

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 703 772**

51 Int. Cl.:

G01N 33/52 (2006.01)

G01N 33/557 (2006.01)

G01N 33/94 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.10.2011 PCT/GB2011/051952**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.04.2012 WO12049486**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.10.2011 E 11782197 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.12.2018 EP 2628002**

54 Título: **Método de detección de analitos**

30 Prioridad:

13.10.2010 GB 201017256

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

12.03.2019

73 Titular/es:

**SPHERE MEDICAL LIMITED (100.0%)
Harston Mill Harston
Cambridge, Cambridgeshire CB22 7GG, GB**

72 Inventor/es:

**PETTIGREW, DAVID MICHAEL;
LAITENBERGER, PETER GEORG y
LIU, BO**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 703 772 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 de detección de analitos

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un método para mejorar la detección de analitos en matrices de mezcla complejas, en situaciones en las que se requiere una etapa de reacción para generar un producto, que se detecta posteriormente. En particular, esta invención proporciona un medio para medir selectivamente la concentración del fármaco anestésico propofol en la sangre completa.

Antecedentes de la invención

10 La atención médica moderna se basa en gran medida en un rango de pruebas analíticas químicas y bioquímicas sobre una variedad de fluidos corporales para permitir el diagnóstico, terapia y manejo de la enfermedad. Los avances médicos y tecnológicos han ampliado considerablemente el alcance de las pruebas de diagnóstico en las últimas décadas. Más aún, se espera que una mayor comprensión del cuerpo humano, junto con el surgimiento de tecnologías, tales como los microsistemas y la nanotecnología, tengan un profundo impacto sobre la tecnología de diagnóstico.

15 Cada vez más, las pruebas de diagnóstico en los hospitales se llevan a cabo en el punto de atención (PoC), en particular, en situaciones en las que una respuesta rápida es una consideración primordial y las decisiones terapéuticas deben tomarse rápidamente. A pesar de los avances recientes en las pruebas de PoC, varias necesidades convincentes siguen sin satisfacerse. Por ejemplo, la detección de pequeñas moléculas en muestras biológicas es a menudo muy desafiante, especialmente cuando no existe un receptor adecuado (por ejemplo, enzima, anticuerpo, aptámero) con una especificidad apropiada. El desafío es aún mayor cuando la molécula es lipófila y una gran proporción del analito no está disponible para el análisis debido a su asociación con componentes hidrófobos de la matriz de la muestra, tales como las células, los lípidos y las proteínas.

20 La detección de pequeñas moléculas en medios complejos (por ejemplo, sangre, plasma, saliva, orina, aguas residuales y sus extractos) a menudo es difícil debido a la asociación del analito con los componentes de la matriz de la muestra (por ejemplo, proteínas plasmáticas y membranas lipídicas). La concentración de molécula libre (no unida) (que puede estar en el rango picomolar) a menudo está por debajo de los límites de sensibilidad de las técnicas de medición más comúnmente utilizadas (por ejemplo, electroquímica, óptica). Por esta razón, los métodos del estado de la técnica para la detección de moléculas pequeñas en medios complejos a menudo implican una preparación intensiva de la muestra, tal como la dilución/extracción de la muestra en un solvente orgánico, centrifugación, evaporación y análisis por cromatografía líquida de alta presión (HPLC). Dependiendo de las características específicas de la molécula de analito, la detección en columna posterior a HPLC del compuesto eluido se realiza utilizando métodos electroquímicos u ópticos (espectroscopia de absorción o fluorescencia), tal como se divulga en G.F. Plummer, "Improved method for the determination of propofol in blood by highperformance liquid chromatography with fluorescence detection.," *Journal of Chromatography*, vol. 421, 1987, p. 171 y en R.A. Uebel et al., "Electrochemical determination of 2,6-diisopropylphenol after high-performance liquid chromatography of extracts from serum", *Journal of Chromatography*, vol. 526, Mar. 1990, pp. 293-5.

25 La naturaleza compleja y que requiere tiempo de los ensayos de HPLC para moléculas pequeñas en muestras complejas significa que se realizan de forma rutinaria por un número muy pequeño de laboratorios especializados; por esta razón, la utilidad de estos ensayos es bastante limitada. Por ejemplo, para muchos fármacos, tales como el propofol, existe una clara necesidad de desarrollar ensayos miniaturizados alternativos. Esto permitiría la medición y la intervención clínica cerca del tiempo real y en el punto de atención (PoC).

30 Un método para detectar y medir el propofol en medios complejos se ha descrito por McGaughan et al., "Rapid measurement of blood propofol levels: A proof of concept study," *Journal of Clinical Monitoring and Computing*, vol. 20, 2006, pp. 109-115. El método divulgado comprende la extracción en fase sólida (SPE) de una muestra de sangre entera diluida, seguida de una reacción con un reactivo específico de fenol (Gibbs), a saber, 2,6 dicloroquinona-4-cloroimida, para producir un producto de indofenol muy coloreado y la detección de este mismo producto por espectroscopia de absorción.

35 El método de Gibbs/indofenol se ha utilizado con éxito para la detección de propofol. En este documento, la especificidad se logra mediante la combinación de la etapa SPE (específica para analitos hidrófobos) y la reacción de Gibbs (específica para fenoles no sustituidos en para, tales como el propofol, como por ejemplo se ha descrito por D. Svobodova et al., "Colour reaction of phenols with the Gibbs reagent. The reaction mechanism and decomposition and stabilisation of the reagent," *Microchimica Acta*, vol. 67, May. 1977, pp. 251-264, y por H.D. Gibbs, "Phenol tests III. The indophenol test," *Journal of Biological Chemistry* vol. 72, 1927, pp. 649-664

40 El documento WO 2011/042757 A1 divulga un método y un aparato para detectar la concentración de un analito lipófilo de interés en una matriz de muestra compleja. El método comprende extraer el analito de interés de dicha muestra en un solvente orgánico que comprende un electrolito disuelto; proporcionar una especie de radical libre, preferiblemente una especie de radical libre de oxígeno, en dicho solvente orgánico; hacer reaccionar el analito de

interés con dichas especies de radicales libres; y realizar una medición para detectar la concentración del producto de reacción del analito que ha reaccionado con radicales libres.

5 El documento US 4649123 A divulga un medio de prueba para determinar la presencia de un ión en una muestra de prueba acuosa, un método para prepararlo y un método para utilizarlo. Los medios de prueba comprenden una matriz portadora hidrófila incorporada con glóbulos finamente divididos de un vehículo hidrófobo y es útil para determinaciones clínicas de potasio en suero.

10 El documento EP 0032286 A2 divulga un método de ensayo y composiciones para determinar la presencia de un analito en una muestra. El analito es un miembro de un par inmunológico (mip) de inmunógenos - ligando y receptor. El método tiene dos elementos básicos: una superficie sólida a la que se une uno de los miembros del par inmunológico y un sistema productor de señales, que incluye un miembro catalítico unido a un mip, cuyo sistema productor de señales produce una señal medible sobre dicha superficie sólida relacionada con la cantidad de analito en el medio.

