



ESPAÑA

1-5 OCT. 1976

ES

11

21

22

NUMERO

467936

10 A3

FECHA DE PRESENTACION

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

PATENTE DE INTRODUCCION

47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL G01N//C07D
------------------------	--

54 TITULO DE LA INVENCIÓN "Procedimiento para la obtención de cintas de ensayo para la investigación de las sustancias con acción peroxidasa en líquidos fisiológicos".
--

66 PATENTE EXTRANJERA U OTRA FUENTE DE INFORMACION ' Patente francesa nº 73.25947 del 18.Marzo 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 invento se refiere a un procedimiento para la obtención de una cinta de ensayo para la investigación de cantidades muy pequeñas de sangre y de otras sustancias con acción de peroxidasa, en líquidos fisiológicos.

5 La determinación de pequeñas cantidades de sangre, no reconocibles a simple vista, en la orina, las deyecciones y los vómitos, es muy importante para el diagnóstico de hemorragias en el estómago, los intestinos las vías urinarias. Estas hemorragias son provocadas, por ejemplo, por tumores, úlceras
10 o inflamaciones de los órganos correspondientes. Además, hemoglobina libre puede penetrar en la orina y en el plasma bajo la influencia de ciertas toxinas hemolíticas. La sangre y la hemoglobina tienen una acción análoga a la de la peroxidasa, es decir liberan oxígeno de los hidroperóxidos y transfieren este
15 oxígeno a ciertos aceptadores. Otras sustancias que presentan esta acción, análoga a la de la peroxidasa, se encuentran también en los leucocitos y las bacterias. El reconocimiento de estas sustancias es muy importante para el diagnóstico de enfermedades y de infección de los riñones y de las vías urina-
20 rias. La mioglobina que actúa precisamente como una peroxidasa se encuentra por ejemplo en la orina después de un infarto cardíaco. Con mucha frecuencia, también pasa sangre a la orina como consecuencia de cálculos en los riñones o en la vesícula biliar.

25 Para detectar con sensibilidad todas estas sustancias es particularmente conveniente su acción análoga a la de la peroxidasa. El oxígeno liberado a partir de un hidroperóxido es

transferido a un agente cromógeno que se oxida para formar un colorante cuya formación atestigua la presencia de una sustancia con acción de peroxidasa. Para la investigación de la sangre, especialmente, esta reacción ha sido introducida desde hace mucho tiempo en análisis medicinal y médico-legal. Se efectúa en general en un tubo de ensayo o en reacción gota a gota utilizando con la mayor frecuencia agua oxigenada en calidad de hidroperóxido. Como agentes cromógenos, se utilizan principalmente bencidina, orto-toluidina o el leuco-derivado de verde malaquita.

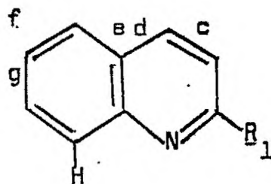
Los ensayos rápidos están constituidos por un soporte absorbente, con la mayor frecuencia a base de papel, que está impregnado con todos los reactivos necesarios para la reacción característica y que presenta una coloración después de siempre inmersión en un líquido fisiológico. Por razón de la gran importancia que han adquirido los dispositivos de ensayo rápido en estos últimos tiempos, aquéllos se han desarrollado especialmente para investigar la sangre en los líquidos fisiológicos.

Por el hecho de que en la investigación de la sangre es la sensibilidad del ensayo la que es determinante, y de que además se pretende también detectar la presencia de los leucocitos y de las bacterias cuya acción de peroxidasa es menos marcada, ya se han intentado diversas maneras de aumentar la sensibilidad de las reacciones características conocidas, por medio de diversas adiciones. Así, por ejemplo, en la solicitud de patente alemana puesta a la inspección pública DAS 1.242.905,

se describen papeles de ensayo que contienen como adiciones activadoras ciertos derivados de quinoleína o preferentemente de quinina. Ciertamente, con estas adiciones se obtiene un aumento sustancial de la sensibilidad pero a pesar de ello no es posible prácticamente, con los papeles de ensayo así mejorados, 5 detectar los leucocitos y las bacterias.

