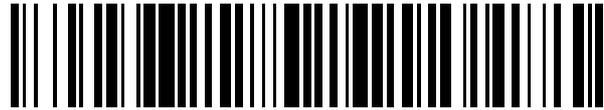


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 782 006**

51 Int. Cl.:

G01N 31/22 (2006.01)
G01N 21/78 (2006.01)
G01N 31/00 (2006.01)
G01N 33/84 (2006.01)
C07D 487/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.11.2014 PCT/JP2014/079806**
87 Fecha y número de publicación internacional: **18.06.2015 WO15087650**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.11.2014 E 14869109 (0)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.01.2020 EP 3081934**

54 Título: **Composición de reactivo de litio, y método y dispositivo para cuantificar iones de litio usando la misma**

30 Prioridad:

09.12.2013 JP 2013254196

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

09.09.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 782 006 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composición de reactivo de litio, y método y dispositivo para cuantificar iones de litio usando la misma

5 **Campo técnico**

Esta invención se refiere a una composición de reactivo usada en la medición cuantitativa de litio en disoluciones acuosas tales como muestras biológicas y muestras líquidas medioambientales, y a un método y dispositivo de medición para determinar la cantidad de ion de litio usando la composición de reactivo.

10

Antecedentes de la técnica

Se sabe que los fármacos que contienen litio son fármacos eficaces para la estabilización de los sentimientos y antidepresivos, de manera que se usan ampliamente como fármaco estabilizador de los sentimientos y antidepresivo.

15

Sin embargo, es necesario controlar la concentración de litio en suero dentro de un intervalo apropiado cuando el fármaco que contiene litio se administra a pacientes.

20

Como estabilizador de los sentimientos, los comprimidos de carbonato de litio (para administración oral) se prescriben generalmente junto con otro fármaco para el trastorno bipolar (psicosis circulatoria) o fármaco antidepresivo. El carbonato de litio (Li_2CO_3) tiene una característica tal que su efecto de administración se muestra sólo cuando la concentración de litio en la sangre alcanza casi el nivel de intoxicación por litio. Por tanto, la monitorización terapéutica del fármaco (MTF) se prescribe para monitorizar la concentración de litio en sangre cuando se administra el fármaco, debido a que el intervalo terapéutico está muy cerca del nivel tóxico.

25

En la práctica, es necesario controlar o limitar la concentración de litio en una muestra de sangre de un paciente dentro de un intervalo de desde 0,6 hasta 1,2 meq./l en general. De hecho, cuando la concentración de litio en suero es menor de 0,6 meq./l, no se espera efecto antidepresivo. Por el contrario, la administración en exceso por encima de 1,5 meq./l de concentración en plasma dará como resultado la intoxicación por litio. La sobredosis da como resultado una causa mortal del síntoma de intoxicación incluyendo temblor, alalia, nistagmo, trastorno renal y convulsión. Por tanto, cuando se observa un signo de síntoma latentemente peligroso de intoxicación, el tratamiento con fármacos que contienen litio debe pararse y es necesario volver a medir la concentración en plasma y tomar las medidas para mitigar la intoxicación por litio.

30

35

Por tanto, la sal de litio es un medicamento eficaz en el tratamiento de pacientes con depresión, pero la sobredosis del mismo da como resultado problemas graves. Por tanto, cuando se administra un fármaco antidepresivo que contiene litio, es indispensable monitorizar la concentración de litio en suero y garantizar que la concentración se mantiene siempre en un intervalo limitado de desde 0,6 hasta 1,2 meq./l.

40

Por tanto, se solicitó llevar a cabo la medición cuantitativa de litio en suero en el tratamiento de un paciente con depresión, y se han desarrollado varias composiciones de reactivo líquidas que permiten la determinación colorimétrica de litio para prueba de laboratorio clínico.

45

El documento patente 1 da a conocer una composición de reactivo usada para determinar la concentración de litio en una muestra biológica usando criptideinofa de cuerpo de color primario.

50

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

55

El documento no patente 1 da a conocer que pueden detectarse iones de litio por un compuesto en el que todos los hidrógenos unidos a carbonos de la tetrafenilporfirina se sustituyen con flúor.

60

Las composiciones de reactivo de litio conocidas, sin embargo, tienen tales deméritos o problemas que son composiciones tóxicas, que los principios activos son costosos o no se suministran de manera estable y que la mayoría de principios activos no se disuelve en agua o, incluso solubles, y se desactivan en agua, de manera que la reacción de coloración es muy lenta.

