

20 NOV 1978

19 ES	460792	10 A1
21		
22	FECHA DE PRESENTACION 12 MAYO 1978	



Concedido el Registro de acuerdo con los datos que se presentan en la presente solicitud, según el contenido de la Memoria adjunta.

PATENTE DE INVENCION

30 PRIORIDADES:		
31 NUMERO	32 FECHA	33 PAIS
P 27 21 942.7	14 de mayo de 1.977	República Federal Alemana.
47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	G 01 N 33/16 ; B 01 L 3/14	
64 TITULO DE LA INVENCION		
DISPOSITIVO PARA PREPARAR UN LIQUIDO DE MEDICION PARA USO EN INSTRUMENTOS ANALITICOS OPTICOS.		
71 SOLICITANTE (S)		
BAYER AKTIENGESELLSCHAFT.		
DOMICILIO DEL SOLICITANTE		
Leverkusen-Bayerwerk, República Federal Alemana.		
72 INVENTOR (ES)		
Georg Frank.		
73 TITULAR (ES)		
74 REPRESENTANTE		
GOMEZ ACEBO.		

La invención se refiere a un dispositivo para preparar un líquido de medición para uso en instrumentos analíticos ópticos y se basa en un frasquito sellado conteniendo una solución de reacción exactamente preparada y un tubo capilar que se puede introducir en el frasquito para alimentar el líquido de prueba a la solución de reacción. La invención se emplea especialmente en el examen analítico de líquidos corporales.

En el terreno de las investigaciones hematológicas, clínico-químicas y bioquímicas se ofrecen cada vez más las "pruebas ya preparadas" y estas "pruebas ya preparadas" permiten al usuario determinar rápida y fácilmente parámetros hematológicos, clínico-químicos y bio-químicos sin necesidad de tener que agregar reactantes.

Estas "pruebas ya preparadas", también conocidas como "mono-pruebas", "pruebas únicas" o "pruebas en un solo frasco" se caracterizan porque los componentes inestables del reactante listo para su uso se almacena en la mayoría de los casos en forma secada por congelación en contenedores de vidrio o de plástico.

Antes de utilizar el reactante se introduce un disolvente que puede contener ulteriores sustancias necesarias para el reactante completo.

En algunos casos, por ejemplo, en la determinación de la hemoglobina, el reactante listo para su uso puede estar presente en el contenedor de vidrio o plástico.

La muestra a analizar, por ejemplo, líquido, sangre, plasma o suero, se introduce en el reactante preparado generalmente mediante una pipeta para garantizar una dosificación exacta. La mezcla reactante-muestra se traslada a conti-

nuación a un recipiente graduado, generalmente de vidrio o cuarzo, y se analiza en un instrumento medidor, por ejemplo, en un fotómetro.

5 Ultimamente se han dado a conocer frasquitos sellables (publicación alemana DOS 2.422.260) que se han desarrollado como frasquitos graduados de plástico para un solo uso (preferentemente compuestos de poliestireno) y que se cierran herméticamente mediante una tapa de plástico.

10 En este caso la tapa se une con el frasquito mediante una soldadura, por ejemplo, mediante ultrasonido, durante la fabricación en masa. La tapa tiene un punto de fractura predeterminado que se puede romper mediante un gorrón. La muestra a analizar se introduce en el frasquito a través de la abertura así producida en la tapa del frasquito.

15 El frasquito mismo ya contiene el líquido reactante completo. En la determinación fotométrica del número de eritrocitos, por ejemplo, solo es necesario que el usuario introduzca 5 μ l de sangre en el frasquito a través de la abertura en la tapa empleando un tubo capilar de vidrio con volumen
20 calibrado. La medición fotométrica se realiza tan pronto como la sangre se halla mezclado completamente con el reactante. Este método es particularmente bueno debido a que el usuario no tiene ni que agregar ni que disolver el reactante, ni precisa de instrumentos auxiliares para el análisis, tales como pipetas.
25 Esto simplifica considerablemente el análisis pudiéndose realizar correctamente por personal no entrenado especialmente.

Los procedimientos descritos tienen las siguientes desventajas:

30 En las "pruebas ya preparadas" generalmente sigue siendo necesario hacer transferencias usando una pipeta. Para

esta finalidad se precisan de instrumentos auxiliares costosos y sensibles, tales como por ejemplo pipetas de Eppendorf. El empleo mismo de una pipeta representa una fuente de error. El disolvente necesario, por ejemplo, agua destilada, no siempre está disponible en la cantidad exigida (agua destilada por cuarzo".

El reactante completo o la mezcla completa de reactante-muestra ha de ser trasladado a un recipiente calibrado, por ejemplo, un frasquito de vidrio, antes de poder realizar la medición. Es esta una etapa de trabajo adicional que incluye la posibilidad de introducción de errores, así, por ejemplo, frascitos no totalmente limpios o no totalmente secos (producción de errores en volúmen) o residuos de detergentes en los frascitos. En general, la realización de estas "pruebas ya preparadas" es tan complicada que no se pueden llamar justificadamente "pruebas ya preparadas" y se presentan un número de fuentes de error tan grandes que estas pruebas no se pueden realizar por personal que no haya sido especialmente entrenado.

La prueba descrita en la publicación alemana DOS 2.422.260 cumple sustancialmente las exigencias de una "prueba ya preparada". El usuario no tiene que disolver reactantes ni ha de mezclar exactamente varias soluciones o trasladar la mezcla de reactante-muestra preparada a un recipiente calibrador. Tan solo ha de introducir en el frasquito la muestra a analizar exactamente medida lo que puede realizar fácilmente, por ejemplo, mediante el empleo de tubos capilares de vidrio de volúmen calibrado, y trasladar entonces el frasquito al fotómetro.

Las posibles fuentes de error que se puedan pre-

sentar en esta operación son así eliminadas desde un principio y el proceso de análisis se simplifica de tal manera que personal sin entrenar es capaz de realizar el análisis en forma correcta.

5 Desgraciadamente hay sin embargo solo muy pocos reactantes para análisis bioquímicos, hematológicos y clínico-químicos que se mantengan en estado utilizable durante un período de tiempo prolongado (seis meses).

10 Esto vale especialmente para los modernos métodos enzimáticos, tal como por ejemplo para la determinación del nivel de azúcar en la sangre empleando glucosa-oxidasa/peroxidasa, hexoquinasa/glucosa-6-fosfato de hidrogenasa o glucosa-dehidrogenasa-mutarotasa, para la determinación enzimática de ácido bórico, úrea, triglicéridos y colesterol y, naturalmente, para determinar la actividad de las mismas enzimas.

15 Sin embargo, los reactantes para la determinación no enzimática frecuentemente no se mantienen utilizables durante un período prolongado (seis meses). Esto vale, por ejemplo, en la determinación de bilirubina empleando ácido sulfanílico diazotado según Jendrassik and Grof [2] o empleando sal de 2,5-diclorofenil-diazonium según Wahlefeld et al [3], así como para la determinación de la creatinina empleando ácido pícrico/NaOH según Popper et al [4].

