

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 628 313**

51 Int. Cl.:

**G01N 31/22** (2006.01)

**C07D 487/22** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.04.2012 PCT/JP2012/061015**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.10.2013 WO13150663**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.04.2012 E 12873711 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.03.2017 EP 2835637**

54 Título: **Composición de reactivo de litio, y método y dispositivo para determinar la cantidad de ion litio usando la misma**

30 Prioridad:

**06.04.2012 JP 2012087928**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**02.08.2017**

73 Titular/es:

**METALLOGENICS CO., LTD. (100.0%)  
1-8-15 Inohana Chuo-ku  
Chiba-city, Chiba 260-0856, JP**

72 Inventor/es:

**IWABUCH,I TAKUYA y  
ODASHIMA, TSUGIKATSU**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

ES 2 628 313 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Composición de reactivo de litio, y método y dispositivo para determinar la cantidad de ion litio usando la misma

**5 Campo técnico**

La presente invención se refiere a una composición de reactivo usada en la medición cuantitativa de litio en una solución acuosa tal como muestras biológicas y muestras de líquidos ambientales, y a un método y dispositivo para determinar la cantidad de iones litio usando la composición de reactivo.

10

**Técnica anterior**

Se sabe que los fármacos que contienen litio son eficaces en la estabilización del estado de ánimo y como antidepresivos, de modo que se usan ampliamente como fármacos estabilizantes del estado de ánimo y antidepresivos. Los comprimidos de carbonato de litio (para administración oral) se prescriben generalmente como un estabilizante del estado de ánimo, así como un fármaco para el trastorno bipolar (psicosis circular) o un fármaco antidepresivo.

15

Sin embargo, cuando dicho fármaco que contiene litio se administra a pacientes, es necesario controlar o ajustar la concentración de litio en suero dentro de un intervalo adecuado. De hecho, el carbonato de litio ( $\text{Li}_2\text{CO}_3$ ) tiene una característica tal que su efecto de administración se muestra solamente cuando la concentración de litio en la sangre llega casi a un "nivel de envenenamiento por litio". En otras palabras, cuando se administra el fármaco, la monitorización de fármacos terapéuticos (TDM) es indispensable para monitorizar la concentración de litio en la sangre, ya que un intervalo terapéutico está muy próximo al nivel de veneno.

20

25

En la práctica, es necesario controlar o limitar la concentración de litio en una muestra de sangre del paciente dentro de un intervalo limitado de generalmente desde 0,6 a 1,2 mEq/l. De hecho, cuando la concentración de litio en suero es inferior a 0,6 mEq/l, no se espera ningún efecto antidepresivo. Por el contrario, una administración en exceso superior a 1,5 mEq/l de la concentración en plasma dará como resultado el envenenamiento por litio. La sobredosis da como resultado una causa mortal de síntomas de envenenamiento incluyendo temblor, alalia, nistagmo, alteración renal y convulsiones. Por lo tanto, cuando se observa un signo de síntomas latentemente peligrosos de envenenamiento por litio, se debe detener el tratamiento con dicho fármaco que contiene litio y la concentración en plasma se debe medir nuevamente para tomar una medición necesaria y aliviar el envenenamiento por litio.

30

Así pues, la sal de litio es un medicamento eficaz en el tratamiento de pacientes depresivos, pero la sobredosis da como resultado graves problemas. Por lo tanto, cuando se administra un fármaco antidepresivo que contiene litio, es indispensable monitorizar la concentración de litio en suero y asegurar que la concentración se mantiene siempre en un intervalo limitado de desde 0,6 a 1,2 mEq/l. Por lo tanto, la medición cuantitativa de litio en suero es necesaria en el tratamiento de pacientes con depresión.

35

40

Se han desarrollado varias composiciones de reactivo líquido que permiten la determinación colorimétrica del litio para la prueba de laboratorio clínico.

El documento patente 1 divulga una composición de reactivo usada para medir la concentración de litio en una muestra biológica usando el cuerpo de color primario *cryptideinofa*.

45

El documento patente 2 divulga un reactivo analítico que reacciona con ion litio, que comprende un compuesto macrocíclico que tiene un anillo de pirrol y ocho átomos de bromo (Br) combinados en la posición  $\beta$  del anillo de pirrol.

50

El documento no patente 1 divulga que el ion litio se puede detectar por un compuesto en el que todo hidrógeno unido a carbonos de tetrafenilporfirina se sustituye reemplaza por flúor.

**Listado de técnicas anteriores**

55

Documento patente 1: JP-A1-7-113807

Documento patente 2: EP 1283986-B1

60

Documento no patente 1: Analytical Chemistry vol.51, n.º 9, pp. 803-807, (2002); K. Koyanagi *et al.*, "Synthesis of F28 tetraphenylporphyrin and its use for separation and detection".

**Sumario de la invención**

65 Problemas que debe resolver la invención

Las composiciones de reactivo de litio conocidas, sin embargo, tienen dichos deméritos o problemas, que son composiciones venenosas, que las sustancias farmacéuticas son costosas o no se suministran de manera estable y que la mayoría de las sustancias farmacéuticas no se disuelven en agua o, incluso si son solubles, se desactivan en agua, por lo que la reacción de coloración es muy lenta.

5 El documento no patente 1 mencionado anteriormente se desarrolló para resolver los problemas anteriores y permite el uso de una técnica de desarrollo del color. Sin embargo, el método de este documento no patente 1 requiere una operación de dilución de una muestra, ya que la sensibilidad es demasiado alta y la especificación de la composición de reactivo de litio requiere un intervalo de pH superior a 11, de manera que se deteriora fácilmente con CO<sub>2</sub> en el  
10 aire y, por tanto, los datos medidos no son estables. Aún más, en la práctica no se dispone de ninguna solución acuosa concentrada distinta de aquellas de hidróxido de sodio y de hidróxido de potasio para un intervalo de pH superior a 11, de manera que es difícil mantener una concentración constante. Estas soluciones acuosas concentradas son sustancias peligrosas que son difíciles de manipular, de modo que se debe evitar su uso. Su almacenamiento requiere recipientes especiales y se requiere un equipo o instalación especial de mayor escala en su manipulación. Por lo tanto, esta tecnología es difícil de aplicar a la monitorización *in situ* y POCT (pruebas a la  
15 cabecera del paciente).

La composición de reactivo para medir la cantidad de litio divulgada en el documento patente 1 es completamente diferente de la presente invención y se puede usar solamente a pH 12. Como se indica anteriormente, en un  
20 intervalo de pH superior a 11, en la práctica no hay ninguna solución acuosa concentrada distinta de las de hidróxido de sodio y de hidróxido de potasio, que son sustancias peligrosas que son difíciles de manipular y se requiere un equipo o instalación especial de mayor escala para su complemento.

El documento de Koyanagi *et al.*, del documento no patente 1 enseña que el ion litio se puede separar y detectar usando F28 tetrafenilporfirina. Sin embargo, la extracción con cloroformo venenoso oleoso es necesaria para realizar  
25 la separación y detección de iones litio. De hecho, era imposible la determinación directa de litio en solución acuosa sin un complicado pretratamiento.

Así pues, existía un problema, que era imposible la medición rápida y cuantitativa del ion litio en suero. De hecho, la  
30 detección de iones litio en soluciones acuosas usando F28 tetrafenilporfirina no es fácil, de modo que la medición cuantitativa de iones litio con este compuesto no se ha realizado hasta ahora.

La presente invención se realizó para resolver el problema y proporciona una composición de reactivo usada en la medición cuantitativa de litio (concentración) en soluciones acuosas tales como muestras biológicas y muestras de  
35 líquidos ambientales, y un método y dispositivo de medición que usa la composición de reactivo para determinar la cantidad de ion litio. La presente invención permite medir la concentración de litio rápida o inmediatamente usando el colorímetro convencional. La presente invención proporciona también una composición de reactivo de litio que se puede usar para la detección mediante observación visual y método y aparato que usa la composición de reactivo de litio para medir el ion litio.

#### 40 Medios para resolver los problemas

Un objeto de la presente invención es el uso de una composición acuosa de reactivo de litio para medir la cantidad de litio de acuerdo con la reivindicación 1.

45 Otras características del uso de acuerdo con la presente invención se dan en las reivindicaciones 2 a 10. Un objeto adicional de la invención es un kit de reactivo de litio como se define en la reivindicación 11 y/o en la reivindicación 12.

50 Otro objeto de la presente invención es un método para determinar la cantidad de iones litio en plasma sanguíneo o suero en una muestra de prueba como se define en la reivindicación 13.

Otras características del método de acuerdo con la presente invención se dan en las reivindicaciones 14 a 16.

55 El litio en una solución acuosa tal como una muestra biológica y una muestra ambiental genera un color con la composición de reactivo de litio usada de acuerdo con la presente invención, en particular, con el compuesto anterior en el que todos los hidrógenos unidos a carbonos de una tetrafenilporfirina están reemplazados por flúor, que funciona como un reactivo quelante (desarrollador de color).

60 El cambio de color de amarillo a rojo por una reacción de coloración que se observa entre un compuesto de F28 tetrafenilporfirina e iones litio es difícil de realizar. Sin embargo, lo que se requiere es determinar con precisión una cantidad de litio en suero en el intervalo de 0,6 mg/dl a 2,0 mg/dl (0,9 mM a 3 mM). Los inventores encontraron tal hecho de que la cantidad de litio en suero se puede determinar con precisión fijando una concentración del compuesto de F28 tetrafenilporfirina en un intervalo de 0,1 a 1,0 g/l, preferentemente 0,5 g/l en un modo de  
65 realización de la presente invención.

El modificador de pH se usa preferentemente en la presente invención. De hecho, en una zona ácida inferior a pH 5,0, el compuesto de F28 tetrafenilporfirina, que es un desarrollador de color (reactivo quelante) de acuerdo con la presente invención, no se une al ion litio, de modo que no se observa ningún cambio de coloración y es difícil determinar la cantidad de litio. En un intervalo entre pH 5 y pH 7, se produce una reacción específica entre el desarrollador de color y el ion litio pero la velocidad de reacción de coloración es lenta. En un intervalo entre pH 8 y pH 11, el desarrollador de color reacciona rápidamente con el ion litio y se puede formar un complejo de coloración estable. En la zona alcalina superior a pH 11, un tono de color del reactivo quelante y del complejo de coloración formado se vuelve inestable con el tiempo. Esto puede ser provocado por la absorción de dióxido de carbono en el aire, de modo que el pH fluctúa. Por lo tanto, es necesario usar un modificador de pH o un tampón de pH que pueda mantener el pH de la composición de reactivo de litio usada de acuerdo con la presente invención en un intervalo desde pH 7 a pH 12, preferentemente desde pH 8 a pH 11.