65

En el documento patente 2 que se desarrolló para resolver los problemas anteriores, puede usarse una técnica de desarrollo de color pero es necesario diluir las muestras ya que su sensibilidad es demasiado alta. Todavía más, esta composición de reactivo de litio requiere un intervalo de pH de por encima de 11 y, por tanto, tiende a deteriorarse con CO_2 en aire, de manera que los datos medidos resultantes no son estables. Todavía más, en un intervalo de por encima de pH 11, sólo pueden usarse hidróxido de sodio e hidróxido de potasio para preparar una disolución acuosa concentrada práctica y, realmente, no existen otros compuestos que puedan usarse, de manera que es difícil mantener un valor de pH constante. Todavía más, estas disoluciones acuosas concentradas son

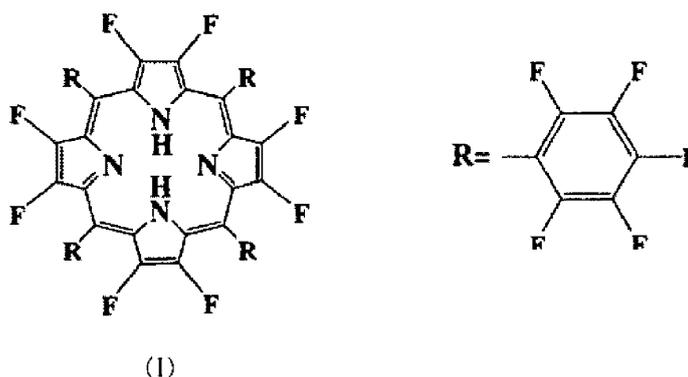
sustancias peligrosas que son difíciles de manejar, de manera que su uso debe evitarse. Debido a estos deméritos, es necesario un envase especial y se requiere un equipo o una instalación especial grande para su manejo, de manera que no son adecuados para usos generales. Por tanto, esta tecnología tiene tal problema que es difícil aplicarla en monitorización *in situ* y POCT (análisis de diagnóstico inmediato).

5 En el documento patente 1, un compuesto que es completamente diferente del compuesto de esta invención (que se explicará más adelante) se usa en una composición de reactivo para medir una cantidad de litio. El compuesto del documento patente 1 puede usarse sólo a pH 12. Tal como se indicó anteriormente, en un intervalo de por encima de pH 11, no hay otra disolución acuosa concentrada práctica que la de hidróxido de sodio y de hidróxido de potasio. Y, por tanto, la composición de reactivo del documento patente 1 no tiene versatilidad porque la disolución acuosa anterior es una sustancia peligrosa que es difícil de manejar y se requiere un equipo o una instalación especial grande en sus usos prácticos.

15 En el documento no patente 1, Koyanagi *et al.* dan a conocer que los iones de litio pueden separarse y detectarse usando tetrafenilporfirina F28. Sin embargo, la extracción de disolventes con cloroformo tóxico oleoso es necesaria para realizar la separación y detección de iones de litio. Sobre todo, la determinación directa de litio en una disolución acuosa no podría llevarse a cabo sin un tratamiento previo o manejo complicado.

20 Por tanto, existía un problema tal que los iones de litio en suero no pueden medirse rápida y cuantitativamente en un método práctico. De hecho, la medición cuantitativa de iones de litio en disoluciones acuosas usando tetrafenilporfirina F28 era difícil de realizar, de manera que la concentración de iones de litio no podía determinarse de manera cuantitativa en un método práctico.

25 Los presentes inventores desarrollaron en el documento patente 3 (patente japonesa n.º 5.222.432) una composición de reactivo para litio ("composición de reactivo de litio" más adelante), comprende un compuesto que tiene una estructura representada por la fórmula (I), como agente quelante:



30 en la que todos los hidrógenos unidos a carbonos de una tetrafenilporfirina se sustituyen con flúor, un disolvente orgánico soluble en agua, un modificador del pH y un estabilizador, y un método para medir litio usando la misma, de manera que la concentración de litio en muestras biológicas y muestras líquidas medioambientales puede medirse inmediata y cuantitativamente mediante el colorímetro o espectrofotómetro de luz ultravioleta-visible conveniente. Los presentes inventores proporcionaron también una composición de reactivo de litio que permite determinar la concentración de litio cuantitativamente y un método y aparato para medir ion de litio usando la misma.