25 El empleo de frasquitos calibrados de un solo uso va acompañado de ulteriores problemas. El vidrio queda eliminado como material para los frasquitos calibrados de un solo uso pues los frasquitos de vidrio son demasiado costosos en la calidad necesaria para las mediciones fotométricas.

30 El empleo de plásticos, por ejemplo, poliestireno, permite una fabricación en masa menos costosa, pero frecuente-

mente va acompañado de problemas con respecto a la durabilidad de los reactantes.

5 El poliestireno no es absolutamente impermeable al vapor de agua y si no se toman medidas adecuadas se varia por esta razón el volúmen del líquido de reactante en los frasquitos cerrados durante el período de almacenamiento. Como en los análisis ha realizar se exige una proporción de mezcla conocida, exactamente determinada, se obtienen resultados falsos.

10 El poliestireno es asimismo permeable a varios gases. Esto repercute negativamente, por ejemplo, en la duración del reactante para determinar la hemoglobina como cianuro de hemiglobina. Este reactante contiene, además de una sustancia tampón y un detergente para la hemólisis de los eritrocitos además hexacianoferrato potásico (III), que oxida la hemoglobina y la KCN que transforma la hemoglobina en cianuro de hemiglobina. El cianuro de hemiglobina se determina a continuación en forma fotométrica.

20 El KCN contenido en el reactante está en equilibrio con el HCN en el recinto de gas sobre el líquido. El HCN puede, sin embargo, difundir a través de la pared de poliestireno del frasquito de manera que el contenido en CN^- del reactante disminuye con un período de media vida de unas 4 semanas. El reactante por lo tanto no tiene suficiente duración para ser comercializado.

25 El cometido de la presente invención es, por lo tanto, vencer los problemas de duración de vida más arriba descritos y desarrollar una "prueba ya preparada" en la que se empleen frasquitos de un solo uso de material sintético previamente fabricados que le permitan al usuario obtener resultados analíticos correctos en un período de tiempo breve sin instru-

30

mantos adicionales, tales como por ejemplo pipetas y sin ningún entrenamiento especial.

Este cometido se soluciona según la presente invención poniendo a disposición un dispositivo para preparar un líquido de medición para uso en instrumentos analíticos ópticos que comprende un frasquito sellado conteniendo una solución reactante exactamente preparada y un tubo capilar que se inserta dentro del frasquito para ceder el líquido de muestra a la solución reactante, donde las propiedades ópticas del líquido de medición se regulan disponiendo como mínimo uno de los reactantes necesarios para la formación de dicho fluido de medición de la mencionada solución de reacción de fase sólida en el tubo capilar empleado para la alimentación del líquido de muestra y/o en un segundo tubo capilar que se puede introducir en el frasquito.

Los reactantes se disponen preferentemente en la pared interior del tubo capilar en forma finamente particulada. De esta manera se puede ampliar considerablemente el espectro de los reactantes. Frecuentemente todos los reactantes no se pueden disponer juntos en una solución ya que se vuelven inestables dentro de un breve período de tiempo o reaccionan entre sí en esta forma. Este problema se resuelve elegantemente almacenando tales componentes inestables en los tubos capilares. Se logran así reacciones anteriormente consideradas inadecuadas para los procesos analíticos descritos en la publicación alemana DOS 2.422.260 debido a la inestabilidad de los reactantes. Los tubos capilares revestidos con uno de los reactantes y almacenados en seco se pueden mantener estables durante largos períodos de tiempo (más de seis meses) mientras los reactantes que son estables en solución se pueden preparar debidamente y

alimentar al frasquito calibrado.

El usuario puede ahora:

5 a) recoger la muestra (líquido, sangre, plasma, suero) con el tubo capilar revestido en su superficie interna e introducir el tubo capilar llenado en el frasquito de plástico para un solo uso. De esta manera se ha formado el reactivo en una etapa de trabajo sencilla y de rápida realización estando exactamente dosificada la muestra a analizar. Después de un período de reacción, en caso dado necesario, se puede analizar 10 la muestra en un aparato de medición (por ejemplo un fotómetro).

En este caso el tubo capilar empleado deberá naturalmente estar calibrado en volúmen y el componente de reactante aplicado sobre la superficie interna del tubo capilar no deberá falsificar el volúmen de llenado.

15 b) Introducir el tubo capilar revestido sobre su superficie interior en el frasquito calibrado para un solo uso de plástico ya preparado, formandose así el reactivo completo. La muestra a analizar (líquido, sangre, plasma, suero) puede entonces ser añadida (por ejemplo, empleando un tubo capilar de 20 volúmen calibrado). Después de un período de reacción, si es necesario, la muestra se puede analizar en un instrumento de medición (por ejemplo, un fotómetro). Si se ha de determinar un valor de control para el reactivo durante la prueba, éste se puede obtener antes de introducir la muestra a analizar.

25 Si se ha de determinar un valor de control para la muestra es preferible introducir primeramente la muestra en el frasquito calibrado de un solo uso de plástico ya preparado, determinar el valor de control, formar el reactivo completo mediante adición del tubo capilar revestido y después determinar 30 el valor analítico. Tanto el valor de control de la muestra como

el valor analítico se pueden así determinar en un frasquito calibrado de un solo uso de plástico. Esto evita el uso de un frasco adicional y la cantidad de muestra que en caso contrario sería necesaria para determinar el valor de control de la muestra.

5 c) Recoger otro componente inestable, por ejemplo, una suspensión de enzimas o la suspensión de una mezcla de enzimas empleando el tubo capilar revestido sobre su superficie interna e introducir éste en el frasquito calibrado de un solo uso de plástico ya preparado, formándose así el reactivo completo. La muestra se puede agregar antes o después de introducir los componentes inestables, según se haya de determinar un valor de control de reactivo o un valor de control de la muestra.

10 El procedimiento descrito bajo a) se ha acreditado especialmente, por ejemplo, para determinar la hemoglobina como cianuro de hemoglobina.

15 1,25 cc del reactivo que está completo con excepción del KCN se introducen en el frasquito calibrado de un solo uso de plástico. El KCN (70 μ g por tubo capilar) se encuentra en estado finamente particulado en la superficie interior de un tubo capilar de volumen calibrado de 5 μ l de capacidad. La muestra, en este caso sangre, se recoge en este tubo capilar. El capilar se llena automáticamente por la acción capilar tan pronto como se ponga en contacto con la sangre. El KCN se disuelve inmediatamente en la sangre y no afecta en forma mensurable la exactitud de la dosificación de la muestra. Una vez que el tubo capilar se halla llenado con sangre se introduce en el frasquito calibrado de un solo uso de plástico. El contenido del tubo capilar se mezcla con el contenido del frasquito mediante simple agitación del frasquito calibrado y se completa simul

20

25

30

táneamente el reactivo. Después de un período de reacción de tres minutos el contenido de hemoglobina de la muestra se puede determinar directamente en un fotómetro.

