



ESPAÑA

19 ES	11 NUMERO	10 A1
	21 481.516	
	23 FECHA DE PRESENTACION	
	13-6-1979	

PATENTE DE INVENCION

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

30 PRIORIDADES:		
31 NUMERO	32 FECHA	33 PAIS
915.587 39.113	15-6-1979 15-5-1979	EE.UU. "
47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	52 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	G 01 N 33/16; G 01 N 33/12	
54 TITULO DE LA INVENCION		
"UN METODO PARA PREPARAR MEDIOS DE ENSAYO PARA ANALIZAR EL CONTENIDO DE UREA DE FLUIDOS"		
71 SOLICITANTE (ES)		
MILES LABORATORIES, INC		(Docket 11927)
DOMICILIO DEL SOLICITANTE		
P.O. Box 40, Elkhart, Indiana 46515, EE.UU.		
72 INVENTOR (ES)		
Richard S. Turk y Adam P. Zipp		
73 TITULAR (ES)		
74 REPRESENTANTE		
DON ALBERTO DE ELZABURU MARQUEZ		(P.-72.115)

V68

**POOR
QUALITY**

1

FUNDAMENTO DE LA INVENCION1. Campo de la invención

Esta invención se refiere a la determinación del contenido de urea de fluidos y de soluciones acuosas y, más en particular, a medios y métodos de ensayo para mejorar la estabilidad de los análisis colorimétricos, para la determinación rápida y exacta de urea.

2. Descripción de la técnica anterior.

La urea es un producto final principal del metabolismo proteínico en el cuerpo humano. La concentración de urea en sangre constituye, por consiguiente, un indicador de la función renal. La elevación de la concentración de urea en sangre significa una función renal inadecuada. Como las sustancias tóxicas son retenidas en la sangre en una proporción aproximada al nivel de urea, un nivel alto de nitrógeno no proteínico o de nitrógeno de urea en sangre, constituye motivo de preocupación para un médico.

Una de las causas más comunes de los valores altos de urea en sangre (uremia) es un trastorno renal, que puede ser agudo o crónico. Cualquiera de las enfermedades inflamatorias, degenerativas, congénitas o neoplásicas, que afectan al riñón, pueden provocar uremia, y el grado de uremia proporciona un índice aproximado de la gravedad del estado existente.

25

En la práctica, la concentración de urea en sangre se expresa, normalmente, en términos de nitrógeno de urea en sangre (NUS). Este valor de NUS representa la cantidad de nitrógeno presente en forma de urea y es aproximadamente la mitad del valor total de urea. Cuando se ha determinado bien sea el valor de urea o el valor de nitrógeno, el

30

1 otro valor puede calcularse a partir del primero.

El intervalo normal de valores NUS en los individuos, varía entre 5 y 20 miligramos por ciento (mg%).

Ordinariamente, no se da importancia a los valores inferiores. Sin embargo, las elevaciones de los valores de NUS indican, generalmente, la presencia de un estado anormal. La causa más común de aumento del nitrógeno de urea en sangre es una excreción inadecuada, debida usualmente a un trastorno renal o a una obstrucción de las vías urinarias. Por ejemplo, en la nefritis aguda, el nivel de NUS puede variar entre 25 miligramos por ciento hasta un valor tan alto como de 160 miligramos por ciento. La retención de urea elevada se produce también en la destrucción parenquimatosa extensa del tejido del riñón, como en la pielonefritis, en la nefrosclerosis avanzada, en la tuberculosis renal, en la necrosis cortical renal, en la malignidad renal, en la supuración renal o en la gota crónica. Aunque los valores de NUS pueden aumentar hasta valores tan elevados como de 400 mg %, éstos no exceden usualmente de 200 mg %.

20 Por lo tanto, existe una necesidad en el sector médico, actualmente, de disponer de una técnica analítica rápida y exacta, para la determinación del NUS. Anteriormente, se han utilizado métodos químicos por vía húmeda, en gorrosos para efectuar dicho análisis. Se han utilizado también otros métodos, tales como métodos por conductividad, técnicas espectrofotométricas y técnicas colorimétricas. Aunque estos métodos son generalmente exactos, las técnicas tienden a ser algo lentas de realización y pueden requerir una interpretación cuidadosa.

