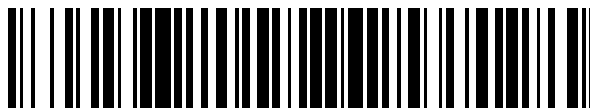


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 527 534**

21 Número de solicitud: 201230001

51 Int. Cl.:

G01N 33/48

(2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

02.01.2012

43 Fecha de publicación de la solicitud:

26.01.2015

Fecha de la concesión:

10.01.2017

45 Fecha de publicación de la concesión:

17.01.2017

73 Titular/es:

**UNIVERSITAT DE LES ILLES BALEARS (100.0%)
Cra. de Valldemossa, km 7,5
07071 Palma de Mallorca (Illes Balears) ES**

72 Inventor/es:

**COSTA BAUZÁ, Antonia;
GRASES FREIXEDAS, Félix;
PRIETO ALMIRALL, Rafael y
GOMILA MUÑIZ, Isabel**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE INOSITOLES FOSFATO Y SU ADAPTACIÓN COMO KIT.**

57 Resumen:

Procedimiento para la determinación de inositoles fosfato y su adaptación como kit.

La presente invención se refiere a un procedimiento para la determinación de inositoles fosfato en muestras biológicas y que comprende las siguientes etapas: poner en contacto la muestra con un intercambiador iónico sólido usando una técnica estática de baño; aislar el intercambiador iónico sólido del resto de muestra sin reaccionar; extraer el inositol fosfato retenido sobre el intercambiador iónico; y detectar el inositol fosfato extraído. Además comprende el procedimiento de detección del inositol fosfato y un kit para llevar a cabo cualquiera de dichos procedimientos.

ES 2 527 534 B1

DESCRIPCIÓN

PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE INOSITOLES FOSFATO Y SU ADAPTACIÓN COMO KIT

5 La presente invención se refiere a un método para la determinación de inositoles fosfato en muestras preferentemente biológicas y su adaptación como kit. Por tanto, la invención se podría encuadrar en el campo de la química analítica.

ESTADO DE LA TÉCNICA

10

La determinación de inositoles fosfato en matrices biológicas (orina, plasma, tejidos) es un problema real que en la actualidad representa un campo de investigación muy amplio.

15 Uno de los inositoles fosfato que más se ha investigado es el inositol hexafosfato. En la literatura se encuentran descritos una amplia variedad de métodos para el análisis de inositol hexafosfato, en general de tipo cromatográfico, aunque la mayoría de ellos se han desarrollado para su aplicación a la determinación del inositol hexafosfato en alimentos. Los
20 métodos actuales para la cuantificación de inositol hexafosfato pueden ser indirectos o directos, independientemente de que sean cromatográficos o no-cromatográficos.

Los métodos indirectos pueden a su vez subclasificarse en:

25

1. Aquellos en los que se hidroliza la molécula, pudiendo cuantificar el inositol liberado [1] o bien el fosfato [2].
2. Métodos basados en la capacidad del inositol hexafosfato para acomplejar iones metálicos. Se fundamentan en el uso de una reacción paralela en la que
30 se forma un compuesto que presenta alguna característica detectable con los detectores habituales (p.ej. fotometría) [3-4]. Concretamente, utilizan como metal el Fe(III) y su formación de complejos coloreados con ácido sulfosalicílico

[3] o con tiocianato [4].

3. También puede cuantificarse la molécula sin ninguna reacción previa a la detección, cuantificando el fósforo de la misma mediante plasma acoplado inductivamente [5] o por resonancia magnética nuclear de ^{31}P [6].

5

Los métodos directos más usados incluyen la espectrometría de masas, conductimetría o refractometría, entre otros métodos, aunque en todos ellos se requiere de una elevada pureza de la muestra, por lo que implican tiempos prolongados de análisis.

10

Sin embargo, son muy pocas las metodologías no-cromatográficas que se han podido aplicar con éxito a matrices biológicas debido a la elevada complejidad de las mismas. En esas matrices, la baja concentración de inositol hexafosfato, la baja sensibilidad, la incapacidad para detectar el compuesto o la falta de robustez del método deja pocas alternativas, y las que hay implican reacciones de hidrólisis o de derivatización, o bien el uso de técnicas de análisis que requieren una instrumentación complicada y costosa poco accesible en el análisis clínico de rutina.

15

20

March y col. [2] describen la determinación indirecta de inositol hexafosfato en orina. La metodología aplicada implica:

- purificación previa de la orina mediante uso de una columna con carbón activo
- purificación del inositol hexafosfato con una columna con resina de intercambio aniónico

25

- el inositol hexafosfato se extrae con una solución de ácido sulfúrico
- hidrólisis del inositol hexafosfato por calor en microondas
- determinación del fosfato liberado por fotometría con azul de molibdeno

30

Sin embargo, este método realiza la purificación de la muestra mediante extracción en fase sólida (SPE) en formato de columna y la concentración de inositol hexafosfato en la muestra purificada no experimenta ningún aumento respecto a la muestra original. Además, la detección aún cuando es de tipo colorimétrico, requiere la hidrólisis previa del inositol hexafosfato lo que

prolonga el tiempo de análisis.

Otra publicación de March y col. [7], también aplicable a la determinación de inositol hexafosfato en orina previa purificación de la misma mediante dos
5 procesos consecutivos de SPE, determina el inositol hexafosfato fluorimétricamente mediante una reacción en la que el inositol hexafosfato activa la oxidación de la hidrazona de la 2-2'-dipiridilcetona.

Finalmente, otras publicaciones (March y col. [8], Perello y col. [9] y Grases y
10 col. [5]) en las que se determina inositol hexafosfato en orina, comparten la purificación mediante SPE con las publicaciones indicadas anteriormente, pero difieren en la detección del inositol hexafosfato que se realiza por técnicas no fotométricas.