15 El proceso global para el ensayo se describe en la Figura 1, mientras que el esquema de reacción dominante para la conversión de propofol al indofenol se muestra en la Figura 2. Como se muestra en la Figura 1, el proceso comienza en la etapa 10 en la que una muestra de sangre completa se diluye con agua destilada en una proporción de 1:2. En la etapa 20, el producto de dilución se inyecta sobre una columna de SPE, seguido de un paso de lavado 30 en el que la columna de SPE se lava con una mezcla de agua y metanol al 50% para eliminar las impurezas unidas débilmente. A continuación, el propofol se extrae de la columna SPE mediante elución con acetonitrilo como se muestra en la etapa 40, después de lo cual se realiza la reacción de Gibbs con propofol como reactivo para producir un producto de indofenol coloreado en la etapa 50. Para determinar la concentración de propofol en la muestra de sangre original, la concentración de indofenol coloreada asociada se determina en la etapa 60 utilizando espectroscopia de absorción visible. Se observa que la reacción de Gibbs es específica para todos los fenoles no sustituidos en para, que incluyen el propofol. El potencial de interferencia en la reacción de Gibbs de otros fenoles se reduce mediante la etapa de extracción de SPE.

25 A un pH suficientemente alto y en presencia de un alcohol primario o secundario, el reactivo de Gibbs (A) se convierte rápidamente en una forma activa (B) que a su vez reacciona con propofol (C) para producir un producto de indofenol coloreado (D), como se muestra en la Figura 2 y se describe en detalle por D. Svobodová et al., "The colour reaction of phenols with the Gibbs reagent," *Microchimica Acta*, vol. 70, 1978, pp. 197-211. A un pH mayor que 9.5, la velocidad de conversión del reactivo de Gibbs (A) a la forma activada (B) es mucho mayor que la velocidad de reacción entre el propofol y el reactivo de Gibbs activado. En este caso, la formación del producto indofenol de la reacción entre el reactivo de Gibbs activado y el propofol es la etapa limitante de la velocidad. Por lo tanto, a un pH alto y cuando la concentración del reactivo de Gibbs está en exceso con respecto al propofol, la concentración del producto de indofenol en equilibrio y la concentración inicial de propofol en la muestra son proporcionales entre sí. Por lo tanto, una medición de equilibrio del pico de absorbancia del producto de indofenol a 595 nm, que según la ley de Beer-Lambert es directamente proporcional a la concentración de indofenol, dará la concentración inicial de propofol en la muestra antes de la reacción.

40 La prueba de un dispositivo que utiliza SPE y la reacción de Gibbs/indofenol para la medición de propofol ha revelado una excelente precisión, linealidad y exactitud para concentraciones de propofol de hasta 1/µg/ml en sangre total, según lo divulgado por McGaughran et al., "Rapid measurement of blood propofol levels: A proof of concept study," *Journal of Clinical Monitoring and Computing*, vol. 20, 2006, pp. 109-115. Este límite de detección hace que el dispositivo sea especialmente adecuado para las mediciones de propofol durante las operaciones quirúrgicas: durante la cirugía, a los pacientes generalmente se les administra suficiente propofol para asegurar que la concentración promedio de propofol en la sangre sea muy superior a 2 µg/ml. Por ejemplo, Schafer et al., "Pharmacokinetics and pharmacodynamics of propofol infusions during general anesthesia," *Anesthesiology*, vol. 69, Sep. 1988, pp. 348-356, informó que los pacientes requerían una concentración promedio de propofol en la sangre de 4.05 +/- 1.01 µg/ml para cirugía mayor y 2.97 +/- 1.07 µg/ml para cirugía no mayor. Las concentraciones de propofol en sangre a las que el 50% de los pacientes (EC50) estaban despiertos y orientados después de la cirugía fueron de 1.07 y 0.95 µg/ml, respectivamente. Este método y aparato es más adecuado para utilizar en estas configuraciones que las técnicas basadas en HPLC, ya que la preparación de la muestra es sencilla y requiere solo una simple dilución de la muestra de sangre antes de la introducción al dispositivo. Adicionalmente, los tiempos de medición típicos son mucho más rápidos en aproximadamente 3 a 5 minutos. Más aún, el instrumento tiene una huella mucho más pequeña y una menor complejidad que el dispositivo HPLC equivalente.

55 En entornos en los que el propofol se utiliza para la sedación, tales como la unidad de cuidados intensivos (UCI), las concentraciones de propofol en la sangre total suelen ser de 0.25 a 2 µg/ml, como lo divulga J. Barr et al., "Propofol dosing regimens for ICU sedation based upon an integrated pharmacokinetic-pharmacodynamic model," *Anesthesiology*, vol. 95, 2001, p. 324. Por lo tanto, subsiste la necesidad de extender el límite inferior de detección y medición para el ensayo de propofol descrito anteriormente. Sin embargo, la medición óptica de propofol en sangre total por debajo de 1 µg/ml está limitada por la presencia de especies en la muestra de sangre que se unen y coeluyen de la columna de SPE y se absorben en la región de la señal de indofenol.

Adicionalmente, también pueden estar presentes agregados insolubles y pueden dispersar la luz, reduciendo así la intensidad medida en el detector. Estas especies contribuyen al espectro de absorbancia medido en la región de la señal de indofenol a 595 nm, causando un desplazamiento en la absorbancia medida en esta longitud de onda y limitando la capacidad del instrumento para medir con precisión la concentración de propofol en muestras de sangre que contienen menos de 1 µg/ml de propofol. Como esta señal de propofol no varía para diferentes muestras de sangre, este desplazamiento debido a especies interferentes no se puede corregir al aplicar, por ejemplo, factores de correlación a los datos. En teoría, es posible corregir la señal de extra absorbancia utilizando el conocimiento de una mayor parte del espectro de absorbancia (dependiendo de la naturaleza de las especies presentes que interfieren). Sin embargo, sería necesario el uso de espectrómetros costosos para medir la señal de absorbancia a ambos lados del pico de interés de la absorbancia e interpolar la señal para restar la contribución de fondo al pico. Esto, a su vez, aumentará el costo y la complejidad del dispositivo.

Resumen de la invención

La presente invención busca proporcionar un método para mejorar el límite inferior de detección y/o medición de la concentración de analitos, en particular propofol, en situaciones en las que se requiere una etapa de reacción para generar un producto de reacción que se detecte posteriormente con el fin de evaluar cualitativamente o cuantitativamente la presencia de ese analito.

De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un método para determinar la presencia de propofol por medio de una detección de un producto de reacción entre propofol y un reactivo de Gibbs activado, el método comprende realizar una medición de fondo sobre la mezcla de reacción inicial que comprende a lo sumo una concentración insignificante del producto de reacción, en el que las condiciones de reacción presentes en dicha mezcla de reacción inicial por lo menos reducen la velocidad de reacción de la formación del producto de reacción de tal manera que la medición de fondo se puede realizar sin un cambio medible en dicha concentración insignificante; alterar las condiciones de reacción en la mezcla de reacción inicial para acelerar dicha velocidad de reacción; continuar dicha reacción hasta que se ha estabilizado la concentración del producto de reacción; realizar una segunda medición sobre la mezcla de reacción resultante para obtener una señal correlacionada a dicha concentración; y determinar la presencia de propofol a partir de una diferencia entre la medición de fondo y la segunda medición,

en el que la mezcla de reacción inicial comprende el reactivo de Gibbs (2,6 dicloroquinona-4-cloroimida), y en el que las condiciones de reacción en la mezcla de reacción inicial comprenden un pH que es suficientemente bajo para prevenir la conversión del reactivo de Gibbs en el reactivo de Gibbs activado, y en el que la etapa de alterar las condiciones de reacción en la mezcla de reacción inicial para acelerar dicha velocidad de reacción comprende aumentar el pH de la mezcla de reacción inicial.