El modificador de pH se puede seleccionar de medicamento alcalino, incluyendo hidróxido de sodio, hidróxido de potasio y amoníaco, medicamento ácido incluyendo ácido acético, ácido fosfórico, ácido cítrico, ácido carbónico, ácido bicarbónico, ácido oxálico, ácido clorhídrico, ácido nítrico y sus sales. El modificador de pH puede ser un tampón de pH y se puede seleccionar de ácido cítrico, ácido carbónico, ácido bicarbónico, ácido fosfórico, ácido succínico, ácido ftálico, cloruro de amonio, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, MES como tampón de Good, Bis-Tris, ADA, PIPES, ACES, MOPSO, BES, MOPS, TES, HEPES, DIPSO, TAPSO, POPSO, HEPPSO, EPPS, Tricina, Bicina, TAPS, CHES, CAPSO, CAPS y sus sales.

La composición de reactivo de litio usada de acuerdo con la presente invención permite la reacción de color específica para litio en un intervalo desde pH 5 a pH 12 incorporando el modificador de pH.

Es indispensable que el disolvente (disolvente polar) usado en la presente invención sea un disolvente orgánico que sea compatible con el agua. El disolvente puede ser una solución que consiste principalmente en disolvente orgánico o una solución acuosa a la que se añade un disolvente orgánico, siempre que el disolvente se pueda mezclar uniformemente con una solución acuosa tal como suero, plasma sanguíneo y eluato, que sea una muestra de prueba. De hecho, puesto que una muestra de prueba que se va a medir está en forma de una solución acuosa cuando la concentración de litio en la muestra se determina mediante un analizador automatizado de uso general y por un espectrofotómetro de luz visible-ultravioleta, es deseable que la composición de reactivo esté en forma de una solución acuosa.

El disolvente orgánico se elige preferentemente de dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF) y dimetilacetamida (DMA).

En los productos actuales, se incorpora un estabilizante adecuado en la composición de reactivo usada de acuerdo con la presente invención. En un modo de realización, se usa un tensioactivo como el estabilizante. El tensioactivo mejora la dispersabilidad del compuesto de F28 tetrafenilporfirina y previene las suspensiones originadas a partir de la muestra durante la reacción de coloración. Por lo tanto, el estabilizante se usa para asegurar dicho efecto.

El estabilizante puede ser un tensioactivo no iónico o un tensioactivo aniónico. El tensioactivo no iónico puede ser éster de ácido graso de sorbitano, éster parcial de ácido graso de pentaeritritol, éster de ácido monofático de propilenglicol, monoéster de ácido graso de glicerina, polioxietileno alquil éter, polioxietileno alquil éter, polioxietileno polioxipropilenglicol, éster parcial de ácido graso de polioxietileno, éster parcial de ácido graso de polioxietileno sorbitol, éster de ácido graso de polioxietileno, dietanolamida de ácido graso, etanolamida de ácido graso, amida de ácido graso de polioxietileno, polioxietileno octilfenil éter (Triton X-100®), p-nonil fenoxi poliglicidol o sus sales. Los tensioactivos no iónicos preferentes son polioxietileno octilfenil éter (Triton X-100®) y p-nonil fenoxi poliglicidol.

El tensioactivo aniónico como estabilizante puede ser una sal de éster de alquilsulfato, sal de sulfato de polioxietileno alquil éter, sal de sulfato de polioxietileno fenil éter, alquilbencenosulfonato y alcanosulfonato. El tensioactivo aniónico típico se selecciona de dodecilsulfato de sodio, dodecilsulfato de sodio y sulfato de sodio de polioxietileno alquilfenil éter.

La composición de reactivo de litio usada de acuerdo con la presente invención puede contener más de un reactivo de enmascaramiento, para evitar la alteración provocada por otros iones distintos de litio, que pueden estar presentes en la muestra, para suprimir la oxidación de la composición de reactivo y para mejorar la estabilidad de almacenamiento. El reactivo de enmascaramiento puede no ser necesario si hay pocos iones distintos de litio.

El reactivo de enmascaramiento que se puede añadir a la composición de reactivo de litio usada de acuerdo con la presente invención se puede seleccionar de trietanolamina, etilendiamina, N,N,N',N'-tetraquis-2-(piridilmetil)etilendiamina (TPEN), piridina, 2,2-bipiridina, propilendiamina, dimetilentriamina, ácido dimetilentriamino-N,N,N',N',N''-pentaacético (DTPA), trimetilentetramina, ácido trimetilentetramino-N,N,N',N'',N'''-hexaacético (TTHA), 1,10-fenantrolina, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido O,O'-bis(2-aminofenil)etilenglicol-N,N',N'-tetraacético (BAPTA), N,N-bis(2-hidroxietil)glicina (Bicina), ácido trans-1,2-diaminociclohexano-N,N,N',N'-tetraacético (CyDTA), ácido O,O'-bis(2-aminoetil)etilenglicol-N,N',N',N'-tetraacético (EGTA), ácido N-(2-hidroxil)iminodiacético

(HIDA), ácido iminodiacético (IDA), ácido nitrilotriacético (NTA), trimetilfosfonato de nitrilo (NTPO) y sus sales. Se usa preferentemente trietanolamina.

5 La composición de reactivo de litio usada de acuerdo con la presente invención puede incluir antisépticos para prevenir la degradación provocada por un microorganismo. Los antisépticos no están especialmente limitados y pueden ser azida de sodio y Procline®. Una cantidad de antisépticos no está especialmente limitada y puede ser una concentración usada generalmente como un antiséptico. Por ejemplo, en el caso de la azida de sodio, la cantidad de antisépticos es aproximadamente un 0,1 % en masa con respecto a una solución de reacción. Los antisépticos se prescriben generalmente para productos que se almacenan durante una duración de periodos más  
10 largos.

15 Para garantizar un almacenamiento a largo plazo, la composición de reactivo de litio usada de acuerdo con la presente invención se puede almacenar por separado en forma de un kit para medir reactivo de litio que comprende dos reactivos separados que se mezclan justo antes de la medición para realizar la composición de reactivo de litio como se usa en la reivindicación 1. Por ejemplo, un primer reactivo comprende el estabilizante y el modificador de pH o tampón de pH, mientras que un segundo reactivo comprende el compuesto de tetrafenilporfirina, disolvente orgánico miscible en agua, estabilizante y modificador de pH o tampón de pH.

20 En los usos actuales, la composición de reactivo de litio usada de acuerdo con la presente invención se pone en contacto con una muestra de prueba de suero y/o plasma sanguíneo para inducir la coloración del complejo de litio que se mide en términos de absorbancia y espectro para determinar una cantidad de litio en la muestra, comparando con concentraciones de referencia de una muestra estándar cuyas concentraciones de litio son conocidas.

25 En la práctica, en la coloración del complejo de litio y en su espectro, la sensibilidad se mide preferentemente a una longitud de onda de 550 nm o en la proximidad de una longitud de onda desde 530 nm a 560 nm, o la sensibilidad se mide a una longitud de onda de 570 nm o en la proximidad de una longitud de onda desde 565 nm a 650 nm para calcular la concentración de litio. En este caso, se entiende por sensibilidad la absorbancia o una diferencia de absorbancia en un espectrofotómetro de luz ultravioleta-visible.

30 En el dispositivo de medición, se mide la coloración, absorbancia o espectro del complejo de litio generado a partir de la composición de reactivo de litio usada de acuerdo con la presente invención en contacto con una muestra de prueba de suero y plasma sanguíneo, o la sensibilidad a una longitud de onda de 550 nm o en la proximidad de una longitud de onda desde 530 nm a 560 nm o la sensibilidad a una longitud de onda desde 570 nm o en la proximidad de una longitud de onda desde 565 nm a 650 nm se mide para calcular el valor cuantitativo de litio.  
35

#### Ventajas de la invención

40 La composición de reactivo de litio usada de acuerdo con la presente invención y el método y dispositivo para medir iones litio permiten determinar o medir fácilmente la concentración de litio en una solución acuosa tal como una muestra ambiental y una muestra biológica. En la composición de reactivo de litio como se usa en las reivindicaciones 1 a 10 o como se obtiene con el kit definido en la reivindicación 11 o 12, la curva de calibración de la concentración de litio es lineal en un intervalo práctico desde 0,6 a 1,2 mEq/l, de manera que la concentración se puede calcular mediante una simple operación a partir de valores numéricos del colorímetro y del espectrofotómetro de luz ultravioleta-visible. Por lo tanto, la concentración de litio en la muestra de suero o muestra biológica se puede  
45 determinar rápida y cuantitativamente por un espectrofotómetro habitual. Los datos resultantes se pueden usar como índice de gestión en el tratamiento TDM, por ejemplo. O, la determinación cuantitativa de un mayor número de muestras se puede hacer en un tiempo corto mediante un analizador de química clínica automático.

50 En la presente invención, la composición de reactivo de litio se ajusta a un intervalo de pH de desde pH 5 hasta pH 12 para permitir la medición por espectrometría. En un intervalo ácido por debajo de pH 5, el reactivo quelante de acuerdo con la presente invención (F28 tetrafenilporfirina litio) no se une a iones de helio de modo que no se observa el cambio de color que es dependiente de la concentración de litio. Por el contrario, en una zona alcalina por encima de pH 12, un tono de color del reactivo quelante y del complejo de coloración formado no es estable. La estabilidad del tono de color se vuelve pobre debido a la absorción de dióxido de carbono en el aire que es una  
55 causa de fluctuación del pH. En el intervalo de pH de pH 5 a pH 7, se puede observar la coloración específica del reactivo quelante, ya que el reactivo quelante se une a iones litio pero la velocidad de coloración es demasiado lenta. Por lo tanto, el intervalo de pH desde pH 8 a pH 11 es preferente, ya que, en el intervalo de pH desde pH 8 a pH 11, el reactivo quelante se une al ion litio rápidamente y la reacción de coloración es específica y estable.

60 El complejo metálico de tetrafenilporfirina posee un intervalo de espectro específico típico en la proximidad desde 380 nm a 460 nm denominado "banda de Soret" en el que se obtiene la máxima sensibilidad. Este intervalo se puede seleccionar como un intervalo de longitud de onda de medición. Sin embargo, la sensibilidad en este intervalo es demasiado alta para una concentración de litio que tenga importancia clínica en una muestra de suero, de modo que es necesaria una operación de dilución, lo que da como resultado un aumento de operaciones complicadas y de  
65 unidades adicionales de dilución que aumentan el tamaño de la unidad de medición.

En la presente invención, se usa una longitud de onda de 550 nm o en el intervalo próximo de desde 530 nm a 560 nm en la que la sensibilidad es varias veces más baja que la de la banda de Soret como el intervalo de longitud de onda de medición. Al seleccionar este intervalo, se obtiene la sensibilidad óptima para una concentración de muestra que se va a someter a prueba y se puede eliminar la complicada operación de dilución y la unidad de dilución. Aún más, la curva de calibración de acuerdo con la presente invención tiene una mejor linealidad que aquella en el caso de la banda de Soret, de manera que la concentración se puede calcular fácilmente a partir de los valores medidos obtenidos mediante un colorímetro de pequeño tamaño o un espectrofotómetro de luz ultravioleta-visible. Aún más, el cambio en el tono de color de amarillo a rojo es muy intenso en la presente invención, el nivel de concentración se puede juzgar por observación visual o a simple vista.