15 Es de destacar que en ninguno de los métodos aplicados a la determinación de inositol hexafosfato en orina se purifica la molécula mediante el uso un absorbente en fase sólida utilizando la técnica "estática" o de baño, usando en todos ellos la técnica de columna.

20 Tampoco, en ninguno de los métodos más cercanos al estado de la técnica se consigue preconcentrar la molécula significativamente, tal y como ocurre en la presente invención, ya que o bien la muestra purificada contiene una concentración igual de inositol hexafosfato a la de la muestra original o incluso esa concentración es menor. Solamente en el documento [9] se consigue un
25 factor de preconcentración de 1,7x. Este hecho es fundamental, pues la aplicabilidad de un método fotométrico o fluorimétrico para la cuantificación de inositoles fosfato en matrices biológicas tiene como requisito una preconcentración significativa debido a la limitada sensibilidad intrínseca de las técnicas, por lo que el procesamiento (la purificación/preconcentración) de la
30 muestra es un factor claramente diferencial.

Referencias

1. March, JG.; Simonet, BM.; Grases, F. Determination of phytic acid by gas chromatography-mass spectroscopy: application to biological samples. J Chromatogr B 2001, 757, 247-255.
2. March, JG.; Simonet, BM.; Grases, F.; Salvador, A. Indirect determination of
5 phytic acid in urine. Anal Chim Acta 1998, 367, 63-68
3. Latta, M.; Eskin, M. A simple and rapid colorimetric method for phytate determination. J. Agric. Food Chem. 1980 28, 1313-1315.
4. Talamond P, Gallon G, Guyot JP, Mbome Lape I, Trèche S. Comparison of
High-Performance Ion Chromatography and absorptiometric methods for the
10 determination of phytic acid in food samples. Analusis 1998 26, 396-400
5. Grases, F.; Perello, J.; Isern, B.; Prieto, R. M. Determination of myo-inositol hexakisphosphate (phytate) in urine by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. Anal. Chim. Acta 2004, 510, 41-43.
6. Mazzola, EP.; Phillippy, B.Q.; Harland, BF.; Miller, TH.; Potemra, JM.;
15 Katsimpiris, EM. Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance spectroscopic determination of phytate in foods, J. Agric. Food Chem. 1986, 34, 60-62.
- 7.- March, J.G. Simonet, B.M. Grases F. Fluorimetric determination of phytic acid based on the activation of 2,2'-diphyridyl ketone hydrazone catalised by Cu(II). Analyst, 1999, 124, 897-900.
- 20 8.- Perello, J.; Isern, B.; Munoz, J. A.; Valiente, M.; Grases, F. Determination of phytate in urine by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry, Chromatographia 2004, 60, 265 -268.
- 9.- Grases, F.; Perello, J.; Isern, B.; Prieto, R. M. Determination of myo-inositol hexakisphosphate (phytate) in urine by inductively coupled plasma atomic
25 emission spectrometry. Anal. Chim. Acta 2004, 510, 41-43.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un método no-cromatográfico sensible,
30 sencillo y rápido para la determinación fotométrica de inositoles fosfato, que además pueda ser aplicado en forma de kit para el análisis de inositoles fosfato.

Un primer aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento no-cromatográfico para la determinación cualitativa y/o cuantitativa de un inositol fosfato en muestras biológicas y que comprende las siguientes etapas:

- 5 i) Poner en contacto la muestra con un intercambiador iónico sólido usando una técnica estática de baño; preferiblemente se ponen en contacto en un recipiente durante 5 minutos como mínimo;
- ii) Aislar el intercambiador iónico sólido del resto de muestra sin reaccionar;
- iii) opcionalmente lavar el intercambiador iónico sólido;
- 10 iv) Extraer el inositol fosfato retenido sobre el intercambiador iónico sólido obtenido en la etapa (ii) o (iii), preferiblemente utilizando una disolución de un ácido o una sal; preferiblemente en varias etapas y conduciendo a una concentración de la muestra inicial en un factor superior a 2x;
- v) opcionalmente concentrar el extracto durante la etapa anterior, obteniendo
- 15 un residuo seco, para mejorar la sensibilidad del procedimiento;
- vi) opcionalmente efectuar una hidrólisis del extracto obtenido en la etapa (iv) o bien a partir de una disolución concentrada o residuo seco en la etapa (v); y
- ix) detectar el inositol fosfato extraído en la etapa (iv) o concentrado en la etapa (v) o su producto de hidrólisis obtenido en la etapa (vi); esta detección se
- 20 puede realizar por cualquier método conocido, preferiblemente mediante colorimetría.

Opcional y previamente a la etapa (i) se puede:

- eliminar las proteínas, grasas u otras sustancias que pueda contener la
- 25 muestra y que puedan interferir en la determinación de inositol fosfato;
- añadir EDTA u otros quelantes de cationes para acomplejar los cationes que pueda contener la muestra y que puedan interferir en la separación de inositol fosfato o en su determinación;
- diluir la muestra; y/o
- 30 -ajustar el pH de la muestra.

Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento

para la determinación cualitativa y/o cuantitativa de un inositol fosfato que comprende la detección mediante fotometría donde el inositol fosfato se derivatiza haciéndolo reaccionar con un complejo metal-compuesto cromógeno seleccionado lista que comprende: Zn-zincón; Al-Lumogalion; Y-Piridilazo
 5 resorcinol junto con un tampón a un pH de 6 a 11) y un surfactante; y Fe-tiocianato, junto con un tampón a un pH de 1 a 6 y un agente oxidante.

Un tercer aspecto de la presente invención se refiere a un kit para llevar a cabo cualquiera de los procedimientos descritos en la presente invención, y que
 10 comprende:

- a) Una disolución de un ácido y/o una sal como las descritas a continuación;
- b) Un intercambiador iónico sólido como los descritos en la presente invención;
- c) Un reactivo o conjunto de reactivos para la formación de un compuesto coloreado con el inositol fosfato (hidrolizado o no) y/o un reactivo o conjunto de
 15 reactivos para la formación de un compuesto coloreado que será destruido por el inositol fosfato, descritos a continuación; y
- d) un recipiente con un desagüe que presenta una frita, que evita que pase la fase sólida, y preferiblemente que contiene una llave de paso.