De acuerdo con la presente invención, la velocidad de formación del producto de reacción, es decir el producto de reacción de Gibbs-indofenol, inicialmente se detiene o se ralentiza utilizando un pH que es suficientemente bajo para prevenir la conversión del reactivo de Gibbs en el reactivo de Gibbs activado, con el fin de permitir una medición de referencia de la muestra a tomar. La ausencia de la reacción o la menor velocidad de reacción permite el tiempo suficiente para medir el nivel de la señal "sin analito" de fondo. Una vez completada la medición de referencia, se permite que la reacción continúe. Una vez que se ha estabilizado la concentración del producto de reacción objetivo, se toma una segunda medición, la medición de la muestra. Para tener en cuenta la presencia de las especies interferentes, la medición de referencia se resta posteriormente de la medición de la muestra con el fin de obtener una estimación precisa de la concentración del Propofol.

En una realización, el método comprende adicionalmente las etapas de extraer el Propofol desde una matriz de muestra compleja; y transferir el Propofol a una mezcla de reacción inicial.

En otra realización, la etapa para determinar la presencia del Propofol comprende determinar la concentración del Propofol en dicha mezcla de reacción.

La primera y segunda mediciones se puede seleccionar de una de mediciones ópticas, fluorescentes, de adsorción, colorimétricas, electroquímicas y gravimétricas.

Preferiblemente, la etapa de realizar la medición de fondo comprende medir por lo menos una parte del espectro de absorción de la mezcla de reacción inicial; y la etapa de realizar la segunda medición comprende medir por lo menos una parte del espectro de absorción de la mezcla de reacción resultante.

En la presente invención, el analito de interés es Propofol (2,6-di-isopropilfenol), y el reactivo es el reactivo de Gibbs activado (2,6-dicloroquinonaimina). La mezcla de reacción inicial comprende el reactivo de Gibbs (2,6 dicloroquinona- 4-cloroimida), en el que las condiciones de reacción en la mezcla de reacción inicial comprenden un pH que es suficientemente bajo para prevenir la conversión del reactivo de Gibbs en el reactivo de Gibbs activado, y en el que la etapa de alterar las condiciones de reacción en la mezcla de reacción inicial para acelerar dicha velocidad de reacción comprende aumentar el pH de la mezcla de reacción inicial.

La mezcla de reacción inicial puede comprender adicionalmente una solución tampón para mantener el pH suficientemente bajo, tal como un tampón de ácido cítrico, un tampón de ácido fórmico o un tampón de bicarbonato.

5 La primera y segunda mediciones pueden comprender determinar la absorbancia de la mezcla de reacción inicial y la mezcla de reacción resultante respectivamente de un espectro de absorbancia que incluye el intervalo 400-800 nm.

La primera y segunda mediciones pueden comprender determinar la absorbancia de la mezcla de reacción inicial y la mezcla de reacción resultante respectivamente en una primera longitud de onda de 595 nm y una segunda longitud de onda de 800 nm.

10 Más específicamente, la primera y segunda mediciones pueden comprender determinar la absorbancia de la mezcla de reacción inicial y la mezcla de reacción resultante respectivamente en solo una longitud de onda de 595 nm.

El método puede comprender adicionalmente extraer el Propofol desde la matriz de muestra compleja utilizando extracción en fase sólida. La matriz de muestra compleja puede ser sangre. La etapa de extracción puede comprender pasar dicha muestra de sangre sobre una columna de extracción en fase sólida, lavar dicha columna y eluir el Propofol utilizando un solvente adecuado. El solvente preferiblemente es acetonitrilo.

15 En una realización, la muestra de sangre se diluye con agua a una relación de más de 1:1 antes de pasar sobre dicha columna, dicha relación preferiblemente se basa en un intervalo de 1:2-1:50 sangre:agua.

20 El método puede comprender adicionalmente realizar por lo menos una medición intermedia luego de la etapa de alterar las condiciones de reacción en la mezcla de reacción inicial para acelerar dicha velocidad de reacción y antes de que se haya estabilizado la concentración del producto de reacción, en el que la etapa para determinar la presencia del Propofol a partir de una diferencia entre la medición de fondo y la segunda medición comprende medir y determinar dicha presencia a partir de una diferencia entre la medición de fondo, la segunda medición y por lo menos una medición intermedia.

Breve descripción de las realizaciones.

25 Las realizaciones de la invención se describen con más detalle y a modo de ejemplos no limitativos con referencia a los dibujos acompañantes, en los que:

La Figura 1 representa esquemáticamente las etapas para operar un ensayo Propofol de Gibbs/indofenol;

La Figura 2 representa esquemáticamente la reacción de Gibbs/indofenol aplicada al propofol; y

La Figura 3 representa esquemáticamente la sustracción de fondo (A) y las mejoras de señal (B) en un ensayo de propofol que emplea una realización del método de la presente invención.

30 Descripción detallada de los dibujos

Se debe entender que las Figuras son solo esquemáticas y no están dibujadas a escala. También se debe entender que los mismos números de referencia se utilizan en todas las Figuras para indicar las mismas partes o similares.

35 Las realizaciones de la presente invención se pueden aplicar a situaciones en las que se requiere una etapa de reacción para generar un producto de reacción que se detecte posteriormente con el fin de evaluar cualitativamente o cuantitativamente la presencia del analito objetivo. En general, la invención consta de los siguientes pasos (que se resumen a continuación y en la Figura 1):

40 1. Se prepara un extracto del medio complejo, que comprende el analito de interés. Los métodos de extracción serán específicos para el analito de interés y serán conocidos por aquellos expertos en la técnica. La composición de este extracto debe ser compatible con la reacción deseada y la posterior detección del producto de reacción de interés. Dependiendo del método de intercambio (por ejemplo, SPE), en esta etapa se logra cierta purificación del analito en relación con cualquier especie que pueda interferir con la medición.

45 En una realización preferida, un extracto de sangre completa que contiene propofol se produce al pasar una muestra de sangre completa diluida (sangre diluida con agua en una relación mayor a 1:1 sangre:agua, preferiblemente 1:2 a 1:50 sangre:agua) sobre una columna SPE (por ejemplo, que contiene un material de fase inversa adecuado), lavar la columna, por ejemplo, con una solución de metanol al 50% y finalmente eluir utilizando acetonitrilo. En otra realización, se puede aplicar sangre sin diluir a la columna de SPE directamente sin dilución y las etapas de lavado y elución se realizan de la misma manera.

50 2. Transferencia del extracto del medio complejo, que contiene el analito de interés, a un módulo de detección de reacción/analito. Este módulo puede estar separado o conectado directamente al aparato de extracción (por ejemplo, la columna SPE) a través de una conexión de fluido, y debe proporcionar un entorno adecuado para la reacción. Esto será conocido por aquellos expertos en la técnica. El módulo de detección puede utilizar una variedad de diferentes técnicas analíticas, por ejemplo, pero no limitadas a enfoques ópticos, fluorescentes, de adsorción,

electroquímicos colorimétricos o gravimétricos. En una realización preferida para la detección de propofol, el módulo de detección comprende un aparato para espectroscopia de absorción a longitudes de onda de 595 nm y 800 nm.