La acción activadora de las sustancias del grupo de la quinoleína con vistas a investigar la sangre es conocida desde hace largo tiempo (véase Zeitschrift für Gerichtl. Med. 12 10 216 1928). No obstante, la quinoleína y sus derivados simples son líquidos o volátiles, y por consiguiente son inutilizables en el invento.

Se ha encontrado ahora que se obtienen papeles de ensayo con una sensibilidad inigualada, para la investigación de las sustancias con acción de peroxidasa, escogiendo como activadores compuestos orgánicos de la fórmula general I: 16



(I)

en la que R_1 es un átomo de hidrógeno o un grupo metilo, siendo condensados estos compuestos por unión de núcleos de benceno y/o 20 de piridina, en uno o al menos de los lugares marcados por c, (d, e), f y g, pero no debiendo contener dos núcleos contiguos, ca-

da uno de ellos, un átomo heterocíclico de nitrógeno, pudiendo estos compuestos de fórmula I, aparte de las posiciones indicadas por H y R₁, estar sustituidos con grupos alcohilo inferiores que eventualmente pueden formar también en conjunto un núcleo hidro-aromático.

Se prefieren los compuestos en los cuales R₁ es un átomo de hidrógeno. Por grupo alcohilo inferior, han de entenderse aquí los que contienen de 1 a 4 átomos de carbono y cuando dos grupos alcohilo forman conjuntamente un núcleo hidro-aromático se prefieren los núcleos de 5 ó 6 eslabones.

Seguidamente se dan ejemplos de los grupos más importantes de compuestos que responden a la fórmula I antedicha. Los compuestos propiamente dichos son en general conocidos en la bibliografía.

15 1. Las benzoquinoleínas:

1.1. benzo(c)quinoleína (fenantridina);

2-metilfenantridina;

6-metilfenantridina;

2-etilfenantridina;

20 1.2. benzo(f)quinoleína;

3-metilbenzo(f)quinoleína;

1,3-dimetilbenzo(f)quinoleína;

1,2-tetrametilbenzo(f)quinoleína;

1,2-trimetilbenzo(f)quinoleína;

25 1.3. benzo(g)quinoleína;

4-metilbenzo(g)quinoleína;

2,4-dimetilbenzo(g)quinoleína.

2. Las dibenzoquinoleínas:

2.1. dibenzo(c,f)quinoleína (benzo(α)fenantridina)

2.2. dibenzo(c,d,e)quinoleína (4-azapireno, tebanidina)

3. Las piridoquinoleínas

5 3.1. pirido(2,3-f)quinoleína (1,7-fenantrolina);

2-metil-1,7-fenantrolina;

2,8-dimetil-1,7-fenantrolina.

3.2. pirido(3,2-f)quinoleína (4,7-fenantrolina);

3-metil-4,7-fenantrolina;

10 3,8-dimetil-4,7-fenantrolina;

1,3,8,10-tetrametil-4,7-fenantrolina.

3.3. pirido(2,3-g)quinoleína (1,6-antrazolina);

2,7-dimetil-1,6-antrazolina.

Por lo tanto, el presente invento tiene como objeto
15 papeles de ensayo para investigar sustancias con acción de pe-
roxidasa en los líquidos fisiológicos, los cuales papeles están
constituidos por un soporte absorbente impregnado con un hidró-
peróxido y al menos un agente cromógeno, caracterizados por el
hecho de que el soporte contiene, en calidad de activador, un
20 compuesto que responde a la fórmula I.

Otro objeto del invento es la utilización de compues-
tos de la fórmula I para la preparación de papeles de ensayo -
con el fin de investigar sustancias con acción de peroxidasa.