30 En el método quizá el más comúnmente utiliza

1 do, para la determinación de urea en fluidos biológicos, la
urea se hidroliza a carbonato amónico, por medio de la enzi
ma ureasa, en presencia de una solución tampón. La cantidad
de amoniaco liberada se determina colorimétricamente. Este
5 primer método es muy específico y sensible, pero tiene la
desventaja de la inhibición e inactivación de la ureasa, el
problema de la estabilidad del reactivo y una desventaja adi
cional, debida a que el método determina amoniaco endógeno.
Otro procedimiento utiliza la hidrólisis con ureasa y re-
10 quiere un aparato especial, del que no siempre se dispone
en el laboratorio de rutina. Todavía otro procedimiento em-
plea la reacción colorimétrica directa de la urea en un fil
trado libre de proteínas, con un reactivo orgánico, tal co-
mo diacetilmonoxima. La reacción del diacetilo tiene las des
15 ventajas de que el color producido es inestable, que los co-
lores se desarrollan a unos 95°C, y que el diacetilo volá-
til tiene un olor que es desagradable, por lo menos, para
algunos individuos.

En la patente de Estados Unidos Nº 4.074.972,
20 cedido a American Monitor Corporation, se describe una de-
terminación de urea en medio líquido, que implica una reac-
ción entre una muestra de fluido biológico y una solución
reactivo ácida de aldehído orto-ftálico y 3-(4-amino-1-metil
-butil-amino)-6-metoxiquinoleína. En ella no existe ninguna
25 enseñanza ni ninguna sugerencia sobre la incorporación de la
solución reactivo a un medio de ensayo, tal como una matriz
portadora, y mucho menos sobre una matriz portadora cargada
de resina cambiadora de cationes fuerte, que está en su for
ma ácida. Además, esta patente no describe ningún método de
30 superar el problema de la estabilidad, que se produce cuan-

1 do se combinan los reactivos de la solución reactivo ácida.
Otro problema de la determinación descrita, es el hecho de
que las determinaciones deben efectuarse a longitudes de on
da comprendidas en el margen de 470 a 540 nanometros, el
5 cual está próximo al máximo de absorción de color de la mues
tra en blanco, dando como resultado la posibilidad de erro
res de medida por espectroscopía de reflectancia.

En el sector industrial, la urea es una impor
tante materia de adición a los fluidos de procesos, tales co
10 mo baños galvanoplásticos, siendo de gran valor en este sec
tor el disponer de un medio rápido para determinar la concen
tración de urea. La urea propiamente dicha se utiliza como
fertilizante y en su producción y uso, es importante, como
medida de control, un medio rápido para la determinación de
15 este material.

Por consiguiente, tanto para las aplicaciones
médicas como industriales, existe la necesidad de determinar
el contenido de urea de los fluidos, de un modo que pueda
efectuarse rápidamente, sin un equipo altamente especializa
20 do ni técnicos adiestrados para hacer funcionar dicho equipo.

RESUMEN DE LA INVENCION

Un objeto de la presente invención es pro
porcionar medios de ensayo para la determinación del conte
nido de urea de los fluidos, en los que se consiga la esta
25 bilidad de los reactivos utilizados para la preparación de
los medios de ensayo.

Otro objeto de la presente invención es redu
cir a un mínimo las interferencias debidas a la turbidez del
suero y a la presencia de bilirrubina, cuando se determina
30 el contenido de urea del suero en sangre.

1 Todavía otro objeto de la presente invención
es proporcionar medios de ensayo, que tengan una especifici-
dad y sensibilidad altas, para la determinación de urea en
los fluidos, a lo largo de un margen de concentraciones.

5 Aún otro objeto de la presente invención es
proporcionar medios de ensayo colorimétricos, capaces de de-
tectar urea, cuando la cantidad de fluido a someter a la de-
terminación, es limitada.

10 Un objeto adicional de la presente invención
es proporcionar una determinación de NUS, que pueda ser efec-
tuada rápidamente, sin necesidad de un equipo altamente es-
pecializado.

15 De acuerdo con la presente invención, el me-
dio de ensayo para detectar la urea presente en un fluido
de ensayo, comprende un miembro portador modificado con áci-
do, que incorpora reactivos separados entre sí. Un reactivo
es aldehído orto-ftálico, y el otro reactivo es 3-hidroxi-1,
2,3,4-tetrahidrobenzo/h/quinoleína, 3-acetoxi-1,2,3,4-te-
trahidrobenzo/h/quinoleína, o sus sales diclorhidrato. Ven-
20 tajosamente, los reactivos están separados entre sí, median-
te un material polímero.

El medio de ensayo puede ser utilizado median-
te una inmersión momentánea del mismo en una muestra de en-
sayo, o introduciendo de otra manera la muestra de ensayo
25 en la matriz portadora, y observando cualquier variación de
color detectable que resulte.