3. Adición de reactivos al módulo de reacción/detección e inhibición de la reacción. Los volúmenes conocidos de algunos o todos los componentes de la reacción se agregan a la celda de reacción; estos reactivos se pueden introducir durante la etapa de extracción (es decir, como parte del agente de elución SPE) o agregar después de transferir el extracto a la celda de reacción/detección. En esta etapa, la reacción se inhibe o se reduce la velocidad de reacción utilizando un método apropiado, por ejemplo, utilizando uno o más estímulos, que incluyen, pero no se limitan a, temperatura, pH, mezcla lenta, ausencia o eliminación o uno o más Reactivos y/o la adición de un inhibidor. Aquellos expertos en la técnica conocerán otros métodos de inhibición y/o reducción de la velocidad de reacción.

En una realización preferida, después de la elución del extracto de propofol de la sangre completa utilizando acetonitrilo, se agrega el reactivo de Gibbs y el pH se mantiene por debajo de 8. En otra realización, se puede incluir un tampón de pH bajo y débil de pH adecuado (por ejemplo, $\text{pH} \leq 8$) en el reactivo de Gibbs, agregar como una solución separada (antes del reactivo de Gibbs) o incorporar en la solución de acetonitrilo utilizada para la elución de la columna SPE. El bajo pH garantiza que el propofol reaccione muy lentamente con el reactivo de Gibbs. Los ejemplos de tampones débiles incluyen, pero no se limitan a, bajas concentraciones de ácido cítrico y ácido fórmico. Si es necesario, después de la adición de todas las soluciones requeridas, la celda de reacción se puede mezclar utilizando métodos que incluyen, entre otros, la agitación de la celda de reacción, la agitación magnética y/o el burbujeo de un gas a través de la solución.

4. Adquisición de una medición de referencia. En una realización de la invención, la reacción se inhibe/ralentiza y la técnica de medición pretendida se aplica para medir la solución en ausencia del producto de reacción deseado. Por ejemplo, en una realización preferida, la espectroscopia de absorción se utiliza para medir la absorbancia a 595 nm (A595) y 800 nm (A800) de una solución que contiene un extracto de propofol de sangre completa en acetonitrilo y el reactivo de Gibbs a un pH inferior a 8. Se puede medir una medición de dos longitudes de onda (por ejemplo, 595 nm y 800 nm) o un espectro completo (por ejemplo, pero no limitado a, 400 nm a 800 nm) para recopilar estos datos. A un pH bajo, la cinética de la reacción de Gibbs a este pH es lo suficientemente lenta, por lo que la reacción se pueda considerar inhibida. En este documento, la señal de referencia se establece como la absorbancia a 595 nm (absorbancia máxima de indofenol) menos la absorbancia a 800 nm (la medición de 800 nm se utiliza para proporcionar una corrección para la dispersión óptica de fondo y la variación de la intensidad de la luz incidente en la muestra). También se pueden utilizar otras longitudes de onda de 800 nm (que se sabe que tienen una absorbancia de indofenol cero o suficientemente baja) para cuantificar el nivel de dispersión de fondo, que se conocerán por aquellos expertos en la técnica. En otra realización, para situaciones en las que la intensidad de la luz no varía entre la muestra y la medición de referencia, no es necesario restar la señal A800, ya que la contribución de dispersión (debido a las partículas en la cubeta) se mide a 595 nm durante esta referencia de pH bajo. En este caso, solo se necesita registrar la absorbancia a 595 nm. Se observa que el término AX, en el que X es un número positivo, pretende indicar la absorbancia medida en una longitud de onda de X nm.

En otra realización de la presente invención, se realizan varias mediciones en diversos puntos de tiempo después de la mezcla para monitorizar la evolución de la señal a medida que se produce el producto lentamente. A partir de estas mediciones, se puede determinar la respuesta de fondo debida a la señal inicial "sin producto" en ausencia del producto deseado, por ejemplo, mediante ajuste de curva o extrapolación al momento en que se agregaron los reactivos a la mezcla de reacción.

5. Adquisición de la señal de muestra. Una vez que se han medido las respuestas de fondo, se retira el mecanismo de inhibición para permitir que la reacción deseada se mueva hacia el equilibrio (o finalización). Luego, se emplea el mismo método de detección que se utiliza en la etapa 4 para medir la señal del producto de reacción deseado más la respuesta de fondo. Alternativamente, si la reacción es demasiado lenta para alcanzar el equilibrio en un tiempo razonable, se pueden utilizar mediciones en diferentes momentos para predecir la concentración del producto final en el equilibrio, por ejemplo, mediante ajuste de curva o extrapolación a un momento en que se siente que se alcanza el equilibrio.

Por ejemplo, en una realización preferida dirigida a detectar la concentración de propofol en sangre completa por el método de Gibbs/indofenol, se agrega un volumen conocido de una solución básica (por ejemplo, un tampón de pH adecuadamente alto, por ejemplo, $\text{pH} \geq 9.5$) al extracto de acetonitrilo y la muestra se mezcló bien para aumentar el pH, preferiblemente a un valor de pH mayor o igual a 9.5. Si se agregó un tampón en la etapa anterior para disminuir el pH e inhibir la reacción, el tampón utilizado en esta etapa debe ser lo suficientemente fuerte como para superar la acción del tampón de bajo pH de la composición de solución de la Etapa 4. En una realización preferida, se utiliza un tampón de bicarbonato 20 mM a pH 9.6 para elevar el pH y aumentar la velocidad de formación del producto de indofenol. Los expertos en la técnica conocerán otros sistemas de tamponamiento adecuados, o métodos alternativos para aumentar el pH. Esto permite que la reacción de Gibbs alcance el equilibrio (finalización) y produzca una concentración del producto de indofenol que esté directamente relacionada con la concentración original de propofol en la sangre completa. Si se debe determinar la concentración de propofol en la muestra de sangre, es esencial que el reactivo de Gibbs tenga un exceso suficiente (en relación con la concentración de propofol en el extracto) para garantizar que la concentración del producto de indofenol en el equilibrio de la reacción

sea representativa. de la concentración de propofol. Como antes, se determina la diferencia en la absorbancia óptica a 595 nm y 800 nm. Se puede medir una medición de dos longitudes de onda (595 nm y 800 nm) o un espectro completo (400 nm a 800 nm) para recopilar estos datos. En otra realización, para situaciones en las que la intensidad de la luz no varía entre la muestra y la medición de referencia, no es necesario medir la señal A800, ya que la contribución de dispersión (debido a las partículas en la cubeta) se midió a 595 nm durante la medición de referencia de pH bajo.

6. Resta de la señal generada por las especies interferentes. En esta etapa, la respuesta de fondo (“no producto de interés”) obtenida en la etapa 4 se puede utilizar para eliminar la contribución de las especies interferentes a la señal obtenida en la etapa 5.