Técnicas anteriores

Documentos patente

40 Documento patente 1: JP-A1-7-113807

Documento patente 2: EP1283986-B1

45 Documento patente 3: Patente japonesa n.º 5.222.432

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

50 Sumario de la invención

Problemas a resolver mediante la invención

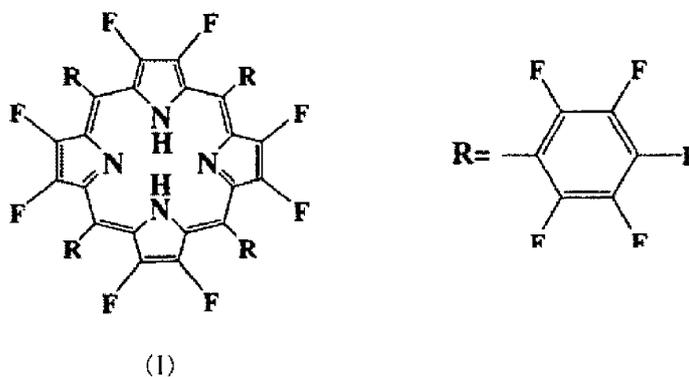
Tal como se indicó anteriormente, la invención del documento patente 3 permite medir litio en disoluciones acuosas tales como muestras biológicas y muestras líquidas medioambientales cuantitativa e inmediatamente usando un pequeño colorímetro y un espectrofotómetro de luz ultravioleta-visible. Por tanto, el documento patente 3 proporciona una composición de reactivo para efectuar la medición cuantitativa de litio a simple vista así como un método y un aparato para medir ion de litio usando la composición de reactivo que comprende un compuesto que tiene la estructura en la que todos los hidrógenos unidos a carbonos de una tetrafenilporfirina se sustituyen con flúor, como agente quelante añadido con un disolvente orgánico soluble en agua tal como dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF) y dimetilacetamida (DMA).

La invención del documento patente 3, sin embargo, tenía un problema que resolver. Concretamente, es recomendable evitar el uso del disolvente orgánico si es posible ya que el disolvente orgánico se absorbe a través de la piel, membrana mucosa y pulmón y sería un motivo de intoxicación o trastorno o proporcionaría efectos adversos en la salud. Y, para reducir las cargas en el medioambiente en la eliminación del disolvente orgánico, debe evitarse el uso del disolvente orgánico.

Por tanto, un problema que va a resolverse mediante la invención es proporcionar una composición de reactivo para litio ("composición de reactivo de litio") sin usar el disolvente orgánico tal como dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF) y dimetilacetamida (DMA). Por tanto, la presente invención proporciona una composición de reactivo de litio que comprende el compuesto que tiene la estructura anterior (I) en la que todos los hidrógenos unidos a carbonos de una tetrafenilporfirina se sustituyen con flúor para medir litio en disoluciones acuosas tales como muestras biológicas y en muestras líquidas medioambientales cuantitativa e inmediatamente usando un simple colorímetro o un espectrofotómetro de luz ultravioleta-visible. La presente invención proporciona también una composición de reactivo que permite la medición cuantitativa de litio a simple vista, así como un método y aparato para medir ion de litio usando la misma.

Medios para resolver los problemas

Para resolver el problema anterior, la presente invención proporciona una composición de reactivo de litio, caracterizada porque está en forma de una disolución acuosa que comprende un compuesto que tiene una estructura representada por la fórmula (I):



en la que todos los hidrógenos unidos a carbonos de una tetrafenilporfirina se sustituyen con átomos de flúor, mezclada con un compuesto orgánico básico seleccionado del grupo que comprende monoetanolamina, dietanolamina y trietanolamina, y un modificador del pH para ajustar el pH de la disolución mayor que pH 5.

En la presente invención, el litio en una disolución acuosa tal como una muestra biológica y una muestra medioambiental genera un color por la composición de reactivo de litio según la presente invención, en particular por el compuesto en el que todos los hidrógenos unidos a carbonos de una tetrafenilporfirina se sustituyen con flúor, que funciona como reactivo quelante (revelador de color).