5 El método descrito bajo b) ha demostrado ser especialmente eficaz para determinar la bilirubina con sal de 3,5-diclorofenildiazonium según Wahleseld et al [3]. Durante esta determinación se ha de tener en consideración el valor de control de la muestra. Como para determinar la bilirubina se necesita relativamente mucho material de muestra (en cada 10 caso 50 μ l de suero para el valor de control de muestra y análisis) es aquí especialmente ventajoso que el valor de control de la muestra y el análisis se puedan determinar en un frasquito calibrado (es decir con 50 μ l de muestra).

15 1,25 cc de reactivo, que está completo a falta de la sal de 2,5-diclorodifenildiazonium se introduce en el frasquito calibrado de un solo uso de plástico. La muestra (por ejemplo 50 μ l de suero) se introduce en el frasquito empleando un tubo capilar y el frasquito se agita ligeramente. El valor de control del reactivo se puede determinar entonces en 20 un fotómetro. A continuación se introduce en el frasquito el tubo capilar sobre cuya superficie interna se ha situado la sal del 2,5-diclorofenildiazonium y se agita ligeramente. El valor analítico se determina en el fotómetro después del período de reacción (10 minutos). El resultado, el contenido de bilirubina de la muestra, se obtiene restando el valor de control 25 de la muestra del valor analítico y multiplicando la diferencia por un factor fijo.

30 El método descrito bajo c) se emplea preferentemente cuando para la determinación se necesitan varios componentes inestables en solución, tal como por ejemplo en la determinación

de colesterol enzimática según Röschlau et al [5] con ulterior reacción de color según Trinder [6]. 1,5 cc de una mezcla de tampón de fosfato/fenol/metanol/hidroxi-polietoxi-dodecano se sitúa en el frasquito calibrador de un solo uso de plástico.

5 La 4-amino-fenazona reacciona con fenol y con el H_2O_2 , formado durante la reacción enzimática del colesterol dando un componente de color (4-(p-benzoquinona monoimino)-fenazona), que se determina fotométricamente.

10 La 4-amino fenazona se sitúa en forma sólida sobre la superficie interna de un tubo capilar de vidrio o de plástico, ya que en solución con el fenol, ya durante el almacenamiento, forma el componente de color que se ha de determinar después de la reacción enzimática. El tubo capilar recubierto con la 4-amino fenazona se utiliza para la introducción de la mezcla
15 de enzima suspendida en, por ejemplo, sulfato amónico (unos 20 μ l de colesterol estearasa/colesterol oxidasa/peroxidasa) en el frasquito calibrado de un solo uso de plástico. El contenido del tubo capilar se mezcla con el componente en el frasquito bajo ligero agitamiento y el valor de control del reactivo se
20 determina entonces fotométricamente. Se agrega entonces la muestra a analizar (líquido, suero, plasma) con un tubo capilar de volumen calibrado (por ejemplo 10 μ l), el frasquito se agita ligeramente y se determina el valor analítico en el fotómetro después de un período de reacción de unos 15 minutos. El
25 resultado, el contenido de colesterol de la muestra, se obtiene restando el valor de control del reactivo del valor analítico y multiplicando la diferencia con un factor fijo.

30 Con la invención descrita es por primera vez posible ofrecer frasquitos de "prueba ya preparada" para investigaciones hematológicas, clínico-químicas y bioquímicas que, contra-

rio a las "mono-pruebas", "pruebas únicas" o pruebas en un solo frasco" son verdaderamente "pruebas ya preparadas".

El empleo de los frasquitos calibrados de la presente invención permitan utilizar el mismo frasquito para preparar la mezcla y para la medición. El usuario, por lo tanto, ya no necesita mezclar la muestra con el reactivo en un recipiente de reacción especial y trasladarlo a continuación al frasquito de medición.

Este significa tanto un ahorro en costes (no se precisan recipientes de reacción) como también una simplificación de la operación.

Como el frasquito de medición ya contiene todos los constituyentes líquidos de la constitución de reacción en cantidades exactas y los componentes inestables se sitúan en cantidades exactas en la superficie interior del tubo capilar (de vidrio o de plástico) la solución de reacción se puede terminar en forma sencilla simplemente por inserción del tubo capilar en el frasquito calibrado de un solo uso de plástico. Se elimina así errores en la disolución y dosificación de los componentes inestables. El usuario no necesita realizar etapas empleando una pipeta. El análisis se puede realizar así en forma más sencilla, más rápida y más exacta.

La aplicación de los componentes inestables en la superficie interior de un tubo capilar tiene ventajas especiales:

Cantidades pequeñas (microgramos) se pueden introducir y manipular exactamente en el tubo capilar.

No se precisan aditivos (por ejemplo materiales de carga y aglutinantes) en la fabricación de tabletas (que pudieran interferir con las reacciones que frecuentemente son

sensibles a los aditivos.

5 El componente inestable se disuelve en forma garantizada rápidamente (aproximadamente 1 minuto), ya que no se precisan de aditivos, mientras las tabletas precisan por ejemplo 10 minutos hasta disolverse totalmente.

Se evitan enturbiamientos frecuentemente producidos por los aditivos y que dificultan el análisis fotométrico.

Se evita el contacto directo de sustancias peligrosas con la piel (dedos).

10 La duración de las pruebas se prolonga considerablemente ya que también los componentes inestables en una solución de reacción si se almacenan en seco y en frío se mantienen durante años. El período de reacción se puede reducir y por lo tanto también el período de análisis. Así, por ejemplo, al determinar la hemoglobina por el método de cianuro de hemiglobina el pH de la solución se regula a 7,2. Esto es un compromiso entre la velocidad de reacción que disminuye según se aumenta el pH de la solución y la duración de la solución que aumenta según disminuye el pH debido a que el HCN se expulsa de la solución más rápidamente a un pH bajo y la solución de reacción por esta razón se inutiliza más rápidamente.

El período de reacción asciende hasta a 3 minutos a un pH de 7,2.

25 A un pH de 6,8 el período de reacción solo asciende a 1 minuto, pero la solución ya no es estable durante un período prolongado.

30 Sin embargo, si se emplea un tubo capilar interiormente revestido con KCN, entonces el pH de la solución se puede regular, por ejemplo, a 6,3 con buena estabilidad y el período de reacción se puede reducir así claramente.

Como no se precisan agentes auxiliares tales como pipetas o probetas calibradas para completar los reactantes estos ensayos están idealmente adecuados para un empleo móvil, por ejemplo, en un helicóptero de rescate, ambulancia, o visitas a domicilio, en especial debido a que ya se dispone para estos ensayos de un fotómetro portátil accionado por batería, (Compur mini-photometer M 1000).

