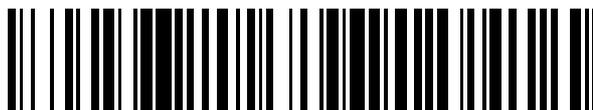


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 670 501**

51 Int. Cl.:

G01N 31/00 (2006.01)

G01N 31/22 (2006.01)

G01N 33/15 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.12.2012 PCT/JP2012/081742**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.05.2014 WO14073119**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.12.2012 E 12887932 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.02.2018 EP 2927683**

54 Título: **Método para estimar la concentración de litio en muestras de biomaterial**

30 Prioridad:

07.11.2012 JP 2012245766

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

30.05.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**SUZUKI, HIROKO;
IWABUCHI, TAKUYA y
ODASHIMA, TSUGIKATSU**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 670 501 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

Método para estimar la concentración de litio en muestras de biomaterial

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a un método para estimar visualmente la concentración de litio en un espécimen de biomaterial tal como muestras de prueba de orina, suero, plasma y sangre y en una solución acuosa tal como muestras ambientales incluyendo agua depurada.

10

Técnicas anteriores

Se sabe que los estabilizantes del humor que contienen litio son eficaces en el tratamiento médico de enfermedad maniaco-depresiva, epilepsia y trastorno bipolar, de modo que se usan ampliamente. Sin embargo, es necesario controlar o limitar la concentración de litio en una muestra de sangre de paciente dentro de un intervalo apropiado limitado cuando se administran a pacientes.

15

En general, se prescribe un comprimido de carbonato de litio (administración oral) como estabilizante del humor junto con otro fármaco terapéutico para trastorno bipolar (psicosis maniaco-depresiva) o antidepresivo. Sin embargo, el carbonato de litio (Li_2CO_3) tiene una característica tal que su efecto administración solo se presenta cuando la concentración de litio en sangre llega casi a un "nivel de envenenamiento por litio". En otras palabras, cuando se administra el fármaco, es indispensable la monitorización farmacoterapéutica (TDM) para monitorizar la concentración de litio en sangre, puesto que un intervalo terapéutico está muy próximo al nivel de veneno.

20

En la práctica, es necesario controlar o limitar la concentración de litio en una muestra de sangre de paciente dentro de un intervalo limitado de desde 0,6 a 1,2 mEq/l. De hecho, cuando la concentración de litio en suero es menor que 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 de litio 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 convulsión. 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 se debe volver a medir la concentración en plasma para tomar una medición necesaria y para aliviar el envenenamiento por litio.

25

30

Por tanto, la sal de litio es un medicamento eficaz en el tratamiento de pacientes que padecen depresión, trastorno bipolar, epilepsia o similares, pero la sobredosis da como resultado problemas graves. Por lo tanto, cuando se administra un fármaco antidepresivo que contiene litio, es indispensable monitorizar la concentración de litio en suero y garantizar que la concentración siempre se mantiene en un intervalo limitado de desde 0,6 a 1,2 mEq/l.

35

Por lo tanto, se pidió determinar la concentración de litio en suero cuantitativamente y se han desarrollado varias composiciones de reactivo líquidas que permiten la determinación colorimétrica de litio para la prueba de laboratorio clínico.

40

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

45

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

50

El documento no patente 1 divulga que se puede detectar el ion litio por un compuesto en el que todos los hidrógenos unidos a carbonos de tetrafenilporfirina se reemplazan por flúor.

Documentos de la técnica anterior

55

Documento patente 1: JP-A1-07-113807

Documento patente 2: EP 1283986 (B1)

Documento patente 3: Patente japonesa n.º 5100903

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

Problema a resolver por la invención

Las composiciones de reactivo de litio conocidas, sin embargo, tienen los deméritos o problemas de que son composiciones venenosas, que las sustancias farmacéuticas son caras 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, de modo que la reacción de coloración es muy lenta.

El documento patente 2 se desarrolló para resolver los problemas anteriores y permite el uso de la técnica de desarrollo de color. Sin embargo, el método del documento no patente 2 requiere una operación de dilución de un espécimen puesto que la sensibilidad es demasiado alta y la especificación de la composición de reactivo de litio requiere un intervalo de más de pH 11, de modo que se deteriora fácilmente con CO₂ en el aire y, por tanto, los datos medidos no son estables. Todavía más, no hay disponible ninguna solución acuosa concentrada distinta de las soluciones acuosas de hidróxido de sodio y de hidróxido de potasio para un intervalo de más de pH 11 en usos prácticos, de modo 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. Se requieren recipientes especiales para su almacenamiento y se requiere un equipo o instalación especial a mayor escala en su manipulación. Por lo tanto, esta tecnología es difícil de aplicar para la monitorización *in situ* y POCT (análisis de diagnóstico inmediato).

La composición de reactivo usada para la medición de litio cuantitativamente divulgada en el documento patente 1 es completamente diferente de la presente invención y se puede usar solo a pH 12. Como se establece anteriormente, en un intervalo de más de pH 11, no hay ninguna solución acuosa concentrada práctica distinta de las de hidróxido de sodio y de hidróxido de potasio, que sean sustancias peligrosas que son difíciles de manipular y se requiere un equipo o instalación especial a 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 tetrafenilporfirina F28. Sin embargo, es necesaria la extracción con cloroformo venenoso oleoso para realizar la separación y detección del ion litio. De hecho, fue imposible la determinación directa de litio en solución acuosa sin un pretratamiento complicado. Por tanto, existía el problema de que fue imposible una medición rápida y cuantitativa del ion litio en suero. De hecho, la detección del ion litio en soluciones acuosas usando tetrafenilporfirina F28 no es fácil, de modo que la medición cuantitativa del ion litio con este compuesto no se ha realizado hasta ahora.

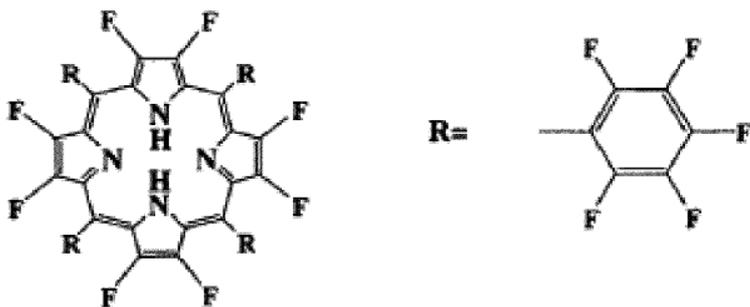
Los reactivos de litio convencionales requieren un instrumento de medición de gran tamaño que tenga una fuente de alimentación tal como una máquina de análisis automático bioquímico. Para superar dicho requisito, los autores de la presente invención desarrollaron un técnico divulgado en el documento patente 3. En el documento patente 3, la composición de reactivo de litio reivindicada permite medir la concentración de litio (cuantitativamente) en soluciones acuosas tales como espécimen de biomaterial y muestras ambientales por un instrumento pequeño tal como un colorímetro o por detección visual a una temperatura habitual y a una presión normal.

Este método de medición del documento patente 3 se basa en la detección de la diferencia en el nivel de concentración por el grado de concentración en el mismo tono de color. Por ejemplo, se compara una diferencia de concentración en el color rojo y el color bermellón, por ejemplo. Por lo tanto, existe el problema de que no se puede llevar a cabo de forma evidente la detección de litio en un intervalo más amplio o significativo, de modo que es difícil usar el método de medición del documento patente 3 para pacientes en los que se sospecha de intoxicación por litio tales como pacientes trasladados a urgencias en inspecciones de urgencia. De hecho, el método de medición del documento patente 3 es difícil de aplicar o usar en un estudio rápido sin instrumental.

La presente invención se realizó en vista del problema mencionado anteriormente y proporciona un método que puede inspeccionar la concentración de litio de una solución acuosa de especímenes de biomaterial tales como orina, suero, plasma y de muestras ambientales, por observación visual y usando la composición de reactivo de litio como reactivo de reacción colorimétrica. En particular, la presente invención proporciona un método para estimar el litio de forma evidente, simple y rápida en la inspección de urgencia en centros médicos.

Medios para resolver los problemas

Para resolver los problemas, la invención de la reivindicación 1 se refiere a un método para estimar la concentración de litio en una muestra de biomaterial, caracterizado por poner en contacto un espécimen con una solución acuosa de una composición de reactivo de litio que comprende un compuesto representado por la siguiente fórmula estructural en la que todos los hidrógenos unidos a carbonos de una tetrafenilporfirina se reemplazan por flúor:



un regulador de pH y un tampón de pH, por irradiar la solución resultante con luz blanca y por detectar un cambio en el tono de color por una observación visual.

5

En el método de estimación de litio de acuerdo con la presente invención, se usa la composición de reactivo de litio en forma de una solución acuosa que incluye el compuesto representado por la fórmula estructural mencionada anteriormente en la que todos los hidrógenos unidos a carbonos de una tetrafenilporfirina se reemplazan por flúor usado como agente quelante, un disolvente orgánico miscible en agua y un regulador de pH. Esta solución acuosa se pone en contacto con un espécimen o una sustancia de prueba tal como un espécimen biológico de origen sanguíneo incluyendo suero y plasma, orina y extracto celular o muestra ambiental para producir un complejo quelato de coloración con iones de litio en la sustancia de prueba, de modo que se desarrolla un cambio en el color de un color amarillo a un color rojo. El color desarrollado depende de la concentración de litio. De acuerdo con el principio de la presente invención, a continuación se irradia la solución resultante con una cantidad predeterminada de luz blanca para producir una variación de enantiotropía fotoquímica del ligando del quelato sin reaccionar, de modo que se produce coloración de un color verde dependiente de la concentración de litio. Como resultado, se puede observar un cambio de color evidente en un intervalo de la concentración de litio de 0,0 mM a 4,5 mM en la sustancia de prueba y este cambio evidente o brusco en el tono de color se puede detectar fácilmente por observación visual. En el método de acuerdo con la presente invención, la sustancia de prueba es una solución acuosa tal como una muestra de prueba de suero y plasma.

