE PUBLICIDAD	20 CLASIFICACION INTERNACIONAL	42 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	G 0601 N 1101 A	

54 TITULO DE LA INVENCION
"UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE UNA COLUMNA DE ADSORCION"

71 SOLICITANTE (S)
UNION CARBIDE CORPORATION

DOMICILIO DEL SOLICITANTE
270 Park Avenue, Nueva York, Nueva York, 10017, Estados Unidos de América

72 INVENTOR (ES)
Arlene Joan Gimovsky

73 TITULAR (ES)

74 REPRESENTANTE
D. FERNANDO DE ELZABURU MARQUEZ

La presente invención se refiere en general a columnas de adsorción. Desde un punto de vista la presente invención se refiere a columnas de adsorción que son útiles en radioinmunoensayos. En otro punto de vista, la presente invención se refiere a un procedimiento para la preparación de las columnas.

Actualmente hay una demanda por dispositivos analíticos rápidos y automáticos, debido a los requerimientos siempre en aumento de estudios micro-analíticos en la investigación bioquímica, análisis clínicos de rutina, estudios enzimáticos y lo similar. Se están poniendo a disposición de esa demanda dispositivos analíticos de estaciones múltiples que utilizan un campo centrífugo, para el rápido microanálisis de una amplia variedad de líquidos tales como los fluidos corporales, por ejemplo, suero sanguíneo, productos alimenticios, y los similares.

En tales dispositivos con frecuencia resulta crítico que una serie de reacciones sean iniciadas exactamente al mismo tiempo para poder obtener resultados dignos de confianza. Esto es de particular importancia para los estudios enzimáticos, en los cuales se pueden tomar, con frecuencia, mediciones solamente después que la reacción haya proseguido por unos pocos segundos o minutos.

Algunos de estos dispositivos pueden utilizar columnas de adsorción para separar los componentes a ser ana

lizados. Sin embargo, cuando se utilizan columnas de adsorción en dispositivos que emplean un campo centrífugo, tienen el problema adicional del agrietamiento o compactación a causa de la pérdida de agua intersticial. Dado que es posible efectuar simultáneamente numerosos análisis, las columnas deben ser baratas, uniformes y fáciles de usar.

Por consiguiente, uno o más de los siguientes objetos serán logrados mediante la práctica de la presente invención. Es un objeto de la misma proveer columnas de adsorción que sean útiles en los sistemas de radioinmunoensayo. Otro objeto de la presente invención es el de proveer columnas que son utilizadas en un sistema analítico que empleen la fuerza centrífuga para mezclar y transferir los reactivos. Otro objeto de la presente invención es el de proveer columnas de adsorción que se puedan almacenar de manera segura hasta que se las deba utilizar. Otro objeto es el de proveer columnas que contengan un sustrato de gel uniforme. Otro objeto adicional es el de proveer un procedimiento para la preparación de las columnas. Otro objeto es el de proporcionar un procedimiento que vuelvan hidrófilos a los discos de retención. Un objeto adicional es el de proporcionar un procedimiento para cargar y desgasificar la columna.

Estos y otros objetos resultarán fácilmente evidentes a quienes son expertos en esta técnica a la luz de las enseñanzas establecidas en esta memoria descriptiva y en los

dibujos adjuntos.

El único dibujo es una vista en corte de la columna de adsorción de la presente invención. La columna 10 puede consistir de casi cualquier material inerte, tal como el vidrio, el plástico y lo similar. Un material preferido es el poliestireno que es claro y transparente y no se rompe con facilidad. La columna 10 es de aproximadamente 10 centímetros de largo y tiene un cilindro externo con un diámetro de aproximadamente un centímetro. Puede contener aproximadamente 2,5 mililitros de líquido. La punta 12 tiene un diámetro interno de aproximadamente un milímetro y el depósito superior 14 tiene un diámetro externo de aproximadamente dos centímetros. El tapón de la punta 16 y el tapón 18 sellan los extremos respectivos de la columna. El disco de retención 20 y el disco superior 22 están comprendidos de un material, preferiblemente plástico tal como el polietileno, que ha sido convertido en hidrófilo según se describirá más adelante. Dentro del cilindro de la columna está contenido gel 24, entre los dos discos. Las columnas que se pueden emplear son las suministradas por la Sorstedt Company, bajo la marca registrada "Sorpette".