DESCRIPCION DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

Para los fines de esta solicitud, debe enten-
derse que el término "fluidos" se refiere a fluidos corpora-
30 les, tales como suero sanguíneo, plasma sanguíneo, orina,

1 líquido espinal, y que debe referirse, además, a soluciones
acuosas que contienen urea. Aunque la aplicación más preferi
da del medio y del método de ensayo de esta invención, son
los fluidos corporales, tales como el suero sanguíneo, debe
5 entenderse que el medio y el método de ensayo pueden aplicar
se también a fluidos industriales.

De acuerdo con la presente invención, se pre
para una única tira de reactivo, mediante la incorporación
de los reactivos aquí descritos, a una matriz portadora, se
10 parados sobre ésta de un modo adecuado, por ejemplo, median
te una barrera polímera. La expresión "matriz portadora" se
refiere a matrices absorbentes y no absorbentes, que son in
solubles en agua o en otros fluidos fisiológicos, y que man
tienen su integridad estructural cuando se exponen al agua
15 o a otros fluidos fisiológicos. Las matrices absorbentes ade
cuadas que pueden ser utilizadas, incluyen: papel, celulosa,
madera, bellones de resina sintética, telas tejidas y no te
jidas, y similares. Las matrices no absorbentes, incluyen:
fibra de vidrio y materiales plásticos orgánicos, tales co
20 mo polipropileno y similares. La matriz puede fijarse, ven
tajosamente, a un miembro de soporte insoluble, tal como una
tira de plástico orgánico, por ejemplo, poliestireno, median
te medios adecuados, tales como cinta adhesiva por ambas ca
ras, para facilidad de utilización.

25 Los reactivos incorporados a la matriz porta
dora reaccionan con la urea en condiciones ácidas, para pro
ducir un cromógeno, que absorbe luz por encima de unos 550
nanometros y, normalmente, entre aproximadamente 550 y apro
ximadamente 700 nanometros. La cuantificación puede conse
30 guirse mediante la vigilancia de la variación de reflectan

1 cia a unos 620 nanometros, después de la aplicación de la muestra o del contacto con ella.

Con el fin de conseguir la acidez deseada para las condiciones del ensayo, se ha encontrado necesario
5 modificar o impregnar la matriz portadora con un material ácido. Un método de preparar la matriz portadora modificada con ácido, implica impregnar la matriz portadora con materiales ácidos, tales como ácido benceno-sulfónico, ácido bencenodisulfónico, ácido poliestirenosulfónico, o similares, en una
10 cantidad comprendida entre aproximadamente 5 y aproximadamente 10 gramos %.

Un método alternativo para la preparación de la matriz portadora modificada con ácido, implica cargar la matriz portadora con resinas cambiadoras de cationes fuertes, preferiblemente, en su forma ácida. Las matrices portadoras cargadas con resinas cambiadoras de iones, que contienen Amberlite IR 120 (Rohm & Haas, Filadelfia, Pensilvania) o Dowex 50 (Dow Chemical Co., Midland, Michigan) son particularmente preferidas como materiales portadores modificados con ácido sulfónico, especialmente cuando se utiliza suero. Estas resinas cambiadoras de iones, particulares, son poliestirenos modificados con ácido sulfónico, reticulados con diversas cantidades de divinilbenceno. Cada una de las matrices portadoras está cargada con una cantidad comprendida
15 entre aproximadamente 25 y aproximadamente 50 % en peso de resina cambiadora de iones y, preferiblemente, entre aproximadamente 35 y aproximadamente 50% en peso.

Se utilizan dos reactivos para la preparación del medio de ensayo. Un reactivo es el aldehído orto-ftálico, y el otro reactivo es 3-hidroxi-1,2,3,4-tetrahidroben-
20

1 zo(h)quinoleína, 3-acetoxi-1,2,3,4-tetrahidrobenzo(h)quino-
leína o sus sales diclorhidrato. Se prefiere la 3-hidroxi-1,
2,3,4-tetrahidrobenzo(h)quinoleína.

Aunque de acuerdo con la presente invención,
5 los reactivos deben ser aplicados a la matriz portadora, por
separado, el orden de aplicación de los reactivos carece de
importancia. Por lo tanto, puede aplicarse primero cualquier
reactivo. El material de ácido sulfónico puede aplicarse a
la matriz portadora, bien sea a la vez que el primer reacti-
10 vo, o bien puede utilizarse una matriz portadora cargada con
resina cambiadora de iones.