Por ejemplo, en una realización preferida dirigida a detectar la concentración de propofol en sangre completa por el método de Gibbs/indofenol, la señal de absorbancia (A595-A800) a pH 7 se resta de la señal de absorbancia (A595-A800) a pH 9.6. Esto se conoce como la señal de absorbancia de indofenol corregida. Alternativamente, en otra realización, para situaciones en las que los espectros de absorbancia total se adquieren (en lugar de una medición de absorción de dos longitudes de onda a 595 nm y 800 nm) durante las etapas 4-5, el espectro de referencia de la etapa 4 se resta del espectro de muestras de la etapa 5. La señal de absorbancia de indofenol corregida se calcula luego a partir de este gráfico restado, al medir la diferencia de absorbancia a 595 nm y 800 nm.

En otra realización, para situaciones en las que la intensidad de la luz incidente no varía entre la muestra y la medición de referencia, no es necesario utilizar las señales sustraídas de A800 para el cálculo de la señal de absorbancia de indofenol corregida. Esto se debe a que el desplazamiento de dispersión (debido a las partículas en la cubeta) a 595 nm se mide durante la medición de referencia de pH bajo. En las tres realizaciones descritas en este documento, solo la señal de absorbancia de indofenol corregida final es representativa de la absorbancia del indofenol, ya que las señales de absorbancia no indofenol (por ejemplo, proteínas, lípidos y dispersión óptica) están presentes tanto en el espectro de referencia como en el de muestra. Como hay un exceso molar de reactivo de Gibbs en la muestra, esta señal de absorbancia de indofenol corregida será directamente proporcional a la concentración del fármaco de propofol en la muestra de sangre que se analiza. La comparación con una curva de calibración construida utilizando concentraciones conocidas del fármaco produce una estimación precisa y exacta de la concentración original del fármaco en la muestra.

La técnica de medición de acuerdo con las realizaciones del método de la presente invención tiene ventajas significativas sobre la técnica anterior; estas ventajas se demuestran más fácilmente en el caso de las mediciones de propofol utilizadas como una realización preferida de la invención. Primero, el estado del arte en la detección de bajas concentraciones (<50 ng/ml) de propofol en sangre completa es HPLC. El método Gibbs/indofenol establecido ofrece ahorros sustanciales con respecto a la HPLC en cuanto a la complejidad del equipo, el coste financiero, la preparación de la muestra y el tiempo de medición, pero tiene un límite de detección relativamente pobre (1 µg/ml). La presente invención detalla reactivos y métodos para incorporar una medición de fondo en ausencia del producto de indofenol. Esto, a su vez, confiere un aumento significativo en la sensibilidad, y una disminución en el límite inferior de detección, a la técnica de Gibbs/indofenol que se aplica a extractos de sangre completa, ya que permite la eliminación del desplazamiento variable en la absorción de fondo/señal de dispersión. También resulta en una simplificación significativa de la instrumentación de medición de absorbancia, ya que solo requiere el uso de una longitud de onda única (en lugar de una medición de espectro completo como se describe en la técnica anterior) para la detección y medición de concentración. Por lo tanto, esta invención combina los beneficios de la alta sensibilidad de detección que brinda la HPLC con la simplicidad de un aparato de medición que utiliza la técnica de Gibbs/indofenol. Esto permite una medición consistente de las concentraciones de propofol en sangre completa hasta <100 ng/ml. Esto, a su vez, permite un ensayo simple, rápido y de bajo coste que se adapta de forma única a los entornos en los que se miden de forma rutinaria concentraciones bajas de propofol (por ejemplo, Unidades de Cuidados Intensivos).

El método de la presente invención se puede utilizar en un ensayo para la detección y medición de la concentración de fenoles no sustituidos en para, es decir el propofol anestésico, en sangre completa, en el que se proporciona una nueva mejora del ensayo de reacción en fase sólida/extracción de Gibbs descrito anteriormente. En una realización preferida, después de transferir el extracto de la fase post-sólida a una celda de reacción, el pH de la reacción se controla primero para inhibir efectivamente la reacción entre el fenol y el reactivo de Gibbs.

Esta inhibición se logra a medida que la conversión del reactivo de Gibbs (Figura 2, A) a la forma activada (Figura 2, B) se evita efectivamente a un pH bajo (por ejemplo, pH ≤8). Aunque la reacción se puede desarrollar a través de mecanismos alternativos, como por ejemplo, se divulga por I. Pallagi et al., “Mechanism of the Gibbs Reaction. Part 4.1: Indophenol Formation via N-Chlorobenzoquinone Imine Radical Anions. The Aza-SRN2 Chain Reaction Mechanism. Chain Initiation with 1,4-Benzoquinones and Cyanide Ion,” The Journal of Organic Chemistry, vol. 64, 1999, pp. 6530-6540, el indofenol se produce a una velocidad extremadamente lenta en relación con la situación de pH alto, con un tiempo de equilibrio >1 h en lugar de en el orden de <1 min para la situación de pH alto.

Por lo tanto, durante un período de unos pocos minutos, la concentración de indofenol en la muestra es suficientemente pequeña bajo estas condiciones de reacción, por ejemplo, cerca de cero o al menos lo suficientemente baja como para no afectar significativamente el espectro de absorbancia, para realizar una medición

de absorbancia adicional para determinar la señal de fondo de cualquier especie contaminante en ausencia del producto de indofenol coloreado. Después de realizar las mediciones de referencia, el pH del extracto se incrementa (por ejemplo, pH >9.5) y se permite que la reacción progrese rápidamente a través del mecanismo que se muestra en la Figura 2. Después de que el sistema alcanza el equilibrio, se adquiere un espectro de muestra y la cantidad de producto de indofenol se cuantifica después de la sustracción de los datos de referencia apropiados.

En otra realización para la determinación de propofol por el método de Gibbs/indofenol, se realiza una única medición de referencia de longitud de onda y de muestra (en lugar de un espectro completo). En este caso, solo se requiere la señal de absorbancia a 595 nm para medir la contribución de cualquier absorbancia no indofenol y dispersión óptica a la señal final. Esto hace que el dispositivo sea considerablemente más económico que las mediciones del espectro completo alternativo (por ejemplo, 400 nm-800 nm) descritas en la técnica anterior, tal como por L. McGaughran et al.

También permite el análisis en tiempo real de las concentraciones de propofol en sangre completa por debajo de 1 µg/ml en una configuración de PoC, lo que mejora la utilidad del análisis en entornos clínicos, tales como la UCI. Otras aplicaciones para esta realización incluyen, pero no se limitan a, el análisis de bajas concentraciones de compuestos fenólicos en fluidos biológicos, aguas residuales o muestras de alimentos.

Ejemplo

La presente invención se describirá con más detalle por medio del siguiente ejemplo no limitante. En este ejemplo, el fármaco anestésico propofol se detecta a partir de sangre completa utilizando extracción en fase sólida (SPE), seguida de una reacción de Gibbs y detección mediante espectroscopia de absorción. Los protocolos de medición establecidos para bajas concentraciones de propofol se basan en ensayos basados en HPLC complejos y que requieren mucho tiempo. La baja complejidad y el coste de la técnica descrita en este ejemplo permiten un ensayo de propofol que se puede realizar en un entorno cercano al paciente.