Si la banda de Soret se usa como longitud de onda de fotometría, hay otro problema de que el valor cuantitativo del litio está influenciado por otras sustancias orgánicas y componentes de color tales como ion nitrato, creatinina, bilirrubina, biliverdina y hemoglobina hemolizada. Esta influencia o problema se puede reducir en la presente invención y la concentración de litio se puede determinar con alta precisión.

En el método convencional para medir litio, se requirió un aparato de uso único de gran escala. En la presente invención, la concentración de litio se puede determinar mediante un pequeño colorímetro portátil y puede construirse como un kit POCT.

## Breve descripción de los dibujos

[Fig. 1] Una tabla para calcular la concentración óptima de F28 tetraporfirina de acuerdo con la presente invención.

[Fig. 2] Gráficos de espectrofotómetro de luz ultravioleta-visible obtenidos en el resultado del ejemplo 1 de acuerdo con la presente invención.

[Fig. 3] Gráfico de la curva de calibración a diferentes longitudes de onda en el ejemplo 1 de acuerdo con la presente invención.

[Fig. 4] Gráficos que muestran el cambio en el espectro (reacción de color) cuando se forma el complejo F28 tetrafenilporfirina-litio en el ejemplo 1 de acuerdo con la presente invención.

[Fig. 5] Un gráfico que muestra una correlación entre los valores medidos de las muestras de suero en el ejemplo 1 de acuerdo con la presente invención y los valores medidos obtenidos por el método de absorción atómica (método convencional).

[Fig. 6] [Tabla 1] muestra una comparación con valores medidos obtenidos usando un analizador automatizado en el que se usaron las muestras de suero de control.

[Fig. 7] [Tabla 2] muestra cómo detectar litio por observación visual en la presente invención.

[Fig. 8] Una gráfica de un espectro de absorbancia en el ejemplo 1 de acuerdo con la presente invención.

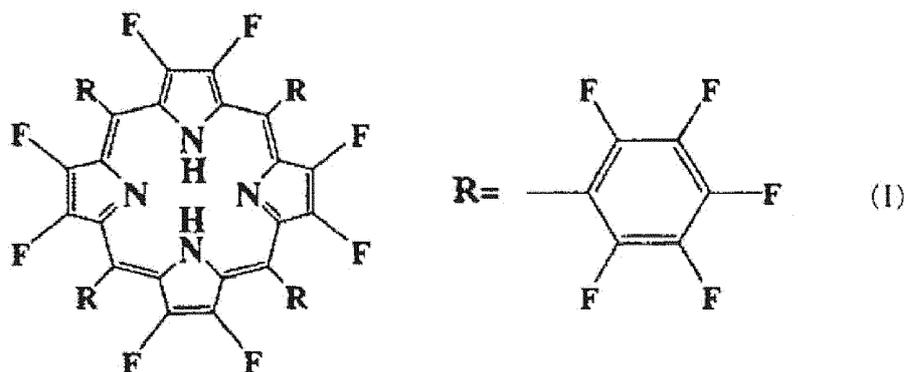
[Fig. 9] [Tabla 3] muestra los valores medidos obtenidos por diferentes disolventes orgánicos de acuerdo con la presente invención.

[Fig. 10] [Tabla 4] muestra los valores medidos obtenidos por diferentes estabilizantes de acuerdo con la presente invención.

[Fig. 11] [Tabla 5] muestra los valores medidos obtenidos por diferentes reactivos de enmascaramiento de acuerdo con la presente invención.

## Modo de llevar a cabo la invención

Los inventores estudiaron composiciones de reactivo de litio que se pueden usar para medir una concentración de litio en suero y plasma sanguíneo cuantitativa y más simplemente y enfocada en un compuesto representado por la fórmula general (I):



5 en la que todos los átomos de hidrógeno unidos a los carbonos de un anillo de tetrafenilporfirina están reemplazados por átomos de flúor (el número total de flúor es 28) en el compuesto macrocíclico descrito en el documento no patente 1 y completan la presente invención. El compuesto anterior se denomina en el presente documento "F28 tetrafenilporfirina".

10 Los documentos de patente 2 y 3 divulgan composiciones similares de reactivo de litio que comprenden un compuesto macrocíclico que tiene anillos de pirrol en los que ocho átomos de bromo (Br) están unidos a la posición  $\beta$  del anillo de pirrol, para proporcionar un reactivo analítico que puede reaccionar con iones litio. Este compuesto, sin embargo, es difícil de hacer reaccionar con litio si el pH no está en una zona alcalina por encima de pH 11.

15 En el caso de la F28 tetrafenilporfirina de acuerdo con la presente invención, la reacción se produce en un intervalo de pH 5 a pH 12. En la presente invención, la F28 tetrafenilporfirina se usa como un reactivo quelante y se usa para determinar cuantitativamente los iones litio en un sistema acuoso.

Ahora, la composición de reactivo de litio usada de acuerdo con la presente invención se explica con más detalle usando los ejemplos.

## 20 Ejemplos

### Ejemplo 1 (muestra 1)

25 En este ejemplo 1, se preparó en primer lugar un primer reactivo como una solución de tampón de pH y un segundo reactivo como una solución de reactivo de coloración. A continuación, dos reactivos del primer y segundo reactivo se mezclaron justo antes de la operación de medición para preparar una composición de reactivo de litio usada de acuerdo con la presente invención. Aunque estos dos reactivos pueden ser almacenados en una forma de combinado, es aconsejable almacenarlos por separado y mezclarlos justo antes de la operación de medición para evitar el deterioro de los reactivos durante una larga duración de almacenamiento.

30 Ahora, explicaremos en detalle cómo preparar la composición de reactivo de acuerdo con la presente invención.

Para empezar, se prepara el primer reactivo (solución de tampón de pH). Lo siguiente es la composición del primer reactivo.

35 (1) Primer reactivo (como estabilizante y solución de tampón):

- reactivo quelante: ninguno

40 - disolvente orgánico: ninguno

- estabilizante (dispersante: tensioactivo no iónico): 1,0 % en peso de TritonX-100® (polioxietileno octilfenil éter)

45 - reactivo de enmascaramiento: 10 mM de trietanolamina

50 En una mezcla de los componentes anteriores, se añadió 7 % en peso de cloruro de amonio para ajustar a pH 10. A continuación, el volumen total se aumentó a 1 litro con agua purificada y se almacenó en un recipiente de almacenamiento habitual. Si una proporción de TritonX-100 ® (polioxietileno octilfenil éter) es inferior al 1,0 % en peso, puede producirse turbidez en algunos casos. Por el contrario, si se usa estabilizante en exceso, se generará espuma en un recipiente de reactor. Dicha turbidez o formación de espuma puede influir en la reproducibilidad de la medición, de modo que es preferente un intervalo de 0,1 a 5,0 % en peso y 1,0 % en peso.

En este ejemplo, el reactivo de enmascaramiento es 10 mM de trietanolamina. Si una cantidad del reactivo de

enmascaramiento es corta, no se obtendrá un efecto de enmascaramiento satisfactorio en muestras que contengan iones extraños en exceso distintos del litio. Por el contrario, el exceso de reactivo de enmascaramiento enmascarará el propio ion litio, dando como resultado una causa de errores en la medición. Por lo tanto, un intervalo de 1,0 a 100 mM es preferente y 10 mM es más preferente.

5

El segundo reactivo (solución de reactivo de revelado de color) se produce como sigue.

(2) Segundo reactivo (como solución de reactivo de revelado de color):

10 - reactivo quelante: 0,5 g/l de F28 tetrafenilporfirina

- disolvente orgánico; 20 % en peso de dimetilsulfóxido (DMSO)

15

- estabilizante (dispersante: tensioactivo no iónico): 1,0 % en peso de TritonX-100® (polioxietilen octilfenil éter)

- reactivo de enmascaramiento: 10 mM de trietanolamina

20 

En una mezcla de los componentes anteriores, se añadió 0,05 M (mol/l) de MOPS (tampón de Good) para ajustar a pH 7,0. A continuación, el volumen total se aumentó a 1 litro con agua purificada y la solución resultante se almacenó en un recipiente de almacenamiento habitual.

25 

En el ejemplo 1, la reacción de revelado de color del compuesto de F28 tetrafenilporfirina es complicada. Sin embargo, en las pruebas prácticas de laboratorio clínico para medir la concentración de litio en suero, se requiere la precisión en un intervalo de concentración de litio de 0,6 mM a 3 mM. El inventor encontró que la medición precisa se puede hacer seleccionando la concentración de compuesto de F28 tetrafenilporfirina de 0,1 a 1,0 g/l, preferentemente 0,5 g/l.

30 

En el intervalo de concentración de litio de 0,6 mM a 3 mM, la medición de litio se puede realizar ventajosamente ajustando la concentración de compuesto de F28 tetrafenilporfirina en la composición de reactivo final a 0,1 a 1,0 g/l, preferentemente 0,5 g/l. Si la concentración es inferior al límite anterior, una reacción entre F28 tetrafenilporfirina e ion litio no es proceder suficiente. Por el contrario, si la concentración excede el límite anterior, se producirá otro problema de aumento de la absorbancia de un blanco de compuesto de F28 tetrafenilporfirina. Por lo tanto, se usa preferentemente la concentración de 0,5 g/l.

35 

En más detalle, la reacción entre F28 tetrafenilporfirina e ion litio es una reacción de una relación molar igual de 1:1 para formar un complejo de quelato. Cuando se hace reaccionar una muestra de prueba que contiene 3 mM de litio con la composición de reactivo usada de acuerdo con la presente invención bajo la condición del ejemplo 1, la concentración de litio en el sistema de reacción se convierte en 0,02 mM. Por lo tanto, la concentración de compuesto de F28 tetrafenilporfirina debe existir a una concentración superior a 0,02 mM para efectuar la reacción suficientemente (ni demasiado ni demasiado poco).