En el método preferido, la primera etapa com-
prende, por lo tanto, la aplicación de por lo menos un reac-
tivo a la matriz portadora. La segunda etapa comprende, nor-
15 malmente, la aplicación del polímero a la matriz portadora,
estando presente el polímero en un disolvente que no disuel-
ve ni al primer reactivo ni al material de ácido sulfónico.
Pueden utilizarse polímeros tales como: metilcelulosa, ace-
tato de celulosa, óxido de polietileno, copolímero de esti-
20 reno-butadieno, copolímero de estireno-isopreno, poliestire-
no y copolímero de estireno-acrilonitrilo. Finalmente, la
tercera etapa o etapa final, comprende la aplicación del
otro reactivo a la matriz portadora, estando presente el reac-
tivo en un disolvente que no disuelve al material polímero
25 aplicado en la segunda etapa. Normalmente, se deja que la
tira reactivo se seque entre cada etapa.

Los disolventes adecuados para ser utilizados
con el aldehído orto-ftálico, incluyen: agua, metanol, ace-
tona y hexano. El agua, el metanol o una mezcla de los mis-
30 mos, son el disolvente preferido, en el caso de que el reac

1 tivo aldehído orto-ftálico se aplique en la primera etapa. La
acetona o el hexano son el disolvente preferido, en el caso
de que el reactivo aldehído orto-ftálico se aplique en la ter
cera etapa. En lo que respecta a los polímeros, los disolven
5 tes adecuados incluyen: cloroformo, acetona, benceno, tolu-
eno y similares. Los disolventes adecuados para el otro reac-
tivo, incluyen: agua, metanol y mezclas de metanol y acetona.
El agua es nuevamente el disolvente preferido, cuando el
reactivo se aplica en la primera etapa y, cuando el reacti-
10 vo se aplica en la tercera etapa, el disolvente preferido es
metanol o una mezcla de metanol-acetona.

Los reactivos pueden utilizarse en diversas
concentraciones. Normalmente, el aldehído orto-ftálico está
presente en la cantidad comprendida entre aproximadamente 300
15 (miligramos por ciento (mg%) a 800 mg% y, preferiblemente,
está presente en una cantidad comprendida entre aproximada-
mente 500 mg % y 600 mg %. El otro reactivo está presente
normalmente, en una cantidad comprendida entre aproximadamen
te 200 mg% y aproximadamente 500 mg%, cuando se emplea una
20 sal diclorhidrato, y en la cantidad comprendida entre apro-
ximadamente 600 mg % y aproximadamente 1200 mg %, cuando se
utiliza la base libre. Las concentraciones del material po-
límérico no son esenciales, siempre que se utilice una canti-
dad comprendida entre aproximadamente 0,5 gramos por ciento
25 (g%) y aproximadamente 5 g%. Preferiblemente, el material
polímérico debe estar presente en una cantidad comprendida en
tre aproximadamente 1 g por ciento y 3 g por ciento.

Aunque el método preferido para la prepara-
ción del medio de ensayo, es mediante la impregnación en
30 tres etapas, seguida por secado, el medio de ensayo de la

1 presente invención puede prepararse, también, mediante otras técnicas adecuadas, tales como impresión sobre una o más caras de una matriz o, adecuadamente, aplicación de los reactivos separados en las caras opuestas de un sustrato o matriz.

5 El medio de ensayo de acuerdo con la presente invención se utiliza ventajosamente, mediante la inmersión momentánea del mismo en una muestra de ensayo o mediante la introducción, de otro modo, de una muestra de ensayo sobre la matriz portadora, y observando cualquiera variación
10 de color detectable que resulte.

EJEMPLO 1

La preparación del medio de ensayo en forma de un dispositivo de ensayo, no será descrita. Panel de filtro SA-2, cargado con cambiador de cationes y lavado previamente con ácido clorhídrico (10-20%), obtenido de la firma
15 Reeve Angel, Clifton, Nueva Jersey, que tiene una capacidad cambiadora de aproximadamente 4 miliequivalentes por gramo de resina seca, se impregnó con las siguientes soluciones, en tres etapas, después de haber sido lavado con agua desionizada, y secado. El panel SA2 es un panel que contiene resina cambiadora de iones Amberlite IR 120, sulfonada, para
20 comunicar propiedades cambiadoras de iones. La resina se suministra en la forma sódica, y el papel contiene entre 45 y 50 por ciento de resina.

Primera etapa de impregnación

Se impregnó el panel de filtro, sumergiéndolo en una solución que contenía los siguientes materiales, en las cantidades indicadas.

<u>Material</u>	<u>Cantidad</u>
30 agua	100 mililitros (ml)

- 1 copolímero de anhídrido maleico-éter
metilvinílico (estabilizador) 100 miligramos (mg)
ácido bórico (estabilizador del co-
lor) 2,5 gramos (g)
- 5 aldehído orto-ftálico 300 mg
- 7-(2,3-dihidroxipropil)-teofilina (es-
tabilizador) 10 g

Después de la impregnación, se secó el papel a 60°C, durante 30 minutos.