Una muestra de sangre (preferiblemente 1 ml), que contiene una concentración conocida de propofol, se diluye 1:2 en agua y luego se aplica un volumen conocido de esta muestra diluida, preferiblemente 1.5 ml, a una columna de fase inversa SPE. La columna se lava con (preferiblemente (1.5 ml) de agua desionizada y (preferiblemente con 0.75 ml) de una mezcla 1:1 de agua y metanol para eliminar las impurezas débilmente unidas). El extracto de propofol luego se eluye de la columna SPE utilizando un volumen conocido (preferiblemente 0.75 ml) de acetonitrilo. La extracción en fase sólida de propofol en acetonitrilo ha sido detallada por L. McGaughran et al. El eluyente de la columna SPE se transfiere luego a una celda de medición de absorción óptica, y se agrega un volumen conocido (preferiblemente 100 µl) y concentración (preferiblemente 0.8 mmol.l⁻¹) de reactivo de Gibbs (Figura 2, compuesto A) en metanol y mezclado mediante burbujeo de una presión conocida de gas nitrógeno (15 psi) a través de la cubeta. Como la reacción entre el reactivo de Gibbs y el propofol es lo suficientemente lenta, la concentración de producto de indofenol se puede considerar como insignificante en este momento. La transmitancia óptica de la solución luego se determina al medir la intensidad dispersada espectralmente de la luz transmitida (entre 400 nm y 800 nm) a través de una longitud de ruta conocida de la solución. Este espectro es el espectro de referencia.

Se registran las intensidades transmitidas de las señales a 595 nm y 800 nm ($I_{ref,595nm}$ y $I_{ref,800nm}$, respectivamente).

Luego, se agrega a la cubeta un volumen conocido (preferiblemente 100 µl) de tampón de bicarbonato 20 mM a pH 9.6 y se mezcla utilizando burbujeo de gas nitrógeno como se describió anteriormente. El aumento en el pH resulta en la conversión del reactivo de Gibbs (Figura 2, compuesto A) en la forma activada (Figura 2, compuesto B), que luego reacciona rápidamente con el propofol eluido en la muestra para producir el producto de indofenol coloreado con una absorbancia máxima a 595 nm. Después de un período de espera definido (preferiblemente 40 s) para permitir que la reacción alcance un equilibrio (y la concentración del indofenol para alcanzar un estado estable), se mide el espectro de intensidad transmitido, registrando la intensidad dispersada espectralmente de la luz transmitida (entre 400 nm y 800 nm) a través de la misma longitud de ruta conocida de la solución como anteriormente. De nuevo, se registran las intensidades transmitidas de las señales a 595 nm y 800 nm ($I_{s,595nm}$ e $I_{s,800nm}$ respectivamente). La absorbancia del producto indofenol (A_{final}) se define, por lo tanto, por la Ley de Beer-Lambert (Ecuación 1)

$$[Indofenol] \alpha A_{final} = \log \left(\frac{I_{ref,595nm}}{I_{s,595nm}} \right) - \log \left(\frac{I_{ref,800nm}}{I_{s,800nm}} \right) \text{ Ecuación 1}$$

Esta absorbancia final es la absorbancia del producto de indofenol, corregida por la absorbancia de fondo a 595 nm de especies no indofenol (por ejemplo, proteínas, lípidos extraídos de la sangre completa en la extracción de SPE) y por dispersión óptica de fondo debido a la turbidez en la muestra (por ejemplo, derivados de agregados insolubles). Por lo tanto, esta señal de absorbancia es directamente proporcional a la concentración de la especie de indofenol final y, asumiendo que la reacción está en estado estable y un exceso de reactivo de Gibbs, mediante inferencia la concentración original de propofol en la muestra.

Los resultados de este esquema mejorado de sustracción de fondo se muestran en la Figura 3. El panel A muestra una gráfica de la absorbancia versus la longitud de onda obtenida para un extracto en fase sólida de una muestra de sangre completa con una concentración de propofol original de .0.8 µg/ml. La inspección del espectro de referencia de pH bajo (traza 2) en relación con una referencia de metanol revela que existe una absorbancia significativa no indofenol a 595 nm. Esto produce un desplazamiento en el espectro de muestra de pH 9.6 (traza 1) en relación con una referencia de metanol que no se atribuye al indofenol. Este desplazamiento variará de una muestra a otra y, por lo tanto, debe corregirse. La sustracción del espectro de referencia de pH bajo del espectro de pH 9.6 produce un espectro final (traza 3) con un pico de absorbancia a 595 nm que se atribuye solo a la absorbancia del indofenol.

El panel B muestra una gráfica final de la absorbancia versus a los datos de concentración predichos para la referencia de metanol anterior (traza 4) y el nuevo esquema de sustracción de referencia de bajo pH (traza 5). También se muestran las regresiones lineales y las ecuaciones asociadas para el ajuste. Tenga en cuenta las mejoras en la linealidad y la reducción en la compensación obtenida con el nuevo esquema de referencia de pH bajo.

Utilizando el método de sustracción normal definido por McGaughan et al., "Rapid measurement of blood propofol levels: A proof of concept study," *Journal of Clinical Monitoring and Computing*, vol. 20, 2006, pp. 109-115, en el que el espectro de muestra utiliza una muestra "solo de metanol" en la cubeta como referencia (Figura 3A, traza 1), hay un desplazamiento significativo en la absorbancia debido al fondo sin indofenol en el espectro. La medición de referencia adicional a bajo pH permite que esta señal de fondo "no indofenol" se mida directamente (Figura 3A, traza 2) y luego se reste del espectro de la muestra para obtener solo el espectro del indofenol (Figura 3A, traza 3).

La inspección de una gráfica de la absorbancia final (Ecuación 1) versus la concentración de propofol conocida revela que este nuevo esquema de sustracción reduce efectivamente la absorbancia medida y mejora la linealidad de la gráfica al eliminar el desplazamiento variable introducido por la señal de fondo variable, como se muestra en La Figura 3B. Por lo tanto, permite que la concentración del producto de indofenol, y por lo tanto la concentración de propofol original, se determine con mayor precisión para estas muestras de muy baja concentración. Finalmente, note también la reducción en el desplazamiento a 800 nm para el espectro restado final (Figura 3A, traza 3). Esto demuestra que la medición de referencia de bajo pH explica la señal de absorbancia que surge de la dispersión óptica. Por lo tanto, se puede utilizar una única medición de longitud de onda a 595 nm para determinar la concentración de propofol en lugar de las mediciones del espectro completo (400 nm-800 nm) descritas en este documento. Esto dará como resultado ahorros sustanciales en la complejidad y el coste del equipo.

Se debe observar que las realizaciones mencionadas anteriormente ilustran en lugar de limitar la invención, y que aquellos expertos en la técnica podrán diseñar muchas realizaciones alternativas sin apartarse del alcance de las reivindicaciones adjuntas. En las reivindicaciones, cualquier signo de referencia colocado entre paréntesis no se debe interpretar como una limitación de la reivindicación. La palabra "que comprende" no excluye la presencia de elementos o etapas distintas de los enumerados en una reivindicación. La palabra "un" o "una" que precede a un elemento no excluye la presencia de una pluralidad de dichos elementos. La invención se puede implementar por medio de hardware que comprende varios elementos distintos. En la reivindicación del dispositivo que enumera varios medios, varios de estos medios se pueden incorporar por un mismo elemento de hardware. El solo hecho de que ciertas medidas se reciten en reivindicaciones dependientes mutuamente diferentes no indica que una combinación de estas medidas no se pueda utilizar para obtener ventajas.