4045 

En la reacción de formación de complejos (reacción de coloración) entre un reactivo quelante e iones metálicos, es necesario en general usar el reactivo quelante (F28 tetrafenilporfirina) en una cantidad de igual moles a 10 veces más moles con respecto a un reactivo o un sujeto a ser sometido a prueba (litio). Como se muestra en la fig. 1 que muestra las concentraciones óptimas de F28 tetrafenilporfirina, la composición de reactivo se prepara de tal manera que la concentración de F28 tetrafenilporfirina durante el tiempo de reacción se convierte de igual moles a 10 veces más moles. En la práctica, es preferente usar una concentración del reactivo quelante en la composición de reactivo de 0,5 g/l (5 veces) en lugar de 0,1 g/l (mismo tamaño) para permitir su uso en condiciones de medición más amplias, debido a que los parámetros de las dosificaciones para medir la reacción de una cantidad añadida de la composición de reactivo y de una cantidad de muestra que se va a someter a prueba varían y dependen del aparato de medición y umbrales deseados. Por ejemplo, en el caso de un aparato de medición cuya precisión de medición no sea tan alta, se puede aumentar una cantidad de muestra de dos veces a cinco veces la del ejemplo 1. Para preparar dichos casos, es aconsejable usar la concentración de 0,5 g/l (5 veces) de la composición de reactivo que es suficiente cantidad de reactivo para la reacción. El exceso de cantidad de más de 10 veces no tiene ninguna ventaja porque la mayor cantidad de reactivo puede no tener una ventaja significativa en la cinética de la reacción de coloración, sino más bien aumentar un problema de elevación del nivel de blanco.

50  
5560 

Lo que se necesita es satisfacer la condición de reacción en la relación molar entre el reactivo quelante y el litio. Por ejemplo, cuando la concentración de reactivo quelante (F28 tetrafenilporfirina) en el segundo reactivo es 1,0 g/l, una cantidad del segundo reactivo que se añade a la reacción puede reducirse a la mitad. O, cuando una cantidad de muestra se reduce a la mitad, una cantidad del reactivo quelante puede reducirse a la mitad.

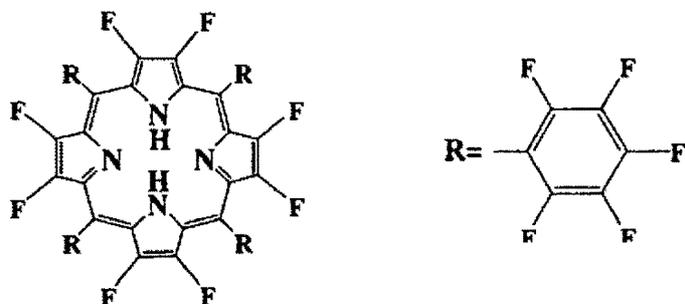
65 

En el ejemplo 1, la concentración de F28 tetrafenilporfirina es de 0,5 g/l. La concentración óptima de F28 tetrafenilporfirina es de 0,1 a 1,0 g/l que satisface la condición de reacción en moles y disminuye el nivel de blanco al mínimo.

Una cantidad de dimetilsulfóxido (DMSO) es de 5 a 30 % en peso. Cuando esta cantidad es más corta, la dispersión de F28 tetrafenilporfirina en una solución se vuelve pobre. Por el contrario, la cantidad en exceso de dimetilsulfóxido da como resultado un aumento del disolvente orgánico en la composición de reactivo. Por lo tanto, una cantidad preferente es un 20 % en peso.

5

La F28 tetrafenilporfirina usada en este ejemplo 1 tiene una estructura representada por la siguiente fórmula (I):



(I)

10 en la que todos los hidrógenos unidos a carbonos de una tetrafenilporfirina están reemplazados por átomos de flúor.

(3) Ahora explicaremos cómo preparar una curva de calibración de la composición de reactivo de litio preparada mezclando el primer reactivo con el segundo reactivo para muestras cuyas concentraciones de litio son conocidas.

15 En el ejemplo 1, se añadieron 720  $\mu$ l del primer reactivo (solución de tampón) y 240  $\mu$ l del segundo reactivo (solución de reactivo de coloración) a 6  $\mu$ l de una muestra. En este caso, el primer reactivo tiene una capacidad tamponadora a pH10. Después de mezclar el primer y segundo reactivo y la muestra, la mezcla resultante de un líquido de prueba tiene aproximadamente pH 10.

20 Así pues, cuando se usa F28 tetrafenilporfirina de acuerdo con la presente invención como reactivo quelante, la reacción de revelado de color se puede llevar a cabo en un intervalo de pH de pH 5 a pH 10. De hecho, la presente invención proporciona un reactivo para la medición de litio que posee una fuerte acción tamponadora del pH en un intervalo de pH inferior a 10, de manera que la fluctuación del pH provocada por la absorción del CO<sub>2</sub> en el aire se puede reducir. Por lo tanto, se puede evitar un efecto adverso a los valores medidos, y es posible almacenar los  
25 reactivos de medición en recipientes de uso general.

Es posible mezclar el primer reactivo con el segundo reactivo justo antes de su uso y añadir la mezcla resultante al mismo volumen de muestra. En este caso, se pueden añadir 940  $\mu$ l de la mezcla líquida a 6  $\mu$ l de una muestra.

30 Se añadió una muestra de prueba a la mezcla resultante de pH 10 para efectuar una reacción a temperatura ambiente durante 10 minutos y a continuación se midió una absorbancia a 550 nm mediante un espectrofotómetro de luz visible ultravioleta (HITACHI, tipo U-3900), siendo el blanco la muestra de prueba. La fig. 2 muestra el resultado que es una relación entre la absorbancia y la concentración de Li (mg/l). La fig. 4 es un gráfico que muestra el cambio en el espectro en un intervalo de luz visible cuando se forma el complejo F28 tetrafenilporfirina-  
35 litio.

Para el complejo metálico de tetrafenilporfirina, se obtiene la máxima sensibilidad a un intervalo de longitud de onda de la llamada banda de Soret (aproximadamente de 380 nm a 460 nm). Sin embargo, en la presente invención no se usa este intervalo de banda de Soret sino que se usa una longitud de onda de 550 nm o en el intervalo alrededor de  
40 530 nm a 560 nm, de modo que operaciones complejas de dilución y de medios de dilución o una instalación auxiliar no son necesarias en la presente invención.

La fig. 3 que muestra gráficas de las curvas de calibración a diferentes longitudes de onda revela que se puede obtener mejor linealidad en la curva de calibración cuando se usa una longitud de onda de 550 nm o en el intervalo  
45 alrededor de 530 nm a 560 nm que en los casos en que se usan las longitudes de onda de la llamada banda de Soret. Por lo tanto, la concentración exacta se puede calcular fácilmente mediante un colorímetro simple o un espectrofotómetro. Aún más, el cambio de color de amarillo a rojo es muy agudo, por lo que un nivel de la concentración se puede detectar fácilmente a simple vista. En la técnica convencional, un aparato de gran escala para uso exclusivo es necesario para medir la concentración de litio, mientras que en la presente invención la  
50 concentración de litio puede medirse fácilmente mediante un colorímetro portátil o un espectrofotómetro de luz ultravioleta-visual que se usa ampliamente. Se puede construir la presente invención en forma de un kit POCT.

En el gráfico de la fig. 3, se obtuvo una línea (•) en una longitud de onda de 550 nm que se usó en el ejemplo 1, mientras que se obtuvieron otras dos curvas en longitudes de onda de 405 nm (\*) y 415 nm (x) que corresponden a

longitudes de onda de la banda de Soret cuando se repitió el mismo procedimiento que en el ejemplo 1. En los casos de 405 nm (\*) y 415 nm (x), sin embargo, la medición se llevó a cabo después de que las muestras se diluyeran 5 veces ya que la sensibilidad era demasiado alta. La fig. 3 revela que se puede obtener una curva de calibración que tiene una buena linealidad para la longitud de onda de 550 nm de ejemplo, pero las curvas de calibración de las longitudes de onda de 405 nm y 415 nm no son lineales.

La fig. 4 muestra cambios en el espectro cuando se forma el complejo F28 tetrafenilporfirina-litio. Se confirma claramente en la fig. 4 que la absorbancia aumentará linealmente con el aumento de la concentración de litio de 6 mg/dl a 1,2 mg/dl, 1,8 mg/dl, 2,4 mg/dl y 3,0 mg/dl. Un pico de absorción de 415 nm (banda de Soret) que es típico para complejo de porfirina-metal y un pico de absorción de 550 nm (mostrado en la fig. 4) aumentan y un pico de absorción de 570 nm (también mostrado en la fig. 4) disminuye en proporción a la concentración de litio. Por lo tanto, se puede calcular una diferencia en absorbancia en estos picos de absorción. En la presente invención, la longitud de onda de 550 nm se usa preferentemente como una longitud de onda de medición de fotometría debido a una buena linealidad en la curva de calibración.

Es posible seleccionar un intervalo de longitud de onda de 540 nm a 560 nm como el intervalo de medición fotométrico en lugar de la longitud de onda de 550 nm usada en el ejemplo 1. De hecho, algunos equipos de medición pueden no tener un filtro fotométrico para los 550 nm. En tal caso, la longitud de onda de medición de la fotometría se puede seleccionar a partir de un intervalo de longitud de onda en la proximidad tal como 540 nm o 560 nm donde la sensibilidad es también alta. También se puede usar una longitud de onda de 570 nm como longitud de onda de medición de fotometría, ya que la disminución en la sensibilidad de la absorbancia a 570 nm es también cuantitativa como se muestra en la fig. 4. Por lo tanto, también se puede calcular una diferencia en la absorbancia ( $\Delta$  Abs) a 570 nm con una referencia del reactivo como blanco.

En el raro caso que se produzcan algunos contaminantes que interfieran a la longitud de onda de 550 nm en una muestra de paciente y se produzcan datos erróneos a la longitud de onda de 550 nm, es posible seleccionar una longitud de onda de 570 nm o en la proximidad de desde 565 nm hasta 650 nm como la longitud de onda de medida en la fotometría para evitar tales problemas y para calcular la concentración de litio a causa de una disminución en la sensibilidad como una diferencia en absorbancia.

Ahora, explicaremos los datos experimentales del ejemplo 1 que muestran que la concentración de litio puede medirse con gran exactitud con la composición de reactivo de litio usada de acuerdo con la presente invención. Resultados del experimento por espectrofotómetro de luz ultravioleta-visible (HITACHI, modelo U-3900).

La fig. 2 muestra un resultado del experimento medido por un espectrofotómetro de luz ultravioleta-visible (HITACHI, modelo U-3900) Un eje de abscisas es las concentraciones de iones litio conocidas (concentración de Li, mg/dl) y un eje de ordenadas es la diferencia de absorbancia medida por el espectrofotómetro de luz ultravioleta-visible a una longitud de onda de 550 nm.

La fig. 2 revela que se obtiene una buena linealidad en una relación entre la absorbancia y la concentración de litio.

Prueba de correlación entre el método de absorción atómica (método convencional) y el método de acuerdo con la presente invención para una muestra de suero

La fig. 5 es un gráfico que muestra una correlación de los valores medidos entre el método de medición del ejemplo 1 de acuerdo con la presente invención y el método de absorción atómica convencional (método convencional) llevado a cabo para la misma muestra de suero. Los valores medidos obtenidos por el método de absorción atómica convencional (método convencional) se representan en el eje de abscisas (X), mientras que los valores medidos de acuerdo con la presente invención se representan en el eje de ordenadas (Y). Una línea de regresión mostrada en la fig. 5 muestra una buena correlación de más del 95 %. Este resultado revela que el litio en una muestra de suero se puede determinar cuantitativamente mediante una absorciometría de luz ultravioleta-visible con la composición de reactivo usada de acuerdo con la presente invención.