10
15
20

Ventajas de la invención

En el método de acuerdo con la presente invención, un espécimen o sustancia de prueba se pone en contacto con una solución acuosa de la composición de reactivo de litio que incluye el compuesto representado por la fórmula estructural mencionada anteriormente en la que todos los hidrógenos unidos a carbonos de una tetrafenilporfirina se reemplazan por flúor, un regulador de pH y un tampón del valor de pH, y a continuación la solución resultante se irradia con o se expone a luz blanca (o luz monocromática si es reaccionable). Se descubrió que se puede observar un cambio de color intenso y brusco de color verde a color rojo a través de color amarillo de la solución resultante en un intervalo de 0,0 mM a 4,5 mM de la concentración de litio en el espécimen. El cambio en el color depende de la concentración de litio. Por tanto, se puede determinar la concentración de litio contenida en la solución acuosa añadida al espécimen por observación visual. De hecho, la concentración de litio en una sustancia de prueba de suero o un espécimen de organismo vivo se puede detectar o estimar rápidamente a simple vista, debido a que el desarrollo de color es intenso y brusco como se menciona anteriormente y debido a que una cantidad de litio en la sustancia de prueba de suero o un espécimen de organismo vivo se puede determinar rápidamente usando un espectrofotómetro pequeño de tipo común. La información resultante se puede usar además como índice de control en la TDM, por ejemplo. El método de medición de litio de acuerdo con la presente invención es aplicable a un análisis cuantitativo de un gran número de sustancias de prueba en un analizador automatizado de bioquímica clínica en un tiempo corto.

25
30
35
40

El método de acuerdo con la presente invención permite detectar o medir la concentración de litio por observación visual a través de un cambio en el tono de color, usando la composición de reactivo de litio como reactivo de reacción colorimétrica y poniéndola en contacto con una solución acuosa de espécimen de materia viva tal como orina, suero, plasma y sangre o de una muestra ambiental, en oposición a las técnicas convencionales para medir la concentración de litio en las que se necesitaba una máquina de uso particular de gran tamaño.

45

En particular, al usar la presente invención, la concentración de litio en el caso de la inspección de urgencia en un centro médico se puede estimar rápidamente de inmediato después de que se extraiga suero como espécimen.

50 **Breve explicación de los dibujos**

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

55 [Figura 2] Un gráfico de espectrofotómetro de luz ultravioleta-visible obtenido en el resultado del ejemplo 1 de

acuerdo con la presente invención.

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

5 [Figura 4] Un gráfico que muestra los cambios en el espectro (reacción colorimétrica) cuando se forma el complejo tetrafenilporfirina F28-litio en el ejemplo 1 de acuerdo con la presente invención.

10 [Figura 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).

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

[Figura 7] [Tabla 2] que muestra una influencia sobre los valores medidos provocada por la hemoglobina hemolítica por la corrección de la longitud de onda secundaria de acuerdo con la presente invención.

20 [Figura 8] [Tabla 3] que muestra la evaluación de la concentración de litio por observación visual en la técnica anterior.

[Figura 9] [Tabla 4] que muestra la evaluación de la concentración de litio por observación visual de acuerdo con la presente invención.

25 [Figura 10] Un dibujo ilustrativo de una unidad para irradiar una sustancia de prueba con luz blanca de acuerdo con la presente invención.

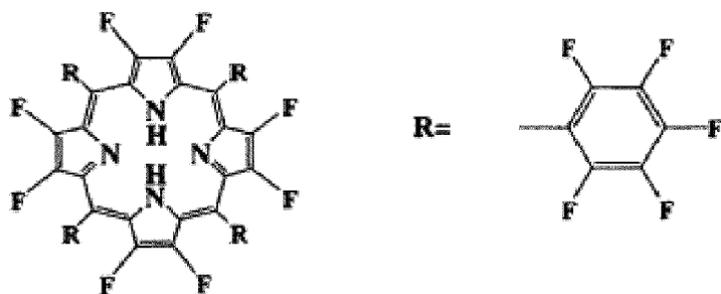
[Figura 11] Un gráfico que muestra una influencia de la irradiación sobre la duración temporal requerida para finalizar la reacción de tautomerización fotoquímica de acuerdo con la presente invención.

30 [Figura 12] Un gráfico del espectro de absorción de electrones de un tautómero fotoquímico originado a partir de tetrafenilporfirina F28.

35 [Figura 13] Un gráfico del espectro de absorción de electrones después de que se irradiara el complejo de tetrafenilporfirina F28.

Modo de llevar a cabo la invención

40 Los inventores estudiaron composiciones de reactivo de litio que se pueden usar para estimar una concentración de litio en suero y plasma sanguíneo de forma cuantitativa y más simple y se centraron en un compuesto representado por la siguiente fórmula general:



45 en la que todos los átomos de hidrógeno unidos a carbonos de un anillo de tetrafenilporfirina se reemplazan por átomos de flúor (el compuesto anterior se denomina en el presente documento "tetrafenilporfirina F28") teniendo el número total de flúor de 28, entre el compuesto macrocíclico divulgado en el documento no patente 1, y descubrieron la composición de reactivo de litio usada en el método de acuerdo con la presente invención.

50 El documento patente 2 divulga composiciones de reactivo de litio similares que comprenden un compuesto macrocíclico que tiene anillos de pirrol en los que ocho átomos de bromo (Br) están unidos a la posición β del anillo de pirrol, para proporcionar un reactivo analítico que puede reaccionar con iones de litio. Sin embargo, es difícil que este compuesto reaccione con litio si el pH no está en la zona alcalina por encima de pH 11. En el caso de la tetrafenilporfirina F28 divulgada en el documento patente 3, la reacción se produce en un intervalo de pH 5 a pH 12, de modo que la tetrafenilporfirina F28 se usa como reactivo quelante en la presente invención para determinar la

55

cantidad de iones litio en un sistema acuoso.

La presente invención permite estimar de forma visual y evidente. En primer lugar se explica esta composición de reactivo de litio usada en la medición cuantitativa.

5 En la presente invención, la composición de reactivo de litio mencionada anteriormente, en especial el compuesto mencionado anteriormente en el que todos los átomos de hidrógeno unidos a carbonos de un anillo de tetrafenilporfirina se reemplazan por átomos de flúor, que funciona como un agente quelato (agente colorante) produce un complejo de desarrollo de color de litio-quelato con los iones de litio en una solución acuosa tal como un
10 espécimen de biomaterial y en una muestra ambiental, de modo que solo el ligando de quelato sin reaccionar se cambia a un isómero estructural como tautómero fotoquímico cuando se irradia o se expone a luz blanca que tiene una luminancia predeterminada. La solución resultante muestra un color verde cuando la concentración de litio en el espécimen es menor que 0,5 mEq/l (= mol/l), un color amarillo cuando la concentración de litio es superior de 0,5 mEq/l a 1,5 mEq/l, y un rojo color cuando la concentración de litio es mayor que de 1,5 mEq/l a 1,5 mEq/l. Este
15 cambio de coloración corresponde convenientemente a los niveles de valor umbral de la región de control y de la región de envenenamiento, de modo que la concentración de litio se puede evaluar o detectar de forma evidente por observación visual y/o colorimetría.

20 Los inventores también descubrieron que la concentración óptima de la tetrafenilporfirina F28 en la composición de reactivo de litio es de 0,1 a 1,0 g/l, preferentemente de 0,5 g/l para las muestras de prueba usadas en la presente invención para distinguir las concentraciones de litio correspondientes a la región de control y a la región de envenenamiento.

25 En relación con el regulador de pH usado en la presente invención, el compuesto de tetrafenilporfirina F28 que es un agente colorante (agente quelato) de la presente invención no se acopla con los iones de litio en la zona ácida de valor de pH menor que 5,0, y por lo tanto no se produce cambio de color, de modo que la detección cuantitativa de litio es difícil.

30 En un intervalo de entre pH 5 y pH 7, se produce una reacción específica entre el desarrollador de color y el ion de litio pero la velocidad de reacción de coloración es lenta. En un intervalo de entre pH 8 y pH 11, el desarrollador de color reacciona con el ion de litio rápidamente y se puede formar un complejo de coloración estable. En la zona alcalina mayor que pH 11, un tono de color del reactivo quelante y del complejo de coloración formado se vuelve inestable con el tiempo. Esto puede estar 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 tampón de pH que pueda mantener el pH de la
35 composición de reactivo de litio de acuerdo con la presente invención en un intervalo de pH 7 a pH 12, preferentemente de pH 8 a pH 11.

40 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, Tricine, Bicine, TAPS, CHES, CAPSO, CAPS y sus sales.

45 La composición de reactivo de litio de acuerdo con la presente invención presenta la reacción colorimétrica específica para litio en un intervalo de pH 5 a pH 12 incorporando el modificador de pH.

50 Es indispensable que el disolvente (disolvente polar) usado en la presente invención sea un disolvente orgánico que sea compatible con agua. El disolvente puede ser una solución que consiste principalmente en disolvente orgánico o una solución acuosa en 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 eluido, 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, es deseable que la composición de reactivo esté en forma de una solución acuosa.

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

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

65 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 mono-ácido graso de propilenglicol, monoéster de ácido graso de glicerol, éter alquílico de polioxietileno, éter alquilfenílico de

polioxietileno, polioxietileno-polioxipropilenglicol, éster parcial de ácido graso de polioxietileno, éster parcial de ácido graso de polioxietilensorbitol, éster de ácido graso de polioxietileno, dietanolamida de ácido graso, etanolamida de ácido graso, amida de ácido graso de polioxietileno, éter octilfenílico de polioxietileno (Triton X-100®), p-nonilfenoxipoliglicidol o sus sales. Los tensioactivos no iónicos preferentes son éter octilfenílico de polioxietileno (Triton X-100®) y p-nonilfenoxipoliglicidol.