En su aspecto más amplio, el procedimiento de acuerdo con la presente invención se relaciona a columnas de adsorción útiles en radioinmunoensayos y a un procedimiento para su preparación. Las columnas son preparadas mediante

un procedimiento que comprende las etapas de:

(1) insertar en una columna cilíndrica que está abierta por ambos extremos y tiene una porción media de diámetro esencialmente uniforme, una porción de base que se ahúsa hasta un diámetro menor que dicha porción media, y una porción superior que es de diámetro mayor que dicha porción media, un primer miembro de retención hidrófilo poroso de manera que el primer miembro de retención esté dispuesto dentro de dicha columna en un punto en que la porción media se estrecha hasta el diámetro menor,

(2) llenar la columna con una suspensión acuosa de un medio de separación capaz de retener selectivamente uno o más componentes que son llevados a la columna,

(3) insertar en la columna un segundo miembro de retención hidrófilo poroso de manera que el segundo miembro de retención esté dispuesto dentro de dicha columna en un punto superior al medio de separación, aproximadamente donde la porción media se ensancha hasta el diámetro mayor,

(4) hacer entrar suficiente agua a la parte superior de la columna para impedir que se seque el medio de separación, y

(5) colocar miembros de sellado removibles en ambos extremos de la columna.

La preparación de las columnas de acuerdo con la presente invención involucran diversos factores que tie

nen importancia para la obtención de resultados aceptables. En las columnas de adsorción a ser utilizadas en dispositivos que emplean un campo centrífugo, es importante que el medio de separación se comporte como la resistencia limitadora del flujo. Por lo tanto, los retenes de la parte superior y la inferior de la columna deben dejar pasar líquido a una velocidad superior que la del medio de separación. No obstante, el tamaño de los poros del retén inferior debe ser menor que el tamaño de las partículas del medio retenido. Las partículas separadas no deben ser forzadas a través del material retenedor en el campo centrífugo. De manera similar, el tamaño de los poros del retén superior debe ser suficientemente pequeño para retener al medio de separación durante el almacenamiento o el tránsito, durante los cuales podría quedar invertido.

El material utilizado como retén de columna debe poder soportar un campo centrífugo de por lo menos alrededor de cinco veces la gravedad sin agrietarse ni doblarse. Se puede emplear una variedad de materiales, aunque el de mayor preferencia, con mucho es el polietileno poroso de elevada densidad. Otros materiales que tienen menor preferencia son el nylon, teflón, copolímeros de polietileno, tales como el copolímero polietileno-polipropileno, pues el material seleccionado para los retenes debe tener un flujo inherente de ingreso mayor que el del medio de separa-

ción. Es por este motivo que el uso del polietileno preferido requiere que sea convertido a estado hidrófilo como se indicará más adelante.

El material preferido para utilizarlo como retenes, según lo indicado, es el polietileno poroso de alta densidad de aproximadamente 1,59 milímetros de espesor y que tiene una porosidad de hasta 30 micrones y un índice durométrico de aproximadamente 80 hasta aproximadamente 100.

El ejemplo 1 de este descubrimiento describe la preparación de los retenes o discos. El tratamiento se puede realizar antes o después de cortar la lámina de polietileno. Si bien el oxidante preferido es el ácido crómico, también se pueden emplear otros agentes de oxidación. Por ejemplo, es posible emplear el ácido nítrico, el ácido perclórico, el permanganato de potasio, el ozono, o lo similar. Si se lo desea, también se puede emplear la oxidación térmica.

El margen de tamaño de partícula del medio de separación es otro factor importante a fin de asegurar columnas de adsorción de flujo rápido. Si en las columnas está presente un exceso de partículas finas con relación al tamaño medio de partícula, los caudales de flujo disminuirán sustancialmente. Recíprocamente, las columnas que contienen una abundancia de partículas mayores en relación con el tamaño medio de partículas perderán agua intersticial rá-

pidamente debido a la menor capilaridad. Este efecto apresura el agrietamiento de las columnas rellenas cuando no están completamente sumergidas en agua, es decir durante la rotación en el campo centrífugo. Por consiguiente, el margen del tamaño de las partículas utilizadas en las columnas debe ser suficientemente estrecho como para permitir la formación de lachos uniformes. Un margen de tamaños que sea demasiado amplio con frecuencia puede dar como resultado una distribución desigual en cada columna y perjudicará la resolución separatoria.

En la práctica, se ha observado que el medio de adsorción empleado en el dispositivo centrífugo ya mencionado debe tener un tamaño de partícula medio dentro del margen de aproximadamente 20 hasta aproximadamente 30 micrones. No debe haber más del 10 por ciento de las partículas del medio fuera de este margen.