No era previsible que la modificación de la quinoleí-
25 na, en sí conocida como activador, condujese a un aumento tan
extraordinario de la actividad. Es un hecho importante para el

invento el que la modificación solamente de ciertas posiciones del esqueleto de la quinoleína procura un aumento de la actividad. Así, por ejemplo, por ciclización en (b) y en (h) de la quinoleína, es decir para la acridina y la benzo(h)quinoleína, se obtiene una disminución de la actividad con relación a la quinoleína. El efecto según el invento todavía no puede apenas ser explicado. Si debiera ser imputado, como resultaría plausible, a una formación de complejos con las sustancias con acción de peroxidasa, la orto-fenantrolina, que es conocida como más intensamente formadora de complejos, debería comportarse como fuertemente activadora. Ahora bien, esto no ocurre mientras que por el contrario la meta- y la para-fenantrolina son activadores muy enérgicos.

Se ha comprobado con sorpresa que los compuestos de la fórmula I no aumentan la sensibilidad de las peroxidases de origen vegetal, tales como por ejemplo la peroxidasa del rábano marino, pero actúan específicamente sobre los compuestos con acción de peroxidasa de los organismos humanos o animales. Así, es posible investigar selectivamente los leucocitos, la sangre, los constituyentes de la sangre o de las bacterias, en las deyecciones o los vómitos, junto con peroxidases vegetales. La mioglobina puede ser determinada así con la misma sensibilidad que la hemoglobina.

La sensibilidad de la reacción característica es aumentada tan fuertemente por ciertos compuestos de la fórmula I que incluso es posible detectar en la orina la presencia de algunos eritrocitos que se hacen visibles en el papel de ensayo bajo -

forma de puntos coloreados. Así, con la fenantridina se puede preparar por ejemplo un papel de ensayo con el cual todavía se pueden discernir netamente 5 eritrocitos por mm^3 . Esto corresponde a una dilución de la sangre de $1/10^6$.

5 Es evidente que todos los compuestos que responden a la fórmula general I no presentan propiedades activadoras idénticas. Así, se tiene la posibilidad de regular, para la determinación de la sangre, por ejemplo, la sensibilidad de un papel de ensayo, a las exigencias de la práctica. Se obtienen por -
10 ejemplo papeles de ensayo de actividad creciente utilizando - como activadores los compuestos seguidamente enumerados en el orden: meta-fenantrolina < para-fenantrolina < benzo(f)quinoleína < fe-
nantridina.

15 Mediante sustituyentes alcoholados se puede aumentar todavía más la sensibilidad. Por ejemplo, con un constituyente metilo introducido en posición X con relación a un átomo de -
nitrógeno del núcleo, la actividad es disminuída, mientras que esta sustitución colocada más allá conduce en general a un aumen-
to de la actividad.

20 El límite de sensibilidad de los papeles de ensayo - que contienen un débil activador tal como por ejemplo 2,8-dime-
til-1,7-fenantrolina se sitúa en alrededor de 50 eritrocitos -
por mm^3 de orina.

25 Los agentes activadores según el invento son añadidos a razón de 0,05 a 1g y preferentemente a razón de 0,2 a 0,5g -
por 100 ml de solución de impregnación.

Otros constituyentes de un dispositivo de ensayo rápi

do para la sangre son, por ejemplo, un hidroperóxido orgánico un indicador de oxidación, un tampón y un agente tensioactivo, así como eventualmente una amida fosfórica tal como por ejemplo la trimorfolida de ácido fosfórico con el fin de lograr -
5 estabilización, así como otros coadyuvantes.

Como hidroperóxido puede citarse, por ejemplo, el hidroperóxido de cumeno o el 2,5-dimetilhexano-2,5-dihidroperóxido : como indicador se utilizan ventajosamente los de la serie de la bencidina, tales como orto-toluidina o de la serie de las
10 azinas heterocíclicas, tales como por ejemplo la bis(N-etilquinolon-2)-azina o (N-metilbenzo-tiazolon-2)-(1-etil-3-fenil-5-metil-tiazolon-2)-azina (según la patente alemana 1.648.840).

Los indicadores son añadidos en proporciones de 0,05 a 5 g, preferentemente de 0,2 a 1 g por 100 ml de solución de
15 impregnación.