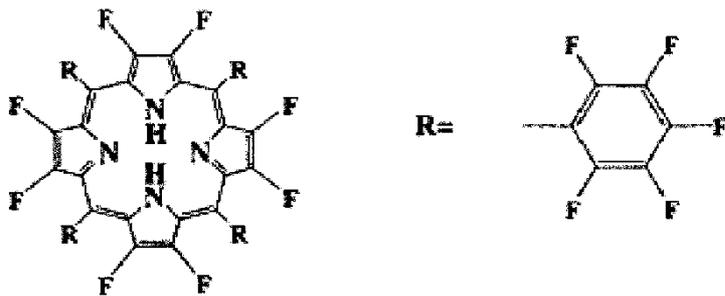
El tensioactivo aniónico como estabilizante puede ser una sal de éster de alquilsulfato, sal sulfato de éter polioxietilenoalquílico, sal sulfato de éter polioxietilenoalquílico, alquilbencenosulfonato y alcanosulfonato. El tensioactivo aniónico típico se selecciona de dodecilsulfato de sodio, dodecilbencenosulfonato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

La composición de reactivo de litio 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 en 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 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 dimetilentriamin-N,N,N',N'',N'''-pentaacético (DTPA), trimetilentetramina, ácido trimetilentetramin-N,N,N',N'',N'''-hexaacético (TTHA), 1,10-fenantrolina, ácido etilendiamintetraacético (EDTA), ácido O,O'-bis(2-aminofenil)etilenglicol-N,N',N'-tetraacético (BAPTA), N,N-bis(2-hidroxi)etilglicina (Bicine), ácido trans-1,2-diaminociclohexan-N,N,N',N'-tetraacético (CyDTA), ácido O,O'-bis(2-aminoetil)etilenglicol-N,N',N',N'-tetraacético (EGTA), ácido N-(2-hidroxi)iminodiacético (HIDA), ácido iminodiacético (IDA), ácido nitrilotriacético (NTA), trimetilfosfonato de nitrilo (NTPO) y sus sales. Preferentemente, se usa trietanolamina.

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

Para garantizar un almacenamiento prolongado, la composición de reactivo de litio de acuerdo con la presente invención se puede almacenar por separado en forma de un kit para medir el reactivo de litio que comprende dos reactivos separados que se mezclan justo antes de la medición para realizar la composición de reactivo de litio. De hecho, un primer reactivo comprende el modificador de pH y el estabilizante, mientras que un segundo reactivo comprende el compuesto representado por la siguiente fórmula general:



en la que todos los átomos de hidrógeno unidos a carbonos de un anillo de tetrafenilporfirina se reemplazan por átomos de flúor, el disolvente orgánico miscible en agua, modificador de pH o tampón de pH y el reactivo de enmascaramiento.

La composición de reactivo de litio usada en el método de medición de litio de acuerdo con la presente invención es una solución acuosa que contiene el compuesto representado por la fórmula estructural mencionada anteriormente en la que todos los hidrógenos unidos a carbonos de una tetrafenilporfirina se reemplazan por flúor, como agente quelato, un disolvente orgánico miscible en agua y un regulador de pH. Cuando la solución acuosa se pone en contacto con iones de litio en una muestra de prueba de suero y de plasma, se observa un cambio en el tono de color provocado por un complejo de litio producido. Si la solución acuosa se irradia con una luz que tiene una intensidad predeterminada, se puede observar un color verde intenso provocado por la tetrafenilporfirina F28 que no reaccionó con los iones de litio. Por otra parte, un color rojo desarrollado con el complejo de desarrollo de color entre porfirina F28 e iones de litio permanece sin cambios. Como resultado, se puede observar un cambio de color intenso evidente de color verde a color rojo a través de color amarillo en un intervalo de concentración de litio de 0,0 mM a 4,5 mM. La presente invención se realizó por este hallazgo y se basa en un principio de cambio de color intenso

evidente. En el método de medición de litio de acuerdo con la presente invención, el cambio en el tono de color intenso evidente en un espécimen de una solución acuosa que contiene una muestra de prueba de suero y plasma se puede observar o detectar fácilmente a simple vista.

- 5 De forma alternativa o adicional, se puede medir la absorbancia y el espectro del complejo de litio usando la composición de reactivo de litio sin o con el método de medición de litio por observación visual. O, se puede calcular un valor cuantitativo en un espécimen desconocido a partir de concentraciones de litio conocidas en las muestras estándar. En particular, en la absorbancia y el espectro del complejo de litio, se mide la sensibilidad a una longitud de onda de medición de 560 nm o en su intervalo de longitud de onda cercana de desde 530 nm a 550 nm. O, se mide la sensibilidad a una longitud de onda de medición de 570 nm o en un intervalo de longitud de onda próxima de 565 nm a 650 nm para determinar la concentración de litio.

15 En el método de medición divulgado en la técnica anterior mencionada anteriormente, se pone en contacto una muestra de prueba de suero y plasma con la composición de reactivo de litio y se mide el desarrollo de color resultante del complejo de litio o absorbente o espectro. Se mide la sensibilidad resultante preferentemente a una longitud de onda de 560 nm o un intervalo de longitud de onda cercana de 530 nm a 550 nm en el espectro, o se mide la sensibilidad resultante a una longitud de onda de 570 nm o en un intervalo de longitud de onda próxima de 565 nm a 650 nm para determinar un valor cuantitativo de litio. Aún más, puesto que el cambio en el tono de color de amarillo a rojo es muy brusco, se puede estimar el nivel de concentración por observación visual o a simple vista. En la técnica convencional, se necesitaba una máquina de uso particular de gran tamaño para medir la concentración de litio.

Ahora se describe el ejemplo 1 de la composición de reactivo de litio usada en la presente invención.

25 **Ejemplo comparativo 1**

(Muestra de composición de reactivo de litio 1)

30 En este ejemplo 1, en primer lugar se preparó un primer reactivo como solución de tampón de pH y un segundo reactivo como solución de reactivo de coloración. A continuación, se mezclaron dos reactivos de los primero y segundo reactivos justo antes de la operación de medición para preparar una composición de reactivo de litio de acuerdo con la presente invención. Aunque estos dos reactivos se pueden almacenar en forma de mezcla, 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.

35 Ahora se explica 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.

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

- reactivo quelante: ninguno

45 - disolvente orgánico: ninguno

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

50 - reactivo de enmascaramiento: 10 mM de trietanolamina

55 En una mezcla de los componentes anteriores, se añadió un 7 % en peso de cloruro de amonio para ajustar a pH 10. A continuación, se incrementó el volumen total hasta 1 litro con agua depurada y se almacenó en un recipiente de almacenamiento habitual. Si una proporción de TritonX-100® (éter polioxietilenoctilfenílico) es menor que un 1,0 % en peso, se puede producir 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 un 0,1 a un 5,0 % en peso y es más preferente un 1,0 % en peso.

60 En este ejemplo, el reactivo de enmascaramiento es 10 mM de trietanolamina. Si una cantidad del reactivo de enmascaramiento es escasa, no se obtendrá un efecto de enmascaramiento satisfactorio en dichas muestras que contienen iones extraños en exceso distintos de litio. Por el contrario, el reactivo de enmascaramiento en exceso enmascarará el propio ion de litio, dando como resultado una causa de errores en la medición. Por lo tanto, es preferente un intervalo de 1,0 a 100 mM y es más preferente 10 mM.

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

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

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

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

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

10 - reactivo de enmascaramiento: 10 mM de trietanolamina

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, se incrementó el volumen total hasta 1 litro con agua depurada y se almacenó la solución resultante en un recipiente de almacenamiento habitual.

15 En la medición cuantitativa de litio en suero de la prueba de laboratorio, se pide la precisión de la concentración de litio en un intervalo más amplio de 0,6 mM a 3 mM. En el ejemplo 1, se descubrió que se puede realizar una medición precisa cuando la concentración del compuesto de tetrafenilporfirina F28 se establece en un intervalo de 0,1 a 1,0 g/l, preferentemente de 0,5 g/l, para la concentración de litio mencionada anteriormente. De hecho, en el intervalo de concentración de litio de 0,6 mM a 3 mM, se puede realizar la medición del litio en el intervalo de 0,1 a 20 1,0 g/l, preferentemente de 0,5 g/l en la composición de reactivo final. Si la concentración es menor que el límite anterior, la reacción entre tetrafenilporfirina F28 e ion de litio no avanza suficientemente. Por el contrario, si la concentración excede el límite anterior, se producirá otro problema de incremento en la absorbancia de un blanco del compuesto de tetrafenilporfirina F28. Por lo tanto, se usa preferentemente la concentración de 0,5 g/l.

25 En más detalle, la reacción entre tetrafenilporfirina F28 e ion de litio es una reacción de una proporción 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 de acuerdo con la presente invención en 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 del compuesto de tetrafenilporfirina F28 debe existir a una concentración mayor que 0,02 mM para efectuar la reacción 30 suficientemente (ni demasiado ni muy poco).

En la reacción de formación de complejo (reacción de coloración) entre un reactivo quelante e iones metálicos, es necesario en general usar el reactivo quelante (tetrafenilporfirina F28) en una cantidad de desde moles iguales a 10 veces más moles con respecto a un reactivo o un objeto que se va a someter a prueba (litio). Como se muestra en la 35 figura 1 que muestra las concentraciones óptimas de tetrafenilporfirina F28, se prepara la composición de reactivo de tal manera que la concentración de tetrafenilporfirina F28 durante el tiempo de reacción pasa de moles iguales a 10 veces. 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 40 composición de reactivo y de una cantidad de muestra que se va a someter a prueba dependen del aparato de medición y valores umbrales deseados y varían. Por ejemplo, en el caso de un aparato de medición con una precisión de medición que no es tan alta, se puede incrementar 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. La cantidad en exceso mayor que 45 10 veces no tiene ninguna ventaja porque un incremento en la cantidad del reactivo puede no tener una ventaja significativa en la cinética de la reacción de coloración, sino más bien incrementar un problema de elevación del nivel de blanco.

