

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 737 417**

51 Int. Cl.:

G01N 31/22 (2006.01)

C07D 487/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.04.2012** **E 17153308 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2019** **EP 3179246**

54 Título: **Composición de reactivo de litio para determinar la cantidad de ion de litio**

30 Prioridad:

06.04.2012 JP 2012087928

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

14.01.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

IWABUCHI, TAKUYA y
ODASHIMA, TSUGIKATSU

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 737 417 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composición de reactivo de litio para determinar la cantidad de ion de litio.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a una composición de reactivo usada en la medición cuantitativa de litio en una solución acuosa tal como muestras biológicas y muestras de líquidos ambientales.

10 **Técnica anterior**

Se conoce que los medicamentos que contienen litio son eficaces en la estabilización de los sentimientos y la depresión, de modo que se usan ampliamente como fármacos estabilizadores de los sentimientos y antidepresivos. En general, se prescriben comprimidos de carbonato de litio (para administración oral) como un estabilizador de los sentimientos así como un fármaco para el trastorno bipolar (psicosis circulatoria) o un fármaco antidepresivo.

15 Sin embargo, cuando dicho fármaco que contiene litio se administra a pacientes, es necesario controlar o ajustar la concentración de litio en suero dentro de un intervalo apropiado. De hecho, el carbonato de litio (Li_2CO_3) tiene una característica tal que el efecto de su administración se presenta solo cuando la concentración de litio en la sangre llega a casi un "nivel de intoxicación por litio". En otras palabras, cuando se administra el fármaco, el control terapéutico del fármaco (CTF) es indispensable para controlar la concentración de litio en la sangre, ya que el intervalo terapéutico está muy cerca del nivel tóxico.

20 En la práctica, es necesario controlar o limitar la concentración de litio en una muestra de sangre de un paciente dentro de un intervalo limitado de 0,6 a 1,2 mEq/l en general. De hecho, cuando la concentración de litio en el suero es más baja de 0,6 mEq/l, no se espera un efecto antidepresivo. Por el contrario, la administración en exceso por encima de 1,5 mEq/l de la concentración en plasma dará como resultado la intoxicación por litio. La sobredosis da como resultado una causa mortal de síntomas de intoxicación, que incluyen temblor, alalia, nistagmo, alteraciones renales y convulsiones. Por lo tanto, cuando se observa un signo de síntomas latentes peligrosos de intoxicación por litio, el tratamiento con dicho fármaco que contiene litio se debe interrumpir y la concentración en plasma se debe volver a medir para tomar una medición necesaria y aliviar la intoxicación por litio.

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

30 Se han desarrollado varias composiciones de reactivos líquidos que permiten la determinación colorimétrica de litio para la prueba de laboratorio clínico.

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

35 El documento de patente 2 divulga un reactivo analítico que reacciona con el 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.

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

Lista de técnicas anteriores

Documento de patente 1 JP-A1-7-113807

Documento de patente 2 EP 1283986-B1

Documento no de 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"

Resumen de la invención

Problemas que debe resolver la invención

65 Sin embargo, las composiciones de reactivos de litio conocidas tienen tales desventajas o problemas que son composiciones tóxicas, que las sustancias farmacéuticas son caras o no se suministran de forma estable, y que la

mayoría de las sustancias farmacéuticas no se disuelven en agua o, aunque sean solubles, se desactivan en agua, de modo que la reacción de coloración es muy lenta.

El documento no de patente 1 mencionado anteriormente fue desarrollado para resolver los problemas anteriores y permite el uso de una técnica de revelado de color. Sin embargo, el procedimiento de este documento no de patente 1 requiere una operación de dilución de una muestra, ya que la sensibilidad es demasiado alta y la especificación de la composición de reactivo de litio requiere un intervalo de pH superior a 11, de modo que se deteriora fácilmente con el CO₂ en el aire y, por tanto, los datos medidos no son estables. Todavía más, no está disponible una solución acuosa concentrada distinta de las de hidróxido de sodio y de hidróxido de potasio para un intervalo de pH superior a 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. Su almacenamiento requiere recipientes especiales y se requiere un equipo o instalación especial a mayor escala para su manipulación. Por lo tanto, esta tecnología es difícil de aplicar a la monitorización en el sitio y a las PLAP (pruebas en el lugar de asistencia al paciente)

La composición de reactivo para medir la cantidad de litio divulgada en el documento de 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 pH superior a 11, no hay ninguna solución acuosa concentrada en la práctica que no sea la de hidróxido de sodio y la de hidróxido de potasio, que son sustancias peligrosas que son difíciles de manipular y se requiere una instalación o equipo especial a mayor escala para su suplemento.

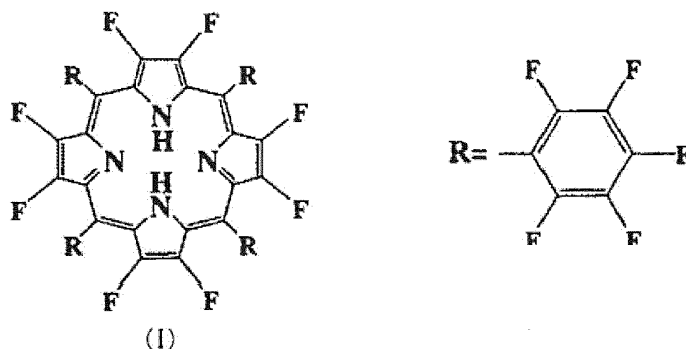
El documento de Koyanagi *et al.*, del documento no de patente 1, enseña que el ion de litio se puede separar y detectar usando tetrafenilporfirina F28. Sin embargo, es necesaria la extracción con cloroformo tóxico aceitoso para realizar la separación y detección del ion de litio. De hecho, la determinación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

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

La presente invención se realizó para resolver el problema y proporciona una composición de reactivo usada en la medición cuantitativa de litio (concentración) en soluciones acuosas tal como muestras biológicas y muestras de líquidos ambientales. La presente invención permite medir la concentración de litio con rapidez o de inmediato usando el colorímetro convencional. La presente invención también proporciona una composición de reactivo de litio que se puede usar para cribado mediante observación visual.

Medios para resolver los problemas

Un objeto de la presente invención es una composición de reactivo para litio ("composición de reactivo de litio" en lo sucesivo), caracterizada por que comprende un compuesto que tiene una estructura representada por la fórmula (I):



en la que todos los hidrógenos unidos a los carbonos de una tetrafenilporfirina están reemplazados por flúor, un disolvente orgánico soluble en agua y un modificador del pH.

