

20 SET. 1978

ES

NUMERO 40/093 A3



ESPAÑA

Concedido el Registro de acuerdo con los datos que figuran en la presente descripción y según el contenido de la Memoria adjunta.

FECHA DE PRESENTACION

PATENTE DE INTRODUCCION

47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL G01N
------------------------	--

54 TITULO DE LA INVENCIÓN "Procedimiento para la obtención de un agente de diagnóstico para la investigación de la bilirrubina en líquidos fisiológicos".
--

55 PATENTE EXTRANJERA U OTRA FUENTE DE INFORMACION Patente francesa nº 73.29672 del 1-4-1974

71 SOLICITANTE (S) BOEHRINGER MANNHEIM GmbH.

DOMICILIO DEL SOLICITANTE Mannheim-Waldhof (Alemania)
--

72 INVENTOR (ES)

73 TITULAR (ES)

74 REPRESENTANTE Carlos Fernández Candelas

El presente invento concierne a un procedimiento para la obtención de un agente de diagnóstico mejorado para la investigación rápida y sensible de la bilirrubina en líquidos fisiológicos, caracterizado por el hecho de que contiene diésteres fosfóricos.

La investigación y la valoración de la bilirrubina en líquidos fisiológicos tienen una gran importancia para el diagnóstico de enfermedades del hígado y de la vesícula. Así es como en el caso de lesiones en el hígado y de atascos de la vesícula, la bilirrubina pasa muy rápidamente a la orina todavía antes que se eleve el contenido de bilirrubina del suero y aparezcan signos clínicos de amarilleamiento o ictericia. Además, puede distinguirse este tipo de amarilleamiento de la ictericia denominada "hemolítica" en la cual se puede observar un aumento del contenido de bilirrubina solamente en el suero y no en la orina.

Los métodos de investigación y de valoración de la bilirrubina en líquidos fisiológicos son conocidos desde hace tiempo. Los métodos más importantes son los que se basan en la formación de compuestos coloreados por copulación de sales de diazonio con bilirrubina. Existen un gran número de métodos similares desde el descubrimiento de la reacción diazoica en 1.883.

Se han introducido en estos últimos tiempos, cada vez más, métodos de análisis denominados ensayos rápidos, en la práctica medicinal y en laboratorios clínicos, como medios subsidiarios de diagnóstico. Esos medios de ensayos rápidos son dispositivos muy simples, frecuentemente pa

peles de ensayo, que permiten la investigación y la valoración semicuantitativas, rápidas y seguras, de sustancias - patológicas en el organismo, incluso realizadas por personas poco experimentadas, tales como los auxiliares sanitarios.

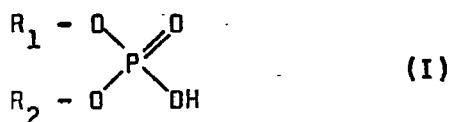
Así es como se ha descrito, por ejemplo, en la solicitud de patente alemana, puesta a inspección pública, número 1.102.444, una tableta reactiva que contiene una sal de diazonio y un ácido fuerte, que se coloca sobre una plg
quita humedecida con un líquido fisiológico y que, después
de humidificación con agua, revela la existencia de bilirrubina por aparición de un anillo violeta.

Es evidente que tal agente de diagnóstico es relativamente complicado de manipular. Para una amplia utilización en la práctica medicinal y al lado del lecho del enfermo, es deseable sin embargo disponer de ensayos rápidos que puedan ser leídos después de una simple inmersión en el líquido fisiológico a examinar. Este objetivo se logra del mejor de los modos mediante papeles de ensayo. Estos son soportes absorbentes que han sido impregnados con todos los reactivos necesarios para la reacción característica.

En la solicitud de patente alemana, publicada antes de examen, número 2.007.013 ya se han descrito papeles de ensayo para la investigación de la bilirrubina, que contienen como reactivos sales de diazonio. No obstante, según ensayos particulares, aquéllos no son totalmente satisfactorios desde el punto de vista de la velocidad de reacción.

y de la sensibilidad, lo cual pone en compromiso a su utilización en la práctica.

Se ha encontrado ahora con sorpresa que se puede aumentar considerablemente tanto la velocidad de reacción como la sensibilidad de los papeles de ensayo para la bilirrubina, si la copulación de las sales de diazonio se efectúa en presencia de diésteres fosfóricos que responden a la fórmula general I



en la que R_1 y R_2 son radicales alifáticos, cicloalifáticos, aralifáticos o aromáticos, eventualmente sustituidos.