20 Un cuarto aspecto de la presente invención se refiere al uso del kit descrito en la presente invención, para la determinación cualitativa y/o cuantitativa de inositol fosfato, más preferiblemente inositol hexafosfato.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

25

La presente invención contiene dos aspectos fundamentales:

1. Procesamiento (purificación/preconcentración) de una muestra biológica para la posterior determinación del contenido en inositoles fosfato.
- 30 2. Detección del inositol fosfato mediante:
 - a. Nuevas reacciones químicas para la determinación de inositoles fosfato.

b. Optimización de reacciones químicas para la determinación de inositoles fosfato.

1. Procesamiento de muestras biológicas (purificación/preconcentración).

5 El proceso de purificación según se ha descrito en el estado de la técnica, se consigue, en los métodos no-cromatográficos disponibles para la determinación de inositol hexafosfato, mediante separación en fase sólida (SPE), utilizando una resina de intercambio aniónico, que se realiza mediante la técnica en columna (la resina está empaquetada en una columna), mientras que en la
10 presente invención la SPE se realiza la técnica estática. Esta técnica en columna tiene varios inconvenientes graves en su aplicación a muestras biológicas, especialmente orina, cuando se desean usar volúmenes de la misma superiores a 5 mL. El principal es que la columna se obstruye, llegando un momento en que es totalmente imposible pasar más muestra. En los casos
15 más favorables su paso se hace muy lento, lo que prolonga enormemente el tiempo de análisis y produce variaciones en el proceso de adsorción ya que la velocidad de paso de muestra no es homogénea.

En la presente invención, se entiende por “método no-cromatográfico” aquél en
20 el cual no se utiliza una columna para efectuar la purificación/preconcentración de la muestra.

Los métodos fotométricos de detección de inositoles fosfato disponibles presentan calibrados lineales para concentraciones de inositol hexafosfato en
25 el rango de 0 a 100 μM , presentando muy baja precisión para valores de inositol hexafosfato por debajo de 10 μM . Este rango es apto para la determinación de inositol hexafosfato en muestras cuyo contenido en dicha sustancia es elevado, en el rango del 1%, tal y como ocurre en alimentos. Sin embargo, las concentraciones de inositol hexafosfato en muestras biológicas se
30 encuentran en la mayoría de casos, por debajo de 2 μM , por lo que resulta obvia la necesidad de aumentar o bien la sensibilidad de la reacción de detección, por ejemplo fotométrica, o conseguir una mayor concentración de

inositol hexafosfato durante el proceso de purificación, o bien ambas cosas a la vez.

En la presente invención, durante el proceso de purificación/preconcentración mediante SPE con un intercambiador iónico sólido, preferentemente una resina, se consigue que la concentración de inositol fosfato, preferiblemente de inositol hexafosfato, en la muestra purificada sea lo suficientemente elevada para su detección con el método fotométrico escogido, ya que se aumenta la concentración de inositol hexafosfato respecto a la concentración en la muestra inicial, pudiendo ser dicho aumento superior a un factor de 2x, preferiblemente superior a 3x y más preferiblemente superior a 4x. Este aumento es imposible de conseguir cuando la SPE se realiza con la técnica en columna, ya que usando menor volumen de eluyente la elución no es cuantitativa.

Para ello se ha puesto a punto una versión que lleva a cabo la SPE con la resina de intercambio iónico, preferiblemente aniónico, en recipientes (técnica estática), realizando las fases de lavado y elución de la resina mediante un recipiente (una columna con una frita), que favorece la separación de fases sólida y líquida pues evita que pase la fase sólida, aun cuando no se puede considerar que corresponde a la técnica en columna ya que la resina no se empaqueta y se debe seguir homogeneizando por agitación con el disolvente de lavado y con el eluyente para favorecer los procesos de intercambio. La elución se realiza con un volumen pequeño de una disolución de un ácido o una sal, preferiblemente en varios pasos, para aumentar el rendimiento de la elución.

El recipiente descrito para la elución puede contener una llave de paso, de esta manera favorece aislar el intercambiador del resto de muestra sin reaccionar.

Los compuestos que pueden utilizarse para preparar las disoluciones de lavado y/o de elución del intercambiador iónico son aquellos que contengan un anión con una afinidad por el intercambiador iónico sólido tal que libere a los

inositoles fosfato retenidos por el intercambiador iónico sólido. Dichos compuestos son preferentemente ácido clorhídrico y sus sales, ácido sulfúrico y sus sales, ácido nítrico y sus sales, preferiblemente ácido clorhídrico y sus sales, más preferiblemente ácido clorhídrico y cloruro sódico. Las concentraciones de ácido y/o sal usadas para el lavado están en el rango 0,005-0,200 M, preferiblemente 0,01-0,10 M, más preferiblemente 0,02-0,08 M. Aún más preferiblemente, la concentración de HCl es de 50 mM. Las concentraciones de ácido y/o sal usadas para la elución están en el rango 0,1-10 M, preferiblemente 0,5-5 M, más preferiblemente 0,7-3,0 M. Aún más preferiblemente, la concentración de NaCl es de 2 M.

La resina será preferiblemente de intercambio iónico, preferiblemente de intercambio aniónico y más preferiblemente de intercambio aniónico fuerte. Algunos ejemplos no limitativos de resinas se citan a continuación: AG1-X2, AG1-X4, AG1-X8, AG4-X4, Dowex 1X2, Dowex 1X4, Dowex 1X8, SAX o WAX. Una resina preferida es AG1-X8. La cantidad de resina de intercambio iónico para la purificación/preconcentración de 10 mL de muestra puede variar entre 0,05 g y 2 g, preferiblemente entre 0,1 g y 0,6 g y más preferiblemente entre 0,2 g y 0,3 g.