10 Segunda etapa de impregnación

Seguidamente, se impregnó el papel impregnado y seco, procedente de la primera etapa, sumergiéndolo en una solución que contenía los siguientes materiales, en las cantidades indicadas:

- | 15 <u>Material</u> | <u>Cantidad</u> |
|---|-----------------|
| tolueno | 100 ml |
| gránulos de poliestireno (Styron,
Dow Chemical Co., Midland, Michigan) | 2 g |

Tercera etapa de impregnación

- 20 Seguidamente, se impregnó el papel impregnado y seco procedente de la segunda etapa, sumergiéndolo en una solución que contenía los siguientes materiales, en las cantidades indicadas. Los materiales (1) y (4) se disolvieron primeramente, los materiales (2) y (3) se disolvieron por se-
- 25 parado y, seguidamente, se añadieron a los materiales (1) y (4) para formar la solución.

- | <u>Material</u> | <u>Cantidad</u> |
|---|-----------------|
| (1) metanol | 30 ml |
| (2) acetona | 70 ml |
| 30 (3) hidroxipropil-celulosa (estabilizador) | 0,5 g |

- 1 (4) clorhidrato de 3-hidroxi-1,2,3,4-tetrahidro benzo
 2 /h/quinoleína 300 mg

3 Seguidamente, se secó el papel a 60°C, du-
 4 rante 10 minutos, y se aplicó a un sustrato de poliestireno,
 5 por medio de una cinta adhesiva por ambas caras. El sustrato
 de poliestireno proporciona un asidero adecuado, con el cual
 sumergir el dispositivo de ensayo de papel impregnado de reac-
 tivo, resultante, en una solución, con fines de determinación
 del contenido de urea de la solución.

10 La intensidad del color de las tiras de reac-
 tivo de nitrógeno de urea para diversas concentraciones de
 urea, se muestran en la siguiente tabla.

Una parte de una muestra de suero, que conte-
 nía la cantidad indicada de nitrógeno de urea, se diluye con
 15 dos partes de agua y se aplican 0,030 ml a la superficie de
 un dispositivo de ensayo, preparado como en el Ejemplo I.
 Después de incubar a 37°C durante 1 minuto, se determina la
 reflectancia de la tira de reactivo, para 620 nanómetros (nm)
 con relación a una superficie reflectante blanca, de sulfato
 20 bórico.

Tabla 1

Concentración de	Reflectan-	Concentración de	Reflectancia	
nitrogeno de urea	cia, %	nitrogeno de urea,	%	
mg%		mg%		
25	0	75	50	30
	5	62	60	27
	10	54	70	25
	20	44	90	21
	30	38	120	18
30	40	33	150	15

1

EJEMPLO II

Se describirá a continuación, la preparación de otro medio de ensayo. Se impregnó papel de filtro, cargado al 40% en peso con Dowex 50W, suministrada en su forma ácida, reticulada al 8% con divinilbenceno (Dow Chemical Co., Midland, Michigan), con las siguientes soluciones, en tres etapas.

Primera etapa de impregnación

Se impregnó el papel de filtro, sumergiéndolo en una solución que contenía los siguientes materiales, en las cantidades indicadas.

<u>Material</u>	<u>Cantidad</u>
agua	100 mililitros (ml)
óxido de polietileno	50 miligramos (mg)
aldehído orto-ftálico	300 mg
7-(2,3-dihidroxipropil)-teofilina (estabilizador)	10 g
ácido bórico	2,5 g

Después de la impregnación, se secó el papel a 60°C, durante 30 minutos.

Segunda etapa de impregnación

El papel impregnado y seco procedente de la primera etapa, se impregnó seguidamente, sumergiéndolo en una solución que contenía los siguientes materiales, en las cantidades indicadas.

<u>Material</u>	<u>Cantidad</u>
tolueno	100 ml
copolímero de estireno-acrilonitrilo	2 g

Después de la impregnación con el copolímero de estireno, se secó el papel a 60°C, durante 15 minutos.

Tercera etapa de impregnación.

1 El papel impregnado y seco procedente de la
segunda etapa, se impregnó seguidamente, sumergiéndolo en una
solución que contenía los siguientes materiales, en las can-
tidades indicadas. Los materiales (1) y (4) se disolvieron
5 primero; los materiales (2) y (3) se disolvieron por separa-
do y, seguidamente, se añadieron a los materiales (1) y (4),
para formar la solución.