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

El cambio de color de amarillo a rojo por una reacción de coloración que se observa entre un compuesto de tetrafenilporfirina F28 e iones de litio es difícil de realizar. Sin embargo, lo que se solicita es determinar con precisión

una cantidad de litio en suero en el intervalo de 0,6 mg/dl a 2,0 mg/dl (0,9 mM a 3 mM). Los autores de la invención descubrieron el hecho de que la cantidad de litio en suero se puede determinar con precisión fijando una concentración del compuesto de tetrafenilporfirina F28 en un intervalo de 0,1 a 1,0 g/l, preferentemente 0,5 g/l en un modo de realización de la presente invención.

El modificador de pH se usa en la presente invención. De hecho, en un lado ácido más bajo que un pH 5,0, el compuesto de tetrafenilporfirina F28 que es un revelador de color (reactivo quelante) de acuerdo con la presente invención no se une al ion de litio, de modo que no se observa cambio de coloración y es difícil determinar la cantidad de litio. En un intervalo entre pH 5 y pH 7, se produce una reacción específica entre el revelador de color y el ion de litio, pero la velocidad de la reacción de coloración es lenta. En un intervalo entre pH 8 y pH 11, el revelador de color reacciona con el ion de litio con rapidez y se puede formar un complejo de coloración estable. En el lado alcalino de pH más alto de 11, un tono de color del reactivo quelante y del complejo de coloración formado se vuelve inestable con el tiempo. Esto puede estar causado por la absorción de dióxido de carbono en el aire, de modo que el pH fluctúa. Por lo tanto, es necesario usar un modificador de pH o un tampón de pH que pueda mantener el pH de la composición de reactivo de litio de acuerdo con la presente invención en un intervalo de pH 5 a pH 12, preferentemente de pH 7 a pH 12, más preferentemente de pH 8 a pH 11.

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

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

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

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

El estabilizador puede ser un tensioactivo no iónico o un tensioactivo aniónico. El tensioactivo no iónico puede ser éster de ácido graso de sorbitán, éster parcial de ácido graso de pentaeritritol, éster de ácido monograso de propilenglicol, monoéster de ácido graso de glicerina, éter alquílico de polioxietileno, éter alquilfenílico de polioxietileno, polioxietileno polioxipropilenglicol, éster parcial de ácido graso de polioxietileno, éster parcial de ácido graso de polioxietileno sorbitol, éster de ácido graso de polioxietileno, dietanolamida de ácido graso, etanolamida de ácido graso, amida de ácido graso de polioxietileno, éter octilfenílico de polioxietileno (Triton X-100®), p-nonilfenoxi poliglicidol o sus sales. Los tensioactivos no iónicos preferentes son éter octilfenílico de polioxietileno (Triton X-100®) y p-nonilfenoxi poliglicidol.

El tensioactivo aniónico como estabilizador puede ser sal de éster de alquilsulfato, sal sulfato de éter alquílico de polioxietileno, sal sulfato de éter fenílico de polioxietileno, sulfonato de alquilbenceno y sulfonato de alcano. El tensioactivo aniónico típico se selecciona de dodecil sulfato de sodio, dodecil benceno sulfonato de sodio y polioxietileno alquilfenil éter sulfato 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 perturbación causada por otros iones distintos de litio, que pueden estar presentes en la muestra, para inhibir la oxidación de la composición de reactivo y mejorar la estabilidad de almacenamiento. El reactivo de enmascaramiento puede no ser necesario si existen 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'*-tetrakis(2-piridilmetil)etilendiamina (TPEN), piridina, 2,2-bipiridina, propilendiamina, dimetilentriammina, ácido dimetilentriammina-*N,N,N',N',N''*-pentaacético (DTPA), trimetilentetramina, ácido trimetilentetramina-*N,N,N',N',N'',N''*-hexaacético

(TTHA), 1,10-fenantrolina, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido *O,O'*-bis(2-aminofenil)etilenglicol-*N,N',N'*-tetraacético (BAPTA), *N,N*-bis(2-hidroxietil)glicina (Bicina), *trans*-1,2-diaminociclohexano-*N,N,N',N'*-tetraacético (CyDTA), ácido *O,O'*-bis(2-aminoetil)etilenglicol-*N,N,N',N'*-tetraacético (EGTA), ácido *N*-(2-hidroxil)iminodiacético (HIDA), ácido iminodiacético (IDA), ácido nitrilotriacético (NTA), trimetilfosfonato de nitrilo (NTPO) y sus sales. Se usa preferentemente trietanolamina.

La composición de reactivo de litio de acuerdo con la presente invención puede incluir antisépticos para evitar la degradación causada por microorganismos. Los antisépticos no están limitados especialmente 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 normalmente se prescriben para productos que se almacenan durante un plazo más prolongado.

Para garantizar un almacenamiento a largo plazo, 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 la reivindicación 1. Por ejemplo, un primer reactivo comprende el estabilizador y el modificador de pH o el tampón de pH, mientras que un segundo reactivo comprende el compuesto de tetrafenilporfirina, un disolvente orgánico miscible en agua, un estabilizador y un modificador de pH o un tampón de pH.

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

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

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

Ventajas de la invención

La composición de reactivo de litio de acuerdo con la presente invención y el procedimiento y dispositivo para medir iones de litio permiten determinar o medir la concentración de litio en una solución acuosa tal como una muestra ambiental y una muestra biológica fácilmente. En la composición de reactivo de litio definida en las reivindicaciones 1 a 13, la curva de calibración de la concentración de litio es lineal en un intervalo práctico de 0,6 a 1,2 mEq/l, de modo que la concentración se puede calcular mediante una operación simple a partir de valores numéricos del colorímetro y del espectrofotómetro de luz visible-ultravioleta. Por lo tanto, la concentración de litio en una muestra de suero o una muestra biológica se puede determinar con rapidez y de forma cuantitativa mediante el espectrofotómetro habitual. Los datos resultantes se pueden usar como un índice de gestión en el tratamiento con CTF, por ejemplo. O bien, la determinación cuantitativa de un mayor número de muestras se puede realizar en poco tiempo mediante un analizador automático de bioquímica clínica.