Aunque se puede emplear una variedad de medios de separación, esta columna preferida preparada mediante el procedimiento de la presente invención contiene medios de separación compuestos de geles, combinaciones de geles, resinas de intercambio iónico, y lo similar. También se puede emplear carbón vegetal en polvo o finamente perlado, pero actualmente, esto es menos preferido. Un medio particularmente preferido es un gel vendido por Pharmacia bajo la marca registrada Sephadex-G-25 Fine y, en el cual aproxima-

mente el 90 por ciento de las partículas tienen un tamaño de aproximadamente 20 a aproximadamente 80 micrones.

Se ha observado que las columnas pueden ser preparadas a partir de este gel, tal como es recibido. No es necesaria la eliminación de partículas finas, mientras se empleen condiciones que liguen esta mezcla de gel-agua sin subdividir ulteriormente las partículas de gel. ⁴ Este respecto, se observó después de mucha experimentación que el uso de un agitador magnético era inconveniente dado que tendía a subdividir aun más a las partículas. La solución de gel resultante no era uniforme y cuando las columnas eran utilizadas en radioinmunoensayos era difícil obtener resultados reproducibles. Se comprobó que el uso de un agitador colgante era preferible y proporcionaba suspensiones de gel de tamaño uniforme de partículas.

Una característica ulterior que tiene importancia para la preparación de las columnas de acuerdo con la presente invención es la relación de medio de separación a agua. La relación es importante para asegurar volúmenes de suspensión uniformes en cada columna, asegurando con esto una capacidad separatoria uniforme. En la práctica, una relación del medio de separación al agua desde aproximadamente 1:1,5 a 1,5:1 se ha comprobado que es satisfactoria.

El gel de estaño preparado de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención no debe ser refrigerado

puesto que a bajas temperaturas es difícil extraer el aire que pudiera haber sido atrapado.

Como se indicó previamente, las columnas de adsorción de acuerdo con esta invención son particularmente útiles en los radioinmunoensayos, particularmente en aquellos que emplean la fuerza centrífuga para mezclar, transferir y separar los reactivos y/o productos de reacción. Por supuesto, las columnas se pueden emplear en otros procedimientos analíticos que no utilizan fuerza centrífuga, pero no ofrecen ninguna ventaja sobre las columnas que se hallan disponibles en el comercio. Debido al hecho de que la suspensión gel en las columnas de acuerdo con la presente invención están sujetas a fuerzas centrífugas es importante que no se produzca resquebrajamiento ni compactación debida a pérdida de agua intersticial de las columnas. Además, es igualmente importante que la velocidad de flujo del líquido a través de la suspensión gel mientras que ha balle bajo tal fuerza sea esencialmente uniforme para todas las columnas de manera que la adsorción o la desadsorción del componente o los componentes que se debe medir sea uniforme. Todas estas características sufren la influencia del procedimiento por el cual se preparan las columnas.

Un dispositivo analítico particularmente preferido en el cual se pueden emplear las columnas de adsorción de acuerdo con la presente invención es el revelado

en la solicitud copendiente de patente de Estados Unidos de América No. de serie 468.649 titulada "Method and Apparatus For Assaying Liquid Materials" (Método y Aparato para Ensayo de Materiales Líquidos) presentada el 10 de mayo de 1974 y dedida al mismo cesionario de la presente invención. Tal como se revela allí, el dispositivo es un analizador de estaciones múltiples que utiliza un campo de centrifugación para mezclar, transferir y separar reactivos y/o productos de reacción. El dispositivo puede ser controlado para permitir el mezclado parcial de componentes, dar tiempo para que se produzca la incubación y una separación y medición simultánea de los componentes. Por ejemplo, la columna de adsorción de acuerdo con la presente invención es utilizada convenientemente en este dispositivo para el radioinmunoensayo de una variedad de composiciones tales como los fluidos corporales, por ejemplo, el suero sanguíneo y lo similar. Por ejemplo, las columnas de adsorción preparadas de acuerdo con los procedimientos de los ejemplos 1 a 4 de esta memoria descriptiva pueden ser utilizados para el microanálisis de la digoxina, triyodotironona (T-3), tetrayodotironina (T-4), absorción de T-3, cortisol y lo similar.