El cambio de color de amarillo a rojo mediante una reacción de coloración que se observa entre un compuesto de tetrafenilporfirina F28 y los iones de litio es difícil de realizar. Sin embargo, lo que se solicita es determinar de manera precisa una cantidad de litio en suero en el intervalo de 0,6 mg/dl a 2,0 mg/dl (de 0,9 mM a 3 mM). En una realización de esta invención, los inventores encontraron el hecho de que la cantidad de litio en suero puede determinarse de manera precisa ajustando la concentración del compuesto de tetrafenilporfirina F28 en el intervalo de 0,05 a 1,0 g/l, preferiblemente 0,5 g/l.

En la composición de reactivo de litio según la presente invención, se usa el modificador del pH. El compuesto de tetrafenilporfirina F28 que es un revelador de color (reactivo quelante) según esta invención no se une al ion de litio en un lado ácido menor de pH 5,0, y, por tanto, no se observa cambio de coloración de manera que es difícil determinar la cantidad de litio.

Se produce una reacción específica entre el revelador de color y el ion de litio en un intervalo entre pH 5 y pH 7, 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 rápidamente y puede formarse un complejo de coloración estable. En el lado alcalino de mayor que
 5 pH 11, el tono de color del reactivo quelante y del complejo de coloración formado se vuelve inestable con el tiempo. Esto puede provocarse por la absorción de dióxido de carbono en el aire y el valor de pH fluctúa. Por tanto, es necesario usar un modificador del pH o tampón de pH que pueda mantener el pH de la composición de reactivo de litio según la presente invención en un intervalo de desde pH 8 hasta pH 11.

10 El modificador del pH puede seleccionarse 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 del pH puede ser un tampón de pH y puede seleccionarse 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,
 15 Bis-Tris, ADA, PIPES, ACES, MOPSO, BES, MOPS, TES, HEPES, DIPSO, TAPSO, POPSO, HEPPSO, EPPS, tricina, bicina, TAPS, CHES, CAPSO, CAPS y sus sales.

La composición de reactivo de litio según la presente invención que incorpora el modificador del pH permite la reacción de coloración específica para litio en un intervalo de desde pH 5 hasta pH 11.

20 Cuando la concentración de litio en muestra se determina mediante un analizador automatizado de tipo universal y mediante un espectrofotómetro de luz ultravioleta-visible, es deseable que la composición de reactivo esté en forma de una disolución acuosa, debido a que la muestra de prueba que va a medirse está en forma de una disolución acuosa. Por tanto, la composición de reactivo de litio según la presente invención se disuelve en agua para formar
 25 una disolución que sea compatible con una disolución acuosa de una muestra de prueba tal como suero, sangre plasma y eluato.

Según la presente invención, el compuesto de tetrafenilporfirina F28 se disuelve en agua en presencia de un compuesto orgánico básico seleccionado de monoetanolamina, dietanolamina y trietanolamina en lugar del disolvente orgánico.

En los productos reales, se incorpora un estabilizador adecuado en la composición de reactivo según esta invención. En una realización, se usa un tensioactivo como estabilizador. El tensioactivo mejora la capacidad de dispensar el compuesto de tetrafenilporfirina F28 e impide la formación de suspensiones originadas a partir de la muestra durante
 35 la reacción de coloración. Por tanto, el estabilizador se usa para garantizar tal efecto.

El estabilizador puede ser un tensioactivo no iónico o un tensioactivo aniónico. El tensioactivo no iónico puede ser éster de ácido graso de sorbitano, éster parcial de ácido graso de pentaeritritol, éster de ácido monograso de propilenglicol, monoéster de ácido graso de glicerina, polioxietilenoalquil éter, polioxietilenoalquil fenil éter, polioxietilenoalquilpropilenglicol, éster parcial de ácido graso de polioxietileno, éster parcial de ácido graso de polioxietilenoalquil sorbitol, éster de ácido graso de polioxietileno, dietanolamida de ácido graso, etanolamida de ácido graso, amida de ácido graso de polioxietileno, polioxietilenoalquilfenil éter (Triton X-100®), p-nonilfenoxipoliglicidol o sus sales.

45 Los tensioactivos no iónicos preferidos son polioxietilenoalquilfenil éter (Triton X-100®) y p-nonilfenoxipoliglicidol.

Según la presente invención no se usa disolvente orgánico adicional.

El tensioactivo aniónico como estabilizador puede ser sal de éster de sulfato de alquilo, sal de sulfato de polioxietilenoalquil éter, sal de sulfato de polioxietilenoalquilfenil éter, bencenosulfato y alcanosulfonato de alquilo. El tensioactivo aniónico típico se selecciona de dodecilsulfato de sodio, dodecilsulfato de sodio, sulfato de polioxietilenoalquilfenil éter de sodio y sus sales.