En la presente invención, la composición de reactivo de litio se ajusta a un intervalo de pH de desde pH 5 dentro de pH 12 para permitir la medición por espectrometría. En un intervalo ácido inferior a pH 5, el reactivo quelante de acuerdo con la presente invención (tetrafenilporfirina F28 litio) no se une a los iones de helio, por lo que no se observa un cambio en el color que dependa de la concentración de litio. Por el contrario, en un lado alcalino de más de pH 12, un tono de color del reactivo quelante y del complejo colorante formado no es estable. La estabilidad del tono de color se vuelve deficiente debido a la absorción de dióxido de carbono en el aire, que es una causa de la fluctuación del pH. En el intervalo de pH de pH 5 a pH 7, se puede observar la coloración específica del reactivo quelante, ya que el reactivo quelante se une a los iones de litio, pero la velocidad de coloración es demasiado lenta. Por lo tanto, el intervalo de pH de pH 8 a pH 11 es preferente, ya que, en el intervalo de pH de pH 8 a pH 11, los reactivos quelantes se unen con rapidez al ion de litio y la reacción de coloración es específica y estable.

El complejo metálico de tetrafenilporfirina posee un intervalo de espectro específico típico en la proximidad de 380 nm a 460 nm llamado "banda de Soret" en la que se obtiene la máxima sensibilidad. Este intervalo se puede seleccionar como un intervalo de longitud de onda de medición. Sin embargo, la sensibilidad en este intervalo es demasiado alta para una concentración de litio que tenga importancia clínica en una muestra de suero, de modo

que la operación de dilución es necesaria, lo que da como resultado un aumento de operaciones complicadas y de unidades adicionales para dilución, lo que incrementa un tamaño de la unidad de medición.

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

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

En el procedimiento convencional para medir el litio, se requería un aparato de propósito único a gran escala. En la presente invención, la concentración de litio se puede determinar mediante un pequeño colorímetro portátil y se puede construir como un kit de PLAP.

Breve descripción de los dibujos

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

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

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

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

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

[Fig. 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.

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

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

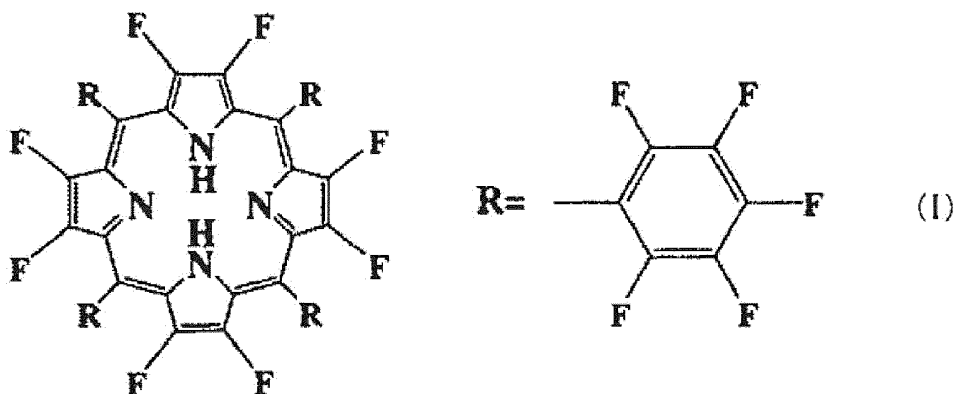
[Fig. 9] [Tabla 3] que muestra los valores medidos obtenidos por diferentes disolventes orgánicos de acuerdo con la presente invención.

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

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

Modo de realización de la invención

Los autores de la invención estudiaron composiciones de reactivos de litio que se pueden usar para medir una concentración de litio en suero y plasma sanguíneo de manera cuantitativa y más simple, y se centraron en un compuesto representado por la fórmula general (I):



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

Los documentos de patente 2 y 3 divulgan composiciones de reactivo de litio similares que comprenden un compuesto macrocíclico que tiene anillos de pirrol en el que ocho átomos de bromo (Br) se une en la posición β del anillo de pirrol, para proporcionar un reactivo analítico que puede reaccionar con iones de litio. Sin embargo, es difícil hacer reaccionar este compuesto con litio si el pH no está en un lado alcalino por encima de pH 11.

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

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

EJEMPLOS

Ejemplo 1 (Muestra 1)

En este ejemplo 1, se prepararon en primer lugar 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 del primer 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 mezclador, es recomendable almacenarlos por separado y mezclarlos justo antes de la operación de medición para evitar el deterioro de los reactivos durante un largo período de tiempo de almacenamiento.

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

Para empezar, se prepara el primer reactivo (solución de tampón de pH). Los siguientes son la composición del primer reactivo.

(1) Primer reactivo (como estabilizador y solución de tampón):

- | | |
|--|---|
| - reactivo quelante: | ninguno |
| - disolvente orgánico; | ninguno |
| - estabilizador (dispersante: tensioactivo no iónico): | Un 1,0 % en peso de TritonX-100® (éter octilfenílico de polioxietileno) |
| - reactivo de enmascaramiento: | 10 mM de trietanolamina |

A una mezcla de los componentes anteriores, se le añadió un 7 % en peso de cloruro de amonio para ajustar a pH 10. A continuación, se incrementó el volumen total a 1 litro con agua purificada y se almacenó en un recipiente de almacenamiento habitual. Si una proporción de TritonX-100® (éter octilfenílico de polioxietileno) más baja de un 1,0 % en peso, se puede producir turbidez en algunos casos. Por el contrario, si se usa un exceso de estabilizador, se generará espuma en un recipiente del reactor. Dicha turbidez o formación puede influir en la reproducibilidad de la medición, de modo que es preferente un intervalo de intervalo de un 0,1 a un 5,0 % en peso y es más preferentemente un 1,0 % en peso. En este ejemplo, el reactivo de enmascaramiento es 10 mM de trietanolamina. Si la cantidad de reactivo de enmascaramiento es pequeña, no se obtendrá un efecto de enmascaramiento

satisfactorio en muestras que contengan un exceso de iones extraños distintos de litio. Por el contrario, el exceso de reactivo de enmascaramiento enmascarará el ion de litio en sí mismo, lo que dará como resultado errores en la medición. Por lo tanto, un intervalo de 1,0 a 100 mM es preferente y 10 mM es más preferente. El segundo reactivo (solución de reactivo de revelado de color) se produce como sigue.