<u>Material</u>	<u>Cantidad</u>
(1) metanol	30 ml
10 (2) acetona	70 ml
(3) hidroxipropil-celulosa	0,5 g
(4) clorhidrato de 3-acetoxi-1,2,3,4- -tetrahidrobenzo[h]quinoleína	300 mg

15 Seguidamente, se secó el papel a 60°C, duran-
te 10 minutos, y se aplicó a un sustrato de poliestireno,
mediante una cinta adhesiva por ambas caras. El sustrato de
poliestireno proporciona un asidero adecuado, con el cual su-
mergir el dispositivo de ensayo de papel impregnado de reac-
tivo resultante, en una solución, con fines de determinación
20 del contenido de urea de la solución.

Se prepararon otros medios de ensayo, por el
mismo procedimiento de este ejemplo II, utilizando Dowex 50W,
la cual estaba reticulada al 2% con divinilbenceno y reticu-
lada al 16% con divinilbenceno. Se encontró que la intensi-
25 dad de la producción del color sumergida en una muestra de
urea, podía controlarse mediante la variación de la cantidad
de reticulación. La intensidad variaba inversamente con el
grado de reticulación.

La velocidad de la formación de color de las
30 tiras de reactivo del nitrógeno de urea, preparadas con por

1 tadores que contienen resinas cambiadoras de iones de una re-
 ticulación con divinilbenceno (DVB) diversa, se muestra en
 la siguiente tabla.

5 Se prepararon tiras de reactivo como en el
 Ejemplo II, con papel cargado con resina cambiadora de iones,
 que contenía resinas Dowex 50 de una reticulación con divi-
 nilbenceno, del 2%, del 3% y del 16%. Seguidamente, se dilu-
 yeron muestras de urea, se incubaron durante un minuto a 37°C,
 y se sometieron a determinación en un reflectómetro, como en
 10 la Tabla 1.

Tabla 2

Lecturas de reflectancia para diversas concentraciones de
 urea y para diversas reticulaciones con DEV.

(Las lecturas de reflectancia y la intensidad del color, va-
 15 rían inversamente).

Concentración de nitrógeno de urea, mg%	% de reticulación con DVB		
	2	8	16
20	37	44	66
40	27	33	56
20 60	21	27	50

En la siguiente tabla se ilustra la velocidad
 de la formación del color de las tiras de reactivo del nitró-
 geno de urea, preparadas con portadores cargados, que tienen
 diversas cantidades de resina cambiadoras de iones.

25 Se prepararon tiras de reactivo como en el
 Ejemplo I, con papel cargado con resina cambiadora de iones,
 que contenía un 25%, un 35% y un 50% en peso de una resina
 cambiadora de iones reticulada al 8% con divinilbenceno. Se
 diluyeron muestras de urea, se incubaron durante un minuto
 30 a 37°C, y se sometieron a determinación en un reflectómetro

1 como en la Tabla 1.

Tabla 3

Lecturas de reflectancias para diversas concentraciones de urea y para diversas cargas de resina.

5 Concentración de nitrógeno de urea, mg %	Carga de resina, %		
	25	35	50
20	58	51	44
40	48	40	33
60	42	33	27

10

EJEMPLO III

Utilizando papel con resina cambiadora de iones, como se describe en el Ejemplo II, se preparó un dispositivo de ensayo, mediante el procedimiento siguiente en tres etapas.

15 Primera etapa de impregnación

Se impregnó el papel, sumergiéndolo en una solución que contenía los siguientes materiales, en las cantidades indicadas.

	<u>Materiales</u>	<u>Cantidad</u>
20	agua	25 ml
	óxido de polietileno	100 mg
	7-(2,3-dihidroxipropil)-teofilina	10 g
	ácido etilendinitrilotetraacético,	
	sal dipotásica	1,5 g
25	laurilsulfato sódico	100 mg
	metanol	75 ml
	glicerina	0,2 ml
	ácido bórico	4,5 g
	aldehído orto-ftálico	600 mg

30

Después de la impregnación, se secó el papel

1 a 50°C, durante 20 minutos.

Segunda etapa de impregnación

<u>Materiales</u>	<u>Cantidad</u>
-------------------	-----------------

tolueno	100 ml
---------	--------

5 gránulos de poliestireno	3 g
----------------------------	-----

Después de la impregnación con el polímero de estireno, se secó el papel a 50°C, durante 10 minutos.

Tercera etapa de impregnación

10 El papel impregnado y seco procedente de la segunda etapa, se impregnó seguidamente, sumergiéndolo en una solución que contenía los siguientes materiales, en las cantidades indicadas. Los materiales (2), (3) y (4) se combinaron por separado y, seguidamente, se añadió el material (1) para formar la solución.