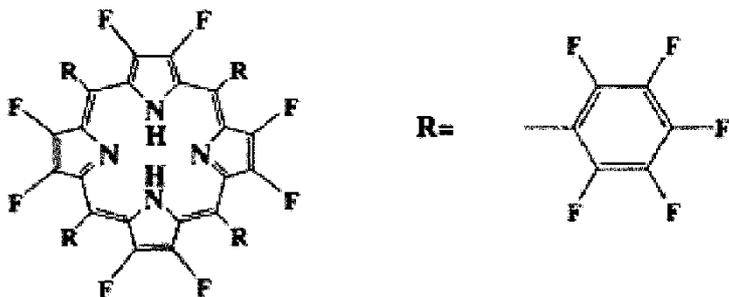
Lo que se necesita es satisfacer la condición de reacción en la proporción molar entre el reactivo quelante y el litio. 50 Por ejemplo, cuando la concentración de reactivo quelante (tetrafenilporfirina F28) en el segundo reactivo es de 1,0 g/l, se puede reducir a la mitad una cantidad del segundo reactivo que se añade a la reacción. O, cuando una cantidad de muestra se reduce a la mitad, se puede reducir a la mitad una cantidad del reactivo quelante.

En el ejemplo 1, la concentración de tetrafenilporfirina F28 es de 0,5 g/l. La concentración óptima de tetrafenilporfirina F28 es de 0,1 a 1,0 g/l que satisface la condición de reacción en moles y disminuye el nivel de 55 blanco al mínimo.

Una cantidad de dimetilsulfóxido (DMSO) es de un 5 a un 30 % en peso. Cuando esta cantidad es más escasa, la dispersión de tetrafenilporfirina F28 en una solución se vuelve mala. Por el contrario, si hay cantidad en exceso de 60 dimetilsulfóxido da como resultado un incremento del disolvente orgánico en la composición de reactivo. Por lo tanto, una cantidad preferente es de un 20 % en peso. Cuando se desea reducir la cantidad de disolvente orgánico, se puede usar una cantidad menor que un 10 % en peso sin ningún problema.

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

65



en la que todos los hidrógenos unidos a carbonos de una tetrafenilporfirina se reemplazan por átomos de flúor.

- 5 (3) Ahora, se explicará cómo se prepara una curva de calibración de la composición de reactivo de litio preparada mezclando el primer reactivo con el segundo reactivo para muestras con concentraciones de litio que son conocidas.

En el ejemplo 1, se añadieron 720 μ l del primer reactivo (solución de tampón) y 240 μ l del segundo reactivo (solución de reactivo de coloración) a 6 μ l de una muestra. En este caso, el primer reactivo tiene una capacidad tamponadora a pH 10. Después de que se mezclen los reactivos primero y segundo y la muestra, la mezcla resultante de un líquido de prueba tiene aproximadamente pH 10.

Por tanto, cuando se usa tetrafenilporfirina F28 de acuerdo con la presente invención como reactivo quelante, se puede llevar a cabo la reacción de desarrollo de color en un intervalo de pH de desde 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 menor que 10, de modo que se puede reducir la fluctuación del pH provocada por la absorción del CO_2 en el aire. Y por lo tanto, se puede evitar un efecto adverso para los valores medidos, y es posible almacenar los 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 μ l de la mezcla líquida a 6 μ l de una muestra.

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 por un espectrofotómetro de luz ultravioleta-visible (HITACHI, tipo U-3900), siendo el blanco la muestra de prueba. La figura 2 muestra el resultado que es una relación entre la absorbancia y la concentración de Li (mg/l). La figura 4 es un gráfico que muestra el cambio en el espectro en un intervalo de luz visible cuando se forma el complejo de tetrafenilporfirina F28-litio.

Para el complejo metálico de tetrafenilporfirina, se obtiene la sensibilidad máxima a un intervalo de longitud de onda de la denominada 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, pero se usa una longitud de onda de 550 nm o en el intervalo próximo de 530 nm a 560 nm, de modo que no son necesarios ni una operación de dilución complicada ni medios de dilución o una instalación auxiliar en la presente invención.

Como se muestra en la figura 3 que es un gráfico que muestra una relación entre la concentración de Li (mg/dl) y la absorbancia (longitud de onda de 380 nm (*), 415 nm (x), 550 nm (•)), se puede obtener una mejor linealidad en la curva de calibración cuando se usa una longitud de onda de 550 nm o en el intervalo próximo de 530 nm a 560 nm en comparación con otros casos cuando se usan las longitudes de onda de la denominada banda de Soret. Por lo tanto, se puede calcular fácilmente la concentración precisa por un colorímetro o espectrofotómetro simple. Aún más, el cambio de color de amarillo a rojo es muy brusco, de modo que se puede detectar fácilmente un nivel de la concentración a simple vista. En la técnica convencional, es necesario un aparato de gran escala para uso exclusivo para medir la concentración de litio, mientras que, en la presente invención, se puede medir fácilmente la concentración de litio por un colorímetro portátil o espectrofotómetro de luz ultravioleta-visible que se usa ampliamente. Se puede construir la presente invención en forma de un kit POCT.

En el gráfico de la figura 3, se añadieron los mismos reactivos del 1^{er} reactivo y 2^o reactivo usados en el ejemplo 1 efectuados a una longitud de onda de 550 nm (•) para el intervalo de banda de Soret de 405 nm (*) y 415 nm (x). Sin embargo, en el caso de la longitud de onda de 405 nm y 415 nm, se diluyó el espécimen a 5 veces debido a que la sensibilidad era demasiado alta. La figura 3 revela un hecho tal que se puede obtener una curva de calibración lineal en el caso de 550 nm de la presente invención, mientras que las curvas de calibración para la longitud de onda de 405 nm y 415 nm no tienen curvas lineales.

La figura 4 muestra cambios en el espectro cuando se forma el complejo de tetrafenilporfirina F28-litio. Se confirma de forma evidente en la figura 4 que la absorbancia se incrementará linealmente con el incremento en 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 el complejo de porfirina-metal y un pico de absorción de 550 nm (mostrado en la figura 4) se incrementan y un pico de absorción de 570 nm (mostrado también en la figura 4) disminuye en proporción a la concentración de litio. Por lo tanto, se puede calcular una diferencia en la 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 fotométrica 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 fotométrica en lugar de la longitud de onda de 550 nm usada en el ejemplo 1. De hecho, puede que algunos equipos de medición no tengan un filtro fotométrico para 550 nm. En dicho caso, se puede seleccionar la longitud de onda de medición fotométrica a partir de un intervalo de longitud de onda en la proximidad tal como de 540 nm o 560 nm donde la sensibilidad también es alta. También se puede usar una longitud de onda de 570 nm como longitud de onda de medición fotométrica, ya que la disminución en la sensibilidad de la absorbancia a 570 nm también es cuantitativa como se muestra en la figura 4. Por lo tanto, también se puede calcular una diferencia en la absorbancia (Δ Abs) a 570 nm con una referencia del reactivo como blanco.

En el raro caso de 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 a 650 nm como la longitud de onda de medición fotométrica para evitar dicho problema y calcular la concentración de litio de una disminución en la sensibilidad como diferencia en la absorbancia.

Ahora, se explicará un método para corregir un error de medición en el método de medición de litio de la presente invención.

Se sabe que se observan dos picos de absorción (banda beta y banda alfa respectivamente) provocados por hemoglobina que es un factor de perturbación aproximadamente a 540 nm y aproximadamente de 560 nm a 650 nm para una sustancia de prueba tal como suero hemolizado. Se descubrió que se produce un error positivo con respecto a un valor medido real cuando se pone en contacto una sustancia de prueba que contiene una concentración alta de hemoglobina con la composición de reactivo de acuerdo con la presente invención, debido a que la absorción a 540 nm que se origina de bandas beta y alfa de hemoglobina se solapa con la absorción a 550 nm que es una longitud de onda de acuerdo con la presente invención.

A saber, se produce el error positivo provocado por la hemoglobina en una sensibilidad medida a 550 nm que es el total de (una sensibilidad del complejo de litio-tetrafenilporfirina F28 a 550 nm) + (una sensibilidad de hemoglobina a 550 nm).

Se destaca un hecho tal que una proporción de dos sensibilidades de hemoglobina a 550 nm y a 600 nm es casi la misma. En otras palabras, la sensibilidad de hemoglobina a 550 nm es igual a una sensibilidad de hemoglobina a 600 nm, de modo que la sensibilidad de hemoglobina a 550 nm se puede anular por la sensibilidad de hemoglobina a 600 nm. Por lo tanto, se puede obtener una sensibilidad correcta a 550 nm por una ecuación de la sensibilidad: La sensibilidad a 550 nm = una sensibilidad del complejo de litio-tetrafenilporfirina F28 a 550 nm + una sensibilidad de hemoglobina a 550 nm - una sensibilidad de hemoglobina a 600 nm.

Ahora, se explicará cómo medir correctamente la concentración de litio con la composición de reactivo de litio de acuerdo con la presente invención a partir de los datos experimentales del ejemplo 1.

Resultados del experimento en espectrofotómetro de luz ultravioleta-visible (modelo HITACHI, U-3900)

La figura 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 de 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 figura 2 revela que se obtiene una buena linealidad de una curva de calibración 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 figura 5 es un gráfico que muestra una correlación de valores medidos entre el método de medición del ejemplo 1 de acuerdo con la presente invención mostrado en la figura 2 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 figura 5 muestra una buena correlación de más de un 95 %. Este resultado

revela que se puede determinar cuantitativamente el litio en una muestra de suero por una absorciometría de luz ultravioleta-visible con la composición de reactivo de acuerdo con la presente invención.

Comparación de valores medidos llevada a cabo por análisis automático para muestras de suero de control

5 Se midió la concentración de litio para las siguientes muestras de suero de control:

- Precinorm U (Roche)

10 - Precipath U (Roche)

- Pathonorm H (SERO AS)

15 - Auto norm (SERO AS)

en las que se valora la concentración de litio usando un analizador automatizado bioquímico (HITACHI, modelo H-7700) a una longitud de onda de medición fotométrica de 546 nm (que es una longitud de onda establecida en este analizador y está cerca de 550 nm) por un método de 1 punto final.