Los radicales R_1 y R_2 son preferentemente idénticos, ya que tales diésteres fosfóricos son particularmente simples de preparar. Los radicales alifáticos R_1 y R_2 pueden ser de cadena recta o ramificada y contienen de 1 a 18 átomos de carbono, aumentando la actividad de los ésteres correspondientes primeramente con el número de los átomos de carbono, y disminuyendo luego a partir de 14 átomos de carbono, por razón del carácter cada vez más hidrófobo del éster. Como radicales cicloalcohilo, los más interesantes son los que contienen 5 a 8 átomos de carbono. Como sustituyentes de los radicales alifáticos o cicloalifáticos, pueden citarse átomos de halógeno, especialmente cloro y bromo, así como grupos nitro y grupos alcoxi inferiores, que llegan hasta 8 átomos de carbono.

Desde el punto de vista de la estabilidad de los papeles de ensayo, se prefieren los diésteres fosfóricos de la fórmula I en los cuales R_1 y R_2 son radicales aromáticos. Como radical aromático se recomiendan los arilos, -
5 sustituidos o no, con uno o varios núcleos tales como por ejemplo: fenilo, xililo, tolilo, clorofenilo, nitrofenilo o naftilo.

Como radicales aralifáticos se prefieren especialmente los radicales fenilo o naftilo, unidos por un puente
10 alcohileno de bajo peso molecular de 1, 2 ó 3 átomos de carbono en el radical ácido fosfórico.

El invento tiene como objeto la utilización de los diésteres fosfóricos que responden a la fórmula general I para la preparación de papeles o cintas de ensayo destinadas a la investigación de bilirrubina en líquidos fisiológicos.
15

El invento tiene igualmente como objeto los papeles o cintas de ensayo, destinados a su vez a la investigación de la bilirrubina en líquidos fisiológicos, que con
20 tienen una sal de diazonio susceptible de copulación con bilirrubina y una cantidad suficiente de ácido para asegurar la reacción de copulación y que están caracterizadas por un cierto contenido de diésteres fosfóricos que responden a la fórmula I.

25 Estos diésteres fosfóricos son en sí conocidos - (véase Method. der Org. Chem. Houben-Weyl, volumen XII/2, - páginas 226 y siguientes).

Los diésteres fosfóricos desarrollan sus efectos de aumento de la sensibilidad y de la velocidad de reacción ya para concentraciones de 2 a 3% en la solución de impregnación. Solamente los ésteres alcohólicos menos elevados necesitan una concentración un poco más elevada. Por esta razón los ésteres fosfóricos (I) no pueden reemplazar generalmente a los constituyentes ácidos necesarios para la reacción de copulación, de modo que para mantener un pH fuertemente ácido, es necesario añadir ácidos. A este efecto, pueden escogerse toda una serie de ácidos fuertes. Pueden mencionarse, por ejemplo, ácido oxálico, ácido cítrico, bisulfato de potasio y especialmente desde el punto de vista de la estabilidad de la sal de diazonio, ácido metafosfórico comercial que contiene eventualmente alrededor de 60% de su sal de sodio.

Los papeles de ensayo que contienen, además de las sales de diazonio, únicamente estos ácidos pero no diésteres fosfóricos, reaccionan con bilirrubina de modo netamente más lento y presentan una sensibilidad enteramente insuficiente para la valoración exacta de la bilirrubina.

No se sabe todavía exactamente a qué se debe esta acción de los diésteres de acuerdo con el invento, ya que aquí no se trata de ningún parentesco químico con los aceleradores de reacciones diazoicas que se utilizan con frecuencia, tales como cafeína o benzoato de sodio. Los diésteres fosfóricos de la fórmula I son particularmente activos en las reacciones según el invento y la notable actividad del éster difenílico de ácido fosfórico se opone de manera sor-

prendente al ácido fosfórico, al éster monofenílico de ácido fosfórico, al ácido bencenofosfórico y al éster trifenílico de ácido fosfórico, los cuales son totalmente inactivos.

5 En lo que concierne al empleo de las diversas sales de diazonio, ha de distinguirse si el papel de ensayo para la valoración de la bilirrubina es conveniente para el suero o para la orina o para ambos, es decir que se debe modificar consiguientemente la receta de preparación de los papeles de ensayo.