El término “muestra” se aplica a matrices de origen biológico, preferiblemente plasma sanguíneo, suero sanguíneo, sangre, orina, heces, extractos de tejidos o similares.

En algunos casos la disolución que contiene la muestra podrá requerir un pretratamiento previo a la purificación/preconcentración para minimizar la interferencia de proteínas, lípidos y/o sustancias orgánicas e inorgánicas.

Este pretratamiento puede incluir, entre otros, una etapa de eliminación de proteínas y/o grasas de la matriz biológica. Las proteínas se eliminan preferentemente mediante la adición de ácido tricloroacético y las grasas preferentemente mediante la adición de una mezcla metanol/cloroformo.

En algunos casos la fuerza iónica de la disolución acuosa puede impedir que la purificación/preconcentración sea óptima con lo que será necesario usar alguna técnica que disminuya la fuerza iónica de la muestra, entre ellas, y no
5 excluyente de otras técnicas, la dilución de la muestra. Preferiblemente la dilución de la muestra que se realiza previamente al paso (i) del procedimiento de la invención, se lleva a cabo con agua.

En una realización más preferiblemente la muestra se diluye como mínimo $\frac{1}{2}$
10 (muestra/diluyente), encontrándose una mayor precisión en la determinación de inositol fosfato a estas diluciones de la muestra.

Opcionalmente, puede ajustarse, previamente al paso (i) de procedimiento de la invención, el pH de la muestra, preferiblemente en el rango 1-6, más
15 preferiblemente en el rango 2-4,5. El hecho de mantener el pH ácido evita la cristalización de sales cálcicas en la matriz biológica, que podría dar lugar a errores por defecto en la cuantificación del inositol fosfato.

El contenido de inositoles fosfato en la muestra original que se puede
20 determinar según la presente invención está entre 0,01 μM y 100 μM , preferiblemente entre 0,02 μM y 20 μM y más preferiblemente entre 0,1 μM y 5 μM .

Durante la extracción del inositol fosfato de la resina es posible concentrar el
25 inositol fosfato en relación a la concentración en la muestra inicial, mediante el uso de volúmenes de disolución de un ácido o una sal descritos anteriormente inferiores al volumen de muestra para mejorar la sensibilidad del procedimiento de la invención. El volumen de dicha disolución de ácido o de sal será inferior o igual al 25% del volumen de muestra utilizado. Preferiblemente, el ácido será
30 clorhídrico, nítrico o sulfúrico. Preferiblemente, la sal será cloruro sódico. El factor de concentración será preferiblemente superior a 2, más preferentemente igual o superior a 4.

Una vez extraído el inositol fosfato de la resina, opcionalmente podrá efectuarse una etapa de hidrólisis. Dicha hidrólisis podrá ser enzimática o térmica.

5

En el caso de hidrólisis térmica, se trabajará preferentemente con una de las siguientes opciones:

- Medio ácido clorhídrico, temperatura superior a 100 °C y tiempo de reacción de al menos 2 horas.
- 10 - Medio ácido sulfúrico, usando un oxidante auxiliar, preferiblemente peroxodisulfato sódico, temperatura superior a 100 °C y tiempo de reacción de al menos 1 hora.

En el caso de hidrólisis enzimática, se trabajará preferentemente a 37 °C, utilizando una fosfatasa que hidrolice, típicamente a valores de pH entre 2,5 y 5,5. El tiempo de reacción será de al menos 30 minutos.

15

Los procesamientos de muestras descritos anteriormente son aplicables a matrices biológicas y combinables con cualquier técnica de detección.

20

Por "inositol fosfato" se entiende en la presente invención a un compuesto inositol que contiene de 2, 3, 4 5 o 6 grupos fosfato, preferiblemente es el inositol hexafosfato.

25 2. Detección del inositol fosfato:

Un segundo aspecto novedoso de la presente invención es el desarrollo de nuevas técnicas fotométricas de detección, y la optimización o perfeccionamiento de reacciones fotométricas ya descritas previamente.

30 Estas técnicas de detección son aplicables a cualquier tipo de matriz, con o sin procesamiento de muestra, es decir, con o sin los pasos (i) a (vi) del procedimiento descrito en la presente invención.

La cuantificación de inositol fosfato, preferentemente inositol hexafosfato se realiza mediante una reacción fotométrica o colorimétrica posterior a la purificación/preconcentración anterior. La reacción fotométrica consiste en la
5 adición de un compuesto metálico (un complejo metal-compuesto cromógeno que presenta una absorción inicial) a la muestra purificada/concentrada, en la que el inositol fosfato forma un complejo incoloro con el metal, teniendo como resultado una disminución de la absorción respecto a una disolución en la que no hay presente inositol fosfato, siendo dicha disminución directamente
10 proporcional a la concentración de inositol fosfato. El cambio de absorción se detecta fotométricamente a una longitud de onda adecuada.

A continuación se presentan algunos ejemplos no limitativos de detección de inositol fosfato mediante reacción fotométrica o colorimétrica:

15

a) Una aplicación preferente de la invención utiliza como medio para la detección fotométrica de inositoles fosfato una mezcla de Zn(II) y zincón.
No existe en la bibliografía ningún método fotométrico de cuantificación de inositol hexafosfato que use el complejo Zn-zincón. Ventajosamente, el metal
20 que se utiliza, el Zinc, presenta un único estado de oxidación, con lo que se evita la interferencia de reductores u oxidantes, que podrían variar el estado de oxidación del metal. El componente cromógeno es el zincón, que forma complejos coloreados únicamente con zinc y cobre, y con cadmio, plomo y bismuto a concentraciones superiores a las de zinc y cobre, con lo que
25 presenta pocas interferencias positivas por presencia de otros metales, a diferencia de lo que ocurre con otros cromógenos, que forman complejos coloreados con una mayor cantidad de metales divalentes y trivalentes.