20 Parámetros del dispositivo:

Reactivo:	0,24 ml
Muestra:	0,005 ml
Longitud de onda fotométrica (principal/sec.):	546 nm/700 nm
Tiempo de medición:	10 minutos
Temperatura:	37 °C
1 punto final:	método de incremento

25 Los resultados mostrados en la [tabla 1] de la figura 6 demuestran un hecho tal 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 por un analizador automatizado para pruebas clínicas.

30 Los resultados mostrados en la [tabla 1] de la figura 6 demuestran un hecho tal 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 por un analizador automatizado para pruebas clínicas.

35 En el ejemplo anterior, la composición de reactivo de litio es un tipo de dos componentes en el que un primer reactivo y un segundo reactivo se mezclan antes de su uso. Por otra parte, en un método de medición de litio por un lector de microplacas y en un método de detección de litio por observación visual que se explicará más adelante, se usa una composición de reactivo de litio de tipo envase y se usa una placa de 96 pocillos como recipiente de espécimen. Por lo tanto, los experimentos se llevaron a cabo usando una composición de reactivo de litio de tipo envase que se explicará en el ejemplo 2 (muestra de composición de reactivo de litio 2) preparada en base a la composición del ejemplo 1.

40 Para confirmar que el mismo método que el ejemplo 2 que se explicará más adelante se puede realizar en el ejemplo 1, se llevó a cabo una prueba de detección de litio por observación visual también para la composición de reactivo de litio del ejemplo 1 ajustando una cantidad de muestra de prueba. En este caso, cuando se irradió la muestra de prueba con luz blanca, se observó el siguiente cambio de color dependiendo de la concentración de litio en la muestra de prueba:

Color verde: menor que 0,5 mEq/l (= mol/l)

Color amarillo: de 0,5 mEq/l a 2,5 mEq/l

Color rojo: mayor que 1,5 mEq/l

50 Este cambio de color corresponde convenientemente a los niveles de valor umbral de la región de control y de la región de intoxicación, de modo que se puede detectar de forma evidente el nivel de litio por observación visual o por colorímetro. Los resultados del experimento que usa la composición de reactivo de litio del ejemplo 1 fueron casi los mismos que los obtenidos en el ejemplo 2 y, por lo tanto, los detalles del experimento cuando se usó la composición de reactivo de litio del ejemplo 1 no se describen aquí.

Ejemplo comparativo 2

(Muestra de composición de reactivo de litio 2)

5 Una composición del ejemplo 2 es sustancialmente igual que en el ejemplo 1, pero se usa un fluido de desarrollo de color de tipo envase en el ejemplo 2, mientras que se usa de tipo dos envases en el ejemplo 1, debido al siguiente motivo: cuando se lleva a cabo la detección en una placa de 96 pocillos para lectores de microplacas, se puede simplificar la manipulación a dos operaciones para una muestra y para fluido de desarrollo de color en el caso del tipo envase. Se puede llevar a cabo fácilmente una operación de mezclado complicada en el caso del ejemplo 1 en el que se usa un recipiente de cubeta que tiene una gran capacidad de 1 ml para un espectrofotómetro, pero dicha operación complicada para mezclar el primer reactivo y el segundo reactivo en un pequeño pocillo de la placa de pocillos no es fácil en el caso de un fluido de desarrollo de color de tipo envase. Por lo tanto, se usa un fluido de desarrollo de color de tipo envase en el ejemplo 2 para facilitar la operación. En el ejemplo 2, el tensioactivo y el tampón de pH mencionados anteriormente se eligen para no dar una mala influencia a un material del pocillo que es resina de poliestireno.

20 La figura 7 muestra los resultados de la prueba de interferencia en la hemólisis efectuada por un lector de microplacas (CORONA SH1200) en la [Tabla 2] cuando se adopta un método de corrección de errores para el método determinar la concentración de litio de acuerdo con la presente invención.

(1) Reactivo de coloración (composición de reactivo de litio 2):

Agente quelato:	tetrafenilporfirina F28	0,17 g/l
Disolvente orgánico:	dimetilsulfóxido (DMSO)	5 % en peso
Estabilizante (agente dispersante):	dodecilsulfato de sodio	1 % en peso
	Triton X-100	1 % en peso
Agente de enmascaramiento:	trietanolamina	10 g/l
	tetraacetato de etilendiamina dipotásico	0,5 g/l

25 En una mezcla de los componentes anteriores, se añadieron regulador de pH y un tampón de pH para ajustar a pH 10 y se añadió agua depurada hasta el volumen total de 1 litro. Se almacenó la mezcla resultante en un recipiente de conservación de uso general.

(2) Espécimen de hemólisis

30 Se preparó un espécimen de hemólisis añadiendo una cantidad predeterminada del control de interferencia A+® (Sysmex) como hemoglobina de hemólisis en un suero de base que contenía litio 1,5 mM. Se añadieron 240 µl de reactivo de coloración a 4 µl del espécimen mencionado anteriormente y se hizo reaccionar la mezcla resultante durante 5 minutos.

35 A continuación, se midió una absorbancia del espécimen por un lector de microplacas (CORONA SH-1200) para calcular la concentración de litio en base a la absorbancia de la sustancia estándar a una longitud de onda principal de 550 nm y a una longitud de onda secundaria de 600 nm.

40 Como se explicó anteriormente, en el caso de una sustancia de prueba de hemólisis, la hemoglobina que tiene una absorbancia a 550 nm será una perturbación positiva para un valor medido, si una medición fotométrica se efectúa solo con una longitud de onda de 550 nm. Por lo tanto, se efectuó la medición con dos longitudes de onda de 550 nm y 600 nm de modo que dos valores de absorbancia se compensan entre sí calculando una absorbancia a 550 nm, una absorbancia a 600 nm. La influencia de la hemólisis se puede anular con este método de corrección.

45 Cuando se usa un analizador automatizado, es suficiente introducir, como parámetros, 550 nm como longitud de onda principal y 600 nm como longitud de onda secundaria.

50 La figura 7 muestra en la [Tabla 2] que una diferencia de un valor correcto es solo de un 2 % en un caso corregido (recuperación = 102 %), mientras que la diferencia se incrementa a un 25 % si no se usa el método de corrección (recuperación = 125 %) a una concentración de hemoglobina de 1000 mg/dl. Este resultado revela que la medida de corrección mencionada anteriormente de acuerdo con la presente invención es muy eficaz para determinar la concentración de litio.

[Detección de litio por observación visual]

Ahora, se explicará cómo medir y detectar la concentración de litio por observación visual de acuerdo con la presente invención.

5 La figura 8 muestra, en la [Tabla 3], un resultado de la tasa de respuesta correcta obtenida por una técnica conocida descrita en el documento patente 3 que es otra invención de la presente solicitud. En esta prueba, se observó el desarrollo de color de los fluidos de prueba a simple vista. En la práctica, se usó la muestra de composición de reactivo de litio mencionada anteriormente 2 como reactivo de coloración. Se añadieron 240 μl del reactivo de coloración a 4 μl de espécimen y se efectuó una reacción durante 5 minutos a temperatura ambiente. A 10 continuación, se observó el color desarrollado de los especímenes a simple vista de los observadores y se contó el número de personas que dieron una respuesta correcta. Se comparó cada espécimen que tenía un nivel de concentración predeterminado con muestras estándar que tenían cada una una concentración de litio predeterminada usadas como referencias de tono de color.

15 En esta prueba, se observó un cambio de color de color amarillo a color rojo en los intervalos de concentración medidos y el desarrollo de color del suero de control fue consistente con las referencias de tono de color. Por lo tanto, se entiende que la concentración de litio en un suero se puede estimar rápida y simplemente sin usar un aparato especial.

20 Las tasas de respuesta correcta para un color amarillo de Auto norm 1 mM que es una región de control y para un color rojo de suero modelo 3,5 mM que es una región peligrosa son de un 100 % para 25 personas que realizaron la estimación, debido a un cambio de color evidente de amarillo color a un color rojo. Sin embargo, las tasas de respuesta correcta empeoraron en un 52 % en los casos para Pathonorm H 1,6 mM (región de 25 semienvenamiento) y Precinorm U 2,5 mM (región de envenenamiento).

Los autores de la presente invención estudiaron mejorar el método mencionado anteriormente y llegaron a la presente invención.

30 En un modo de realización de la presente invención, una muestra de prueba (una mezcla de un espécimen y la composición de reactivo) obtenida en la técnica anterior mencionada anteriormente se irradia con o se expone a luz blanca que tiene una luminancia predeterminada, de modo que una porción de tetrafenilporfirina F28 que no reaccionó con iones de litio se cambia a un isómero estructural de tautómero fotoquímico, lo que da como resultado que se desarrolle el siguiente color de acuerdo con la concentración de litio en el espécimen:

35 0,5 mEq/l (= mol/l) o menos color verde,
de 0,5 mEq/l a 1,5 mEq/l color amarillo,
1,5 mEq/l o más color rojo.

Se descubrió que este cambio de color corresponde convenientemente a los niveles umbrales de una región de control y una región de envenenamiento, de modo que el cambio de color es detectable de forma evidente por observación visual o por un colorímetro.

40 La figura 9 muestra, en la [Tabla 4], el resultado de la estimación llevada a cabo para detectar la concentración de litio por observación visual de acuerdo con la presente invención. Los resultados de 25 personas que realizaron la estimación fueron tan buenos que la tasa de respuesta correcta fue de un 100 % para un color verde que muestra la 45 región de control de Auto norm 1 mM y para un color rojo que muestra la región peligrosa del suero modelo 3,5 mM y de un 96 % para la región de semienvenamiento de Pathonorm H 1,6 mM y para la región de envenenamiento de Precinorm U 2,5 mM.

De hecho, el tautómero óptico se genera por la irradiación de luz blanca solo para una porción de tetrafenilporfirina F28 que no reaccionó con litio para mostrar un color verde. Cuando la concentración de litio es de 4,3 mM, un porcentaje de especies químicas sin reaccionar (o tautómero óptico generado) no es tan alto como para que el color rojo de la muestra no cambie y, por lo tanto, se mantiene un color rojo. Si la concentración de litio está dentro de una 50 región intermedia, se observa un color amarillo que es un color neutro entre verde y rojo.