Como agente tampón pueden citarse, por ejemplo, los tampones de citrato, fosfato, ftalato o succinato, escogiéndose el pH y la capacidad para que después de la inmersión del -
papel de ensayo en el líquido fisiológico se establezca sobre
20 el papel un pH de 4 a 7 y preferentemente de 5 a 6.

Es ventajoso añadir al preparado pequeñas cantidades (alrededor de 0,05 a 0,5 g por 100 ml) de un formador de complejos tal como metafosfato de sodio o ácido etilendiaminotetraacético, lo cual evita las reacciones positivas erróneas que podrían ser provocadas por trazas metálicas.
25

Como los papeles de ensayo tienen tendencia a separarse del líquido, por razón de las cantidades relativamente impor

tantes de sustancias solubles en agua, es recomendable añadir, al preparado agentes espesantes tales como metilcelulosa y especialmente gelatina, en cantidades del orden de 0,5 a 5 g por 100 ml.

5 Como agente humectante, se utilizan ventajosamente - sulfatos orgánicos de cadena larga o sulfonatos tales como por ejemplo dodecibencenosulfonato sódico, dioctilsulfosuccinato o laurilsulfato sódico, los cuales, tal como es sabido, esta-
10 bilizan los radicales catiónicos tales como la orto-toluidina oxidada. Los agentes humectantes son añadidos a la solución de impregnación en cantidades de 0,5 a 5% y preferentemente de 1 a 3%.

 Para la preparación de los papeles de ensayo según el invento, se impregnan soportes absorbentes tales como por
15 ejemplo papel de filtro, celulosa o velos de fibras artificia- les, con soluciones de los reactivos en disolventes fácilmente volátiles. Esto se efectúa en dos operaciones distintas: prime-
20 ramente se impregna con una solución que contiene un hidroperóxido, un agente humectante, un tampón y eventualmente un espe- sante. Seguidamente se impregna con una solución de un indica-
 dor y de un activador que responde a la fórmula general I,

 Los papeles de ensayo según el invento, después del secado, son cortados en forma de cintas y pueden ser colocados ventajosamente entre una lámina de material plástico y una red
25 de mallas finas, tal como se describe en la patente alemana - 2.118.455.

 Para la investigación de las sustancias con acción de peroxidasa en las deyecciones también es posible incorporar los

activadores según el invento con los reactivos en una película resistente al agua, según la solicitud de patente alemana - publicada antes de examen DOS 1.598.153. Esto presenta la ventaja de que la superficie de la cinta de ensayo puede ser lavada por simple enjuagado con vistas a leer la reacción coloreada.

El invento se describe con mayor detalle en los ejemplos no limitativos que siguen.

EJEMPLO 1.

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

Solución 1

	tampón de citrato 1,2 molar pH 5.25	35 ml
	sal disódica de ácido etilendiaminotetraacético	0,1 g
	dioctilsulfosuccinato de sodio	2,0 g
15	2,5-dimetilhexano-2,5-dihidroperóxido (aproximadamente al 70%)	1,6 g
	trimorfolida de ácido fosfórico	12,7 g
	etanol	30,0 ml
	agua destilada c.s. para	100 ml

20 Solución 2

	orto-toluidina	0,3 g
	fenantridina	0,2 g
	tolueno c.s. para	100 ml

Se obtiene un papel de ensayo de color blanco, el cual por inmersión en orina que contiene sangre se colorea de verde después de alrededor de 5 a 20 segundos. Si los eritrocitos están intactos, los papeles de ensayo quedan sembrados de puntos

verdes. Si ha habido hemólisis o se encuentra hemoglobina libre en la orina, los papeles son coloreados de verde de una manera uniforme. La sensibilidad se sitúa en alrededor de 5 eritrocitos por mm^3 , o de una cantidad correspondiente de hemoglobina. Un número menor de eritrocitos intactos puede producir, -
5 en ciertas circunstancias, algunos puntos verdes sobre el papel de ensayo. La sensibilidad frente a la mioglobina corresponde a la que se observa con relación a la hemoglobina.