5

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

- reactivo quelante: 0,5 g/l de tetrafenilporfirina F28
- disolvente orgánico; un 20 % en peso de dimetilsulfóxido (DMSO)
- estabilizador (dispersante: ® tensioactivo no iónico): un 1,0 % en peso de TritonX-100 (éter octilfenílico de polioxietileno)
- reactivo de enmascaramiento: 10 mM de trietanolamina

10

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

15

En el ejemplo 1, la reacción de revelado de color del compuesto de tetrafenilporfirina F28 es difícil. Sin embargo, en la prueba de laboratorio clínico práctica para medir la concentración de litio en suero, se requiere la exactitud en un intervalo de concentración de litio de 0,6 mM a 3 mM. El autor de la invención descubrió que la medición precisa se puede hacer seleccionando la concentración de compuesto de tetrafenilporfirina F28 a 0,1 a 1,0 g/l, preferentemente 0,5 g/l.

20

En el intervalo de concentración de litio de 0,6 mM a 3 mM, la medición del litio se puede realizar de forma ventajosa fijando la concentración de tetrafenilporfirina F28 en la composición de reactivo final en 0,1 a 1,0 g/l, preferentemente 0,5 g/l. Si la concentración es más baja que el límite anterior, una reacción entre la tetrafenilporfirina F28 y el ion de litio no se realiza de manera suficiente. Por el contrario, si la concentración supera el límite anterior, se producirá otro problema de aumento de la absorbancia de un blanco de compuesto de tetrafenilporfirina F28. Por lo tanto, se usa preferentemente la concentración de 0,5 g/l.

25

En más detalle, la reacción entre la tetrafenilporfirina F28 y el ion de litio es una reacción de igual proporción molar de 1:1 para formar un complejo de quelato. Cuando se hace reaccionar una muestra problema 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 más alta de 0,02 mM para que la reacción se realice de manera suficiente (ni demasiada cantidad ni demasiada poca).

30

En la reacción de formación de complejo (reacción de coloración) entre un reactivo quelante y los iones metálicos, es necesario en general usar el reactivo quelante (tetrafenilporfirina F28) en una cantidad de desde igual en moles a diez veces los moles con respecto a un reactivo o a una materia que se va a someter a prueba (litio). Como se muestra en la fig. 1, que muestra las concentraciones óptimas de tetrafenilporfirina F28, la composición del reactivo se prepara de tal manera que la concentración de tetrafenilporfirina F28 durante el tiempo de reacción pase de ser igual en moles 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 en la reacción de medición de una cantidad añadida de la composición de reactivo y de una cantidad de muestra que se va a someter a prueba depende del aparato de medición y los umbrales deseados y varían. Por ejemplo, en el caso de un aparato de medición cuya exactitud de medición no sea tan alta, la cantidad de muestra se puede incrementar de dos a cinco veces la del ejemplo 1. Para prepararse para dichos casos, es aconsejable usar la concentración de 0,5 g/l (5 veces) de la composición de reactivo, que es una cantidad suficiente de reactivo para la reacción. Una cantidad en exceso más alta de 10 veces no tiene ninguna ventaja porque una mayor cantidad de reactivo puede no ser una ventaja significativa en la cinética de la reacción de coloración, sino más bien incrementar el problema de la elevación del nivel del blanco.

35

40

45

50

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

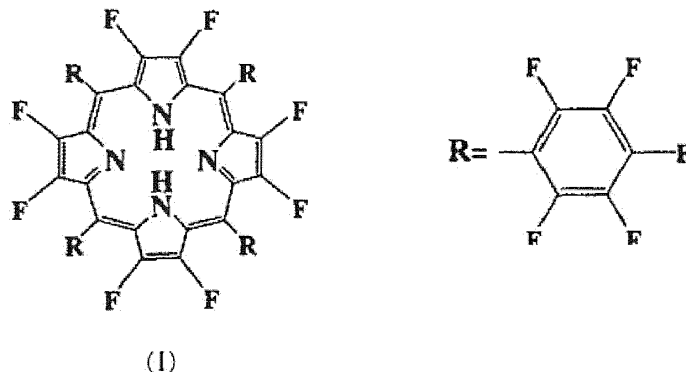
55

En el ejemplo 1, la concentración de tetrafenilporfirina F28 es 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 hasta el nivel mínimo de blanco.

Una cantidad de dimetilsulfóxido (DMSO) es de un 5 a un 30 % en peso. Cuando esta cantidad es más pequeña, la dispersión de tetrafenilporfirina F28 en una solución se vuelve deficiente. Por el contrario, si la cantidad en

exceso de dimetilsulfóxido da como resultado un incremento del disolvente orgánico en la composición del reactivo. Por lo tanto, una cantidad preferente es un 20 % en peso.

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



en la que todos los hidrógenos unidos a los carbonos de una tetrafenilporfirina están reemplazados por átomos de flúor. (3) Ahora, explicaremos cómo preparar una curva de calibración de la composición de reactivo de litio preparada mezclando el primer reactivo con el segundo reactivo para muestras cuyas concentraciones de litio son conocidas.

En el ejemplo 1, se añadieron 720 µl del primer reactivo (solución de tampón) y 240 µl del segundo reactivo (solución de reactivo de coloración) a 6 µl de una muestra. En este caso, el primer reactivo tiene una capacidad tamponante a pH 10. Después de que el primer y segundo reactivos y la muestra se mezclan, la mezcla resultante de un líquido problema tiene aproximadamente pH 10.

Por tanto, cuando la tetrafenilporfirina F28 de acuerdo con la presente invención se usa como un reactivo quelante, la reacción de revelado de color se puede llevar a cabo en un intervalo de pH de pH 5 a pH 10. De hecho, la presente invención proporciona un reactivo para la medición de litio que posee una potente acción tamponante del pH en un intervalo de pH más bajo de 10, de modo que se puede reducir la fluctuación de pH causada por la absorción de CO₂ en el aire. Además, por tanto, se puede evitar un efecto adverso en 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 del uso y añadir la mezcla resultante al mismo volumen de muestra. En este caso, se pueden añadir 940 µl de la mezcla líquida a 6 µl de una muestra.