En la detección habitual por observación visual o por un colorímetro, se detecta una diferencia en la densidad para 55 determinar la concentración. En la presente invención, sin embargo, se detecta o se observa un cambio en el propio tono de color (de color verde a color rojo a través de color amarillo y color naranja). Es un caso muy raro que dicho cambio de tono de color sea detectable de forma evidente y altamente eficaz.

Ahora, se explicará el método de detección de acuerdo con la presente invención desde la primera etapa de la 60 preparación de la muestra en detalle.

La figura 10 ilustra un aparato para cambiar solo una porción de tetrafenilporfirina F28 que no reaccionó con litio al isómero estructural como un tautómero fotoquímico irradiando (o exponiendo) un espécimen contenido en un recipiente transparente con luz blanca que tiene una luminancia predeterminada.

5 Se preparó la muestra de composición de reactivo de litio 2 del ejemplo 2 como la misma composición de reactivo que en el ejemplo 1. Se añadió 1 ml de la muestra de composición de reactivo de litio 2 a una muestra en un recipiente transparente o una cubeta para espectrometría en una parte de reacción (1) de la figura 10. Se irradia la cubeta con luz blanca de una fuente de luz LED (2).

10 La figura 11 es un gráfico medido que muestra una relación entre la duración temporal requerida para finalizar la reacción de tautomerización fotoquímica (tiempo de finalización de la reacción) y la iluminancia.

Se midió la intensidad de la fuente de luz LED por un iluminómetro instalado en la proximidad de la cubeta de espectro. Se determinó la terminación (tiempo de finalización de la reacción) de la reacción de fotoisomerización midiendo un espectro de absorción de electrones y observando un desplazamiento del espectro desde un intervalo de banda de longitud de onda de 400 nm a 600 nm (el espectro antes de la reacción) a un intervalo de banda de longitud de onda de 600 nm a 800 nm (el espectro después de la fotoisomerización).

15 La figura 11 muestra los resultados. Se confirmó que la reacción de fotoisomerización finaliza en 40 segundos con una iluminancia de 1430 lx o más, mientras que son necesarios aproximadamente 3 minutos para finalizar la reacción con una iluminancia de 420 lx. La iluminancia en una oficina general, una sala de consulta en el hospital y una sala de inspección es de 750 lx de 300 lx. Por lo tanto, el método de medición de acuerdo con la presente invención se puede llevar a cabo rápidamente bajo una iluminación interior habitual en el centro habitual sin usar una fuente de luz especial.

20 Para obtener una iluminancia mayor que 1430 lx, es suficiente llevar la fuente de luz LED cerca de un espécimen para finalizar la reacción más rápidamente.

30 La figura 11 es un gráfico que muestra una influencia de la iluminancia (lux) que es un índice cuantitativo de la fuente de luz en una duración temporal requerida para finalizar la reacción de tautomerización fotoquímica o una duración temporal requerida para finalizar el cambio de color (fotoisomerización).

35 En la figura 10, la fuente de luz (2) se puede establecer en un ángulo de iluminación opcional (θ) con respecto a una parte de reacción (1) (recipiente transparente). De hecho, no se observa ninguna influencia importante por el ángulo de iluminación (θ), puesto que la luz puede pasar a través del recipiente y una luz transmitida puede alcanzar a un espécimen en este último es transparente, y también porque el cambio mencionado anteriormente para un isómero estructural como tautómero fotoquímico es tan rápido que el tiempo de finalización de la reacción es relativamente corto, de solo 150 segundos bajo una iluminancia de incluso 500 lx, como se muestra en la figura 11.

40 Si el tautómero fotoquímico resultante se deja en un ambiente oscuro, el tautómero vuelve al estado anterior gradualmente después de un cierto período de tiempo.

45 En el aparato de irradiación de la figura 10, se irradia una muestra de prueba, de modo que solo una porción de tetrafenilporfirina F28 que no reaccionó con iones de litio se cambia al isómero estructural como un tautómero fotoquímico. Un color se cambia a verde cuando la concentración de litio en un espécimen es menor que 0,5 mEq/l (= mol/l).

50 La figura 12 es un gráfico del espectro de absorción de electrones de un tautómero fotoquímico originado a partir de tetrafenilporfirina F28. Una línea continua es un espectro de absorción en un intervalo de longitud de onda de luz visible de 400 nm a 800 nm antes de la irradiación, y una línea discontinua es un espectro de absorción en el mismo intervalo de longitud de onda de luz después de la irradiación con luz blanca durante aproximadamente 3 minutos. Este cambio se reconoce como un cambio en el color de color amarillo anaranjado a color verde en la observación visual.

55 La figura 13 es un gráfico ampliado del espectro de absorción de electrones en un intervalo de luz visible de 500 nm a 600 nm después de la irradiación. Una línea discontinua gruesa es un espectro de absorción para la concentración de iones de litio de 0,5 mEq/l (= mol/l) o menos, mientras que una línea de puntos fina es un espectro de absorción para la concentración de iones de litio mayor que 1,5 mEq/l o más que se reconoce como un color rojo en la observación visual.

60 La figura 8 muestra, en la [Tabla 3], un resumen de los resultados de la estimación visual de la concentración de litio para especímenes de suero de control llevada a cabo de acuerdo con el principio de la presente invención. Este resultado revela que la concentración de litio en un espécimen se puede estimar de forma evidente por una detección visual simple y rápida.

65 Las composiciones de reactivo de litio usadas en el ejemplo 1 y el ejemplo 2 se prepararon por el mismo

procedimiento que los descritos en el documento patente 3. En la presente invención, sin embargo, los inventores confirmaron que la concentración de litio en un espécimen se puede medir a simple vista viendo una graduación de color o una diferencia en el tono de color de un espécimen. El mismo resultado que el ejemplo 1 y el ejemplo 2 se obtuvo también en el siguiente ejemplo 3.

5

Ejemplo comparativo 3

(Muestra de composición de reactivo de litio 3)

10 (1) Primer reactivo (como estabilizante y solución de tampón)

Agente quelato:	ninguno
Disolvente orgánico:	ninguno
Estabilizante (agente dispersante: tensioactivo no iónico):	
TritonX-100 (®) (éter polioxietilenoetilfenílico)	1,0 % en peso
Agente de enmascaramiento:	trietanolamina 10 mM

15 En una mezcla de los componentes anteriores, se añadió 0,1 M de MOPS para ajustar el pH a pH 8 y se añadió agua depurada hasta el volumen total de 1 litro. Se almacenó la mezcla resultante en un recipiente de conservación de uso general.

(2) Segundo reactivo (como reactivo de desarrollo de color)

Agente quelato:	tetrafenilporfirina F28 0,5 g/l
Disolvente orgánico:	dimetilsulfóxido (DMSO) 20 % en peso
Estabilizante (agente dispersante: tensioactivo no iónico):	
TritonX-100(®) (éter polioxietilenoetilfenílico)	1,0 % en peso
Agente de enmascaramiento:	trietanolamina 10 mM

20 En 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 depurada hasta el volumen total de 1 litro. Se almacenó la mezcla resultante en un recipiente de conservación de uso general.

25 Para una medición de la concentración de litio, de la misma manera que en el ejemplo 1, se añadieron 720 µl del primer reactivo (solución tampón) y 240 µl del segundo reactivo (reactivo de desarrollo de color) a 6 µl de un espécimen y se llevó a cabo una reacción de desarrollo de color durante una duración temporal predeterminada.

30 De la misma manera que en los ejemplos 1 y 2, se añadió la muestra de prueba a la composición de reactivo de litio y a continuación se irradió la mezcla resultante con luz blanca, de modo que una porción de tetrafenilporfirina F28 que no reaccionó con iones de litio se cambió a un isómero estructural de tautómero fotoquímico, dando como resultado que se desarrolló el siguiente color de acuerdo con la concentración de litio en el espécimen:

0,5 mEq/l (= mol/l) o menos color verde,
de 0,5 mEq/l a 1,5 mEq/l color amarillo,
1,5 mEq/l o más color rojo.

35 Este cambio de color corresponde convenientemente a los niveles umbrales de la región de control y la región de envenenamiento, de modo que el cambio de color es detectable de forma evidente por observación visual o por un colorímetro.

40 La composición de reactivo de litio anterior se puede formar en forma de tipo envase, por supuesto, de acuerdo con la misma relación entre el ejemplo 1 y el ejemplo 2

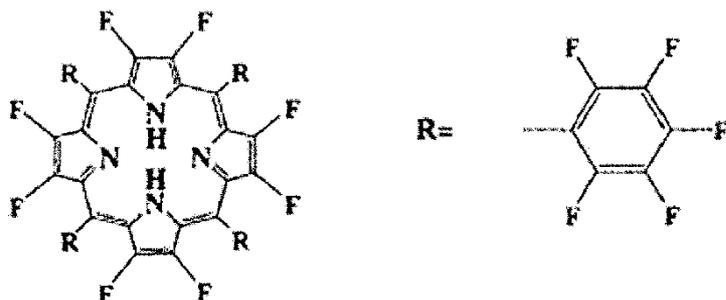
45 Aunque el espécimen de prueba es suero en los ejemplos anteriores, el método de acuerdo con la presente invención es aplicable a otros especímenes tales como muestras vivas incluyendo muestra de prueba de orina, sangre y plasma, y también muestras ambientales incluyendo agua industrial, agua potable y muestras ambientales. De hecho, la concentración de litio en una solución acuosa se puede medir de inmediato por un colorímetro simple y se puede evaluar por observación visual.