La concentración del complejo metálico y la proporción entre el ión metálico y el componente cromógeno puede variar. Para el complejo Zn-zincón la
30 concentración de zincón en el reactivo puede variar entre 0,05 mM y 12 mM, preferiblemente entre 0,1 mM y 1,2 mM y más preferiblemente entre 0,2 mM y 0,6 mM. El contenido de Zn(II) en el reactivo puede variar entre 0,05 mM y 12

mM, preferiblemente entre 0,1 mM y 1,2 mM y más preferiblemente entre 0,2 mM y 0,6 mM.

El reactivo además, puede incorporar un sistema de regulación de pH para
5 favorecer la formación del complejo coloreado y para aumentar la exactitud y reproducibilidad de la detección. Dicho pH está preferiblemente entre 6 y 11, más preferiblemente entre 8 y 11, y aún más preferiblemente entre 8,5 y 9,5.

El calibrado óptimo presenta suficiente sensibilidad, siendo lineal para
10 concentraciones de inositol hexafosfato entre 0 y 14 μ M.

b) Otra aplicación de la invención utiliza como medio para la detección fotométrica de inositoles fosfato una mezcla de Al(III) y Lumogalión.

15 No existe en la bibliografía ningún método fotométrico de cuantificación de inositol hexafosfato que use el complejo Al(III)-Lumogalión. El metal que se utiliza, aluminio, presenta un único estado de oxidación, con lo que se evita la interferencia de reductores u oxidantes, que podrían variar el estado de oxidación del metal. El componente cromógeno el Lumogalión, forma
20 complejos fluorescentes con aluminio y galio, presentando también absorción de la radiación visible.

La concentración del complejo metálico y la proporción entre el ion metálico y el componente cromógeno puede variar. Para el complejo Al(III)-Lumogalión la
25 concentración de Lumogalión en el reactivo puede variar entre 0,012 mM y 8 mM, preferiblemente entre 0,025 mM y 0,8 mM y más preferiblemente entre 0,05 mM y 0,4 mM. El contenido de Al(III) en el reactivo puede variar entre 0,012 mM y 8 mM, preferiblemente entre 0,025 mM y 0,8 mM y más preferiblemente entre 0,05 mM y 0,4 mM.

30

El reactivo además, puede incorporar un sistema de regulación de pH para favorecer la formación del complejo coloreado para aumentar la exactitud y

reproducibilidad de la detección. Dicho pH está preferiblemente entre 2 y 8, más preferiblemente entre 3 y 7, y aún más preferiblemente entre 4,5 y 5,5.

5 También puede contener un surfactante para mejorar la formación del complejo Al(III)-Lumogalión.

El calibrado es lineal para concentraciones de inositol hexafosfato entre 0 y 3 μM .

10 c) Otra aplicación de la invención utiliza como medio para la detección fotométrica de inositoles fosfato una mezcla de Y(III) y piridilazo resorcinol (PAR). Aunque se trata de una reacción descrita en la bibliografía, se han optimizado las condiciones de reacción con el inositol fosfato.

15 El componente cromógeno PAR forma complejos con numerosos metales divalentes y trivalentes.

La concentración del complejo metálico y la proporción entre el ión metálico y el componente cromógeno puede variar. Para el complejo Y(III)-PAR la
20 concentración de PAR en el reactivo puede variar entre 2,5 mM y 6 mM, preferiblemente entre 0,25 mM y 3 mM y más preferiblemente entre 0,5 mM y 1,5 mM. El contenido de Y(III) en el reactivo puede variar entre 0,025 mM y 1,5 mM, preferiblemente entre 0,05 mM y 0,6 mM y más preferiblemente entre 0,1 mM y 0,3 mM.

25 El reactivo además, puede incorporar un sistema de regulación de pH para favorecer la formación del complejo coloreado para aumentar la exactitud y reproducibilidad de la detección. Dicho pH está preferiblemente entre 6 y 11, más preferiblemente entre 7 y 10, y aún más preferiblemente entre 8 y 9.

30 También puede contener un surfactante que mejora la formación del complejo Y(III)-PAR.

El calibrado es lineal para concentraciones de inositol hexafosfato entre 0 y 5 μM .

- 5 d) Otra aplicación de la invención utiliza como medio para la detección fotométrica de inositoles fosfato una mezcla de Fe(III) y tiocianato. Los reactivos utilizados hasta el momento para la cuantificación de inositol hexafosfato que utilizan Fe(III) junto con tiocianato, no serían útiles para su aplicación a los eluatos obtenidos en el proceso previo de separación en
- 10 muestras de orina.

La razón fundamental son las interferencias positivas debido a las sustancias de la orina que eluyen conjuntamente con el inositol hexafosfato. Algunas de las sustancias que se encuentran en los eluatos, tienen capacidad reductora,

15 generando un efecto análogo al del inositol hexafosfato, es decir, una disminución de la cantidad de Fe(III) disponible para reacción con el tiocianato, aunque la reacción responsable es distinta. En el caso del inositol hexafosfato, la disminución se produce por complejación del Fe(III) , en el caso de los compuestos reductores por reducción del Fe(III) a Fe(II) , que no reacciona con

20 el tiocianato.

Estas interferencias se eliminan sin afectar a la acción del inositol hexafosfato, mediante la adición al reactivo de oxidantes que bloqueen la acción de los reductores sobre el Fe(III) .

25 La concentración del complejo metálico y la proporción entre el ion metálico y el componente cromógeno puede variar. Para el complejo Fe(III) -tiocianato la concentración de tiocianato en el reactivo puede variar entre 0,25 M y 6 M, preferiblemente entre 0,5 M y 6 M y más preferiblemente entre 1 M y 3 M. El contenido de Fe(III) en el reactivo puede variar entre 0,12 mM y 6 mM,

30 preferiblemente entre 0,25 mM y 3 mM y más preferiblemente entre 0,5 mM y 1,5 mM.