Comparación de los valores medidos realizados por análisis automático para muestras de suero de control

La concentración de litio se midió para las siguientes muestras de sueros de control en las que se valora la concentración de litio:

- Precinorm U (Roche)

- Precipath U (Roche)

- Pathonorm H (SERO AS)

- Auto norm (SERO AS)

Utilizando un analizador automático de bioquímica (HITACHI, modelo H-7700) a una longitud de onda de medición de fotometría de 546 nm (que es una longitud de onda ajustada en este analizador y está cerca de 550 nm) por método de 1 punto final.

5 Parámetros del dispositivo:

Reactivo	0,24 ml
Muestra:	0,005 ml
Longitud de onda de fotometría (principal/sub.):	546 nM/700 nM
Tiempo de medición:	10 minutos
Temperatura:	37 °C
1 punto final:	método de aumento

10 Los resultados mostrados en la [tabla 1] de la fig. 6 demuestran tal hecho de que los valores medidos obtenidos por la presente invención coinciden con los valores garantizados en las condiciones anteriores, de modo que se confirmó que la concentración de litio en sueros se puede medir con éxito mediante un analizador automatizado para pruebas clínicas.

Detección de litio por observación visual

15 La [tabla 2] de la fig. 7 muestra los resultados de la observación visual para líquidos de muestra de prueba. En esta prueba, se añadieron 920 µl de una solución de reactivo de coloración que era una mezcla del primer reactivo y el segundo reactivo usado de acuerdo con la presente invención a 8 µl de una muestra de prueba y la mezcla resultante se hizo reaccionar durante 10 minutos a temperatura ambiente antes de realizar la observación visual. Los colores desarrollados se compararon con una guía de tono de color preparada usando sueros de control en una  
20 forma de las soluciones de concentración de litio estándar a diferentes niveles de concentración de litio.

Se confirmó un claro cambio de color de amarillo a rojo en los respectivos niveles de concentración y el cambio en el color de los sueros de control coincide con la guía de color de los sueros de control. A partir de este hecho, se demostró o se confirmó que la concentración de litio en suero se puede determinar rápida y fácilmente sin usar  
25 equipo específico de acuerdo con la presente invención.

Como se ha explicado anteriormente, se confirma que la concentración de litio se puede medir a alta precisión usando el reactivo de litio del ejemplo 1 de acuerdo con la presente invención.

30 Ejemplo 2

Se repitió el procedimiento del ejemplo 1 pero se cambió el primer reactivo en la composición de reactivo de litio añadiendo 0,1 M (mol/l) de MOPS para ajustar a pH 8,0 y añadiendo agua pura hasta el volumen total de 1 litro. A saber, una mezcla del primer reactivo, el segundo reactivo y el reactivo se ajustó a casi pH = 8 a un tiempo de  
35 medición.

(1) El primer reactivo (como estabilizante y solución de tampón):

Reactivo quelante:	ninguno
Disolvente orgánico:	ninguno
Estabilizante (tensoactivo no iónico dispersante):	Triton X-100 @ polioxietilen octilfenil éter: 1,0 % en peso
Agente de enmascaramiento:	trietanolamina: 10 mM

40 Se añadió 0,1 M de MOPS a la mezcla anterior para ajustar el pH de la mezcla a pH 8. A continuación, el volumen total se aumentó a 1 litro con agua purificada y la solución resultante se almacenó en un recipiente de almacenamiento de propósito general.

(2) El segundo reactivo (como una solución de reactivo de coloración):

45

Reactivo quelante:	F28 tetrafenilporfirina: 0,5 g/l
Disolvente orgánico:	Dimetilsulfóxido (DMSO): 20 % en peso
Estabilizante (dispersante, tensoactivo no iónico):	TritonX - 100 @ (polioxietilen octilfenil éter) 1,0 % en peso

agente de enmascaramiento:

trietanolamina 10 mM

A una mezcla de los componentes anteriores, se añadió 0,05 M de MOPS (tampón) para ajustar el pH a pH 7,0 y se añadió agua purificada hasta el volumen total de 1 litro, que se almacenó en un recipiente de uso general.

5 De la misma manera que en el ejemplo 1, se añadieron 720 µl del primer reactivo (solución de tampón) y 240 µl del segundo reactivo (solución de reactivo de coloración) a 6 µl de una muestra de prueba en un momento en que se midió la concentración de litio. Después de continuar la reacción durante 10 minutos a temperatura ambiente, se midió la absorbencia a una longitud de onda de 550 nm mediante un espectrofotómetro de luz ultravioleta-visible (tipo HITACHI U-3900).

10

Resultado experimental en el espectrofotómetro de luz ultravioleta-visible (tipo HITACHI U-3900)

La fig. 8 es un gráfico del resultado experimental del espectrofotómetro de luz ultravioleta-visible (HITACHI, tipo U-3900). La abscisa (X) es las concentraciones de iones litio conocidas (concentración de Li, mg/dl) y la ordenada (Y) representa las diferencias en la absorbencia a 550 nm en el espectrofotómetro de luz ultravioleta-visible.

15

La fig. 8 revela que la diferencia de absorbencia es proporcional de manera dependiente a la concentración de litio para la composición de reactivo preparada a pH 8 o bajo una condición de medición de pH 8 y que se obtiene también una buena linealidad de una curva de calibración a pH 8.

20

Sin embargo, en la condición de medición de pH 8, la cinética de reacción disminuye un poco y se estabiliza cuantitativamente en aproximadamente de 10 minutos a 20 minutos. En el caso de pH 10, la reacción se completa en 10 minutos. Por lo tanto, en el sistema de tamponación en un intervalo de pH 5 a pH 10 de la composición de reactivo de litio de la presente invención, no hay necesidad de usar un sistema de tamponación de pH superior a 11 basado en una solución de hidróxido denso tal como hidróxido de sodio e hidróxido de potasio por si caso, y por lo tanto la manipulación de la operación se hace más simple. El intervalo de pH se puede ajustar de acuerdo con las necesidades deseadas y se ajusta preferentemente a pH 10 en el que la cinética de reacción es rápida y se puede mantener suficiente poder tampón con el tampón de Good, el sistema de cloruro de amonio y el sistema de ácido carbónico. Desde un punto de vista práctico, es aconsejable llevar a cabo con un sistema de tamponación de pH 10 del ejemplo 1 en el que la reacción avanza con precisión.

25

30

Así pues, en la composición de reactivo de litio usada de acuerdo con la presente invención, es necesario usar un tampón de pH que funcione como modificador de pH para ajustar el pH a un intervalo de 7 a 12 o un tampón de pH como modificador de pH. Más deseablemente, es preferente usar un modificador de pH o un tampón de pH que ajusta el pH a pH 8 a pH 11 y más preferentemente usar un modificador de pH o tampón de pH que ajusta el pH alrededor de pH 10.

35

### Ejemplo 3

40 Ahora, se explicará la selección del disolvente orgánico. En la invención, es importante que el disolvente sea un disolvente orgánico que sea miscible con agua ya que las soluciones de reacción a medir son soluciones acuosas tales como suero. El disolvente puede ser un líquido que consta principalmente de un disolvente orgánico o una solución acuosa que contiene un disolvente orgánico, siempre que los componentes en la composición de reactivo se estabilicen como una solución acuosa. En particular, cuando la concentración de litio en la muestra se mide mediante un analizador automatizado de uso general y por un espectrofotómetro de luz ultravioleta-visible, es deseable usar básicamente una solución acuosa que contenga disolvente orgánico.

45

Otros disolventes orgánicos que se pueden mezclar con agua además de los ejemplos 1, 2 se explican en el ejemplo 3. En el ejemplo 3, se repitió el mismo procedimiento que en el ejemplo 1, pero el disolvente orgánico del segundo reactivo de dimetilsulfóxido (DMSO) (20 % en peso) en la composición de reactivo de litio se reemplazó por dimetilformamida (DMF) (20 % en peso).

50

(1) El primer reactivo (como solución de tampón):

- Reactivo quelante: ninguno
- Disolvente orgánico: ninguno
- Estabilizante (dispersante: tensioactivo no iónico): TritonX-100®  
(polioxi-etilen octilfenil éter) 1,0 % en peso
- Reactivo de fabricación: trietanolamina 10 mM,

55

En una mezcla de los componentes anteriores, se añadió 7 % en peso de cloruro de amonio para ajustar el pH a pH 10 y se añadió agua purificada hasta el volumen total de 1 litro, que se almacenó en un recipiente de uso general.

(2) El segundo reactivo (como solución de reactivo de coloración)

- Reactivo quelante: F28 tetrafenilporfirina: 0,5 g/l
- Disolvente orgánico: Dimetilformamida (DMF): 20 % en peso
- Estabilizante (agente dispersante: tensioactivo no iónico) TritonX-100® (polioxietilen octilfenil éter) 1,0 % en peso
- Reactivo de enmascaramiento: trietanolamina 10 mM

5 En una mezcla de los componentes anteriores, se añadieron 0,05 M de MOPS (tampón) para ajustar el pH a pH 7,0 y se añadió agua purificada hasta el volumen total de 1 litro, que se almacenó en un recipiente de uso general.

#### Ejemplo 4

10 Como el disolvente orgánico que es miscible con agua, se usó dimetilsulfóxido (DMSO) (20 % en peso) en el ejemplo 1 y se usó dimetilformamida (DMF) (20 % en peso) en el ejemplo 2.

En este ejemplo 4, se preparó una composición de reactivo de litio usando dimetilacetamida (DMA) (20 % en peso) como un disolvente orgánico que es miscible con agua y la concentración de litio se midió mediante la composición de reactivo de litio.

15

(1) El primer reactivo (como solución de tampón):

- Reactivo quelante: ninguno
- Disolvente orgánico: ninguno
- Estabilizante (dispersante: tensioactivo no iónico): TritonX-100® (polioxietilen octilfenil éter) 1,0 % en peso
- Reactivo de fabricación: trietanolamina 10 mM

20 En una mezcla de los componentes anteriores, se añadió 7 % en peso de cloruro de amonio para ajustar el pH a pH 10 y se añadió agua purificada hasta el volumen total de 1 litro, que se almacenó en un recipiente de uso general.