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

El reactivo de enmascaramiento que puede añadirse a la composición de reactivo de litio según la presente invención puede seleccionarse de etilendiamina, N,N,N',N'-tetrakis(2-piridilmetil)etilendiamina (TPEN), piridina, 2,2-bipiridina, propilendiamina, dimetilentriammina, ácido dimetilentriammina-N,N,N',N''-pentaacético (DTPA), trimetilentetramina, ácido trimetilentetramina-N,N,N',N''-hexaacético (TTHA), 1,10-fenantrolina, ácido etilendiaminatetraacético (EDTA), ácido O,O'-bis(2-aminofenil)etilenglicol-N,N',N'-tetraacético (BAPTA), N,N-bis(2-hidroxi)etilglicina (bicina), ácido trans-1,2-diaminociclohexano-N,N,N',N'-tetraacético (CyDTA), ácido O,O'-bis(2-amino)etilenglicol-N,N,N',N'-tetraacético (EGTA), ácido N-(2-hidroxil)iminoacético (HIDA), ácido iminodiacético (IDA), ácido nitrilotriacético (NTA), trimetilfosfonato de nitrilo (NTPO) y sus sales.

La composición de reactivo de litio según esta invención puede incluir antisépticos para impedir la degradación provocada por microorganismos. Los antisépticos no están especialmente limitados y pueden ser azida de sodio y Procline ®. La cantidad de antisépticos no está especialmente limitada y puede ser una concentración usada generalmente como antiséptico. Por ejemplo, en el caso de azida de sodio, la cantidad de antisépticos es aproximadamente del 0,1% en masa en una disolución de reacción. Los antisépticos se prescriben habitualmente para productos que se almacenan durante un periodo más largo.

En los usos reales, la composición de reactivo de litio según la presente invención se pone en contacto con una muestra de prueba de suero y/o plasma sanguíneo para inducir la coloración del complejo de litio. El desarrollo de color resultante o la absorbancia y el espectro del complejo de litio se mide para determinar una cantidad de litio en la muestra en comparación con las concentraciones de referencia de una muestra patrón cuyas concentraciones de litio son conocidas.

En la práctica, en la coloración y el espectro, la sensibilidad se mide preferiblemente a una longitud de onda de 550 nm o en la proximidad de longitud de onda de desde 530 nm hasta 560 nm, o la sensibilidad se mide a una longitud de onda de 570 nm o en la proximidad de longitud de onda de desde 565 nm hasta 650 nm, o la sensibilidad se mide a una longitud de onda de 340 nm o en la proximidad de longitud de onda de desde 310 nm hasta 350 nm, o la sensibilidad se mide a una longitud de onda de 380 nm o en la proximidad de longitud de onda de desde 350 nm hasta 400nm, o la sensibilidad se mide a una longitud de onda de 476 nm o en la proximidad de longitud de onda de desde 460 nm hasta 510 nm, para calcular la concentración de litio. En este caso, la sensibilidad se entiende como la absorbancia o la diferencia en la absorbancia en un espectrofotómetro de luz ultravioleta-visible.

Para anular la influencia de la hemoglobina, la sensibilidad a una longitud de onda de 550 nm puede corregirse mediante la siguiente ecuación:

la sensibilidad a una longitud de onda de 550 nm = la sensibilidad a una longitud de onda de 550 nm para el complejo litio-tetrafenilporfirina F28 + la sensibilidad a una longitud de onda de 550 nm para hemoglobina - la sensibilidad a una longitud de onda de 600 nm para hemoglobina

La sensibilidad anterior a una longitud de onda de 600 nm para hemoglobina es un valor de corrección preferido para la anulación. Sin embargo, es posible usar otro valor en la proximidad de longitud de onda de 600 nm que puede ser la razón de sensibilidad similar con respecto a la sensibilidad a una longitud de onda central de 550 nm.