El empleo de frasquitos calibrados de un solo uso de plástico ofrecen también gran ventaja con respecto a los costes. Por una parte no se necesitan instrumentos adicionales tales como pipetas, contenedores de muestras o contenedores de reacción y, por otra parte, solo la cantidad del líquido de medición necesario para el frasquito de "prueba ya preparada" se forma mediante adición de los componentes inestables, no debiéndose desechar por lo tanto reactivos costosos (por ejemplo debido a la falta de estabilidad).

Como resultado de la operación simplificada se evitan errores y por lo tanto no es necesario repetir análisis.

Debido a la operación simplificada que sustancialmente reduce las posibilidades de error, personas no entrenadas especialmente pueden asimismo realizarla y obtener resultados correctos en los análisis. Estos ensayos se pueden por lo tanto realizar también cuando no hay ningún personal especialmente entrenado disponible (por ejemplo durante los servicios nocturnos cuando no hay empleados médicos disponibles, en los países en vía de desarrollo). La oportunidad de que personal que no han sido especialmente entrenados puedan realizar estas "pruebas ya preparadas" permiten ulteriores ahorros financieros.

Con referencia a los dibujos acompañantes:

Un frasquito compuesto de vidrio o plástico, mostrado

en forma esquemática en el dibujo, sirve como frasquito de medición. Este está llenado hasta aproximadamente la mitad con una solución de reacción 1 y está herméticamente sellado en su parte superior por una tapa 2. La tapa 2 sirve al mismo tiempo como asidero para el frasquito para que no se ensucie al ser manipulado. Sobre la tapa 2 se encuentra un gorrón 3 que lleva un lugar de rotura 4. Si el gorrón 3 se rompe hacia un lado se produce un agujero circular en la superficie de la tapa. A través de este tubo se pueden insertar los tubos capilares 5 y 6. El tubo capilar 5 sirve, por ejemplo, para la alimentación de la muestra del líquido. El tubo capilar 6 está recubierto en su superficie interior de un reactante en forma sólida. En lugar de en forma de revestimiento el reactante sólido puede también rellenar el volumen del tubo capilar en forma suelta. Cuando los tubos capilares 5 y 6 se introducen y el frasquito se agita vigorosamente el contenido del tubo capilar 5 y el reactante en el tubo capilar 6 pasan a la solución de reacción 1. Los tubos capilares 5 y 6 pasan así a los rincones del frasquito como resultado de las fuerzas de adhesión y por lo tanto no interfieren con los pasos ópticos de los rayos en el fotómetro. Es posible dotar ambos tubos capilares 5 y 6 de un revestimiento interno con varios reactantes, en cuyo caso el capilar 5 se emplea simultáneamente para la introducción de la muestra. Además está dada la posibilidad de operar con un solo tubo capilar. En este caso el tubo capilar 5 se emplea tanto para la alimentación de la muestra y al mismo tiempo como soporte para un reactante.

Como fotómetros se pueden emplear instrumentos comerciales del tipo descritos, por ejemplo, en la publicación alemana DOS 2.338.206.

EJEMPLOSA) Determinación de hemoglobina con el método de cianuro de hemoglobina.

5 En este caso la hemoglobina se oxida a hemiglobina mediante hexacianoferrato (III) de potasio y la hemiglobina se transforma en cianuro de hemiglobina mediante cianuro potásico.

La cantidad a medir es la extinción producida por el cianuro de hemiglobina a una longitud de onda de 540 a 546 nm.

10 Instrumentos: Fotómetro espectral o de filtro con longitud de ondas de medición de 540 ó 546 nm.

Reactivos: Recipiente calibrado de un solo uso de plástico con tapa.

Espesor de capa: 1,00 cm; Contenido: 1.25 cc

15 de reactante con la siguiente composición:

0,6 m moles/l de hexacianoferrato (III) de potasio

2,5 m moles/l de tampón de fosfato del pH 7,2 (ó pH 6,8)

1,5 m moles/l de cloruro sódico

0,05% de detergente (por ejemplo Saponin).

20 Tubos capilares de vidrio de volúmen calibrado con un contenido de 5 μ l (longitud: 32 mm; diámetro interior 0,446 mm), que están revestidos interiormente con 70 μ g de KCN.

Método:

25 El punto de fractura 4 en la tapa 2 del frasquito calibrado de un solo uso de plástico se rompe mediante el gorrrón 3 previsto para esta finalidad. Se toman 5 μ l de sangre por ejemplo, de una gota de sangre de la yema del dedo o de un recipiente de muestra que contiene la sangre, mediante un tubo capilar de vidrio con volúmen calibrado. Cualquier sangre
30 que pueda quedarse en el exterior del tubo capilar se retira y

el tubo capilar 5 llenado con sangre se introduce en el frasquito. La abertura formada en la tapa 2 se sella mediante una etiqueta adhesiva. La sangre se mezcla con el reactivo 1 agitando el frasquito calibrado, teniendo cuidado, de que el frasquito calibrado se manipule solo por la tapa y por la base de manera que no se contaminen las paredes del recipiente (paredes de medición). Después del período de reacción (3 minutos) a un pH de 7,2, 1 minuto a un pH de 6,8), la extinción producida por el análisis se puede comparar con aquella que se obtiene de un recipiente calibrado de un solo uso de plástico que aún no ha sido utilizado (= valor de control de reactivo) en el fotómetro. El resultado, la concentración de hemoglobina en la sangre, se obtiene en gramos de hemoglobina por 100 cc de sangre mediante multiplicación de la extinción por 36,8.

15 Preparación de los tubos capilares revestidos interiormente con KCN.

70 mg de KCN se disuelven en 5 cc de un disolvente adecuado (por ejemplo metanol o etanol). Los tubos capilares 5 se llenan por inmersión en esta solución. El disolvente se extrae bajo ligero vacío distribuyéndose así el KCN igualmente en la superficie interior del tubo capilar. Si se almacenan en seco el contenido de estos tubos capilares es estable durante como mínimo 12 meses.

Si las botellitas calibradas de un solo uso de plástico se cierran de manera que sean impermeables al vapor de agua (por ejemplo, sellando con lámina de aluminio embutida) entonces su contenido es asimismo estable durante como mínimo 12 meses con volumen constante.

El margen de medición y la sensibilidad de la determinación corresponden totalmente al método de referencia descri-

to en l norma provisional DIN standard nº 58.931.

La exactitud y precisión de las medidas se comprobaron varias veces mediante análisis de sangre de control (4 C de CoulterCounter, CH 60 de Merz and Dade). Como se muestra en la tabla 1 (apéndice), los mismos resultados se obtienen si la hemoglobina se determina utilizando los frasquitos ya preparados de esta invención como cuando se determina la hemoglobina empleando el hemoglobinómetro producido por Coulter Electronics GmbH.

La línea de regresión $y = 0,9669 \cdot X + 0,3570$ (y = frasquito "ya preparado"; X= hemoglobinómetro) y el coeficiente de la correlación $r = + 0,9985$ se calculan de los resultados del experimento comparativo efectuado en 40 muestras de sangre humana. Conforme a estos valores hay una correlación muy estrecha entre los dos métodos.