(2) El segundo reactivo (como solución de reactivo de coloración)

- Reactivo quelante: F28 tetrafenilporfirina: 0,5 g/l
- Disolvente orgánico: dimetilacetamida (DMA): 20 % en peso
- Estabilizante (agente dispersante: tensioactivo no iónico) TritonX-100® (polioxietilen octilfenil éter) 1,0 % en peso
- Reactivo de enmascaramiento: trietanolamina 10 mM

25 En una mezcla de los componentes anteriores, se añadieron 0,05 M de MOPS (tampón) para ajustar el pH a pH 7,0 y se añadió agua purificada hasta el volumen total de 1 litro, que se almacenó en un recipiente de uso general.

30 La fig. 9 muestra los resultados de una comparación de litio detectado en la muestra de suero de control, en la que se midió la concentración de litio por el mismo procedimiento que en el ejemplo 1, pero el disolvente orgánico se cambió de dimetilsulfóxido (DMSO) del ejemplo 1 a dimetilformamida (DMF) en el ejemplo 3 y a dimetilacetamida (DMA) en el ejemplo 4. La [tabla 3] de la fig. 9 muestra los resultados de una comparación entre el método de medición convencional y el método de medición de acuerdo con la presente invención.

35 La [tabla 3] de la fig. 9 que muestra una "Comparación entre diferentes disolventes orgánicos" muestra los siguientes resultados: un valor medido obtenido usando dimetilformamida (DMF) (20 % en peso) como disolvente orgánico que es miscible con agua en el ejemplo 1 fue 0,83 mM (mmol/l); Un valor medido obtenido usando dimetilformamida (DMF) (20 % en peso) como disolvente orgánico que es miscible con agua en el ejemplo 3 fue de 0,82 mM (mmol/l); Y un valor medido obtenido usando dimetilacetamida (DMA) (20 % en peso) como disolvente orgánico que es miscible con agua en el ejemplo 4 fue 0,81 mM (mmol/l). Estos valores coinciden en más del 95 % con un valor medido obtenido por espectrofotometría de absorción atómica 0,82 mM (mmol/l). Por lo tanto, es posible determinar cuantitativa y exactamente la concentración de litio en muestras acuosas tales como suero dispersando uniformemente F28 tetrafenilporfirina en estos disolventes orgánicos para preparar la composición de reactivo líquido usada de acuerdo con la presente invención.

45 Ejemplo 5

En este ejemplo 5, se explica la selección del estabilizante para la composición de reactivo de litio usada de acuerdo con la presente invención.

5 El uso de estabilizantes para las composiciones de reactivo de litio en los ejemplos 5 a 7 es básicamente igual que en el ejemplo 1, pero el estabilizante se cambió a un tensioactivo no iónico solo (ejemplo 5), un tensioactivo aniónico (ejemplo 6) y ambos un tensioactivo no iónico y un tensioactivo aniónico (ejemplo 7 ) respectivamente.

10 En el ejemplo 5 siguiente, la composición de reactivo de litio contiene sólo tensioactivo no iónico (TritonX-100®) (polioxietilen octilfenil éter) como estabilizante. Otros componentes en la composición de reactivo de litio son los mismos que en el Ejemplo 1.

Ejemplo 5

15 (1) El primer reactivo (como solución de tampón):

- Reactivo quelante: ninguno
- Disolvente orgánico: ninguno
- Estabilizante (dispersante: tensioactivo no iónico): TritonX-100® (polioxietilen octilfenil éter) 1,0 % en peso
- Reactivo de fabricación: trietanolamina 10 mM

En una mezcla de los componentes anteriores, se añadió 7 % en peso de cloruro de amonio para ajustar el pH a pH 10 y se añadió agua purificada hasta el volumen total de 1 litro, que se almacenó en un recipiente de uso general.

20 (2) El segundo reactivo (como solución de reactivo de coloración)

- Reactivo quelante: F28 tetrafenilporfirina: 0,5 g/l
- Disolvente orgánico: Dimetilsulfóxido (DMSO): 20 % en peso
- Estabilizante (agente dispersante: tensioactivo no iónico) TritonX-100® (polioxietilen octilfenil éter) 1,0 % en peso
- Reactivo de enmascaramiento: trietanolamina 10 mM

25 En una mezcla de los componentes anteriores, se añadieron 0,05 M de MOPS (tampón) para ajustar el pH a pH 7,0 y se añadió agua purificada hasta el volumen total de 1 litro, que se almacenó en un recipiente de uso general.

Ejemplo 6

En el ejemplo 6, la composición contiene sólo tensioactivo aniónico (dodecilsulfato de sodio (Wako Junyaku)).

30 (1) El primer reactivo (como solución de tampón):

- Reactivo quelante: ninguno
- Disolvente orgánico: ninguno
- Estabilizante (dispersante: tensioactivo aniónico sólo): dodecilsulfato de sodio (Wako Junyaku) 1,0 % en peso
- Reactivo de fabricación: trietanolamina 10 mM

35 En una mezcla de los componentes anteriores, se añadió 7 % en peso de cloruro de amonio para ajustar el pH a pH 10 y se añadió agua purificada hasta el volumen total de 1 litro, que se almacenó en un recipiente de uso general.

(2) El segundo reactivo (como solución de reactivo de coloración)

- Reactivo quelante: F28 tetrafenilporfirina: 0,5 g/l
- Disolvente orgánico: Dimetilsulfóxido (DMSO): 20 % en peso
- Estabilizante (agente dispersante: tensioactivo aniónico sólo): dodecilsulfato de sodio (Wako Junyaku) 1,0 % en peso
- Reactivo de enmascaramiento: trietanolamina 10 mM

En una mezcla de los componentes anteriores, se añadieron 0,05 M de MOPS (tampón) para ajustar el pH a pH 7,0.

A continuación, el volumen total se aumentó a 1 litro con agua purificada y la solución resultante se almacenó en un recipiente de almacenamiento de uso general.

Ejemplo 7

5 En el ejemplo 7, la composición contiene tanto tensioactivo aniónico como tensioactivo no iónico como estabilizante en la composición de reactivo de litio.

10 (1) El primer reactivo (como solución de tampón):

- Reactivo quelante: ninguno
- Disolvente orgánico: ninguno
- Estabilizante (dispersante: tensioactivo no iónico y tensioactivo aniónico):
  - (a) tensioactivo no iónico: TritonX-100® (polioxietilen octilfenil éter) 1,0 % en peso
  - (b) tensioactivo aniónico: dodecilsulfato de sodio (Wako Junyaku) 1,0 % en peso
- Reactivo de fabricación: trietanolamina 10 mM

15 En una mezcla de los componentes anteriores, se añadió 7 % en peso de cloruro de amonio para ajustar el pH a pH 10. A continuación, el volumen total se aumentó a 1 litro con agua purificada y la solución resultante se almacenó en un recipiente de almacenamiento de uso general.

(2) El segundo reactivo (como solución de reactivo de coloración)

- Reactivo quelante: F28 tetrafenilporfirina: 0,5 g/l
- Disolvente orgánico: Dimetilsulfóxido (DMSO): 20 % en peso
- Estabilizante (agente dispersante: tensioactivo no iónico y tensioactivo aniónico):
  - (a) tensioactivo no iónico: TritonX-100® (polioxietilen octilfenil éter) 1,0 % en peso
  - (b) tensioactivo aniónico: dodecilsulfato de sodio (Wako Junyaku) 1,0 % en peso
- Reactivo de enmascaramiento: trietanolamina 10 mM

20 En una mezcla de los componentes anteriores, se añadieron 0,05 M de MOPS (tampón) para ajustar el pH a pH 7,0. A continuación, el volumen total se aumentó a 1 litro con agua purificada y la solución resultante se almacenó en un recipiente de almacenamiento de uso general.

25 La concentración de litio en la muestra de suero de control se determinó cuantitativamente por el mismo procedimiento que en el ejemplo 1 usando composiciones de reactivo de litio preparadas en el ejemplo 5, ejemplo 6 y ejemplo 7. Los resultados se resumen en la [tabla 4] de la fig. 10 "Comparación de valores medidos entre diferentes estabilizantes".

30 La fig. 10 revela que los valores medidos coinciden más de 95 % entre un valor medido para el tensioactivo no iónico solo (0,82 mM), un valor medido para tensioactivo aniónico solo (0,82 mM) y un valor medido para dos tensioactivos (0,83 mM).

35 Este resultado muestra que se pueden obtener casi los mismos valores de medición independientemente del tipo de tensioactivo usado o de su combinación. Por lo tanto, los tensioactivos se pueden usar en combinación para una muestra en la que preocupa la suspensión o la turbidez.

Ahora, se explica la selección del reactivo de enmascaramiento para la composición de reactivo de litio. En los ejemplos antes mencionados, se usó trietanolamina como reactivo de enmascaramiento para la composición de reactivo de litio, pero también se puede usar ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).

40 El ejemplo 5 muestra un caso de una composición de reactivo de litio que contiene trietanolamina como reactivo de enmascaramiento, el ejemplo 8 muestra un caso de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) solo y el ejemplo 9 muestra un caso que contiene ambos reactivos de enmascaramiento.

Ejemplo 8

45 En el ejemplo 8, se usó ácido etilendiaminotetraacético de potasio (EDTA, 2K) solo como reactivo de enmascaramiento.

(1) El primer reactivo (como solución de tampón):

- Reactivo quelante: ninguno
- Disolvente orgánico: ninguno
- Estabilizante (dispersante: tensioactivo no iónico): TritonX-100®  
(polioxietilen octilfenil éter) 1,0 % en peso
- Reactivo de fabricación: ácido etilendiaminotetraacético (EDTA 2K)  
(Dojin Chemical) 10 mM

En una mezcla de los componentes anteriores, se añadió 7 % en peso de cloruro de amonio para ajustar el pH a pH 10 y se añadió agua purificada hasta el volumen total de 1 litro, que se almacenó en un recipiente de uso general.

5

(2) El segundo reactivo (como solución de reactivo de coloración)

- Reactivo quelante: F28 tetrafenilporfirina: 0,5 g/l
- Disolvente orgánico: Dimetilsulfóxido (DMSO): 20 % en peso
- Estabilizante: TritonX-100®  
(polioxietilen octilfenil éter): 1,0 % en peso
- Reactivo de enmascaramiento: ácido etilendiaminotetraacético (EDTA 2K)  
(Dojin Chemical): 10 mM

En una mezcla de los componentes anteriores, se añadieron 0,05 M de MOPS (tampón) para ajustar el pH a pH 7,0. A continuación, el volumen total se aumentó a 1 litro con agua purificada y la solución resultante se almacenó en un recipiente de almacenamiento de uso general.

10

#### Ejemplo 9

En el ejemplo 9, tanto la trietanolamina como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA 2K) se usan en combinación como un reactivo de enmascaramiento.

(1) El primer reactivo (como solución de tampón):

- Reactivo quelante: ninguno
- Disolvente orgánico: ninguno
- Estabilizante (dispersante: tensioactivo no iónico): TritonX-100®  
(polioxietilen octilfenil éter): 1,0 % en peso
- Reactivo de fabricación: trietanolamina 10 mM

20

En una mezcla de los componentes anteriores, se añadió 7 % en peso de cloruro de amonio para ajustar el pH a pH 10 y se añadió agua purificada hasta el volumen total de 1 litro, que se almacenó en un recipiente de uso general.