40

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar la presencia de Propofol (2,6-di-isopropilfenol), por medio de una detección de un producto de reacción entre Propofol y un reactivo de Gibbs activado (2,6-dicloroquinonaimina), el método comprende:
 - 5 realizar una medición de fondo sobre la mezcla de reacción inicial que comprende a lo sumo una concentración insignificante del producto de reacción, en el que las condiciones de reacción presentes en dicha mezcla de reacción inicial por lo menos reducen la velocidad de reacción de la formación del producto de reacción de tal manera que la medición de fondo se puede realizar sin un cambio medible en dicha concentración insignificante;

alterar las condiciones de reacción en la mezcla de reacción inicial para acelerar dicha velocidad de reacción;
 - 10 continuar dicha reacción hasta que se ha estabilizado la concentración del producto de reacción;

realizar una segunda medición sobre la mezcla de reacción resultante para obtener una señal correlacionada a dicha concentración; y

determinar la presencia de Propofol a partir de una diferencia entre la medición de fondo y la segunda medición,
 - 15 en el que la mezcla de reacción inicial comprende el reactivo de Gibbs (2,6 dicloroquinona-4-cloroimida), y en el que las condiciones de reacción en la mezcla de reacción inicial comprenden un pH que es suficientemente bajo para prevenir la conversión del reactivo de Gibbs en el reactivo de Gibbs activado, y en el que la etapa de alterar las condiciones de reacción en la mezcla de reacción inicial para acelerar dicha velocidad de reacción comprende aumentar el pH de la mezcla de reacción inicial.
2. El método de la reivindicación 1, comprende adicionalmente las etapas de:
 - 20 extraer el Propofol desde una matriz de muestra compleja; y

transferir el Propofol a una mezcla de reacción inicial.
3. El método de la reivindicación 1, en el que la etapa para determinar la presencia de Propofol comprende determinar la concentración de Propofol en dicha mezcla de reacción.
4. El método de la reivindicación 1, en el que la primera y segunda mediciones son una de las mediciones ópticas, fluorescentes, de adsorción, colorimétricas, electroquímicas y gravimétricas.
5. El método de la reivindicación 4, en el que:
 - realizar la medición de fondo comprende medir por lo menos una parte del espectro de absorción de la mezcla de reacción inicial; y
 - 30 realizar la segunda medición comprende medir por lo menos una parte del espectro de absorción de la mezcla de reacción resultante.
6. El método de la reivindicación 1, en el que la mezcla de reacción inicial comprende una solución tampón para mantener el pH suficientemente bajo, tal como un tampón de ácido cítrico, un tampón de ácido fórmico o un tampón de bicarbonato.
7. El método de la reivindicación 1, en el que la primera y segunda mediciones comprenden determinar la absorbancia de la mezcla de reacción inicial y la mezcla de reacción resultante respectivamente de un espectro de absorbancia que incluye el intervalo 400-800 nm.
8. El método de la reivindicación 1, en el que la primera y segunda mediciones comprenden determinar la absorbancia de la mezcla de reacción inicial y la mezcla de reacción resultante respectivamente en una primera longitud de onda de 595 nm y una segunda longitud de onda de 800 nm.
9. El método de la reivindicación 1, en el que la primera y segunda mediciones comprenden determinar la absorbancia de la mezcla de reacción inicial y la mezcla de reacción resultante respectivamente en solo una longitud de onda de 595 nm.
10. El método de la reivindicación 1, comprende adicionalmente extraer el Propofol desde la matriz de muestra compleja utilizando extracción en fase sólida.
- 45 11. El método de la reivindicación 10, en el que la matriz de muestra compleja es sangre.
12. El método de la reivindicación 11, en el que dicha etapa de extracción comprende pasar dicha muestra de sangre sobre una columna de extracción en fase sólida, lavar dicha columna y eluir el Propofol utilizando un solvente adecuado.

13. El método de la reivindicación 12, en el que el solvente es acetonitrilo.
14. El método de la reivindicación 12, en el que la muestra de sangre se diluye con agua a una relación de más de 1:1 antes de pasar sobre dicha columna, dicha relación preferiblemente se basa en un rango de 1:2-1:50 sangre:agua.
- 5 15. El método de la reivindicación 1, comprende adicionalmente realizar por lo menos una medición intermedia luego de la etapa de alterar las condiciones de reacción en la mezcla de reacción inicial para acelerar dicha velocidad de reacción y antes de que se haya estabilizado la concentración del producto de reacción, en el que la etapa para determinar la presencia del Propofol a partir de una diferencia entre la medición de fondo y la segunda medición comprende medir y determinar dicha presencia a partir de una diferencia entre la medición de fondo, la segunda
10 medición y por lo menos una medición intermedia.