B) Determinación de bilirubina empleando sales de 2,5-dicloro-fenil-diazonium.

Para esta determinación el total de bilirubina se copula con cloruro de 2,5-diclorofenil-diaazonium para formar la correspondiente azobilirubina. La bilirubina indirecta se libera mediante un detergente. La cantidad a medir es la extinción producida por la azobilirubina a una longitud de onda de 546 nm. Instrumentos: Fotómetro espectral o de filtro con longitud de onda medidora de 546 nm.

Reactivos: Frasquito calibrado de un solo uso de plástico con tapa.

Espesor de capa: 1,00 cm; Contenido: 1,25 cc de reactivo con la siguiente composición:

0,1 N de ácido hidrociorídico,

1% de detergente,

Tubos capilares de vidrio con volúmen calibrado de 20 μ l de contenido (longitud 30 mm; diámetro interior 1,302 mm) revestidos en la superficie interior con cloruro de 2,6-diclorofenil-diazonium.

- 5 Tubos capilares de vidrio con volúmen calibrado (50 μ l) para la dosificación de la muestra.

Método.

El lugar de fractura 4 en la tapa 2 del frasquito calibrado de un solo uso de plástico se rompe mediante el gorrrón 3 provisto para esta finalidad. 50 μ l de muestra, por ejemplo, suero o plasma se introducen en el frasquito calibrado empleando un tubo capilar de vidrio con volúmen calibrado 5. Una vez que se ha cerrado la tapa con la etiqueta adhesiva la muestra se mezcla con el reactivo mediante ligera agitación el frasquito calibrado. Al hacer esto se debe cuidar de no tocar las superficies de medición. La extinción obtenida para el frasquito calibrado (E_1 = valor de control de la muestra) se determina en el fotómetro. El tubo capilar de vidrio 6 conteniendo el cloruro de 2,5-diclorofenil-diazonium se introduce a continuación en el frasquito calibrado y el frasquito se agita ligeramente hasta que se haya disuelto el cloruro de 2,5-diclorofenil-diazonium (unos 15 segundos). Después del período de reacción (como mínimo 10 minutos a temperatura ambiente) se determina en el fotómetro la extinción para el análisis (E_2).

25 El resultado, la concentración de la totalidad de bilirubina presente, se obtiene en miligramos por 100 cc de muestra (suero o plasma) sustrayendo el valor de control de la muestra (E_1) del valor de análisis (E_2) y multiplicando la diferencia por 44,5.

30 Preparación de los tubos capilares revestidos interiormente con

cloruro de 2,5-diclorofenildiazonium.

125 mg de cloruro de 2,5-diclorofenil-diazonium se suspenden en 10 cc de un líquido adecuado (por ejemplo éter). Tubos capilares de vidrio de volúmen calibrado de 20 μ l se llenan por inmersión con esta solución. El fluido se extrae bajo ligero vacío. El cloruro de 2,5-diclorofenil-diazonium queda así igualmente distribuido sobre la superficie interior del tubo capilar. El contenido de estos tubos capilares es estable durante como mínimo 12 meses si se almacena seco y frío. Si los frasquitos calibrados de un solo uso de plástico se envasan de manera que queden impermeables al vapor de agua (por ejemplo por sellado con lámina de aluminio embutida) entonces su contenido es asimismo estable durante como mínimo 12 meses con volúmen constante.

El márgen y grado de la sensibilidad de las medidas obtenidas corresponden a las del método descrito por Wahlefeld et al. (3).

La exactitud y precisión de las medidas se comprueban varias veces con sueros de control de análisis. Si se determina la concentración total de bilirubina empleando los frasquitos ya preparados se obtienen resultados que se pueden comparar bien con los resultados obtenidos por la determinación de la total de bilirubina según el método descrito por Wahlefeld et al (3).

Las líneas de regresión $y = 0,9392 \cdot X + 0,1804$ ($y =$ frasquito ya preparado; $X =$ envase de control, bilirubina método DPD de Boehringer Mannheim) y el coeficiente de correlación $r = + 0,9931$ se calcula de los resultados de experimentos comparativos efectuados en 40 muestras.

Según estos valores existe una correlación muy estrecha

entre los dos métodos.

C) Determinación de colessterina enzimática empleando colessterol esterasa, colessterol oxidasa, peróxidasa y ulterior reacción de color según el método de Trinder.

5 En este método, se disocia éster de colessterol mediante colessterol esterasa. El colessterol se oxida por la colessterol oxidasa formando la Δ^4 -colestonona. El H_2O_2 así formado se hace reaccionar con fenol y 4-aminofenazona por peroxidasa para formar el componente de color, la 4-(p-benzoquinona-monoimino)-fenazona. La cantidad a medir es la extinción producida por la 4-(p-benzoquinona-monoimino)-fenazona a una longitud de onda de 546 nm.

Instrumentos: Fotómetro espectral o de filtro con longitud de onda medidora de 546 nm.

15 Reactivos: Recipientes calibrados de un solo uso de plástico con tapa,

Espesor de capa: 1,00 cm; Contenido: 1,5 cc de reactivo con la siguiente composición:

0,4 m moles/ l de tampón de fosfato potásico del pH 7,7

20 10 m moles/ l de fenol

1,8 m moles/ l de metanol

0,4% de hidroxipolietoxidodecano,

25 tubos capilares de vidrio de volúmen calibrado de 20 μ l (longitud 32 mm, diámetro interior 0,892), revestidos en la superficie interior con 4-aminofenazona.

Tubo capilar de vidrio de volúman calibrado (20 μ l) para la alimentación de las muestras.

Mezcla de enzimas en 3,2 M de solución de sulfato amónico compuesta de 20 U/cc de colessterol esterasa

30 6 u/cc de colessterol oxidasa

4 U/cc de peroxidasa.

Método:

5 El lugar de fracción nominal en la tapa del frasquito calibrado de un solo uso de plástico se rompe mediante el gor-
rón previsto para esta finalidad. Se introducen 20 μ l de la
mezcla de enzimas en el recipiente calibrado empleando el tubo
capilar de vidrio calibrado en volúmen revestido con 4-amino-
fenazona en la superficie interna y se mezcla con el contenido
10 mediante ligera agitación. Se forma así el reactivo completo para determinar el colesterol. La extinción producida por el
recipiente calibrado (E_1 = valor de control del reactivo) se
determina ahora en un fotómetro. 20 μ l de la muestra (suero o
plasma) se introducen a continuación en el frasquito calibrado
20 empleando un tubo capilar de vidrio de volúmen calibrado y se
mezcla con el reactivo mediante ligera agitación. Terminado el
período de reacción (como mínimo 10 minutos a temperatura am-
biente) se determina en el fotómetro la extinción para el aná-
lisis (E_2).

25 El resultado, la concentración de colesterol, se deter-
mina en miligramos por 100 cc de muestra (suero o plasma) me-
diante sustracción del valor de control del reactivo (E_1) del
valor de análisis (E_2) y multiplicando la diferencia por 652.