(2) El segundo reactivo (como solución de reactivo de coloración)

25

- Reactivo quelante: F28 tetrafenilporfirina: 0,5 g/l
- Disolvente orgánico: Dimetilsulfóxido (DMSO): 20 % en peso
- Estabilizante: TritonX-100® (polioxietilen octilfenil éter) 1,0 % en peso
- Reactivo de enmascaramiento: trietanolamina: 10 mM  
ácido etilendiaminotetraacético (EDTA 2K) (Dojin Chemical): 0,1 mM

En una mezcla de los componentes anteriores, se añadieron 0,05 M de MOPS (tampón) para ajustar el pH a pH 7,0. A continuación, el volumen total se aumentó a 1 litro con agua purificada y la solución resultante se almacenó en un recipiente de almacenamiento de uso general.

30

La concentración de litio en la muestra de suero de control se determinó cuantitativamente por el mismo procedimiento que en el ejemplo 1 usando composiciones de reactivo de litio preparadas en el ejemplo 8 y ejemplo 9. Los resultados se resumen en la [tabla 5] de la fig. 11 "Comparación de valores medidos entre diferentes agentes de enmascaramiento".

La fig. 11 revela que los valores medidos coinciden en más del 95 % entre un valor medido para la trietanolamina sola (0,83 mM), un valor medido para el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) solo (0,83 mM) y un valor medido para su uso combinado (0,82 mM).

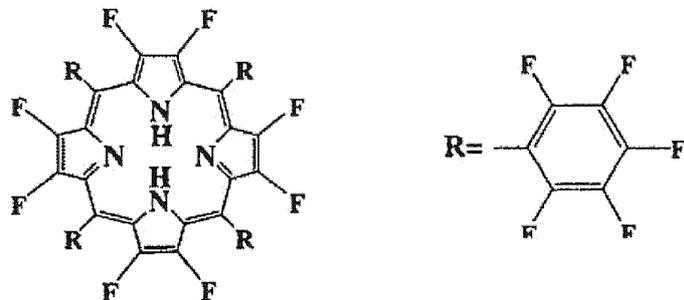
5 Este resultado muestra que pueden obtenerse casi los mismos valores de medición independientemente del tipo de agente de enmascaramiento usado o de su combinación. Por lo tanto, puede usarse agente (s) de enmascaramiento adecuado (s) para prevenir la degradación del reactivo provocado por los iones metálicos traza que pueden estar contenidos en un reactivo almacenado. El agente de enmascaramiento puede usarse para una muestra de prueba  
10 que contiene iones de inclusión en exceso.

Como se ha explicado en los ejemplos anteriores de acuerdo con la presente invención, la concentración de litio en solución acuosa tal como muestra ambiental y muestra biológica se puede determinar mediante el colorímetro conveniente y se puede juzgar inmediatamente por observación visual.

15 Un alcance de la presente invención no se debe limitar a los ejemplos, sino que está definido por las reivindicaciones. Los detalles de los ejemplos se pueden cambiar, alterar y modificar a condición de que la característica de la presente invención no se vea afectada. Por ejemplo, en los ejemplos 1-9, la composición de reactivo para determinar la concentración de litio se divide en dos reactivos del primer y segundo reactivo por separado para almacenar la composición de reactivo durante un plazo más largo. Sin embargo, si la medición se  
20 lleva a cabo dentro de un período corto, el primer reactivo y el segundo reactivo se pueden mezclar desde el principio y la mezcla resultante se usa en la medición.

## REIVINDICACIONES

1. Uso de una composición acuosa de reactivo de litio para medir la cantidad de litio, caracterizado por comprender un compuesto que tiene una estructura representada por la fórmula (I):



10 en la que todos los hidrógenos unidos a carbonos de una tetrafenilporfirina están reemplazados por átomos de flúor (F28 tetrafenilporfirina), un disolvente orgánico miscible en agua elegido de dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF) y dimetilacetamida (DMA), y un modificador de pH para ajustar el pH a un intervalo de pH 5 a pH 12, para medir una coloración del complejo de litio resultante en una longitud de onda que varía desde 530 nm a 560 nm, preferentemente a 550 nm.

15 2. Uso de la composición acuosa de reactivo de litio de la reivindicación 1, en el que dicho modificador de pH se selecciona de ácidos incluyendo ácido clorhídrico, ácido nítrico, ácido acético, ácido fosfórico, ácido cítrico, ácido carbónico, ácido bicarbónico, ácido oxálico y sus sales, medicamento alcalino incluyendo hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, amoníaco y sus sales.

20 3. Uso de la composición acuosa de reactivo de litio de la reivindicación 1, en el que dicho modificador de pH es un tampón de pH seleccionado de ácido cítrico, ácido carbónico, ácido bicarbónico, ácido fosfórico, ácido succínico, ácido ftálico, cloruro de amonio, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, MES como tampón de Good, Bis-Tris, ADA, PIPES, ACES, MOPSO, BES, MOPS, TES, HEPES, DIPSO, TAPSO, POPSO, HEPPSO, EPPS, Tricina, Bicina, TAPS, CHES, CAPSO, CAPS y sus sales.

25 4. Uso de la composición acuosa de reactivo de litio de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la composición de reactivo desarrolla una reacción de color para litio en un intervalo desde pH 5 a pH 11, preferentemente en un intervalo desde pH 8 a pH 11.

30 5. Uso de la composición acuosa de reactivo de litio de la reivindicación 1, que incluye un estabilizante.

6. Uso de la composición acuosa de reactivo de litio de la reivindicación 5, en el que dicho estabilizante es un tensioactivo no iónico y/o un tensioactivo aniónico.

35 7. Uso de la composición acuosa de reactivo de litio para litio de acuerdo con la reivindicación 6, en el que dicho tensioactivo no iónico se selecciona de ésteres de ácido graso de sorbitano, ésteres parciales de ácido graso de pentaeritritol, ésteres de ácido graso de propilenglicol, monoéster de ácido graso de glicerina, polioxietilén alquil éter, polioxietilén alquil fenil éter, polioxietileno polioxipropilenglicol, ésteres parciales de ácido graso de polioxietileno, ésteres parciales de ácido graso de polioxietilén sorbitol, ésteres de ácido graso de polioxietileno, dietanolamida de ácido graso, monoetanolamida de ácido graso, amida de ácido graso de polioxietileno, polioxietilén octilfenil éter, p-nonil fenoxipoliglicidol y sus sales y dicho tensioactivo aniónico es una sal de éster alquilsulfato que incluye dodecilsulfato de sodio, sal de sulfato de polioxietilén alquil éter que incluye sulfato de sodio de polioxietilén alquil fenil éter, sales de alquilbencenosulfonato incluyendo dodecilbencenosulfonato de sodio y alcanosulfonato.

40

45 8. Uso de la composición acuosa de reactivo de litio para litio de acuerdo con la reivindicación 1, que incluye un reactivo de enmascaramiento.

9. Uso de la composición acuosa de reactivo de litio para litio de acuerdo con la reivindicación 8, en el que dicho reactivo de enmascaramiento se elige de trietanolamina, etilendiamina, N,N,N',N'-tetraquis-2-(piridilmetil)etilendiamina (TPEN), piridina, 2,2-bipiridina, propilendiamina, dietilentriamina, dietilentriamino-N,N,N',N'',N''-pentaacetato (DTPA), trietilentetramina, trietilentetramino-N,N,N',N'',N'',N''-hexaacetato (TTHA), 1,10-fenantrolina, etilendiaminotetraacetato (EDTA), O,O'-bis(2-aminofenil)etilenglicol-N,N,N',N'-tetraacetato (BAPTA), N,N-bis(2-hidroxietil)glicina (Bicina), trans-1,2-diaminociclohexano-N,N,N',N'-tetraacetato (CyDTA), O,O'-bis(2-aminoetil)etilenglicol-N,N',N'-tetraacetato (EGTA), N-(2-hidroxil)iminodiacetato (HIDA), ácido iminodiacético (IDA) ácido nitrilotriacético (NTA), trimetilfosfonato de nitrilo (NTPO) y sus sales.

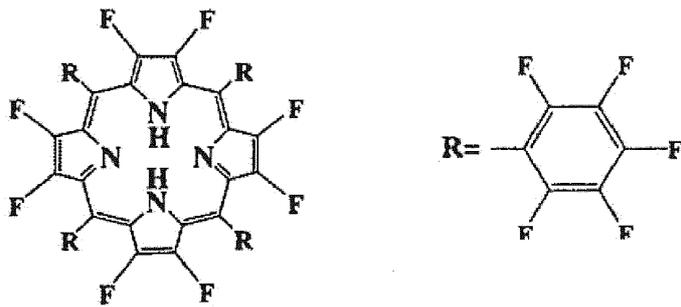
50

10. Uso de la composición acuosa de reactivo de litio para litio de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la concentración de dicha F28 tetrafenilporfirina en la composición de reactivo de litio varía desde 0,1 a 1,0 g/l, y es preferentemente 0,5 g/l.

5 11. Un kit de reactivo de litio para formar una composición acuosa de reactivo de litio como se define en una cualquiera de las reivindicaciones precedentes 5 a 10, que comprende:

un primer reactivo que comprende el estabilizante y el modificador de pH, y

10 un segundo reactivo que incluye el compuesto que tiene la estructura representada por la fórmula (I):



(I)

15 en la que todos los hidrógenos unidos a carbonos de una tetrafenilporfirina están reemplazados por átomos de flúor (F28 tetrafenilporfirina) como se define en la reivindicación 1, el disolvente orgánico soluble en agua elegido de dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF) y dimetilacetamida (DMA), el estabilizante y el modificador de pH,

20 estando almacenados por separado dichos primer y segundo reactivos y mezclados justo antes de la operación de medición o se almacenan en forma de mezcla, para formar dicha composición acuosa de reactivo de litio que puede desarrollar una reacción de color para litio en un pH que varía desde 5 a 12.

25 12. Un kit de reactivo de litio de acuerdo con la reivindicación 11, en el que la concentración de dicha F28 tetrafenilporfirina en la composición acuosa de reactivo de litio después de la mezcla de dicho primer reactivo y de dicho segundo reactivo varía desde 0,1 a 1,0 g/l y es preferentemente 0,5 g/l.

13. Un método para determinar la cantidad de iones litio en plasma sanguíneo o suero en una muestra de prueba, caracterizado por:

30 poner en contacto la muestra de prueba con una composición acuosa de reactivo de litio obtenida a partir del kit de reactivo de litio de acuerdo con la reivindicación 11 o la reivindicación 12,

35 medir la coloración del complejo de litio resultante por la sensibilidad en el espectro a una longitud de onda que varía desde 530 nm a 560 nm, preferentemente en la proximidad de una longitud de onda de 550 nm o a una longitud de onda que varía desde 565 nm a 650 nm, preferentemente en la proximidad de una longitud de onda de 570 nm, y

calcular la cantidad de litio del espectro resultante.