El reactivo además, puede incorporar un sistema de regulación de pH para favorecer la formación del complejo coloreado para aumentar la exactitud y reproducibilidad de la detección. Dicho pH está preferiblemente entre 1 y 6,
5 más preferiblemente entre 1 y 5, y aún más preferiblemente entre 1 y 3.

El calibrado es lineal para concentraciones de inositol hexafosfato entre 0 y 25 μM .

10 Otros metales que se pueden usar, además de los ya indicados, usando el mismo fundamento para la detección fotométrica de inositol hexafosfato comprenden el Th(III), Cr(III), Cd(II), Cu(II), Ni(II), Co(II), Hg(II), Mg(II), Ca(II), Mn(II), y en general, cualquier metal que forme complejos coloreados con un compuesto cromógeno y cuyo complejo con inositol hexafosfato sea lo
15 suficientemente favorable para disminuir la cantidad de metal unida al compuesto cromógeno.

Otros compuestos cromógenos que se pueden usar, además de los ya indicados, usando el mismo fundamento para la detección fotométrica de
20 inositol hexafosfato comprenden naranja de Xilenol, violeta de pirocatecol, negro de eriocromo T, aluminon, calceína, ditizona, calmagita, y en general, cualquier compuesto cromógeno que forme complejos coloreados con un metal cuyo complejo con inositol hexafosfato sea lo suficientemente favorable para disminuir la cantidad de metal unida al compuesto cromógeno en cuestión.

25 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y
30 en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1

5 PROCEDIMIENTO PARA LA PURIFICACIÓN/PRECONCENTRACIÓN DE INOSITOL HEXAFOSFATO EN ORINA HUMANA PARA SU POSTERIOR DETERMINACIÓN FOTOMÉTRICA

- Tomar un recipiente de 50-100 mL para cada muestra.
- 10 - Pesar 0,50 g de resina de intercambio aniónico fuerte (AG1-X8 Bio-Rad) en el recipiente
- Tomar 20 mL de la orina a analizar, llevarla a pH = 3 con ácido clorhídrico y diluirla $\frac{1}{2}$ (añadir 20 mL de agua destilada)
- Poner los 40 mL de orina diluida en el recipiente con la resina y mantener en
- 15 contacto durante 15 minutos. Durante ese tiempo se debe agitar varias veces (5 o 6) la resina y la orina para favorecer el proceso de intercambio o adsorción del inositol hexafosfato a la superficie de la resina.
- Transcurrido ese tiempo, transferir la orina y la resina a un recipiente que disponga de una frita, para así separar la orina de la resina. Dejar eluir la orina
- 20 y descartarla.
- Lavar la resina con 120 mL de HCl 50 mM agitando regularmente la resina y el disolvente de lavado. Descartar el disolvente de lavado.
- Lavar la resina con 5 mL de agua destilada. Descartar el agua.
- Eluir con 4 mL de NaCl 2 M. La elución se debe realizar en 4 pasos, utilizando
- 25 en cada uno de ellos 1 mL de eluyente. Mantener el eluyente en contacto con la resina durante 5 min, agitando la mezcla 5 veces como mínimo.
- Recoger los 4 mL en el mismo tubo y al finalizar, homogeneizar el eluato mediante agitación con vórtex.
- La cantidad de inositol hexafostato se determinó posteriormente con la muestra
- 30 tratada obtenida y los valores habituales hallados con el presente método están en el rango 0-5 μ M.

EJEMPLO 2

PROCEDIMIENTO PARA LA PURIFICACIÓN/PRECONCENTRACIÓN DE INOSITOL HEXAFOSFATO EN ORINA DE RATA PARA SU POSTERIOR DETERMINACIÓN FOTOMÉTRICA

5

- Tomar un recipiente de 50 mL para cada muestra
- Pesar 0,25 g de resina de intercambio aniónico fuerte (AG1-X8 Bio-Rad) en el recipiente.

10

- Tomar 10 mL de la orina a analizar, llevarla a pH = 3 con ácido clorhídrico y diluirla $\frac{1}{2}$ (añadir 10 mL de agua destilada)
- Poner los 20 mL de orina diluida en el recipiente con la resina y mantener en contacto durante 15 minutos. Durante ese tiempo se debe agitar varias veces (5 o 6) la resina y la orina para favorecer el proceso de intercambio o adsorción del inositol hexafosfato a la superficie de la resina.

15

- Transcurrido ese tiempo, transferir la orina y la resina a un recipiente que disponga de una frita, para así separar la orina de la resina. Dejar eluir la orina y descartarla.
- Lavar la resina con 100 mL de HCl 50 mM agitando regularmente la resina y el disolvente de lavado. Descartar el disolvente de lavado.

20

- Lavar la resina con 5 mL de agua destilada. Descartar el agua.
- Eluir con 2.5 mL de NaCl 2 M. La elución se debe realizar en 5 pasos, utilizando en cada uno de ellos 0.5 mL de eluyente. Mantener el eluyente en contacto con la resina durante 5 min, agitando la mezcla 5 veces como mínimo.
- Recoger los 2.5 mL en el mismo tubo y al finalizar, homogeneizar el eluato

25

mediante agitación con vórtex.

La cantidad de inositol hexafostato se determinó posteriormente con la muestra tratada obtenida y los valores habituales hallados con el presente método están en el rango 0-5 μ M.