Preparación del tubo capilar revestido interiormente con 4-ami-
nofenazona.

30 457 mg de 4-aminofenazona se disuelven en 20 cc de un
líquido adecuado (por ejemplo diclorometano o benceno). Tubos
capilares de vidrio de volúmen calibrado de 20 μ l se llenan por
inmersión en esta solución. El líquido se extrae bajo ligero
vacío a 60°C. La 4-aminofenazona está así igualmente repar-
tida en la superficie interior de los tubos capilares.

El contenido de estos tubos capilares es estable durante como mínimo 12 meses si se almacenan en frío y seco.

Si los frasquitos calibrados de un solo uso de plástico son impermeables al vapor de agua, por ejemplo, por sellado en lámina de aluminio embutida, entonces el contenido es estable durante como mínimo 12 meses con volúmen constante.

La mezcla de enzimas se almacena en contenedores de vidrio y es estable durante como mínimo 12 meses si se almacena a $+4^{\circ}\text{C}$.

El margen de medición y la sensibilidad de la determinación corresponde al método descrito por Rösschlau et al (5).

La exactitud y la precisión de la medición se comprueban varias veces por análisis de sueros de control. En la determinación de la colessterina empleando frasquitos ya preparados se obtienen resultados que concuerdan bien con los resultados de la determinación de colessterina con el método según Rösschlau et al (5) empleándose el envase de ensayos del método CHOD-PAP de colessterol según Boehringer Mannheim.

Las líneas de regresión $y = 0,9905 \cdot X + 2,734$ ($r =$ frasco ya preparado; $X =$ embase de ensayo según el método CHOD-PAP de colessterol, Boehringer Mannheim) se calcula de los resultados de los experimentos comparativos efectuados en 40 muestras y el coeficiente de correlación era de $r = + 0,9885$.

Según estos valores existe una estrecha correlación entre los dos métodos.

D) Determinación enzimática de azúcar en la sangre empleando glucosa oxidasa, peroxidasa y ulterior reacción de color según Trinder (ejemplo para varios componentes sensitivos en el tubo capilar).

Con este método la glucosa se oxida por glucosa-oxidasa

para formar ácido glucónico. El H_2O_2 así formado se hace reaccionar con fenol y 4-aminofenazona empleando peroxidasa para formar el componente de color, la 4-(p-benzoquinona-monoimino)-fenazona.

5 La cantidad a medir es la extinción producida por la 4-(p-benzoquinona-amonoamino)-fenazona a una longitud de onda de 546 nm.

Instrumentos: Fotómetro espectral o de filtro con longitud de onda medidora de 546 nm.

10 Reactivos: Frasquito calibrado de un solo uso de plástico con tapa.

Espesor de capa: 1 cm.

Contenido: 1,5 cc de reactivo con la siguiente composición:

0,1 m moles/l de tampón de fosfato del pH 7,0

15 4 m moles/ l de fenol

Tubos capilares de vidrio de volumen calibrado de $10\ \mu\text{l}$ (longitud 10 mm; diámetro interior 1,12 mm), revestidos en la superficie interior con una mezcla compuesta de glucosa oxidasa, peroxidasa y 4-aminofenazona.

20 Tubos capilares de vidrio de volumen calibrado de $10\ \mu\text{l}$ para la alimentación de la muestra.

Método.

El lugar nominal de rotura en la tapa del frasquito calibrado de un solo uso de plástico se rompe mediante el gorrón previsto para esta finalidad. El tubo capilar de vidrio de volumen calibrado conteniendo la mezcla de glucosa-oxidasa, peroxidasa y 4-aminofenazona se introduce en el frasquito calibrado formándose así el reactivo completo. Inmediatamente después se introducen $10\ \mu\text{l}$ de muestra (por ejemplo suero o plasma) en el

25

30 frasquito calibrado empleando un tubo capilar de vidrio de vo-

lumen calibrado. El contenido de los tubos capilares se mezcla con el contenido del frasquito calibrado mediante ligera agitación. La extinción producida por el frasquito calibrado (E_1 = valor de control del reactivo y valor de control de la muestra) se determina a continuación en un fotómetro. Después de terminar el período de reacción (como mínimo 20 minutos a temperatura ambiente) se determina en el fotómetro la extinción para el análisis (E_2).

El resultado, la concentración de glucosa, se obtiene en miligramos por 100 cc de muestra (suero o plasma) por sustracción del valor de control del reactivo y valor de control de la muestra (E_1) del valor analítico (E_2) y por multiplicación de la diferencia por 597.

Preparación de los tubos capilares revestidos interiormente con glucosa-oxidasa, peroxidasa, 4-aminofenazona.

500 mg de glucosa-oxidasa (grado de dureza II 100 U/mg) 50 mg de peroxidasa (grado de pureza II 100 U/mg) y 520 mg de 4-aminofenazona se suspenden en 10 cc de un disolvente adecuado (por ejemplo, acetona o dicloroetano). Tubos capilares de vidrio de volumen calibrado de 10 μ l se llenan por inmersión en esta suspensión. El fluido se extrae bajo ligero vacío y la enzimas y la 4-aminofenazona queda así igualmente repartida en la superficie interna del tubo capilar.

El contenido de estos tubos capilares es estable durante como mínimo 15 meses si se almacena en frío y seco.

Si los frasquitos calibrados de un solo uso de plástico se envasan de manera que sean impermeables al vapor de agua, por ejemplo, por sellado en láminas de aluminio embutida, entonces el contenido es estable durante como mínimo 15 meses con volumen constante. La determinación es lineal en el margen de

50 hasta 400mg de glucosa por 100 cc de muestra. En concentraciones de glucosa superiores la muestra se ha de diluir.

La exactitud y precisión de las mediciones se comprobó mediante con varios análisis de sueros de control.

5 En la determinación de la glucosa empleando frasquitos ya preparados los resultados obtenidos se pueden comparar bien con los resultados obtenidos empleando el envase automático GOD-PAP de glucosa según el método de Boehringer Mannheim para la determinación de la glucosa.

10 La línea de regresión $y = 0,9828 \cdot X + 0,7491$ ($y =$ frasquito ya preparado; $X =$ método de embase GOD-PAP de glucosa automático, Boehringer Mannheim) y el coeficiente de correlación $r = + 0,9923$ se calcula de los resultados de los experimentos comparativos efectuados en 40 muestras.

15 Según estos valores existe una estrecha correlación entre los dos métodos.

E) Determinación enzimática del azúcar de la sangre por el método de glucosa-dehidrogenasa (ejemplo para ensayo UV).

20 Con este método la β -D-glucosa se transforma en D-gluconolactona por glucosa-dehidrogenasa. Aquí se reduce la NAD (nicotinamida-adenina-dinucleotido = co-enzima) a $NADH_2$. La enzima mutarotasa acelera la formación de β -D-glucosa de α -D-glucosa. La cantidad a medir es la extinción de $NADH_2$ a una longitud de onda de 340 ó 366 nm.