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

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

La fig. 3, que muestra gráficos de las curvas de calibración a diferentes longitudes de onda, revela que 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 de proximidad de 530 nm a 560 nm que en los casos en que se usan longitudes de onda de la llamada banda de Soret. Por lo tanto, la concentración precisa se puede calcular fácilmente con un simple colorímetro o espectrofotómetro. Todavía aún, el cambio de color de amarillo a rojo es muy nítido, de modo que un nivel de concentración se puede detectar fácilmente a simple vista. En la técnica convencional, se necesita un aparato a gran escala para uso exclusivo para medir la concentración de litio, mientras que, en la presente invención, la concentración de litio se puede medir fácilmente mediante un colorímetro portátil o un espectrofotómetro de luz visual-ultravioleta que se usa ampliamente. La presente invención se puede construir en forma de un kit de PLAP.

En el gráfico de la fig. 3, se obtuvo una línea (●) en una longitud de onda de 550 nm que se usó en el ejemplo 1, mientras que otras dos tallas se obtuvieron en longitudes de onda de 405 nm (*) y 415 nm (x) que corresponden a las longitudes de onda de la banda de Soret cuando se repitió el mismo procedimiento que en el ejemplo 1. Sin

embargo, en los casos de 405 nm (*) y 415 nm (x), la medición se llevó a cabo después de que las muestras se diluyeron 5 veces, ya que la sensibilidad era demasiado alta. La fig. 3 revela que se puede obtener una curva de calibración que tenga una buena linealidad para la longitud de onda de 550 nm del ejemplo I, pero las curvas de calibración de las longitudes de onda de 405 nm y 415 nm no son lineales.

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

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

En un caso tan raro que algunos contaminantes que interfieren en la longitud de onda de 550 nm se producen en una muestra de un paciente y se producen datos erróneos en 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 longitud de onda de medición de fotometría para evitar dicho problema y para calcular la concentración de litio a partir de una disminución en la sensibilidad como una diferencia en la absorbancia.

Ahora, explicaremos los datos experimentales del ejemplo 1 que muestran que la concentración de litio se puede medir con alta exactitud con la composición de reactivo de litio de acuerdo con la presente invención.

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

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

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

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

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

Comparación de los valores medidos llevada a cabo mediante análisis automático para muestras séricas de control

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

- Precinorm U (Roche)
- Precipath U (Roche)
- Pathonorm H (SERO AS)

- Auto norm (SERO AS)

usando un analizador automatizado de bioquímica (HITACHI, modelo H-7700) en una longitud de onda de medición de fotometría de 546 nm (que es una longitud de onda establecida en este analizador y está cerca de 550 nm) por el procedimiento de 1 punto final.

Parámetros del dispositivo:

Reactivo:	0,24 ml
Muestra	0,005 ml
Longitud de onda de fotometría (principal/sub):	546 nm/700 nm
Tiempo de medición:	10 minutos
Temperatura;	37 °C
1 punto final:	procedimiento creciente

Los resultados mostrados en la [Tabla 1] de la fig. 6 demuestran 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 los sueros se puede medir satisfactoriamente con un analizador automatizado para pruebas clínicas.

Detección de litio por observación visual.

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

El cambio claro en el color del amarillo al rojo se confirmó en los niveles de concentración respectivos y el cambio en el color de los sueros de control coincide con la guía de color de los sueros de control. A partir de este hecho, se demostró o confirmó que la concentración de litio en el suero se puede determinar rápida y fácilmente sin usar equipos específicos de acuerdo con la presente invención.

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

Ejemplo 2

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

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

Reactivo quelante:	ninguno
Disolvente orgánico:	ninguno
Estabilizador (dispersante tensioactivo no iónico):	TritonX-100 a
	Éter octilfenílico de polioxietileno: un 1,0 % en peso
Agente de enmascaramiento:	trietanolamina: 10 mM,

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

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

Reactivo quelante:	tetrafenilporfirina F28: 0,5 g/l
Disolvente orgánico:	Dimetilsulfóxido (DMSO): 20 % en peso

Estabilizador (dispersante, tensioactivo no iónico): TritonX-100 a (éter octilfenílico de polioxietileno) un 1,0 % en peso

Agente de enmascaramiento: trietanolamina 10 mM

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

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

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

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

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

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

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

Ejemplo 3

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

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

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

- Reactivo quelante: ninguno
- Disolvente orgánico: ninguno
- Estabilizador (dispersante: tensioactivo no iónico): TritonX-100® (éter octilfenílico de polioxietileno) un 1,0 % en peso
- Reactivo de enmascaramiento: trietanolamina 10 mM,

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

5

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

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

10

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

Ejemplo 4

15

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

20

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

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

- Reactivo quelante: ninguno
- Disolvente orgánico: ninguno
- Estabilizador (dispersante: tensioactivo no iónico): TritonX-100® (éter octilfenílico de polioxietileno) un 1,0 % en peso
- Reactivo de enmascaramiento: trietanolamina 10 mM,

25

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

30

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

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

35

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

40

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

45

La [Tabla 3] de la fig. 9 que muestra la "Comparación entre diferentes disolventes orgánicos" muestra los siguientes resultados: un valor medido obtenido usando dimetilformamida (DMF) (20 % en peso) como disolvente orgánico que es miscible con agua en el ejemplo 1 fue 0,83 mM (mmol/l); un valor medido obtenido usando dimetilformamida (DMF) (20 % en peso) como disolvente orgánico que es miscible con agua en el ejemplo 3 fue 0,82 mM (mmol/l); y un valor medido obtenido usando dimetilacetamida (DMA) (20 % en peso) como disolvente orgánico que es

miscible con agua en el ejemplo 4 fue 0,81 mM (mmol/l). Estos valores coinciden en más de un 95 % con un valor medido obtenido por espectrofotometría de absorción atómica 0,82 mM (mmol/l). Por lo tanto, es posible determinar cuantitativamente y con exactitud la concentración de litio en muestras acuosas tales como suero dispersando tetrafenilporfirina F28 uniformemente en estos disolventes orgánicos para preparar la composición de reactivo líquido de acuerdo con la presente invención.

Ejemplo 5

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

El uso de estabilizadores para las composiciones de reactivo de litio en los ejemplos 5 a 7 es básicamente igual al ejemplo 1, pero el estabilizador se cambió a tensioactivo no iónico solo (ejemplo 5), tensioactivo aniónico (ejemplo 6) y tanto tensioactivo no iónico como tensioactivo aniónico (ejemplo 7), respectivamente.