30

EJEMPLO 3

PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN FOTOMÉTRICA DE INOSITOL HEXAFOSFATO EN ORINA DE RATA O HUMANA POST

PURIFICACIÓN/PRECONCENTRACIÓN CON EL COMPLEJO Zn-ZINCON

- Preparar el reactivo para la cuantificación del inositol hexafosfato diariamente y poco tiempo antes de su uso mediante mezcla de los siguientes volúmenes de disoluciones que se indican y en el orden en que aparecen:
- 5 R: 3,5 mL Zincon 1,25 mM + 3,2 mL tampón borato/KCl 0.5 M (pH = 9.2) + 3,3 mL Zn(II) 1 mM
- Preparar las disoluciones patrón de inositol hexafosfato (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 μ M) diariamente y poco tiempo antes de su uso en NaCl 2 M
- 10 - Poner 0,5 mL de reactivo R y 3 mL de muestra tratada del ejemplo 2 o 3 o patrón en la cubeta, homogeneizar y medir la absorbancia a 620 nm a los 5 minutos de la mezcla en un espectrofotómetro convencional. También se puede utilizar un espectrofotómetro lector de pocillos, adaptando proporcionalmente los volúmenes de reactivo R y de muestra.
- 15 Los valores habituales hallados con el presente método están en el rango 0-5 μ M.

EJEMPLO 4

- 20 PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN FOTOMÉTRICA DE INOSITOL HEXAFOSFATO EN ORINA DE RATA O HUMANA POST PURIFICACIÓN/PRECONCENTRACIÓN CON EL COMPLEJO Fe(III)-TIOCIANATO
- 25 - Preparar el reactivo para la cuantificación del inositol hexafosfato diariamente y poco tiempo antes de su uso mediante mezcla de los siguientes volúmenes de disoluciones que se indican y en el orden en que aparecen: 5 mL KSCN 4 M + 2,5 mL Glicina 0,1 M (pH = 2) + 1,4 mL H₂O + 0,1 mL persulfato potásico 150 mM + 1,0 mL Fe(III) 10 mM preparado en HNO₃ 1 M
- 30 - Preparar las disoluciones patrón de inositol hexafosfato (0, 5, 10 20, 25 μ M) diariamente y poco tiempo antes de su uso en NaCl 2 M
- Poner 0,5 mL de reactivo y 3 mL de muestra tratada del ejemplo 2 o 3 o

patrón en la cubeta, homogeneizar y medir la absorbancia a 460 nm a los 5 minutos de la mezcla en un espectrofotómetro convencional. También se puede utilizar un espectrofotómetro lector de pocillos, adaptando proporcionalmente los volúmenes de reactivo R y de muestra.

5

Los valores habituales hallados con el presente método están en el rango 0-5 μM .

REIVINDICACIONES

- 1.- Un procedimiento no-cromatográfico para la determinación cualitativa y/o cuantitativa de un inositol fosfato en muestras biológicas y que comprende las siguientes etapas:
 - i) Poner en contacto la muestra con un intercambiador iónico sólido usando una técnica estática de baño;
 - ii) Aislar el intercambiador iónico sólido del resto de muestra sin reaccionar;
 - iii) opcionalmente lavar el intercambiador iónico sólido;
 - 10 iv) Extraer el inositol fosfato retenido sobre el intercambiador iónico sólido obtenido en la etapa (ii) o (iii), preferiblemente utilizando una disolución de un ácido o una sal; preferiblemente en varias etapas y conduciendo a una concentración de la muestra inicial en un factor superior a 2x;
 - v) opcionalmente concentrar el extracto durante la etapa anterior para mejorar la sensibilidad;
 - 15 vi) opcionalmente efectuar una hidrólisis del extracto obtenido en la etapa (iv) o bien a partir de una disolución concentrada de la etapa (v); y
 - ix) detectar el inositol fosfato extraído en la etapa (iv) o concentrado en la etapa (v) o su producto de hidrólisis obtenido en la etapa (vi).
- 20 2.- El procedimiento según vindicación 1, donde se efectúa adicionalmente una dilución de la muestra biológica previamente a la etapa (i), preferiblemente la dilución se lleva a cabo con agua, más preferiblemente se diluye la muestra como mínimo 1/2 (muestra/diluyente).
- 25 3.- El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, donde se efectúa adicionalmente un ajuste del pH de la muestra biológica previamente a la etapa (i), preferiblemente en el rango 1 a 6, más preferiblemente entre 2 y 4,5.
- 30 4.- El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la muestra se selecciona entre sangre, plasma sanguíneo, suero sanguíneo,

orina, heces o extractos de tejidos.

5.- El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el intercambiador iónico sólido es una resina de intercambio aniónico, preferiblemente la resina de intercambio aniónico se selecciona de la lista que comprende AG1-X2, AG1-X4, AG1-X8, AG4-X4, Dowex 1X2, Dowex 1X4, Dowex 1X8, SAX y WAX, más preferiblemente la resina es AG1-X8.

6.- El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde la cantidad de intercambiador iónico sólido está preferiblemente entre 0,2 g y 0,3 g respecto a 10 mL de muestra.

7.- El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde en la etapa (i) la muestra y el intercambiador iónico se ponen en contacto en un recipiente durante 5 minutos como mínimo.

8.- El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde en la etapa (ii) se aísla el intercambiador iónico sólido mediante el uso de un recipiente con un desagüe que presenta una frita, que evita que pase la fase sólida, y preferiblemente que contenga una llave de paso.

9.- El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde en la etapa (iii) el intercambiador iónico sólido se lava con un volumen adecuado de HCl, preferiblemente HCl 50 mM.

10.- El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde en la etapa (vi) se extrae el inositol fosfato retenido sobre el intercambiador iónico sólido con una disolución de un ácido o una sal, preferiblemente se extrae con NaCl 2 M, más preferiblemente usando un volumen de disolución inferior o igual al 25% del volumen de muestra usado.

11.- El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde la

detección en la etapa (ix) se realiza mediante colorimetría, preferiblemente el inositol fosfato a determinar se derivatiza haciéndolo reaccionar con un complejo metal-compuesto cromógeno que se puede seleccionar de la lista que comprende Zn-zincón, Al-Lumogalion, Y-Piridilazo resorcinol y Fe-tiocianato.