25 Instrumentos: Fotómetro espectral o de filtro con longitud de onda medidora de 340 ó 366 nm.

Reactivos: Frasquito calibrado de un solo uso de plástico con tapa.

30 espesor de capa: 1 cm; contenido 1,5 cc de reactivo con la siguiente composición:

0,1 m mol/l de tampón de fosfato de pH 7,6

Tubos capilares de vidrio del volumen calibrado de 10 μ l (longitud 10 mm; diámetro interior 1,12 mm), revestidos en la superficie interior con una mezcla compuesta de glucosa-dehidrogenasa, mutarotasa y NAD.

Tubos capilares de vidrio de volumen calibrado de 10 μ l para la alimentación de la muestra.

Método.

Con este método se determina el valor de control del reactivo (necesario solamente una vez para cada envase). Para esta finalidad un frasquito calibrado con tampón se mide con respecto a un frasquito calibrado con tampón y tubo capilar interiormente revestido. La diferencia de extinción es el valor de control del reactivo (E_0).

La muestra (por ejemplo 10 μ l de suero con plasma) se introduce en el frasquito calibrado abierto y se mezcla con el tampón. En el fotómetro se determina entonces el valor de control de la muestra (E_1). El tubo capilar revestido en el interior de glucosa-dehidrogenasa, mutarotasa, NAD, se introduce a continuación en el frasquito calibrado y el contenido se mezcla con el contenido del frasquito calibrado mediante ligera agitación. Terminado el período de reacción (10 minutos a temperatura ambiente) se determina en el fotómetro la extinción producida por el análisis (E_2).

El resultado, la concentración de glucosa en miligramos por 100 cc de muestra, se obtiene según la siguiente fórmula:

$$\text{Resultado: } E_2 - (E_1 + E_0) \times 824$$

Preparación de los tubos capilares revestidos en el interior de glucosa de hidrogenasa, mutarotasa, NAD.

100 unidades de gluca-dehidrogenasa

3,8 unidades de mutarotasa y

14,6 mg de NAD

5 se suspenden en 10 cc de un disolvente adecuado (por ejemplo diclorometano o dicloroetano). Tubos capilares de vidrio de volúmen calibrado de 10 μ l se llenan por inmersión en esta suspensión. El disolvente se extrae bajo ligero vacío y las enzimas y el NAD están igualmente distribuidos sobre la superficie interior del tubo capilar.

10 El contenido de estos tubos capilares es estable durante como mínimo 15 meses si se almacena en frío y seco.

15 El contenido de los frasquitos calibrados de un solo uso de plástico almacenados de manera que sean impermeables al vapor de agua, se mantienen asimismo estables durante más de 15 meses. El margen de medición y el grado de sensibilidad de la determinación es comparable con el método descrito por Banauch et al (7).

La exactitud y precisión se comprobó mediante análisis múltiples de sueros de control.

20 En la determinación del contenido de glucosa empleando los frasquitos ya preparados los resultados obtenidos se pueden comparar bien con los resultados obtenidos en la determinación de glucosa según Banauch (7), donde se empleó el envase de ensayo de glucosa (método Gluc-DH, ensayo UV) de Merck.

25 La línea de regresión $y = 0,9926 \cdot X + 2,4120$ (y=frascuito ya preparado; X = Merckotest [®] glucosa) y el coeficiente de correlación $r = + 0,9941$ se calcularon de los resultados de experimentos comparativos efectuados en 40 muestras.

30 Según estos valores existe una estrecha correlación entre los dos métodos.

F) Determinación de la actividad de colinesterasa por el método según Ellman (Ejemplo de un método cinético).

5 Con el método descrito por Ellman et al (8), la colinesterasa disocia el ioduro de acetil-tiocolina en ácido acético y ioduro tiocolínico. El ioduro tiocolínico reduce el ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzónico (DTNB) a ácido 5-tio-2-nitrobenzónico que se determina fotométricamente en una longitud de onda de 405 nm.

10 La cantidad a medir es el cambio en la extinción producido por el ácido 5-tio-2-nitrobenzónico a una longitud de onda de 405 nm.

Instrumentos: Fotómetro espectral o de filtro con longitud de onda medidora de 405 nm y un portador de recipiente de temperatura ajustable a 25°C.

15 Reactivos: Frasquito calibrado de un solo uso de plástico con tapa.

Espesor de capa: 1,00 cm; contenido: 1,5 cc de reactivo con la siguiente composición:

50 m moles/ l de tampón de fosfato del pH 7,2

20 0,1% de saponina

Tubos capilares de vidrio de volumen calibrado de 10 μ l (longitud 10 mm; diámetro interior 1,12 mm), que se reviste en su superficie interior de una mezcla de ioduro de acetiltiocolina y de DTNB.

25 Tubos capilares de vidrio del volumen calibrado de 5 μ l para la alimentación de la muestra.

Método.

30 Como las determinaciones de la actividad de las enzimas depende destacadamente de la temperatura, la actividad de la colinesterasa se debe determinar a exactamente 25°C.

Para esta finalidad los frasquitos calibrados de un solo uso de plástico se calientan previamente a esta temperatura (por ejemplo en el sujetador de frasquito de temperatura ajustable del fotómetro). El reactivo completo se forma mediante la introducción del tubo capilar revestido en su interior de ioduro de acetiltiocolina y DTNB. A continuación se agregan 5 μ l de muestra (por ejemplo suero, plasma o sangre completa) empleando un tubo capilar de volumen calibrado y se mezcla con el reactivo mediante ligera agitación. El frasquito calibrado se coloca en el contenedor de frascos del fotómetro, y se ajusta a una temperatura de 25°C. La extinción inicial (E_1) se lee después de 30 segundos.

E_2 se determina exactamente 60 segundos más tarde. E_3 se determina otros 60 segundos más tarde. La diferencia de extinción por minuto se obtiene como valor medio de $E_2 - E_1$ y $E_3 - E_2$. El resultado, la actividad de la colinesterasa en unidades por mililitro (U/cc), se obtiene por multiplicación de la diferencia de extinción por minuto ($\Delta E/\text{min}$) por 22,6.

Preparación de los tubos capilares revestidos interiormente con ioduro de acetildiocolina y DTNB.

2,25 g de ioduro de acetiltiocolina y 150 mg de ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzónico (DTNB) se suspenden en 10 cc de un disolvente adecuado (por ejemplo metanol ó etanol). Tubos capilares de vidrio de volumen calibrado de 10 μ l se llenan por inmersión en esta suspensión. El disolvente se extrae bajo ligero vacío y el ioduro de acetil-tiocolina y el DTNB quedan así igualmente distribuidos en la superficie interior del tubo capilar.

El contenido de estos tubos capilares es estable durante como mínimo 15 meses si se almacena en frío y seco.