15 <u>Materiales</u>	<u>Cantidad</u>
----------------------	-----------------

(1) metanol	25 ml
-------------	-------

(2) acetona	75 ml
-------------	-------

(3) hidroxipropil-celulosa	0,75 g
----------------------------	--------

(4) 3-hidroxi-1,2,3,4-tetrahidrobenzo[h]quino-	
--	--

20 lefina	900 mg
-----------	--------

El papel se secó durante 5 minutos a 50°C. El dispositivo de ensayo resultante puede utilizarse con suero o plasma sanguíneos, que no han sido diluidos, como se requiere en el caso del dispositivo de ensayo de los ejemplos I y II, para concentraciones de hasta 70 mg % de nitrógeno de urea.

25 Se entenderá también, que el uso del estabilizador hidroxipropilcelulosa, no es esencial para la presente invención. Se entenderá, además, que un estabilizador, tal
30 como cafeína, puede sustituir a la difilina empleada en el

1 siguiente ejemplo. Se ha encontrado que la difilina o su sustituto debe utilizarse en una cantidad mayor de 5 gramos por ciento.

EJEMPLO IV

5 Con fines de comparación, se prepara otro dispositivo de ensayo, mediante el siguiente procedimiento.

Primera etapa

Papel de filtro Whatman 3 MM, se modifica con ácido, sumergiéndolo en una solución que contiene los siguientes materiales, en las cantidades indicadas.

<u>Material</u>	<u>Cantidad</u>
agua	100 ml
ácido bencenosulfónico	10 g
diclorhidrato de N-naftiletildiamina	400 mg
15 difilina	10 g
copolímero de anhídrido maleico-éter vinilmetílico (estabilizador)	0,1 g

Después de la impregnación, se seca el papel a 60°C, durante 20 minutos.

20 Segunda etapa

El papel impregnado y seco procedente de la primera etapa, se impregna seguidamente, sumergiéndolo en una solución que contiene los siguientes materiales, en las cantidades indicadas:

<u>Material</u>	<u>Cantidad</u>
óxido de polietileno	1 g
cloroformo	70 ml
acetona	30 ml

30 Seguidamente, se seca el papel a 60°C, durante 20 minutos.

1 Tercera etapa

El papel impregnado y seco procedente de la segunda etapa, se impregna seguidamente, sumergiéndolo en una solución que contiene los siguientes materiales, en las

5 cantidades indicadas:

<u>Material</u>	<u>Cantidad</u>
Hexano	100 ml
Aldehído orto-ftálico	300 mg

Seguidamente, se seca el papel como antes, a 10 60°C, durante 20 minutos. El papel impregnado y seco, resultante, se aplica seguidamente a un sustrato de poliestireno, utilizando cinta adhesiva por ambas caras. La tira reactiva resultante puede ser utilizada para cuantificar muestras desproteinizadas. Se produce una inlesable precipitación cuando se intenta cuantificar muestras que contienen proteína. 15 Este hecho subraya la importancia del descubrimiento que ha sido efectuado.

De lo que antecede, se verá que esta invención es muy adecuada para conseguir todos los fines y objetos expuestos en lo que antecede, junto con otras ventajas 20 que son evidentes y que son inherentes al sistema. Se resuelven tres problemas específicos mediante la preparación de tiras de reactivo de acuerdo con la presente invención.

En primer lugar, en las condiciones ácidas usuales de la determinación, las proteínas del suero precipitan normalmente e interfieren el desarrollo del cromógeno. 25 La presente invención elimina la precipitación de las proteínas del suero, al tiempo que proporciona una matriz ácida adecuada, mediante la utilización de un papel cargado de resina cambiadora de cationes, fuerte. 30

1 En segundo lugar, los reactivos utilizados son normalmente inestables. La presente invención proporciona un método para incorporar los reactivos sobre una matriz de panel, en un formato tal que los reactivos son estabilizados.

5 El tercer problema resuelto de acuerdo con la presente invención, es la reducción a un mínimo del error de las determinaciones por espectroscopía de reflectancia, cuando se determina el contenido de urea del suero sanguíneo. La presente invención utiliza un agente de copulación, que produce un cromógeno detectable a longitudes de onda muy superiores a los 550 nanómetros, superando de este modo el problema provocado por una reacción amarilla de la muestra en blanco, que tiene lugar sobre las tiras y el color interferente provocado por la bilirrubina y/o turbidez en el suero, observado mediante espectroscopía de absorción o de reflectancia.