Los ejemplos siguientes son ilustrativos:

Ejemplo 1

Preparación de discos para columna

Se cortaron láminas de polietileno de aproxi-

madamente 1,59 milímetros de espesor y con una porosidad de 25 ± 3 micrones, en discos de 7,8 a 8,0 milímetros de diámetro externo. Posteriormente los discos fueron sumergidos en acetona y sometidos a remolinos para extraer la grasa que pudieran tener. Mientras estaban en el baño de acetona, se aplicó vacío e inmediatamente después los discos fueron sumergidos en agua y enjuagados utilizando aproximadamente un litro de agua para cada 500 discos. Mientras estaban en el agua, se aplicó vacío nuevamente. Los discos fueron transferidos a un recipiente parcialmente lleno de un fuerte oxidante para convertirlos del estado hidrófobo al estado hidrófilo. El oxidante era una solución de ácido crómico preparada disolviendo de 8 a 10 gramos de dicromato de potasio en 35 a 50 mililitros de agua destilada o desionizada en un vaso con pico de 1500 a 2000 mililitros seguido por la adición gradual con agitación de un litro de ácido sulfúrico concentrado. Los discos fueron dejados que permanecieran en contacto con el ácido crómico hasta que tomaron color verde; habitualmente esto lleva de 5 a 10 minutos. Posteriormente, los discos fueron retirados del ácido y lavados abundantemente con agua destilada hasta que su color se volvió blanco o crema. Esta etapa de lavado habitualmente lleva de 5 a 10 minutos. Los discos se hallan suficientemente enjuagados cuando el pH del agua de enjuague y el agua de entrada son iguales. El estado hi-

drófilo de los discos se verifica colocando un disco seco en una columna de plástico vacía, asentándolo y llenando la columna con agua. La columna debe comenzar a gotear inmediatamente, indicando que la conversión del estado hidrófobo al hidrófilo es completa. Los discos se almacenan bajo agua destilada o desionizada.

Ejemplo 2

Preparación de suspensión gel

Una cantidad medida, generalmente de 40 a 50 gramos, de un gel de dextrano reticulado, vendido bajo la marca registrada "Sephadex G-25 Fine" por Pharmacia Fine Chemicals Company, y que tiene un tamaño de perlado de 20 a 30 micrones fue transferida a un vaso con pico graduado de Pyrex de pared gruesa. Se agregó agua, destilada o desionizada en una cantidad equivalente a 6 a 8 veces el peso del gel. Después la mezcla es agitada hasta que la suspensión sea uniforme. La mezcla es luego colocada en un baño de agua hirviendo durante un período de al menos una hora. Después de dejar enfriar la suspensión se ajusta la relación volumétrica del nivel del líquido al lecho de gel de manera que la relación final sea de aproximadamente 1:0,8. Posteriormente, por cada 1000 mililitros de volumen de la suspensión se agrega 0,10 gramo del agente bacteriostático, por ejemplo Thimerosal.

Ejemplo 3

Preparación de suspensión gel

Una cantidad medida, generalmente de 40 a 50 gramos, del gel de dextrano reticulado empleado en el ejemplo 2 fue transferida a un vaso con pico granulado de Pyrex de pared gruesa. Se agregó agua, destilada o desionizada, en una cantidad equivalente a 6 a 8 veces el peso del gel; luego se agita la mezcla hasta que la suspensión quede uniforme. La mezcla entonces se deja reposar durante la noche a temperatura normal de interior. La relación volumétrica de nivel de líquido a lecho de gel fue ajustada de modo que la relación final sea aproximadamente de 1:0,8. Después, por cada 100 ml de volumen de suspensión se agrega 0,10 gramo del agente bacteriostático Thimerosal. Antes de utilizarla, la suspensión es desgasificada para extraer todas las burbujas de aire.

Ejemplo 4

Preparación de la columna

Columnas de poliestireno con un diámetro exterior del cilindro de aproximadamente 9 milímetros y una longitud de alrededor de 10 centímetros y suministradas por la Walter Sarstedt Company, fueron colocadas verticalmente en un soporte para tubos de ensayo contenido en una bandeja. Cada columna se enjuagó primero con agua destilada o desionizada. Se insertaron discos de polietileno hidrófilos,

preparados conforme al Ejemplo 1 en la sección inferior del cilindro principal de las columnas con una herramienta de asentamiento y se los humedeció con agua destilada. La suspensión gel, preparada de la manera establecida en los Ejemplos 2 ó 3 fue mezclada por medio de un agitador colgante de velocidad variable a una velocidad moderada de 500 a 750 rpm para mantener una mezcla completamente homogénea. Posteriormente, se administraron 5,0 mililitros del gel en cada una de las columnas prelavadas. La suspensión gel se permitió que se asentara de modo que el nivel del lecho resinoso fuera de aproximadamente 1,50 milímetros por encima del cilindro principal de la columna. Por lo menos se mantienen de uno a dos mililitros de agua por encima del gel antes de insertar el disco superior. Se colocó un segundo tapón hidrófilo preparado como en el ejemplo 1 en la sección superior del cilindro principal con una herramienta de asentamiento; la porción de cada columna por encima del disco fue enjuagada a fondo con agua para remover el exceso de gel. Posteriormente, se agregaron a cada columna 3,0 a 4,0 mililitros del agente de abultamiento de gel y se dejó gotear al reactivo a través de la columna hasta que no quedó líquido sobre el disco superior. Las columnas fueron entonces almacenadas en agua destilada que contenía 0,01 por ciento volumétrico de un agente bacteriostático tal como el Thimerosal.