5

12.- Un procedimiento para la determinación cualitativa y/o cuantitativa de un inositol fosfato que comprende la detección mediante fotometría donde el inositol fosfato se derivatiza haciéndolo reaccionar con un complejo metal-compuesto cromógeno seleccionado lista que comprende: Zn-zincón; Al-Lumogalion; Y-Piridilazo resorcinol junto con un tampón a un pH de 6 a 11 y un surfactante; y Fe-tiocianato, junto con un tampón a un pH de 1 a 6 y un agente oxidante.

10

13.- El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 donde el inositol fosfato es inositol hexafosfato.

15

14.- Un kit para llevar a cabo el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, que comprende:

20

a) Una disolución de un ácido y/o una sal;

b) Un intercambiador iónico sólido;

c) Un reactivo o conjunto de reactivos para la formación de un compuesto coloreado con el inositol fosfato (hidrolizado o no) y/o un reactivo o conjunto de reactivos para la formación de un compuesto coloreado que será destruido por el inositol fosfato; y

25

d) un recipiente con un desagüe que presenta una frita, que evita que pase la fase sólida, y preferiblemente que contiene una llave de paso.

30

15.- Uso del kit descrito según la reivindicación 14, para la determinación cualitativa y/o cuantitativa de inositol fosfato, más preferiblemente inositol hexafosfato.



- ②① N.º solicitud: 201230001
②② Fecha de presentación de la solicitud: 02.01.2012
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **G01N33/48** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	BARTLETT G. R. "Isolation and assay of red-cell inositol polyphosphates." Analytical Biochemistry (1982) Vol. 124, páginas 425-431. Resumen, página 425-427.	1-15
A	GRASES F., MARCH J.G., PRIETO R. M., SIMONET B. M., COSTA-BAUZÁ A., GARCÍA-RAJA A., y CONTE A. "Urinary phytate in calcium oxalate stone formers and healthy people." Scandinavian Journal of Urology and Nephrology (2000) Vol. 34, páginas 162-164. Todo el documento.	1-15
A	WANG N., HATCHER D. W., TYLER R. T., TOEWS R., GAWALKO E. J. "Effect of cooking on the composition of beans (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) and chickpeas (<i>Cicer arietinum</i> L.) Food Research International (2010) Vol. 43, páginas 589-594. Página 590, columna 2.	1-15

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
26.02.2013

Examinador
M. J. García Bueno

Página
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

G01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, XPESP, NPL, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 26.02.2013

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-15	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-15	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	BARTLETT G. R. "Isolation and assay of red-cell inositol polyphosphates." <i>Analytical Biochemistry</i> (1982) Vol. 124, páginas 425-431. Resumen, página 425-427.	1982
D02	GRASES F., MARCH J.G., PRIETO R. M., SIMONET B. M., COSTA-BAUZÁ A., GARCÍA-RAJA A., y CONTE A. "Urinary phytate in calcium oxalate stone formers and healthy people." <i>Scandinavian Journal of Urology and Nephrology</i> (2000) Vol. 34, páginas 162-164. Todo el documento.	2000
D03	WANG N., HATCHER D. W., TYLER R. T., TOEWS R., GAWALKO E. J. "Effect of cooking on the composition of beans (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) and chickpeas (<i>Cicer arietinum</i> L.)" <i>Food Research International</i> (2010) Vol. 43, páginas 589-594. Página 590, columna 2.	2010

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud de invención consiste en un procedimiento no cromatográfico para la determinación cualitativa y cuantitativa de inositol fosfato en muestras biológicas que comprende la puesta en contacto de la muestra con un intercambiador iónico sólido usando una técnica estática de baño, aislamiento del intercambiador iónico del resto de la muestra sin reaccionar, extracción del inositol fosfato retenido sobre el intercambiador iónico sólido, y la detección del inositol fosfato extraído (reivindicaciones 1-13).

La presente solicitud de invención también consiste en un kit para llevar a cabo el procedimiento anteriormente citado (reivindicación 4), y el uso de dicho kit para la determinación cualitativa y cuantitativa de inositol fosfato (reivindicación 15).

El documento D01 consiste en el aislamiento por cromatografía en columna de intercambio iónico de polifosfatos de inositol para el estudio de su distribución, función y metabolismo en las células rojas de aves y otros vertebrados (ver resumen, páginas 425-427).

El documento D02 consiste en un estudio sobre los niveles urinarios de fitato en un grupo de pacientes con cálculos de oxalato cálcico, y su comparación con los obtenidos en personas sanas. Los niveles urinarios se determinan utilizando un método indirecto de extracción fotométrica (ver todo el documento).

El documento D03 consiste en un estudio para evaluar el efecto de la cocción doméstica en los compuestos nutricionales y antinutricionales de varios tipos de habas y garbanzos.

Entre los compuestos que se evalúan se encuentra el ácido fítico, el cual se extrae y se separa por cromatografía de intercambio iónico antes de ser cuantificado colorimétricamente. Dicha extracción se realiza con la resina de intercambio AG1-X4 (ver página 590, columna 2).

1.- NOVEDAD (Art. 6.1 Ley 11/1986) Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 8.1 Ley 11/1986).

La invención reivindicada difiere principalmente de los documentos D01-D03 en que ninguno de los documentos citados muestra la purificación de la molécula de inositol mediante el uso de un absorbente en fase sólida utilizando la técnica estática o de baño.

Así, la invención reivindicada implica un efecto mejorado comparado con el estado de la técnica. Además, no se considera obvio que un experto en la materia obtenga la invención a partir de los documentos mencionados anteriormente.

Por tanto las reivindicaciones 1-15 se consideran nuevas y con actividad inventiva en el sentido de los artículos 6.1 y 8.1 Ley 11/1986.