15 El uso de 3-hidroxi-1,2,3,4-tetrahidrobenzo[h]quinoleína o su sal diclorhidrato, reduce a un mínimo la reacción que se produce con la muestra en blanco. En contraste, cuando se utiliza difosfato de primaquina [3-(4-amino-1-metilbutilamino)-6-metoxiquinoleína] o diclorhidrato de N-naftiletileno-

20 diamina, el cromógeno producido desarrolla color, el cual debe medirse a longitudes de onda próximas al máximo de absorción de la reacción con la muestra en blanco. Por lo tanto, el uso de 3-hidroxi-1,2,3,4-tetrahidrobenzo[h]quinoleína o

25 su sal diclorhidrato, permite efectuar determinaciones a longitudes de onda, en las que el color, debido a la reacción con la muestra en blanco, es mínimo.

Además, la presente invención incorpora todos los reactivos en una sola matriz, sin utilizar reactivos líquidos corrosivos.

30

1 Aunque la presente invención tiene una gran
importancia para la pronta detección de trastornos fisioló-
gicos, mediante la determinación del contenido de urea de
los fluidos corporales, tal como se indica en la memoria,
5 tiene también una importante aplicación para la exacta determi-
nación de urea en los fluidos de los procesos industriales,
en los que la concentración de urea debe controlarse dentro
de unos límites definidos. Un medio para la determinación
de fluidos de urea, tanto si son industriales o fisiológicos,
10 es de un gran valor, en el caso de que el medio de ensayo sea
convenientemente rápido, fiable y de una sencillez suficien-
te para que el técnico lo aprenda con facilidad. Además, en
el caso de la diagnosis médica, el medio de ensayo debe ser
lo suficientemente exacto para reflejar las variaciones de
15 un estado del sujeto. Estos objetivos se consiguen utilizan-
do la presente invención.

Evidentemente, pueden efectuarse otras muchas
modificaciones y variaciones de la invención, como se ha ex-
puesto en lo que antecede, sin apartarse del espíritu y al-
20 cance de la misma.

25

30

1

REIVINDICACIONES

5

Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España, por VEINTE años, con los que se recogen en las reivindicaciones siguientes:

10

1ª.- Un método para preparar medios de ensayo para la determinación del contenido de urea de fluidos, el cual método comprende incorporar, a una matriz portadora, cargada con resina cambiadora de cationes, fuerte, que está en su forma ácida, unos primero y segundo reactivos, separados entre sí mediante un material polímero, comprendiendo dicho primer reactivo aldehído orto-ftálico, y comprendiendo dicho segundo reactivo 3-hidroxi-1,2,3,4-tetrahidrobenzo[h]quinoleína, 3-acetoxi-1,2,3,4-tetrahidrobenzo[h]quinoleína, o sus sales diclorhidrato.

20

2ª.- El método de la reivindicación 1ª, en el cual se emplea 3-acetoxi-1,2,3,4-tetrahidrobenzo[h]quinoleína.

25

3ª.- El método de la reivindicación 1ª, en el cual se emplea 3-hidroxi-1,2,3,4-tetrahidrobenzo[h]quinoleína.

30

4ª.- El método de las reivindicaciones 2ª o 3ª, en el cual el reactivo aldehído orto-ftálico se emplea en una cantidad comprendida entre aproximadamente 300 miligramos por ciento y aproximadamente 800 miligramos por ciento, y el otro reactivo se emplea en una cantidad comprendida en

1 tre aproximadamente 200 miligramos por ciento y aproximada-
mente 500 miligramos por ciento, cuando se utiliza sal diclor
hidrato, y en una cantidad comprendida entre aproximadamente
600 miligramos por ciento y aproximadamente 1200 miligramos
5 por ciento, cuando se utiliza base libre.

5a.- El método de la reivindicación 1a, en el
cual los reactivos se separan entre sí, mediante un material
polímero.

6a.- El método de la reivindicación 1a, en
10 el cual la matriz portadora es una matriz de papel de celulosa
absorbente.

7a.- El método de la reivindicación 6a, en el
cual la matriz portadora se carga con entre aproximadamente
25 y aproximadamente 50 por ciento en peso de resina cambia-
15 dora de iones.

8a.- El método de la reivindicación 7a, en
el cual la resina cambiadora de iones es una resina que tie-
ne entre aproximadamente 2 y aproximadamente 16 por ciento
de reticulación con divinilbenceno.

20 9a.- "UN MÉTODO PARA PREPARAR MEDIOS DE ENSA-
YO PARA ANALIZAR EL CONTENIDO DE UREA DE FLUIDOS".

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

Esta Memoria consta de veintitrés hojas es-
25 critas a máquina por una sola cara.

Madrid, 23 AGO. 1979

P.A.

Alberto de Elizaburu
Por Poderes

30

19079 MLJ