En el dispositivo de medición, se mide el desarrollo de color, la absorbancia o el espectro del complejo de litio generado a partir de la composición de reactivo de litio según la presente invención puesto en contacto con una muestra de prueba de suero y plasma sanguíneo. En la práctica, se mide la sensibilidad a una longitud de onda de 550 nm o en la proximidad de longitud de onda de desde 530 nm hasta 560 nm en el espectro, o se mide la sensibilidad a una longitud de onda de 570 nm o en la proximidad de longitud de onda de desde 565 nm hasta 650 nm, o se mide la sensibilidad a una longitud de onda de 340 nm o en la proximidad de longitud de onda de desde 310 nm hasta 350 nm, o se mide la sensibilidad a una longitud de onda de 380 nm o en la proximidad de longitud de onda de desde 350 nm hasta 400 nm, o se mide la sensibilidad a una longitud de onda de 476 nm o en la proximidad de longitud de onda de desde 460 nm hasta 510 nm para calcular valor cuantitativo de litio.

También en este caso, la sensibilidad a una longitud de onda de 550 nm puede corregirse mediante la siguiente ecuación para anular la influencia de la hemoglobina:

la sensibilidad a una longitud de onda de 550 nm = la sensibilidad a una longitud de onda de 550 nm para el complejo litio-tetrafenilporfirina F28 + la sensibilidad a una longitud de onda de 550 nm para hemoglobina - la sensibilidad a una longitud de onda de 600 nm para hemoglobina

Ventajas de la invención

La concentración de litio en una disolución acuosa tal como una muestra biológica y una muestra medioambiental puede determinarse o medirse fácilmente usando la composición de reactivo de litio según la presente invención y usando el método y el dispositivo para medir iones de litio según la presente invención. En las composiciones de reactivo de litio definidas en las reivindicaciones 1 a 11, la curva de calibración de la concentración de litio es lineal en un intervalo práctico de desde 0,0 hasta 2,0 meq./l, de manera que la concentración puede calcularse mediante una simple operación a partir de los valores numéricos del colorímetro y del espectrofotómetro de luz ultravioleta-visible.

Por tanto, la concentración de litio en una muestra biológica o una muestra de suero puede determinarse fácil y cuantitativamente mediante un espectrofotómetro habitual. Los datos resultantes pueden usarse como un índice de gestión en el tratamiento de MTF, por ejemplo. O, puede realizarse la determinación cuantitativa de un gran número de muestras en un tiempo corto mediante un analizador automático para determinar la bioquímica clínica.

En la presente invención, la composición de reactivo de litio se ajusta a un intervalo de pH de desde pH 5 hasta pH 12 para permitir la medición mediante espectrometría. De hecho, el reactivo quelante según la presente invención (tetrafenilporfirina F28 de litio) no se une a iones de helio en un intervalo ácido de por debajo de pH 5, o no se observa cambio en el color que depende de la concentración de litio en un intervalo ácido de por debajo de pH 5.

5 Por el contrario, en el lado alcalino de por encima de pH 12, el tono de color del reactivo quelante y del complejo de coloración formado no es estable.

La estabilidad del tono de color empeora debido a la absorción de dióxido de carbono en aire que es un motivo de la fluctuación del pH. En el intervalo de pH de desde pH 5 hasta pH 7, el reactivo quelante se une a iones de litio y, por tanto, puede observarse la coloración específica del reactivo quelante. Sin embargo, la velocidad de coloración es demasiado lenta. Por tanto, el intervalo de pH de desde pH 8 hasta pH 11 es preferible, ya que, en el intervalo de pH de desde pH 8 hasta pH11, el reactivo quelante se une al ion de litio rápidamente y la reacción de coloración es específica y estable.

15 El complejo metálico de tetrafenilporfirina posee un intervalo de espectros específico típico en la proximidad de desde 380 nm hasta 460 nm denominado la "banda de Soret" en la que se obtiene la sensibilidad máxima. Este intervalo puede seleccionarse como un intervalo de longitudes de onda de medición. Sin embargo, la sensibilidad en este intervalo es demasiado alta para una concentración de litio que tiene significación clínica en una muestra de suero, de manera que no es necesaria la operación de dilución, que da como resultado un aumento de operaciones complicadas y de unidades adicionales para la dilución, que aumenta el tamaño de la unidad de medición.