En el siguiente ejemplo 5, la composición de reactivo de litio contiene solo tensioactivo no iónico (TritonX-100®) (éter octilfenílico de polioxietileno) como estabilizador. Otros componentes en la composición del reactivo de litio son los mismos que en el ejemplo 1.

Ejemplo 5

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

- Reactivo quelante: ninguno
- Disolvente orgánico: ninguno
- Estabilizador (dispersante: tensioactivo no iónico): TritonX-100® (éter octilfenílico de polioxietileno) un 1,0 % en peso
- Reactivo de enmascaramiento: trietanolamina 10 mM

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

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

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

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

Ejemplo 6

En el ejemplo 6, la composición contiene solo tensioactivo aniónico (dodecil sulfato de sodio (Wako Junyaku)).

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

- Reactivo quelante: ninguno
- Disolvente orgánico: ninguno
- Estabilizador (dispersante: solo tensioactivo dodecil sulfato de sodio (Wako Junyaku) un 1,0 % en peso aniónico):
- Reactivo de enmascaramiento: trietanolamina 10 mM,

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

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

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

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

Ejemplo 7

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

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

- Reactivo quelante: ninguno
- Disolvente orgánico: ninguno
- Estabilizador (dispersante: tensioactivo no iónico y tensioactivo aniónico):
 - (a) tensioactivo no iónico TritonX-100® (éter octilfenílico de polioxietileno) un 1,0 % en peso
 - (b) tensioactivo aniónico: dodecil sulfato de sodio (Wako Junyaku) un 1,0 % en peso
- Reactivo de enmascaramiento: trietanolamina 10 mM,

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5 **Ejemplo 8**

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

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

- Reactivo quelante: ninguno
- Disolvente orgánico: ninguno
- Estabilizador (dispersante: tensioactivo no iónico): TritonX-100® (éter octilfenílico de polioxietileno) un 1,0 % en peso
- Reactivo de enmascaramiento: ácido etilendiaminotetraacético 10 mM (EDTA 2K) (Dojin Chemical)

15 A una mezcla de los componentes anteriores, se le añadió un 7 % en peso de cloruro de amonio para ajustar el pH a pH10 y se le añadió agua purificada hasta el volumen total de 1 litro, que se almacenó en un recipiente de propósito general.

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

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

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

25 **Ejemplo 9**

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

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

- Reactivo quelante: ninguno
- Disolvente orgánico: ninguno
- Estabilizador (dispersante: tensioactivo no iónico): TritonX-100® (éter octilfenílico de polioxietileno): un 1,0 % en peso
- Reactivo de enmascaramiento: trietanolamina 10 mM

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

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

- Reactivo quelante: tetrafenilporfirina F28: 0,5 g/l
- Disolvente orgánico: Dimetilsulfóxido (DMSO): 20% en peso
- Estabilizador: TritonX-100® (éter octilfenílico de polioxietileno) un 1,0 % en peso
- Reactivo de enmascaramiento:

- trietanolamina: 10 mM
- ácido etilendiaminotetraacético (EDTA 2K) (Dojin Chemical): 0,1 mM

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

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

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

15 Este resultado muestra que se pueden obtener casi los mismos valores medidos independientemente del tipo de agente de enmascaramiento usado o su combinación. Por lo tanto, se pueden usar agentes de enmascaramiento adecuados para evitar la degradación del reactivo causada por iones metálicos traza que pueden estar contenidos en un reactivo almacenado. El agente de enmascaramiento se puede usar para una muestra problema que contiene iones de inclusión en exceso

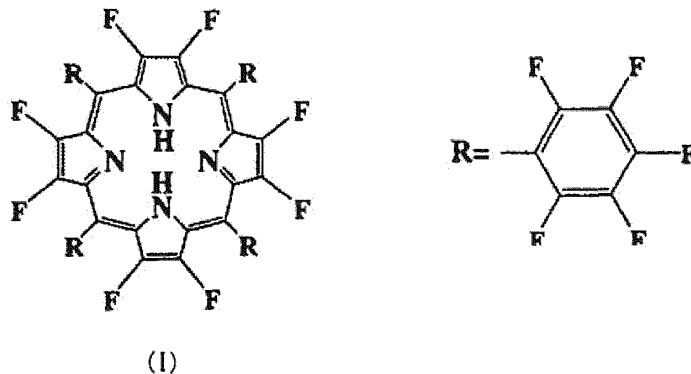
20 Como se explicó anteriormente en los ejemplos de acuerdo con la presente invención, la concentración de litio en una solución acuosa tal como una muestra ambiental y una muestra biológica se puede determinar con el colorímetro conveniente y se puede juzgar de inmediato mediante observación visual.

25 El alcance de la presente invención no debe limitarse a los ejemplos, sino que se define mediante las reivindicaciones. Los detalles de los ejemplos se pueden cambiar, alterar y modificar siempre que la característica de la presente invención no se vea afectada. Por ejemplo, en los ejemplos 1-9, la composición del reactivo para determinar la concentración de litio se divide en dos reactivos del primero y segundo reactivos por separado para almacenar la composición de reactivo por más tiempo. Sin embargo, si la medición se lleva a cabo en un período corto, el primer reactivo y el segundo reactivo se pueden mezclar desde el principio y la mezcla resultante se usa en la medición.

30

REIVINDICACIONES

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



en la que todos los hidrógenos unidos a los carbonos de una tetrafenilporfirina están reemplazados por átomos de flúor, un disolvente orgánico miscible en agua elegido de dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF) y dimetilacetamida (DMA), y un modificador de pH para ajustar el pH a un intervalo de pH 5 a pH 12.