El frasquito calibrado de un solo uso de plástico em-
basado de manera que sea impermeable al vapor de agua tiene
asimismo una duración de como mínimo 15 meses. El margen de
medición y la sensibilidad corresponden a la del método des-
crito por Frank (9).

La exactitud y precisión se comprueban por varios
análisis de suero de control. Al determinar la actividad de
la colinesterasa . empleando los frasquitos ya preparados los
resultados obtenidos se pueden comparar bien con los resulta-
dos de la actividad de colinesterasa determinada según Ellman
et al (8), empleándose los paquetes de ensayo de colinesterasa
de Boehringer Mannheim.

La línea de regresión $y = 1,0030; X - 0,0210$ ($y =$ fras-
quitos ya preparados; $X =$ paquete de ensayo de colinesterasa
de Boehringer Mannheim) y el coeficiente de correlación $r = +$
 $0,9963$ se calcularon de los resultados de los experimentos
comparativos efectuados en 40 muestras.

Según estos valores existe una estrecha correlación
entre los dos métodos.

Descrita suficientemente la naturaleza del invento,
así como la manera de realizarlo en la práctica, debe hacerse
constar que las disposiciones anteriormente indicadas son sus-
ceptibles de modificaciones de detalle, en cuanto no alteren
su principio fundamental.

LITERATURA:

- [1] C. STEFFEN:
Photometrische Bestimmung der Erythorzytenzahl
Arztl. Lab. 5 (1959) 76 - 77
- 5 [2] L. JENDRASSIK et al.:
Biochem. Z. 297 (1938) 81
- [3] A. W. WAHLEFELD et al.:
Scand. J. clin. Lab. Invest.
Vol. 29, Suppl. 126 (1972) Abstract 11.12
- 10 [4] H. POPPER et al.:
Biochem. Z. 291 (1937) 354
- [5] P. ROSCHLAU et al.:
9th Int. Congr. on Clin. Chemistry,
Toronto, 1975 Abstr. No. 1
- 15 [6] P. TRINDER:
Ann. Clin. Biochem. 6 (1969) 24
- [7] D. BANAAUCH et al.:
Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.
13 (1976) 101
- 20 [8] G.L. ELLMAN et al.:
Biochem. Pharmacol. 7 (1961) 88
- [9] G. FRANK:
Z. Analyt. Chem. 279 (1976) 155.

REIVINDICACIONES

5 1.- Dispositivo para preparar un líquido de medición para uso en instrumentos analíticos ópticos, compuesto de un frasquito sellado conteniendo una solución de reacción exacta-
mente dosificada y un tubo capilar que se inserta en el frasquito para la alimentación del líquido de muestra a la solución de reacción, caracterizado porque las propiedades ópticas del líquido de medición se regulan por la disposición de como mínimo uno de los reactantes necesarios para la formación
10 del líquido de medición de dicha solución de reacción en fase sólida en el tubo capilar empleado para la alimentación del líquido de muestra y/o en un segundo tubo capilar que se introduce en el frasquito.

15 2.- Dispositivo según la reivindicación 1, caracterizado porque como mínimo uno de los reactantes se aplica en forma finamente particulada sobre la pared interior del tubo capilar.

20 3.- Dispositivo según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque para la determinación de la concentración de hemoglobina la solución de reacción en el frasquito comprende una solución de potasio-hexacianoferrato (III)/cloruro sódico tamponado con fosfato y el tubo capilar empleado para la alimentación de la muestra se reviste de cianuro potásico.

25 4.- Dispositivo según las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado porque para determinar la bilirubina en la sangre la solución de reacción comprende $0,1-n$ de ácido clorhídrico y


adicionalmente al tubo capilar empleado para la alimentación de la muestra de sangre se dispone un segundo tubo capilar que se recubre de cloruro de 2,5-diclorofenildiazonium.

5 5.- Dispositivo según las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado porque para la determinación del colesterol en suero o plasma la solución de reacción comprende una solución de fenol-metanol tamponada con fosfato potásico con adición de hidroxipolietoxidodecano y, adicionalmente al tubo capilar empleado para la alimentación del suero o plasma se emplea un segundo tubo capilar revestido de 4-aminofenazona para introducir una mezcla de enzimas compuesta de colesterol-esterasa, colesterol oxidasa y peroxidasa.

15 6.- Dispositivo según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque para la determinación del azúcar de la sangre enzimática según el método de Trinder la solución de reacción comprende fenol tamponado con fosfato y adicionalmente al tubo capilar empleado para la alimentación de la muestra de suero o plasma se emplea un segundo tubo capilar que se dota de una mezcla de glucosa oxidasa, peroxidasa y 4-aminofenazona.

20 7.- Dispositivo según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque para la realización de la determinación de azúcar de sangre enzimática por el método de glucosa dehidrogenasa la solución de reacción comprende una solución tamponada con fosfato con un pH de 7,6 y adicionalmente al tubo capilar empleado para la alimentación de la muestra se emplea un segundo tubo capilar que está dotado de una mezcla de glucosa dehidrogenasa, mutarotasa y nicotinamida adenin dinucleotido

25



(NAD).

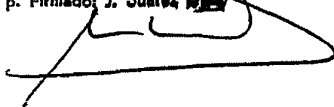
5 8.- Dispositivo según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque para la determinación de la actividad de colinesterasa según el método de Ellman la solución de reacción se compone de una solución tamponada con fosfato con un pH de 7,2 y adicionalmente al tubo capilar empleado para la alimentación de la muestra se emplea un segundo tubo capilar revestido de una mezcla compuesta de ioduro de acetil tiocolina y ácido ditiobis-2-nitrobenzónico.

10 9.- Dispositivo para preparar un líquido de medición para uso en instrumentos analíticos ópticos, tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria e ilustrado en los adjuntos dibujos.

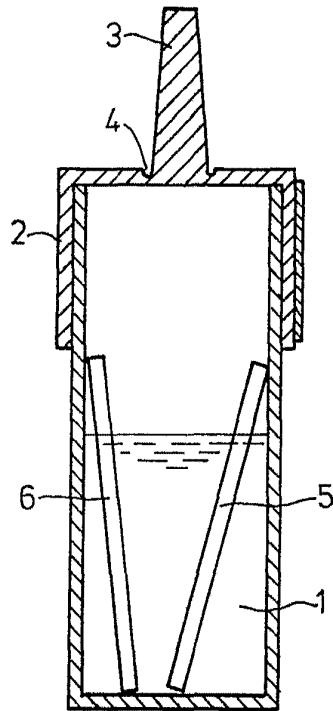
15 Esta Memoria consta de treinta y cuatro hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 2 MAYO 1978

BAYER AKTIENGESELLSCHAFT.

J. SUAREZ ACEDO Y PUMBO
p. p. Firmados J. Suarez 





RECEIVED
MAY 12 1978

Madrid 12 MAYO 1978

INGENIERO DE ASESORÍA Y COMERCIO
Firmado J. Suarez Diaz