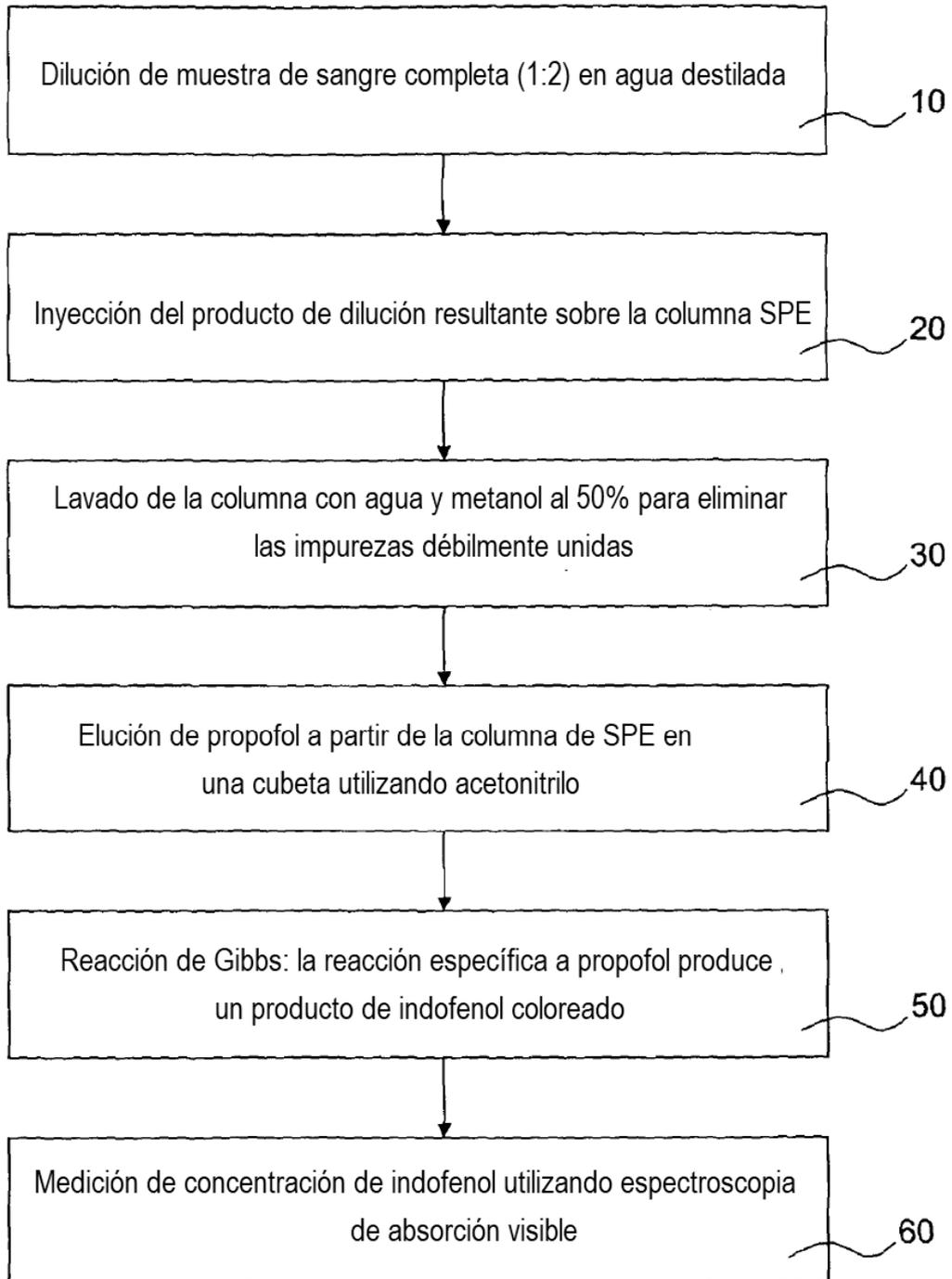


FIG. 1

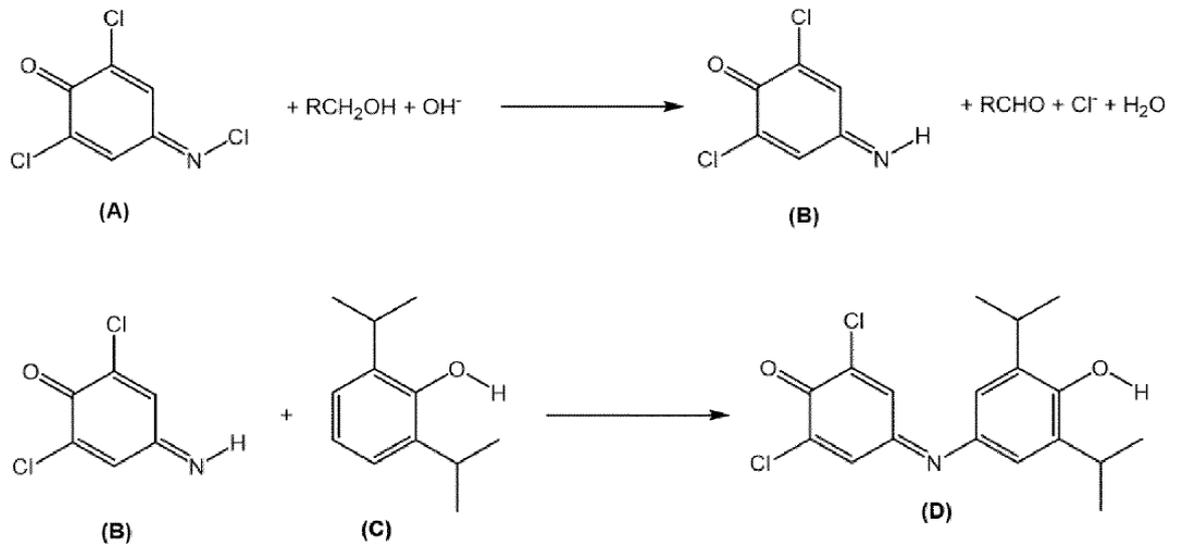


FIG. 2

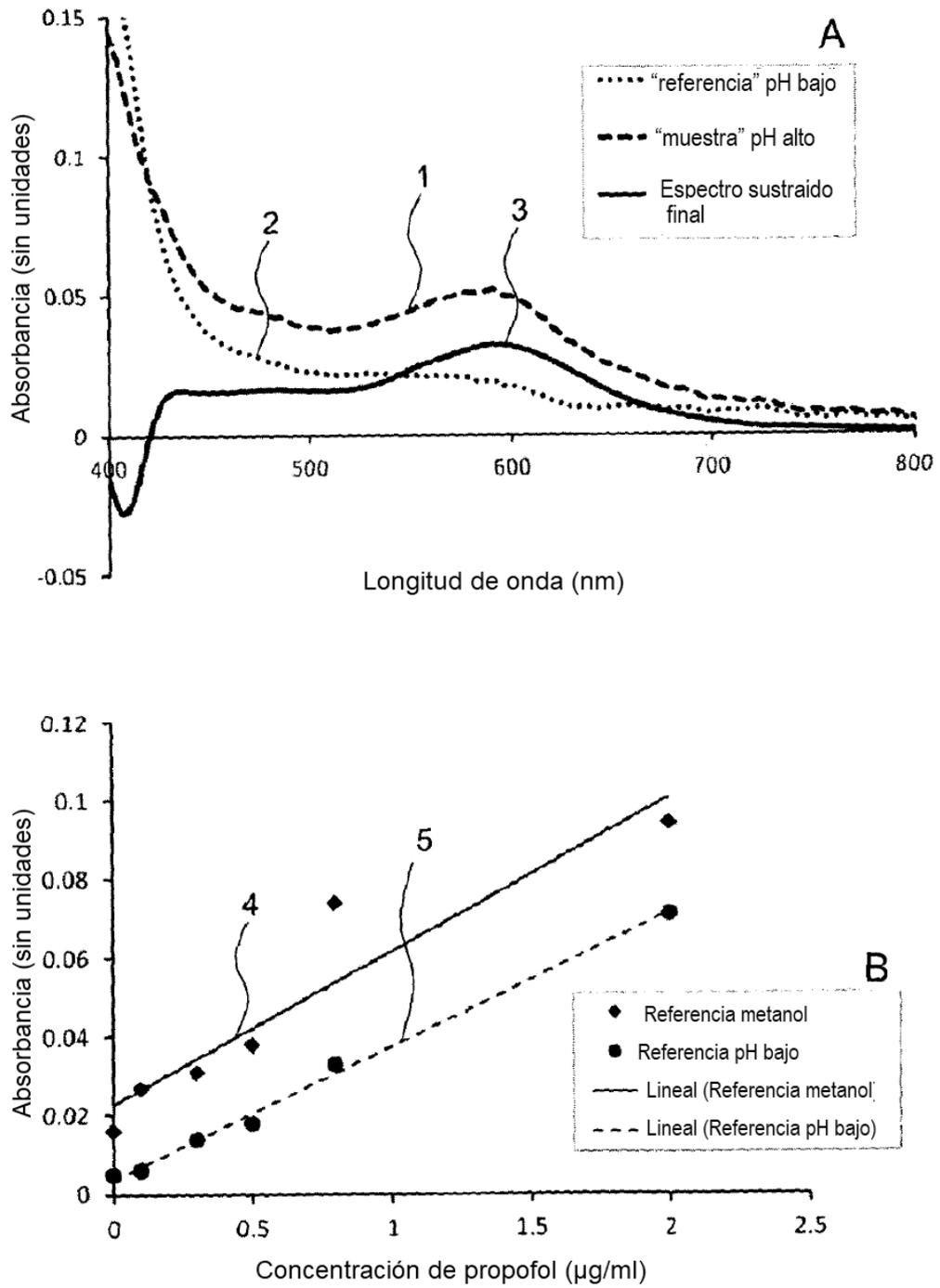


FIG. 3