Los leucocitos y las bacterias se han revelado igualmente, y sobre todo las partículas intactas, por puntos incoloros, mientras que las partículas descompuestas dan una coloración regular.

EJEMPLO 2.

Si en la solución 1 según el ejemplo 1 se introduce, en lugar de 2,5-dimetilhexano-2,5-dihidroperóxido, la cantidad equimolecular de diisopropilbenceno-hidroperóxido y si se reemplaza en la solución 2 la fenantridina por los activadores antes enumerados, se obtienen papeles de ensayo cuya sensibilidad frente a la sangre, a los leucocitos y a las bacterias es del mismo orden de magnitud que en el ejemplo 1 :

2-metil-fenantridina o 2-etilfenantridina;

benzo(f)quinolefina;

1,2-tetrametilenbenzo(f)quinolefina;

benzo(g)quinolefina;

25 4-metilbenzo(g)quinolefina;

dibenzo(c,d,e)quinolefina;

dibenzo(c,f)quinolefina;

pirido(3,2-f)quinoleína;
3-metil-4,7-fenantrolina;
pirido(2,3-f)quinoleína.

EJEMPLO 3.

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

Solución 1

	tampón de citrato 1,2 molar pH 5,25.	40,0 ml
	sal disódica de ácido etilendiaminotetraacético	0,1 g
10	dioctilsulfosuccinato de sodio	2,0 g
	gelatina	2,0 g
	2,5-dimetilhexano-2,5-dihidroperóxido (aproximadamente al 70%)	1,6 g
	etanol	30,0 ml
15	agua destilada c.s. para	100 ml

Solución 2

	Orto-toluidina	0,3 g
	3-metilbenzo(f)quinoleína	0,2 g
	tolueno c.s. para	100 ml

20 El papel de ensayo así obtenido es aproximadamente 10 veces menos sensible que los papeles de ensayo según los ejemplos 1 ó 2 (aproximadamente 50 a 100 eritrocitos por mm³ en 30 a 60 segundos).

25 Se obtienen papeles de ensayo de sensibilidad análoga si en lugar de 3-metilbenzo(f)quinoleína se utilizan cantidades equimoleculares de los activadores siguientes:

1,3-dimetilbenzo(f)quinoleína;