Aunque la invención ha sido ilustrada por los ejemplos precedentes, no debe deducirse que se halla limitada a los materiales empleados en los mismos, sino que más bien la invención se refiere al área genérica según se describe precedentemente. Pueden efectuarse diversas modificaciones de la misma sin apartarse del espíritu y el alcance de la presente invención.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la preparación de una columna de adsorción descartable útil para radioinmunoensayos, caracterizado por comprender la etapas de:

(1) insertar en una columna cilíndrica que se halla abierta por ambos extremos y que tiene una porción media de diámetro esencialmente uniforme, una porción inferior que se ahusa hasta un diámetro menor que el de dicha porción media, y una porción superior que es de mayor diámetro que dicha porción media, un miembro de retención primero, poroso e hidrófilo, de manera tal que dicho miembro de retención primero esté dispuesto dentro de dicha columna en un punto en donde dicha porción media se estrecha hasta dicho diámetro menor,

(2) llenar dicha columna con una suspensión acuosa de un medio de separación capaz de retener selectivamente uno o más componentes que son admitidos a dicha columna,

(3) insertar en dicha columna un segundo miembro de retención poroso e hidrófilo de manera que dicho segundo miembro de retención esté dispuesto dentro de dicha columna en un punto superior a dicho medio de separación aproximadamente en donde dicha porción media se ensancha hasta dicho diámetro mayor,

(4) admitir suficiente agua hasta la parte superior de dicha columna para impedir que dicho medio de separa

ción se seque, y

(5) colocar miembros de sellado removibles a ambos extremos de dicha columna.

2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque dicho medio de separación consiste en una suspensión de un gel en agua que tiene una relación de agua a gel de aproximadamente 1:1,5 a aproximadamente 1,5:1.

3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque el medio de separación está comprendido de una suspensión de un gel que tiene un tamaño promedio de partícula de aproximadamente 20 hasta aproximadamente 80 micrones.

4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque dicho medio de separación está comprendido de una suspensión de un dextrano reticulado en agua.

5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque dicho medio de separación está comprendido por una suspensión de acarbón vegetal en agua.

6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque dichos miembros de retención están comprendidos de un material de polietileno poroso.

7. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, caracterizado porque dichos miembros de retención tienen una porosidad de hasta aproximadamente 30 micrones.

5 8. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, caracterizado porque dichos miembros tienen una resistencia a la tracción, medida en un durómetro, de aproximadamente 80 hasta aproximadamente 100.

10 9. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque dichos miembros de retención han sido convertidos en hidrófilos por tratamiento con un agente oxidante.

15 10. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, caracterizado porque dicho agente oxidante es el ácido crómico.

20 11. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, caracterizado porque dichos miembros de retención antes de ser puestos en contacto con dicho agente oxidante son lavados consecutivamente en acetona y agua mientras se hallan bajo vacío.

12. El procedimiento para la preparación de una columna de adsorción.

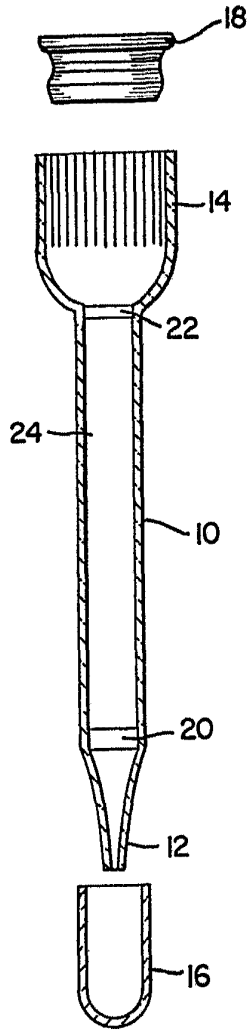
25 Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede, representado en los dibujos que se acompañan y para los fines que se han especificado.

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

Madrid, 22. III. 1976

P.A.

Fernando de Elzaburu
Por Poder.



Fernando de Elizaburu
Por Poder.