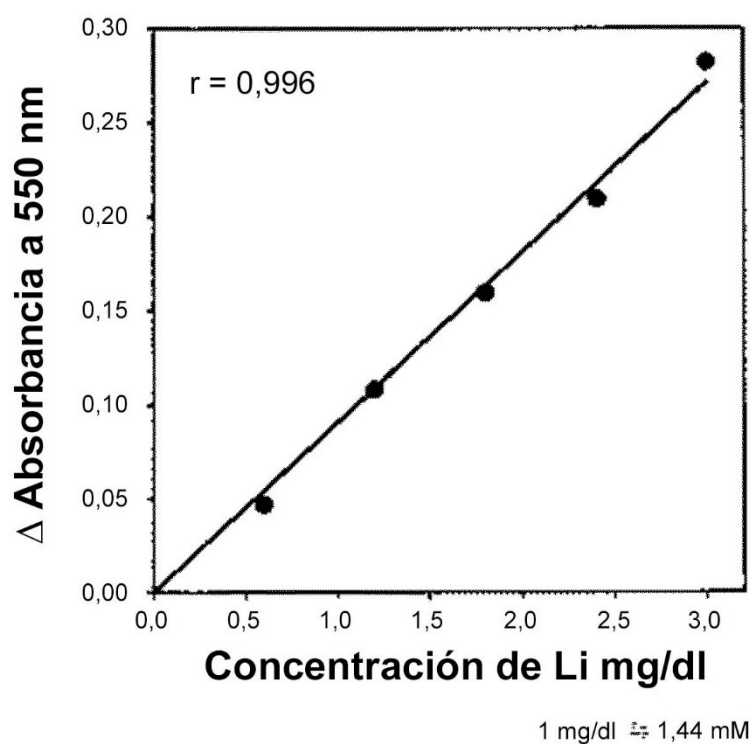
2. La composición de reactivo de litio de la reivindicación 1, en la que dicho modificador de pH se selecciona de ácidos que incluyen ácido clorhídrico, ácido nítrico, ácido acético, ácido fosfórico, ácido cítrico, ácido carbónico, ácido bicarbónico, ácido oxálico y sus sales, medicamento alcalino que incluye hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, amoníaco y sus sales.
3. La composición de reactivo de litio de la reivindicación 1, en la que dicho modificador de pH es un tampón de pH.
4. La composición de reactivo de litio de la reivindicación 3, en la que dicho tampón de pH se selecciona de ácido cítrico, ácido carbónico, ácido bicarbónico, ácido fosfórico, ácido succínico, ácido ftálico, cloruro de amonio, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, MES como tampón de Good, Bis-Tris, ADA, PIPES, ACES, MOPSO, BES, MOPS, TES, HEPES, DIPSO, TAPSO, POPSO, HEPPSO, EPPS, Tricina, Bicina, TAPS, CHES, CAPSO, CAPS y sus sales.
5. La composición de reactivo de litio de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la composición de reactivo desarrolla una reacción colorimétrica para el litio en un intervalo de pH 5 a pH 11.
6. La composición de reactivo de litio de la reivindicación 1, que incluye además un estabilizador.
7. La composición de reactivo de litio de la reivindicación 6, en la que dicho estabilizador es un tensioactivo no iónico y/o un tensioactivo aniónico.
8. La composición de reactivo de litio de acuerdo con la reivindicación 7, en la que dicho tensioactivo no iónico se selecciona de ésteres de ácido graso de sorbitán, ésteres parciales de ácido graso de pentaeritritol, ésteres de ácido graso de propilenglicol, monoéster de ácido graso de glicerina, éter alquílico de polioxietileno, éter alquilfenílico de polioxietileno, polioxietilen polioxipropilenglicol, ésteres parciales de ácido graso de polioxietileno, ésteres parciales de ácido graso de polioxietilen sorbitol, ésteres de ácido graso de polioxietileno, dietanolamida de ácidos grasos, monoetanolamida de ácidos grasos, amida de ácidos grasos de polioxietileno, éter octilfenílico de polioxietileno, p-nonilfenoxipoliglicidol y sus sales.
9. La composición de reactivo de litio de acuerdo con la reivindicación 7, en la que dicho tensioactivo aniónico es una sal de éster de alquilsulfato incluyendo dodecil sulfato de sodio, una sal sulfato de éter alquílico de polioxietileno incluyendo sulfato de éter alquilfenílico de polioxietileno de sodio, sales de alquilbencenosulfonato incluyendo dodecil benceno sulfonato de sodio y alcanosulfonato.
10. La composición de reactivo de litio de acuerdo con la reivindicación 1, que incluye además un reactivo de enmascaramiento.
11. La composición de reactivo de litio de acuerdo con la reivindicación 10, en la que dicho reactivo de enmascaramiento se elige de trietanolamina, etilendiamina, *N,N,N',N'*-tetrakis(2-piridilmetiletilendiamina (TPEN), piridina, 2,2-bipiridina, propilendiamina, dimetilentriamina, dimetilentriamina-*N,N,N',N',N''*-

5 pentaacetato (DTPA), trimetilentetramina, trimetilentetramina-*N,N,N',N'',N''',N'''*-hexaacetato (TTHA), 1,10-fenantrolina, etilendiaminotetraacetato (EDTA), *O,O'*-bis(2-aminofenil)etilenglicol-*N,N,N',N'*-tetraacetato (BAPTA), *N,N*-bis(2-hidroxietil)glicina (Bicina), *trans*-1,2-diaminociclohexano-*N,N,N',N'*-tetraacetato (CyDTA), *O,O'*-bis (2-aminoetil)etilenglicol-*N,N',N'*-tetraacetato (EGTA), *N*-(2-hidroxil)iminodiacetato (HIDA), ácido iminodiacético (IDA), ácido nitrilotriacético (NTA), tris-metilfosfonato de nitrilo (NTPO) y sus sales.