25 En la presente invención, una longitud de onda de 550 nm o en el intervalo de proximidad de desde 530 nm hasta 560 nm en el que la sensibilidad es menor en varias veces que la de la banda de Soret se usa como intervalo de longitudes de onda de medición. Seleccionando este intervalo, se obtiene la sensibilidad óptima para una concentración de muestra que va a someterse a prueba y pueden eliminarse la operación de dilución y unidad de dilución complicadas. Todavía más, la curva de calibración según la presente invención tiene mejor linealidad que la de en el caso de la banda de Soret, de manera que la concentración puede calcularse fácilmente a partir de los valores medidos mediante un simple colorímetro o un espectrofotómetro de luz ultravioleta-visible. Todavía más, el cambio en el tono de color es muy nítido en la presente invención, de manera que el nivel de concentración puede juzgarse mediante observación visual o a simple vista.

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

La medición precisa puede garantizarse anulando la influencia de la hemoglobina mediante la siguiente ecuación para determinar la sensibilidad a una longitud de onda de 550 nm:

40 la sensibilidad a una longitud de onda de 550 nm = la sensibilidad a una longitud de onda de 550 nm para el complejo litio-tetrafenilporfirina F28 + la sensibilidad a una longitud de onda de 550 nm para hemoglobina – la sensibilidad a una longitud de onda de 600 nm para hemoglobina

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

Breve descripción de los dibujos

50 [Figura 1] Gráfico de concentración de litio-absorbancia detectada a una longitud de onda de 550 nm obtenida en el resultado del ejemplo 1 según esta invención.

[Figura 2] [Tabla 1] que muestra una comparación de la concentración de litio del reactivo (C) que contiene trietanolamina usado en el ejemplo según la presente invención con respecto a la concentración de litio obtenida usando un analizador automatizado (D). En el reactivo (A), se usó DMSO en lugar de trietanolamina y en el reactivo (B), no se usa ni DMSO ni trietanolamina.

60 [Figura 3] Gráfico de concentración de litio-absorbancia detectada a una longitud de onda de 340 nm obtenida en el ejemplo 1.

[Figura 4] Gráfico de concentración de litio-absorbancia detectada a una longitud de onda de 384 nm obtenida en el ejemplo 1.

65 [Figura 5] Gráfico de concentración de litio-absorbancia detectada a una longitud de onda de 412 nm obtenida en el ejemplo 1.

[Figura 6] Gráfico de concentración de litio-absorbancia detectada a una longitud de onda de 492 nm obtenida en el ejemplo 1.

5 [Figura 7] Gráficos que muestran el cambio en el espectro a una longitud de onda de 300 a 450 nm en la formación del complejo tetrafenilporfirina F28-litio según esta invención (la densidad se cambia desde 0,9 mM hasta 3,5 mM. El eje vertical indica la absorbancia y el eje horizontal indica la longitud de onda).

10 [Figura 8] Gráficos que muestran el cambio en el espectro a una longitud de onda de 450 a 600 nm en la formación del complejo tetrafenilporfirina F28-litio según esta invención.

[Figura 9] [Tabla 2] que muestra una comparación entre los valores medidos obtenidos en el ejemplo 1 de la presente invención y los valores de las muestras de suero de control.

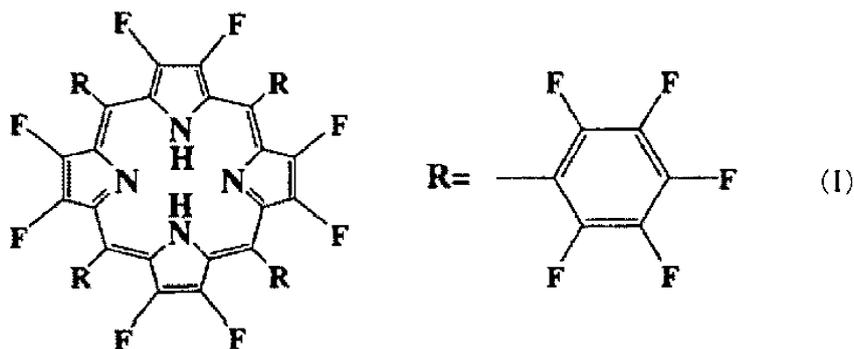
15 [Figura 10] Gráfico de concentración de litio-absorbancia detectada a una longitud de onda de 476 nm obtenida en el ejemplo 2.

[Figura 11] Gráfico de concentración de litio-absorbancia detectada a una longitud de onda de 550 nm obtenida en el ejemplo 3.