10 Para los papeles de ensayo destinados a la investigación de la bilirrubina del suero, se puede escoger prácticamente cualquier sal de diazonio, de la cual deba esperarse desde el punto de vista químico una reacción rápida y sensible. Estas son principalmente las sales de diazonio que contienen exclusiva o esencialmente grupos captadores de electrones. A este respecto pueden citarse especialmente como sustituyentes en la serie del benceno, los grupos nitro, halógenos, grupos carboxilo, radicales de ácidos sulfónicos, grupos nitrilo o grupos amonio cuaternario. Grupos donadores de electrones, tales como los grupos alcoxi, pueden también estar presentes como sustituyentes, pero en una pequeña proporción. Además, son igualmente convenientes derivados diazotados de naftilamina y de bencidina. Las sales de benceno-diazonio que no contienen exclusivamente más que sustituyentes donadores de electrones, tales como los grupos alcoxi y alcohilamino o arilamino, son menos con-

venientes, ya que éstos no reaccionan más que con relativa lentitud con la bilirrubina. La reacción coloreada va, según los sustituyentes, del rojo violeta al azul verde, y además se ha observado que los matices son cada vez más oscuros cuando crece la acidez del diéster de ácido fosfórico (efecto batóchromo). Si se desean preferentemente, por ejemplo, matices violeta oscuro, se escogen las sales de diazonio de 3-nitrobenceno o de 2,4,6-triclorobenceno.

Para una medición con ayuda de fotómetros de reflexión, son más favorables los matices azules o verdes. Se escogen en este caso, por ejemplo, las sales de diazonio de 4-halógeno-benceno o 4-nitrobenceno que proporcionan un matiz azul, o sales de 4-(5-metilbenzotiazolil-2)-bencenodiazonio que proporcionan un matiz verde.

Las sales de diazonio son introducidas ventajosamente en forma de fluoboratos cuya sensibilidad es bien conocida. Igualmente pueden utilizarse otras sales estables tales como arilsulfonatos y, especialmente, naftaleno-1,5-disulfonatos.

Las sales de diazonio pueden ser añadidas en proporciones de 0,02 a 2% y, preferentemente, de 0,05 a 5%.

Para los papeles de ensayo destinados a la valoración de la bilirrubina de la orina, numerosas sales de diazonio no pueden ser utilizadas ya que proporcionan con constituyentes todavía no identificados de la orina, reacciones coloreadas que dan matices que van desde el amarillo-pardo al pardo-rojo, que enmascaran algunas veces las débi-

les coloraciones específicas de la bilirrubina. Además, pueden producirse reacciones secundarias perturbadoras con el urobilinógeno que se encuentra también en la orina, en el caso de enfermedades del hígado o de la vesícula. La reacción coloreada produce primeramente el amarillo pero después de un breve intervalo de tiempo, a veces después de algunos segundos, se obtienen matices que van del violeta al azul que en la práctica no pueden ser distinguidos de los que son característicos de la bilirrubina.

10 Como reactivos para la investigación de la bilirrubina en la orina, se utilizan las sales de 2,6-dihalogenobencenodiazonio, especialmente los derivados 2,6-clorados o -bromados ya que éstos no manifiestan los inconvenientes antedichos más que en un grado muy pequeño. Para las sales, se escogen los aniones estabilizadores usuales tales como los fluoroboratos y los arilsulfonatos. Se obtienen papeles de ensayo los cuales, según la concentración de bilirrubina en la orina, viran del amarillo al rojo-violeta pasando por el anaranjado. La concentración de sal de diazonio puede estar comprendida aquí entre 0,02 y 0,5%, preferentemente entre 0,05 y 0,15%. Los papeles de ensayo para la investigación de la bilirrubina en la orina pueden ser utilizados naturalmente de igual modo para la misma investigación en el suero.

25 A los papeles de ensayo según el invento, para la investigación de la bilirrubina en el suero o en la orina, se pueden añadir ventajosamente estabilizadores de se-

les de diazonio, tales como por ejemplo fluoborato de sodio, sulfato de magnesio, metafosfato de sodio, arilsulfonatos y similares.

Además, éstos pueden contener agentes humectantes para mejorar la absorción del líquido por el papel de ensayo. Como agentes humectantes se pueden citar especialmente aquellos que en el medio fuertemente ácido, después de la inmersión en el líquido fisiológico, son todavía superficialmente activos, especialmente los agentes catiónicos (tales como por ejemplo cloruro de laurilpiridinio) o no iónicos (tales como triglicéridos de polietileno) y entre los aniónicos, principalmente sulfonatos y sulfatos (tales como por ejemplo dodacilbencenosulfonato).