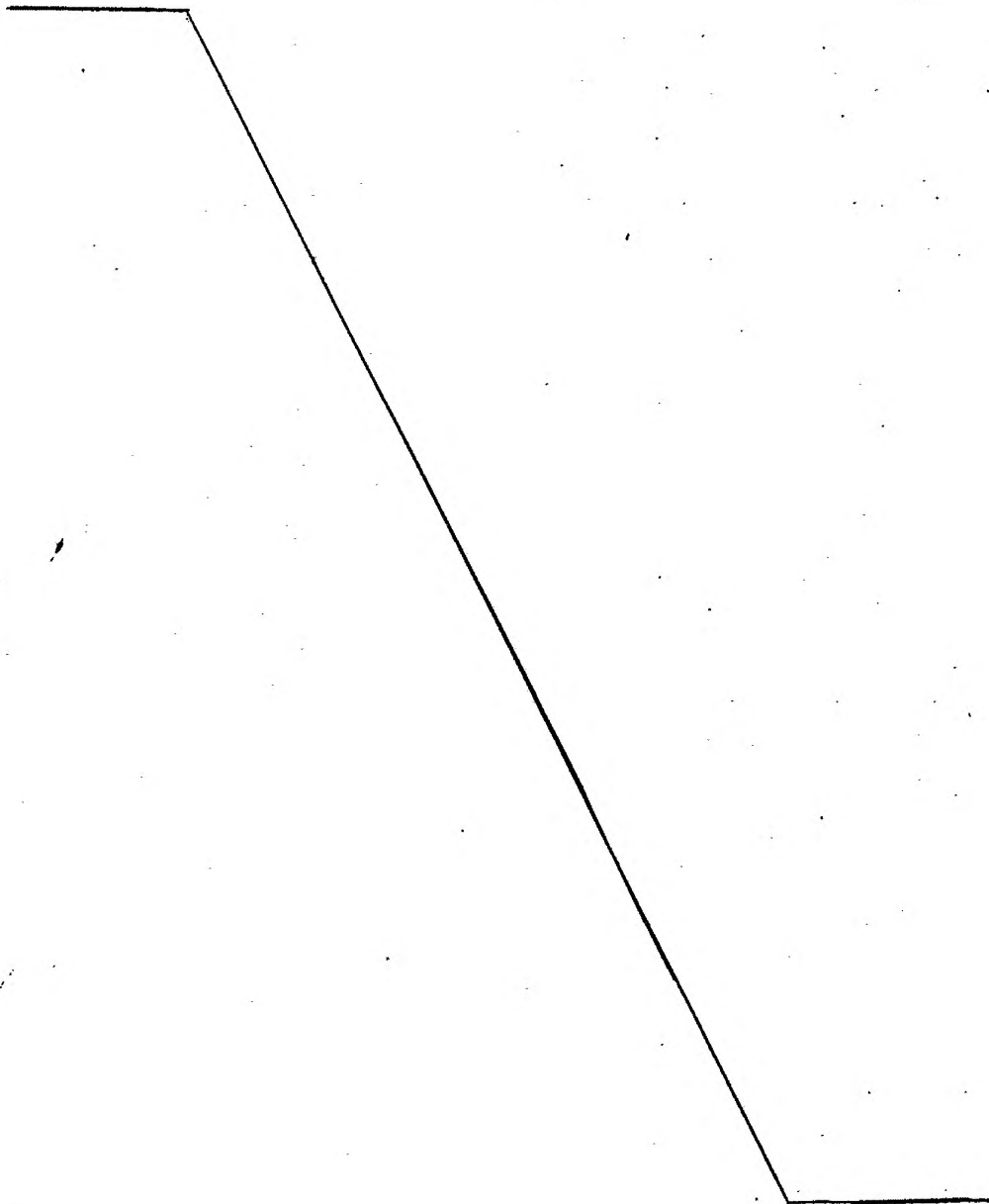
2,4-dimetilbenzo(g)quinolefina;

6-metilfenantridina;

3,8-dimetil-4,7-fenantrolina;

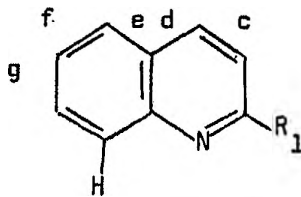
2,8-dimetil-1,7-fenantrolina;

5 2,7-dimetil-1,6-antrazolina.



- REIVINDICACIONES -

1.- Procedimiento para la obtención de cintas para ensayo para la investigación de las sustancias de acción de peroxidasa en los líquidos fisiológicos, constituidas por un soporte impregnado con un hidroperóxido y al menos un agente cromógeno, caracterizado porque el soporte contiene además, en calidad de activador, un compuesto de la fórmula general



en la cual R_1 es un átomo de hidrógeno o un grupo metilo, estando condensados estos compuestos por unión de los núcleos de benceno y/o de piridina en al menos uno de los lugares marcados por c, (d, e), f y g, pero no debiendo contener los núcleos contiguos, cada uno de ellos, un átomo heterocíclico de nitrógeno, pudiendo estos compuestos, aparte de las posiciones indicadas por H y R_1 , estar sustituidos con grupos alcohilo inferior que eventualmente pueden formar también en conjunto un núcleo hidroaromático.

20 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el soporte es absorbente.

3.- Procedimiento según las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el soporte está constituido por una película resistente al agua y que contiene los reactivos.

4.- Procedimiento según las reivindicaciones anteriores caracterizado porque el soporte contiene además sustancias auxiliares, tales como tampones, agentes humectantes, espesantes o estabilizadores.

5 5.- "PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE CINTAS DE EN
SAYO PARA LA INVESTIGACION DE LAS SUSTANCIAS CON ACCION PEROXI
DASA EN LIQUIDOS FISIOLÓGICOS".

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

Madrid, 16 MAR. 1978

CARLOS FERNÁNDEZ CANDELA
P.P.