40 14. Un método de acuerdo con la reivindicación 13, en el que dicha composición acuosa de reactivo de litio se obtiene mezclando dichos primer y segundo reactivos del kit de reactivo de litio justo antes de la operación de medición o dichos primer y segundo reactivos del kit de reactivo de litio se almacenan en forma de mezcla.

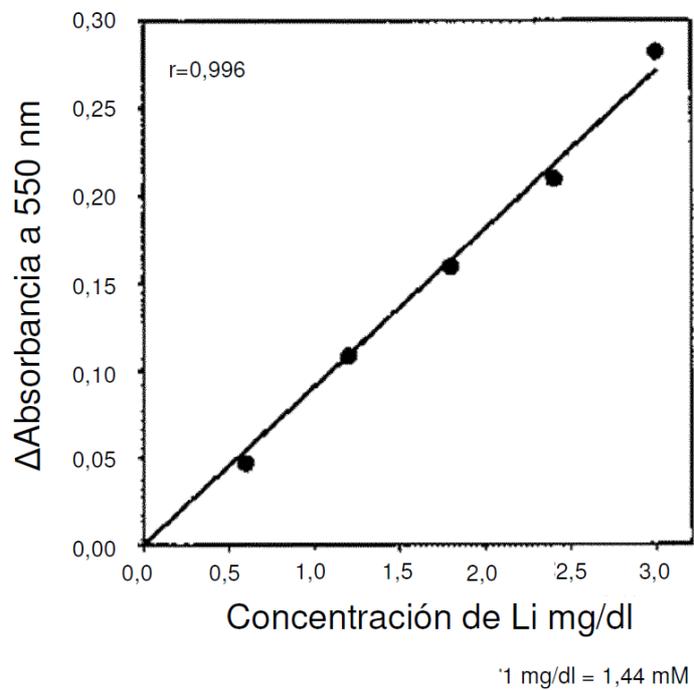
45 15. Un método de acuerdo con la reivindicación 13 o la reivindicación 14, en el que la concentración de dicha F28 tetrafenilporfirina en la composición acuosa de reactivo de litio varía desde 0,1 a 1,0 g/l, y es preferentemente 0,5 g/l.

16. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes 13 a 15, en el que la composición de reactivo desarrolla una reacción de color para litio en un intervalo desde pH 5 a pH 11, preferentemente en un intervalo desde pH 8 a pH 11.

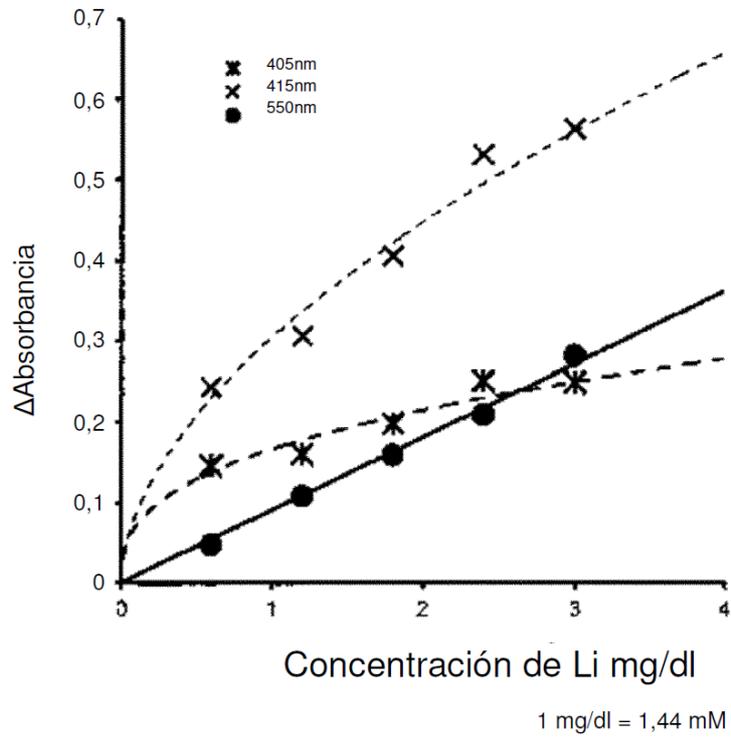
[Fig.1]

muestra de litio 3 mM base		1 vez	5 veces	10 veces
Concentración del reactivo quelante necesaria para la concentración final de Li en la reacción	mM	0,02	0,1	0,2
Concentración del reactivo quelante en la composición de reactivo de litio	mM g/l	0,08 0,1	0,38 0,4	0,75 0,8

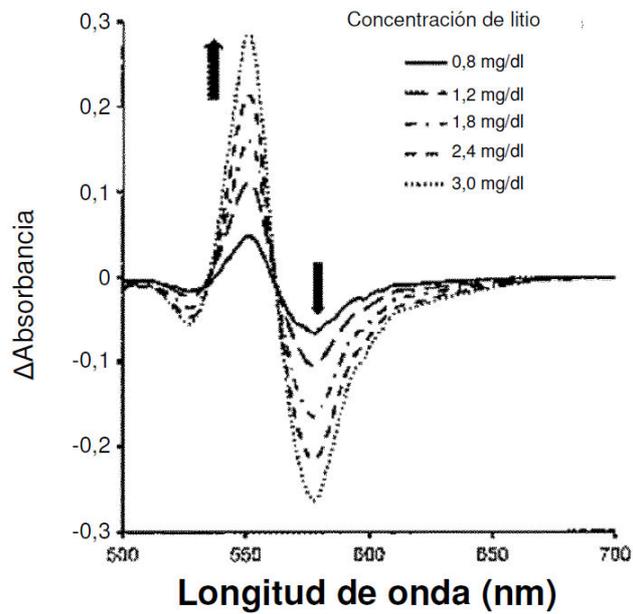
【Fig.2】



【Fig.3】

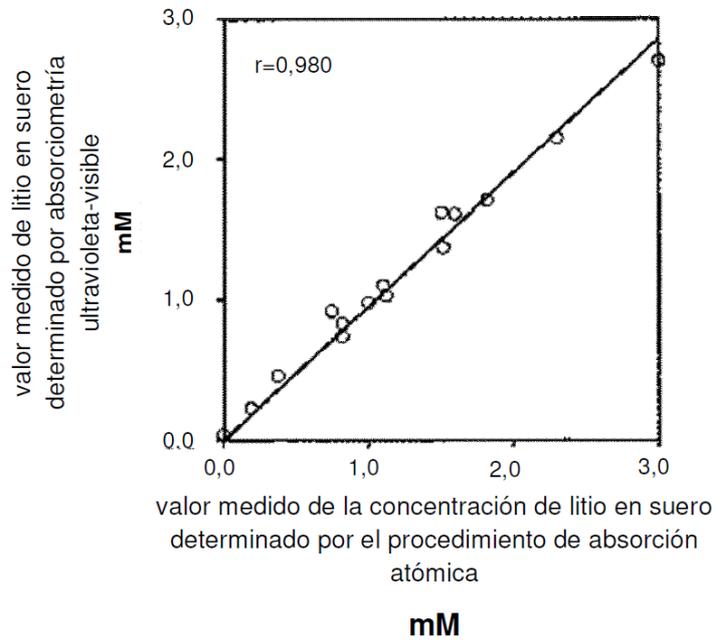


【Fig.4】



Cambio en el espectro de formación del complejo F28 tetrafenilporfirina

【Fig.5】



[Fig.6]

Tabla 1  
Comparación con valores medidos obtenidos por análisis automático para la muestra de suero de control

Suero de control	Unidad: mM Valor garantizado	Valor medido obtenido por la presente invención
Precinorm U	0,82	0,83
Precipath U	2,30	2,20
Pathonorm	1,51	1,50
Autonorm	1,00	0,99

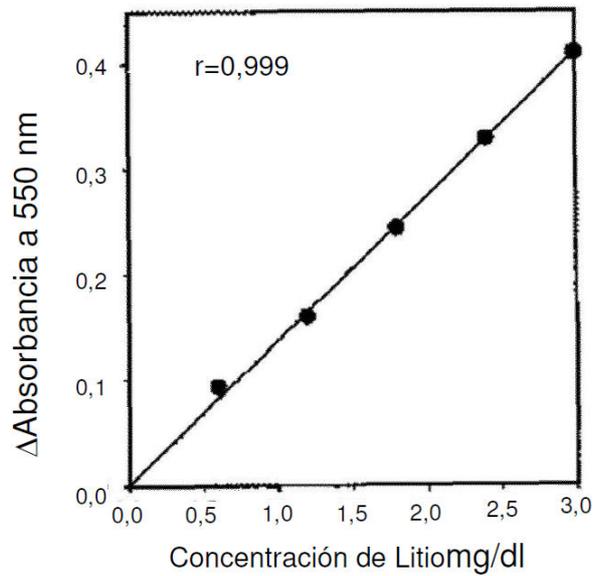
analizador automático: Hitachi clinical analyser H-7700

[Fig.7]

Tabla 2  
Detección de litio a simple vista

Tono de color (muestra estándar)	Color
menos de 1 mM (región normal)	amarillo
1 a 2 mM (región de control)	naranja
más de 2 mM (región anormal)	rojo
Suero de control (muestra)	
Precinorm U (menos de 1 mM)	amarillo
Pathnorm H (1,5 mM/l)	naranja
Precipath U (2 mM/l)	rojo

【Fig.8】



1 mg/dl = 1,44 mM

[Fig.9]

Tabla 3  
Comparación de los valores medidos entre diferentes disolventes orgánicos  
Unidad: mM

	Atómico Absorción Procedimien to	Ejemplo 1 DMSO 20 % en peso	Ejemplo 3 DMF 20 % en peso	Ejemplo 4 DMA 20 % en peso
Muestra de suero	0,82	0,83	0,81	0,81

[Fig.10]

Tabla 4  
Comparación de valores medidos entre diferentes estabilizantes  
Unidad: mM

		Tensioactivo no iónico	tensioactivo aniónico	valor medido
Ejemplo 5	Muestra 1	(+)	(-)	0,82
Ejemplo 6	Muestra 2	(-)	(+)	0,83
Ejemplo 7	Muestra 3	(+)	(+)	0,82

[Fig.11]

Tabla 5  
Comparación de valores medidos entre diferentes agentes de  
enmascaramiento  
Unidad: mM

		Trietanolamina	EDTA 2K	valor medido
Ejemplo 5	Muestra 1	(+)	(-)	0,83
Ejemplo 8	Muestra 2	(-)	(+)	0,83
Ejemplo 9	Muestra 3	(+)	(+)	0,82