Los agentes humectantes son añadidos a razón de 0,1 a 2%, y preferentemente de 0,2 a 0,5%.

Como disolventes o mezclas de disolventes para la impregnación, pueden utilizarse todos aquellos que no reaccionan con las sales de diazonio, en los cuales todos los constituyentes son solubles y que poseen un punto de ebullición poco elevado, con el fin de no quedar obligado a calentar a temperaturas demasiado elevadas a las sales de diazonio en el momento del secado. Se ha manifestado igualmente como ventajoso efectuar la impregnación con ciertos constituyentes en fases operatorias separadas.

Así, por ejemplo, pueden impregnarse primeramente con la mezcla de sal de diazonio y de ácido metafosfórico en agua y luego con éster difenílico de ácido fosfórico

disuelto en acetato de etilo o cloroformo.

Como soporte absorbente pueden utilizarse todos los tipos de papel de filtro, pero igualmente pueden escogerse otros soportes absorbentes, tales como papeles de fibras de vidrio o tejidos y velos de fibras artificiales resistentes a los ácidos, tales como por ejemplo las de poliéster o polipropileno. La expresión "papel de ensayo" aquí utilizada comprende todos estos materiales.

Los papeles de ensayo pueden ser cortados en largas cintas que se enrollen sobre bobinas, a partir de las cuales se cortan pequeños trozos a medida de las necesidades. Las cintas pueden también ser cortadas de antemano a la forma de pequeños rectángulos a los que se pega sobre la parte inferior de bandas de material plástico.

Es particularmente ventajoso insertar y sellar el papel de ensayo entre dos láminas de material plástico según la técnica expuesta en la solicitud de patente alemana, publicada antes de examen, 1.546.307 o entre una lámina de material plástico y una gasa o tamiz, según la técnica de la patente alemana 2.118.455, ya que en estas condiciones se evita el riesgo de que los reactivos sean eliminados por lavado en el momento de la inmersión en el líquido fisiológico.

El invento es descrito con más detalles en los ejemplos no limitativos siguientes:

EJEMPLO 1

Se impregna papel de filtro sucesivamente con las siguientes soluciones y se seca a 40°C.:

Solución 1:

5	fluoroborato de 2,6-diclorobencenodiazonio	0,08 g
	ácido metafosfórico	10,0 g
	ácido cítrico	3,0 g
	agua destilada	c.s. para : 100,0 ml

Solución 2:

10	éster difenílico de ácido fosfórico	5,0 g
	acetato de etilo	c.s. para: 100,0 ml

Por inmersión en orina que contiene bilirrubina, se obtienen dependiendo de la concentración, tras aproximadamente 10 a 20 segundos, coloraciones de rojo a rojo violeta del papel de ensayo. El límite de la sensibilidad se sitúa en los alrededores de 0,1 a 0,3 mg% de bilirrubina. Con suero que contiene bilirrubina, se obtienen matices rojo violeta de intensidad creciente, estando el umbral de sensibilidad en aproximadamente 0,4 a 0,6 mg%.

20 Se obtienen papeles de ensayo que reaccionan de manera similar, reemplazando la sal de diazonio antedicha por fluoroborato de 2,6-dibromo-bencenodiazonio,

Los papeles de ensayo de composición idéntica pero que no contienen éster difenílico de ácido fosfórico necesitan para el viraje 2 a 5 minutos, estando situado entonces el umbral de sensibilidad en alrededor de 1 a 2 mg % de

bilirrubina. Esto vale igualmente para los papeles de ensayo que en lugar del éster difenílico de ácido fosfórico contienen éster monofenílico de ácido fosfórico o éster trifenílico de ácido fosfórico o ácido bencenofosfórico.

5 EJEMPLO 2

Se obtienen papeles de ensayo análogos a los descritos en el ejemplo 1 reemplazando los ésteres difenílicos de ácidos fosfóricos por los ésteres fosfóricos siguientes:

- éster di-orto-tolílico de ácido fosfórico;
- 10 éster di-para-tolílico de ácido fosfórico;
- bis-(éster 3,5-xilílico) de ácido fosfórico;
- bis-(éster orto-clorofenílico) de ácido fosfórico;
- bis (éster para-clorofenílico) de ácido fosfórico;
- bis(éster para-nitrofenílico) de ácido fosfórico;
- 15 éster dibencílico de ácido fosfórico;
- éster dicitclohexílico de ácido fosfórico;
- éster dipentílico de ácido fosfórico.