REIVINDICACIONES

1. Método para estimar una concentración de litio en un espécimen de biomaterial por observación visual, que comprende:

5 • poner en contacto dicho espécimen con una solución acuosa de una composición de reactivo de litio que comprende:

10 - una concentración conocida de compuesto representado por la siguiente fórmula estructural en la que todos los hidrógenos unidos a carbonos de una tetrafenilporfirina se reemplazan por flúor:



15 - un regulador de pH que permite el desarrollo del color provocado por litio en un intervalo de pH de pH 5 a pH 12, y

- un disolvente orgánico miscible en agua elegido entre dimetilsulfóxido, dimetilformamida y dimetilacetamida,

• irradiar la solución resultante con luz blanca, y

20 • estimar por observación visual la concentración de litio en el espécimen a partir del cambio observado en el tono de color desde un color verde que se muestra cuando no existe un complejo de coloración de litio hasta el color rojo final a través de colores intermedios de un color amarillo y de un color naranja que se muestran de acuerdo con un incremento de una cantidad del complejo de coloración de litio.

25 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que dicho cambio en el tono de color se produce cuando el litio está presente en una concentración menor que o igual a 4,5 mM.

3. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, caracterizado por que dicho espécimen de biomaterial es una muestra de prueba de suero o plasma.

30 4. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el regulador de pH se elige de hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, amoníaco, ácido acético, ácido fosfórico, ácido cítrico, ácido carbónico, ácido bicarbónico, ácido oxálico, ácido clorhídrico, ácido nítrico y sus sales.

35 5. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el regulador de pH es un tampón de pH elegido de ácido cítrico, ácido carbónico, ácido bicarbónico, ácido fosfórico, ácido succínico, ácido ftálico, cloruro de amonio, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, tampones de Good, y sus sales.

40 6. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la composición de reactivo de litio comprende un estabilizante seleccionado de tensioactivos no iónicos y tensioactivos aniónicos.

45 7. Un método de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la composición de reactivo de litio comprende un tensioactivo no iónico elegido de éster de ácido graso de sorbitano, éster parcial de ácido graso de pentaeritritol, éster de mono-ácido graso de propilenglicol, monoéster de ácido graso de glicerol, éter alquílico de polioxietileno, éter alquilfenílico de polioxietileno, polioxietileno-polioxipropilenglicol, éster parcial de ácido graso de polioxietileno, éster parcial de ácido graso de polioxietilensorbitol, éster de ácido graso de polioxietileno, dietanolamida de ácido graso, etanolamida de ácido graso, amida de ácido graso de polioxietileno, éter octilfenílico de polioxietileno, p-nonilfenoxipoliglicidol y sus sales.

50 8. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la composición de reactivo de litio comprende un tensioactivo aniónico elegido de sal de éster de alquilsulfato, sal sulfato de éter polioxietilenoalquílico, sal sulfato de éter polioxietilenoalquilfenílico, alquilbencenosulfonato y alcanosulfonato.

55 9. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la composición de reactivo de litio comprende un reactivo de enmascaramiento seleccionado de trietanolamina, etilendiamina, N,N,N',N'-tetraquis(2-piridilmetil)etilendiamina (TPEN), piridina, 2,2-bipiridina, propilendiamina, dimetilentriamina,

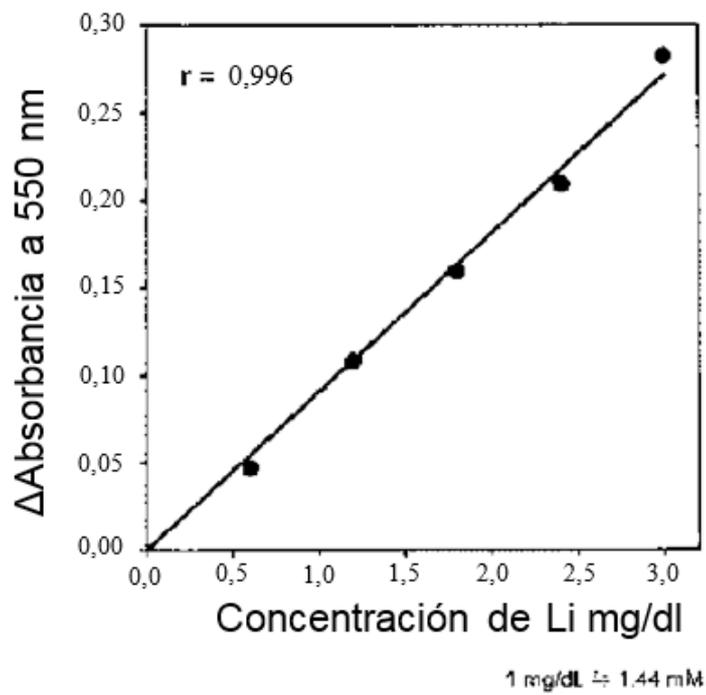
5 ácido dimetilentriamin-N,N,N',N'',N'''-pentaacético (DTPA), trimetilentetramina, ácido trimetilentetramin-N,N,N',N'',N'''-hexaacético (TTHA), 1,10-fenantrolina, ácido etilendiamintetraacético (EDTA), ácido O,O'-bis(2-aminofenil)etilenglicol-N,N',N'-tetraacético (BAPTA), N,N-bis(2-hidroxietil)glicina (Bicine), ácido trans-1,2-diaminociclohexan-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.

10. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que se irradia la solución resultante con luz blanca de una fuente de luz LED.

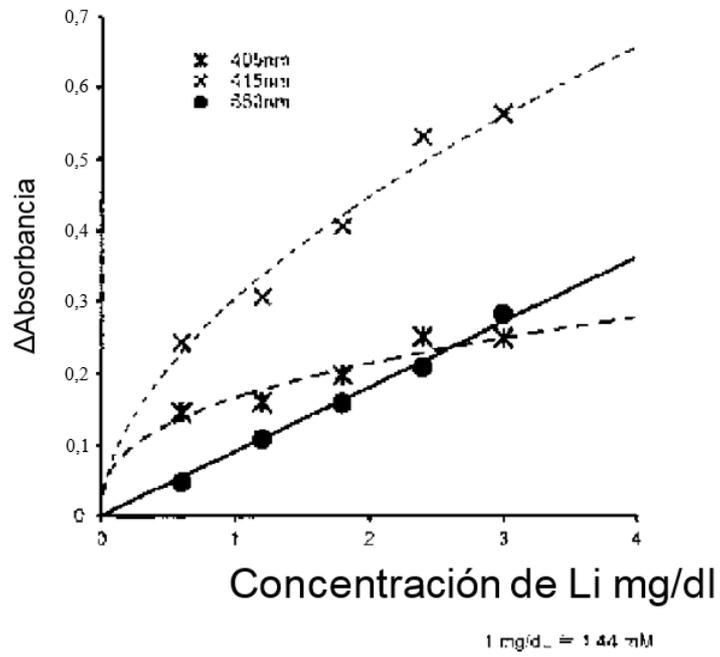
[Fig. 1]

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

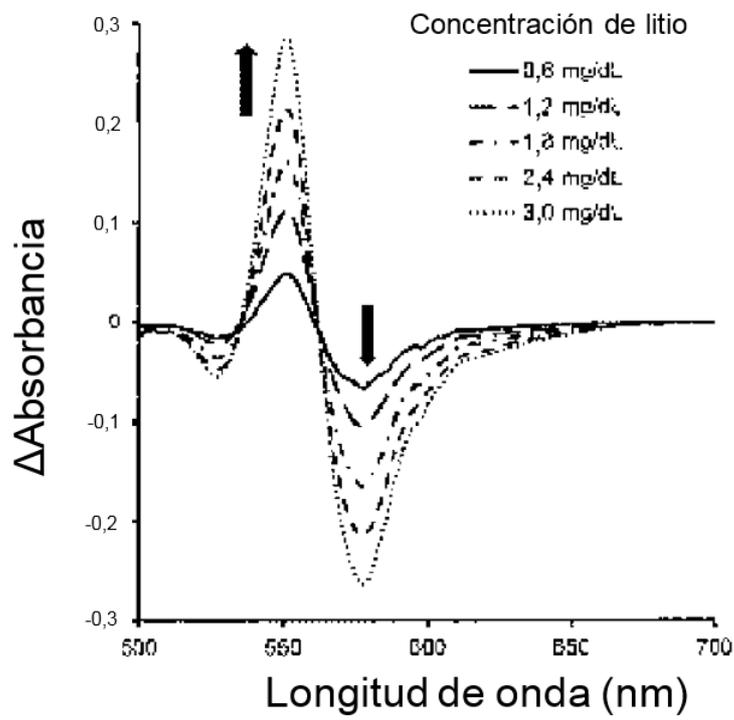
[Fig. 2]



[Fig. 3]

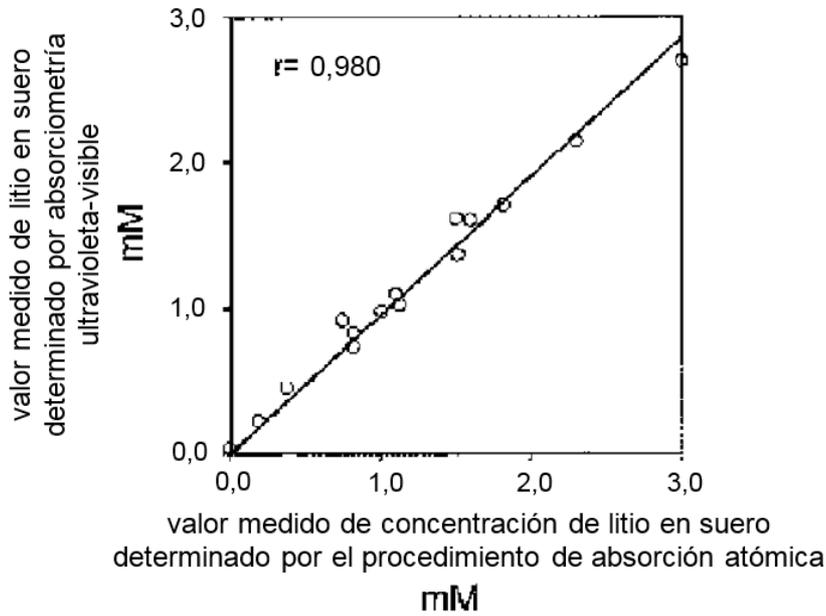


[Fig. 4]



Cambio en el espectro de formación del complejo de tetrafenilporfirina F28

[Fig. 5]