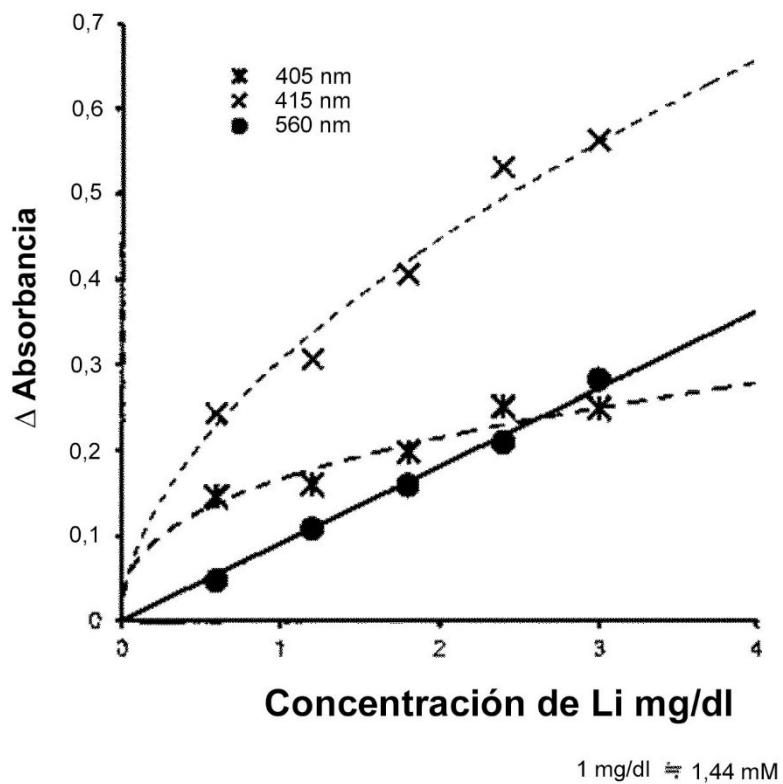
【Fig.1】

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

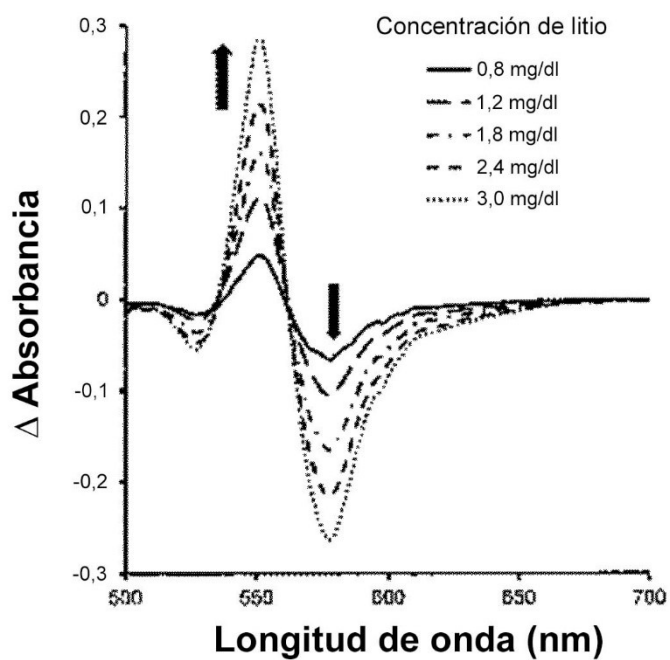
【Fig.2】



【Fig.3】

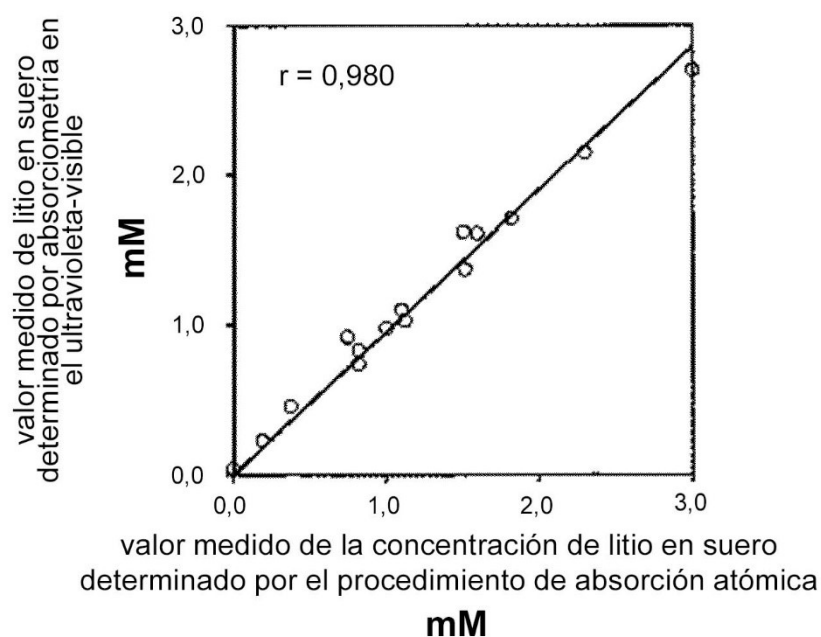


【Fig.4】



Cambio en el espectro de la formación
del complejo de tetrafenilporfirina F28

【Fig.5】



【Fig.6】

Tabla 1
Comparación con los valores medidos obtenidos por
análisis automático para muestra de suero control
Unidad: mM

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

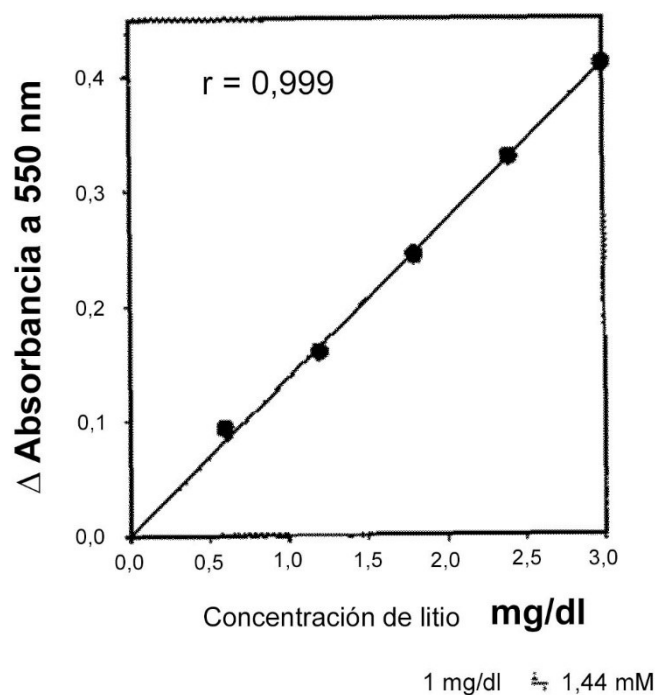
analizador automático: Analizador clínico Hitachi H-7700

【Fig.7】

Tabla 2
Detección de litio a simple vista

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

【Fig.8】



【Fig.9】

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

	Método de absorción atómica	Ejemplo 1 DMSO 20 % en peso	Ejemplo 3 DMF 20 % en peso	Ejemplo 4 DMA 20 % en peso
Muestra de suero	0,82	0,83	0,81	0,81

【Fig.10】

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

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

【Fig.11】

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

		Trietanol amina	EDTA 2K	Valor medido
Ejemplo 5	Muestra 1	(+)	(-)	0,83
Ejemplo 8	Muestra 2	(-)	(+)	0,83
Ejemplo 9	Muestra 3	(+)	(+)	0,82