EJEMPLO 3

Se impregna papel de filtro con las soluciones siguientes y se seca a 40°C.

Solución 1

sal de sodio (véase tabla)		0,3	g
ácido metafosfórico		10,0	g
mezcla de agua/metanol (4:1)	c.s. para:	100	ml

Solución 2

éster difenílico de ácido fosfórico	5,0 mg
sal sódica de ácido dodecilbencenosulfónico	0,5 g
acetato de etilo	c.s. para: 100,0 ml

5 Se obtienen papeles de ensayo que proporcionan en suero que contiene bilirrubina los siguientes virajes de matiz, estando comprendido el umbral de sensibilidad entre 0,3 y 0 6 mg%, dependiendo de la sal de diazonio.

Tabla 1

10	<u>Sal de diazonio</u>	<u>Matiz</u>
	fluoborato de 4-nitrobenceno-diazonio	azul
	naftaleno-2-sulfonato de 3-nitrobencenodiazonio	violeta
	naftaleno-1,5-disulfonato de 2-clorobenceno-diazonio	violeta-azul
15	fluoborato de 4-fluorobencenodiazonio	azul
	fluoborato de 2,5-diclorobencenodiazonio	violeta
	fluoborato de 2,4-dibromobencenodiazonio	azul
	fluoborato de 2,4,6-triclorobencenodiazonio	violeta
20	para-tolueno-sulfonato de 4-carboxibenceno-diazonio	azul
	ácido diazosulfanílico	azul
	fluoborato de bencidino-bis-diazonio	verde
	fluoborato de 4-(5-metilbenzotiazolil-2)ben-cenodiazonio	verde

25 EJEMPLO 4

Se impregna papel de filtro con las soluciones siguientes y se seca a 40°C.

Solución 1

	fluoborato de 2-clorobencenodiazonio	0,05	g
	ácido oxálico	10,0	g
	fluoborato de sodio	5,0	g
5	mezcla de agua/metanol	c.s. para:	100,0 ml

Solución 2

	mezcla de ésteres di-(A)- y mono-(B)-alcohílicos de ácido fosfórico	x	g
		(véase tabla 2)	
	acetato de etilo o cloroformo	c.s. para:	100,0 ml

AD

Se obtienen papeles de ensayo que reaccionan - frente a la bilirrubina en el suero dando matices que van del rojo violeta al azul violeta cuando los ésteres fosfóricos contienen los radicales alcohilo indicados en la tabla 2:

15

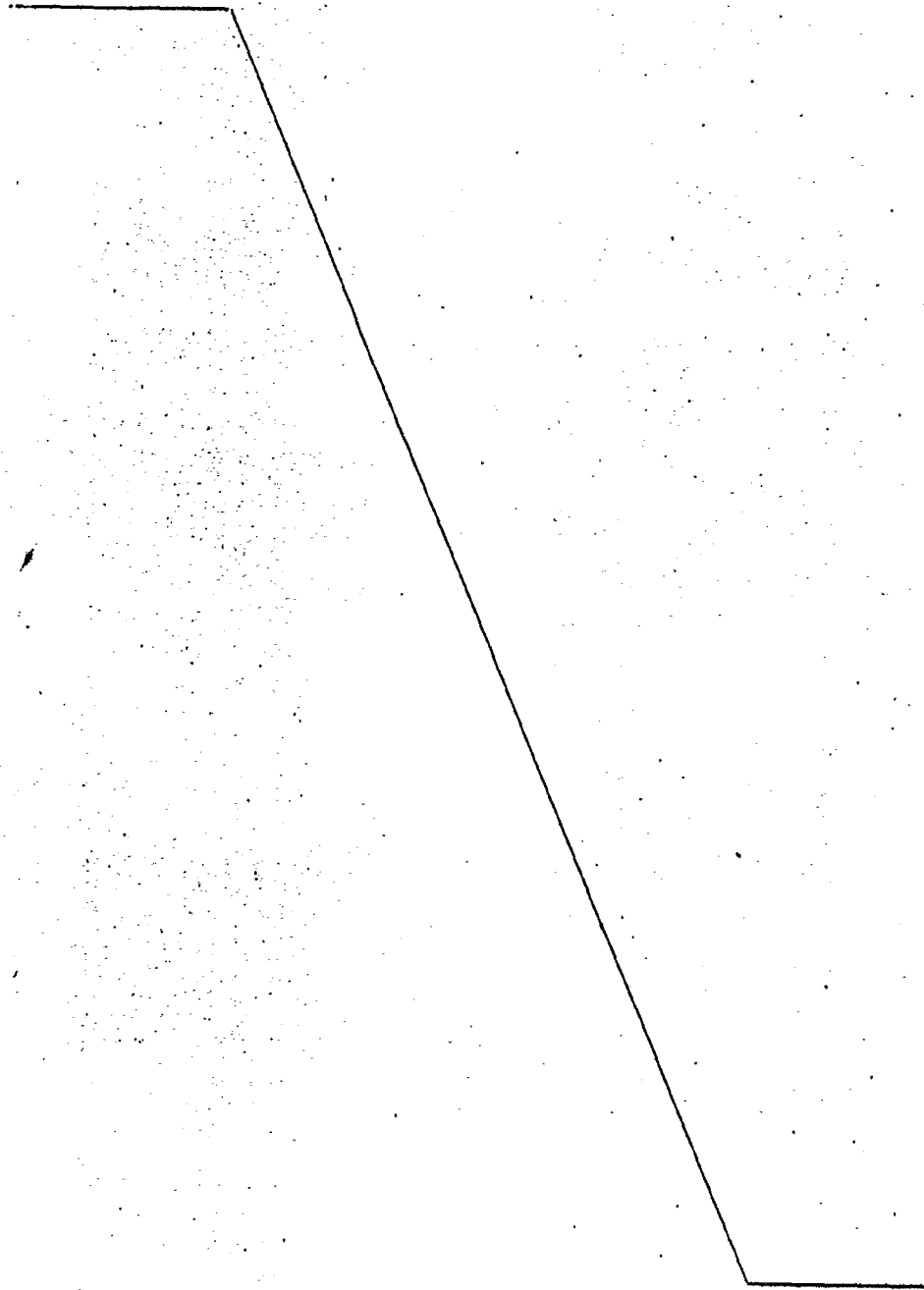
Tabla 2

	radical alcohilo	x	%A	%B
	metilo	40	50	40
	etilo	20	40	50
	2-clorostilo	10	50	45
20	2-butoxietilo	10	50	45
	propilo	10	45	50
	isopropilo	20	25	55
	butilo	10	50	50
	2-etilhexilo	5	92	3
25	iso-octilo ⁺	10	55	45
	iso-nonilo ⁺	10	60	40
	iso-decilo	10	60	40
	dodecilo	10	55	45
	iso-tridecilo	10	60	40

30

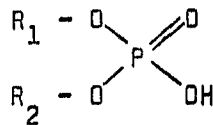
+ mezcla de isómeros

En las mezclas de ésteres antedichas, el monoéster de ácido fosfórico sirve únicamente, junto con el ácido oxálico en la solución 1, como constituyente ácido para la reacción de copulación.



-. REIVINDICACIONES .-

1.- Procedimiento para la obtención de un agente de diagnóstico para investigación de la bilirrubina en líquidos fisiológicos, que contiene una sal de diazonio susceptible de copularse con bilirrubina, así como una cantidad suficiente de ácido para la reacción de copulación, caracterizado porque contiene, por lo menos, un diéster fosfórico de fórmula general:



10 en la cual: R_1 y R_2 son radicales alifáticos, cicloalifáticos, aralifáticos o aromáticos, eventualmente sustituidos.

2.- Procedimiento, según reivindicación anterior, caracterizado porque contiene además, a título de estabilizador, fluoborato de sodio, sulfato de magnesio, metafosfato de sodio o un arilsulfonato.

3.- Procedimiento, según reivindicaciones anteriores, caracterizado porque contiene además un agente humectante.

20 4.- Procedimiento, según las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque, en calidad de ácido, contiene ácido metafosfórico.

5.- "PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE UN AGENTE DE DIAGNOSTICO PARA INVESTIGACION DE LA BILIRRUBINA EN

LIQUIDOS FISIOLOGICOS".

Tal como se describe y reivindica en la presente Memoria Descriptiva, que consta de diecisiete hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, - 9 MAR 1978

CARLOS FERNANDEZ CANDELA
PP