[Fig. 6]

Tabla 1
 Comparación de valores medidos obtenidos por análisis
 automático para la el suero de control
 unidad: mM

Suero de control	Valor garantizado	Valor medido obtenido por la presente invención
Prechnom U	0,82	0,83
Prechipass U	2,30	2,20
Pasonorm	1,51	1,50
Automom	1,00	0,99

[Fig. 7]

[Tabla 2]

Procedimiento de corrección de la presente invención por longitud de onda secundaria de valores medidos de hemoglobina de hemólisis

		Concentración de hemoglobina de hemólisis (mg/dL)				
		Sin hemólisis	250	500	750	1000
Valor de litio medido (mM)	solo longitud de onda principal	1,51	1,59	1,66	1,71	1,89
	corrección con longitud de onda secundaria	1,51	1,51	1,53	1,51	1,54
Recuperación (%)	solo longitud de onda principal	100	105	110	113	125
	corrección con longitud de onda secundaria	100	100	101	100	102

[Fig. 8]

[Tabla 3]

Tasa de respuesta correcta de nivel de litio en suero de control por técnicas anteriores (N= 25 personas)

Referencia de tono de color	(Muestra estándar)	Coloración		
0, 6 mM ~ 1, 5 mM	Región de control	Amarillo		
1, 5 mM ~ 2, 5 mM	Región de semienvenamiento	Naranja		
2, 5 mM ~ 3, 5 mM	Región de envenenamiento	Bermellón		
3, 5 mM o mayor	Región peligrosa	Rojo		

Espécimen de suero de control (muestra)	Coloración	Número de respuestas correctas	Tasa de respuestas correctas
Autonorm 1 mM	Región de control	Amarillo	25 100%
Pathonorm 1, 6 mM	Región de semienvenamiento	Naranja	13 52%
Precinorm 2, 5 mM	Región de envenenamiento	Bermellón	13 52%
Suero modelo 3, 5 mM	Región peligrosa	Rojo	25 100%

[Fig. 9]

[Tabla 4]

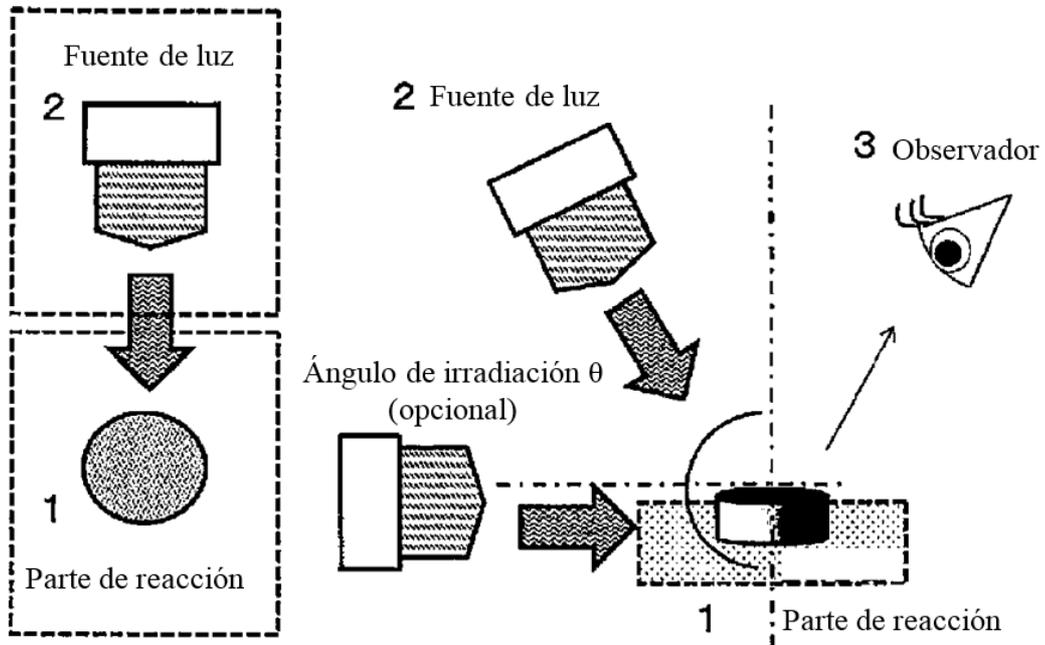
Tasa de respuesta correcta de nivel de litio en suero de control por la presente invención (N= 25 personas)

Referencia de tono de color	(Muestra estándar)	Coloración			
0, 6 mM ~ 1, 5 mM	Región de control	Verde			
1, 5 mM ~ 2, 5 mM	Región de semienvenamiento	Amarillo			
2, 5 mM ~ 3, 5 mM	Región de envenenamiento	Naranja			
3, 5 mM o mayor	Región peligrosa	Rojo			

Espécimen de suero de control (muestra)		Coloración	Número de respuestas correctas	Tasa de respuestas correctas	
Autonorm	1 mM	Región de control	Verde	25	100%
Pathonorm	1, 6 mM	Región de semienvenamiento	Amarillo	24	96%
Precinorm	2, 5 mM	Región de envenenamiento	Naranja	24	96%
Suero modelo	3, 5 mM	Región peligrosa	Rojo	25	100%

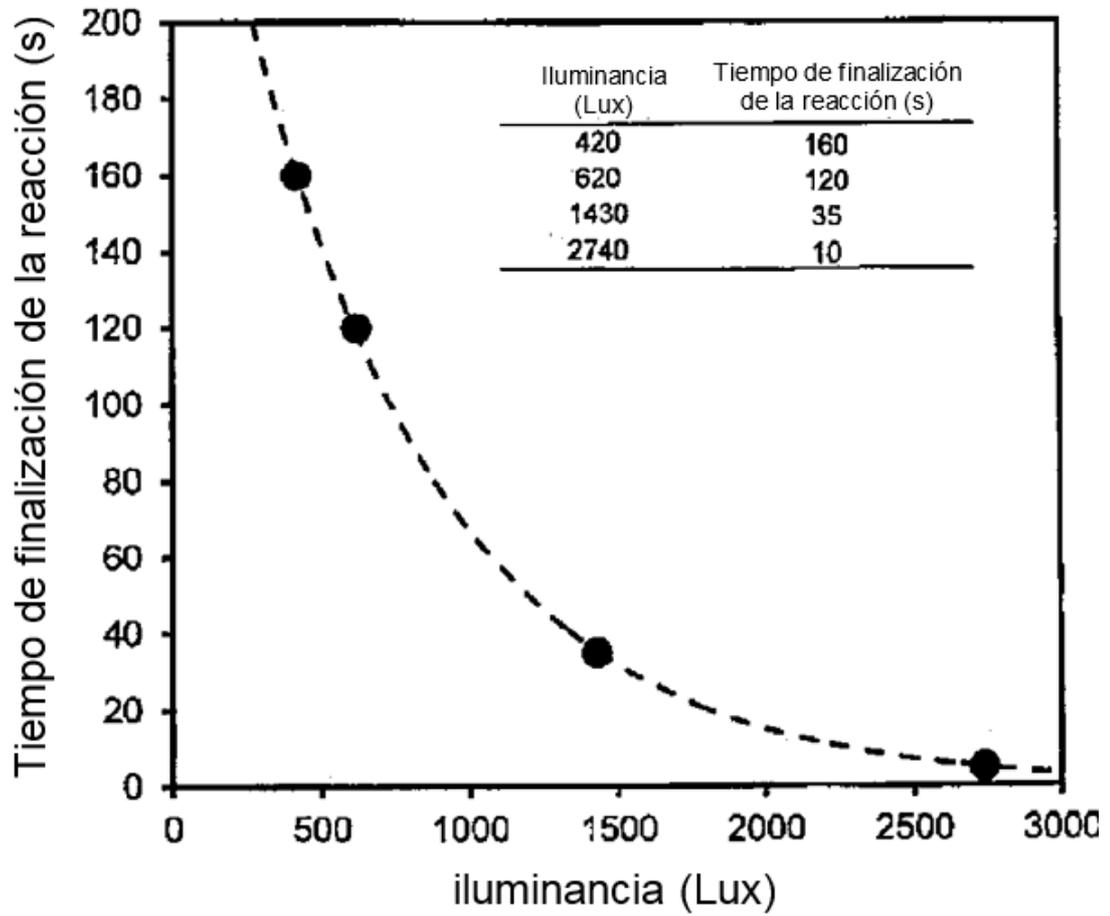
[Fig. 10]

Diagrama esquemático de un aparato de medición para la presente invención



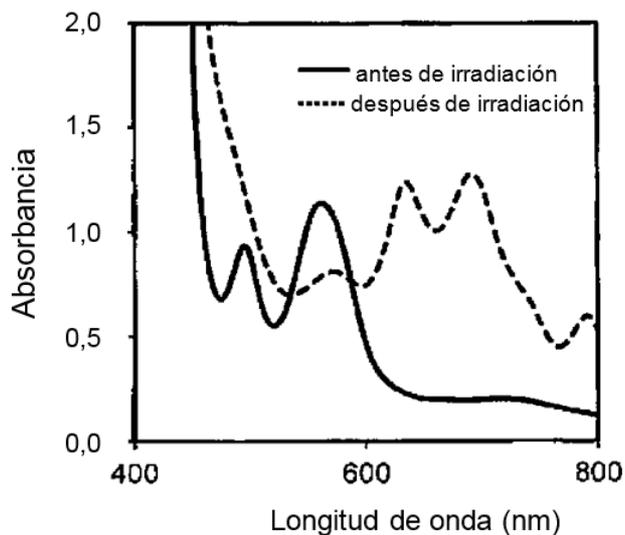
[Fig. 11]

Influencia de iluminancia en el tiempo de finalización de la



[Fig. 12]

Espectro de absorción electrónico del tautómero fotoquímico originado de tetrafenilporfirina F28 en la composición de reactivo en el ejemplo de la presente invención



[Fig. 13]

Espectro de absorción electrónico en la composición de reactivo después de que el complejo de tetrafenilporfirina F28 se irradiara en el ejemplo de la presente invención