20 Modo de llevar a cabo la invención

Los inventores estudiaron composiciones de reactivo de litio que pueden usarse para medir a concentración de litio en suero y plasma sanguíneo cuantitativamente y de manera más simple, y se centraron en un compuesto representado por la fórmula general:

25



30 en la que todos los átomos de hidrógeno unidos a carbonos de un anillo de tetrafenilporfirina se sustituyen con átomos de flúor (el número total de flúor es de 28) en el compuesto macrocíclico dado a conocer en el documento no patente 1. Los inventores llegaron a una invención dada a conocer en el documento patente 3 (patente japonesa n.º 5.222.432) en la que se usó un disolvente orgánico.

35 Ahora, los inventores descubrieron el hecho de que un compuesto orgánico básico seleccionado de monoetanolamina, dietanolamina y trietanolamina puede usarse para preparar una disolución acuosa de tetrafenilporfirina F28, sin usar el disolvente orgánico tal como dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF) y dimetilacetamida (DMA). La presente invención se basa en este hallazgo.

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

45 En el caso de la tetrafenilporfirina F28 según la presente invención, la reacción se produce en el intervalo de pH 5 a pH 12. En la presente invención, la tetrafenilporfirina F28 se usa como reactivo quelante y se mezcla con un compuesto orgánico básico seleccionado de monoetanolamina, dietanolamina y trietanolamina en lugar del disolvente orgánico, para determinar la cantidad de iones de litio en un sistema acuoso.

Ahora, la composición de reactivo de litio según la presente invención se explica en más detalle usando los ejemplos.

50 **Ejemplos**

Ejemplo 1 (reactivo 1)

La composición de reactivo de litio (reactivo 1) usada en el ejemplo 1 contiene los siguientes componentes (% en peso):

Reactivo quelante:	tetrafenilporfirina F28:	0,01% en peso
Modificador multifuncional	trietanolamina	1% en peso
Estabilizador (tensioactivo no iónico):	Triton X-100® (polioxietilenoctilfenil éter)	1.% en peso
Estabilizador (tensioactivo aniónico):	(dodecilsulfato de sodio)	1.% en peso
Agente de enmascaramiento:	EDTA-2K	0,04% en peso

5 A una mezcla de los componentes anteriores, se le añadió hidróxido de sodio para ajustar el pH a pH 10,8 y se añadió agua purificada hasta el volumen total de 1 litro para obtener una composición de reactivo de litio que no contiene disolvente orgánico.

10 Esta composición de reactivo de litio según la presente invención no contiene disolvente orgánico. El término "modificador multifuncional" se usa debido a que la trietanolamina anterior tiene varias funciones de dispersante, agente de tamponamiento, emulsionante y agente de complejación y se cree que la trietanolamina puede tener una cualquiera o más funciones entre ellas.

15 Cuando se lleva a cabo la medición a pH 8, la cinética de reacción resultará un poco lenta y se obtiene la estabilización cuantitativa después de 10 a 20 minutos. A pH 10, la reacción se completa en un plazo de 10 minutos. Por tanto, la composición de reactivo de litio según la presente invención puede manejarse sin dificultad usando un sistema de tampones de un intervalo de pH de pH 5 a 10 y, por tanto, no existe la necesidad de usar un sistema de tampones condensado tal como una disolución acuosa de hidróxido de sodio y de hidróxido de potasio que se usó cuando el pH es mayor que pH 11.

20 El valor del pH puede seleccionarse según la necesidad del usuario pero puede obtenerse una cinética de reacción suficiente a pH 10 en la que puede usarse un sistema de tampones que puede mantener suficiente poder de tampón tal como un sistema de tampones como tampón de Good, cloruro de amonio y ácido carbónico.

25 En 24 μ l de la composición de reactivo de litio, se añadieron 2 μ l de una muestra de prueba que contenía carbonato de litio cuya concentración se conoce. Se mezcló suficientemente la mezcla resultante para realizar una reacción a temperatura ambiental durante 10 minutos y luego se midió la absorbancia a 550 nm mediante un lector de microplacas de tipo SH-1000 de COLONA Co., Ltd. La figura 1 muestra el resultado que es la relación entre la absorbancia y la concentración de Li en la muestra de prueba.

30 El eje vertical de la figura 1 indica la absorbancia y el eje horizontal indica la concentración de Li (mM) en la muestra de prueba. Las figuras 1, 3, 4, 5, 6, 10 y 11 muestran la misma relación.

35 La figura 1 muestra un hecho tal que la absorbancia aumenta y depende de la concentración de litio en la muestra de prueba y dibuja una buena aproximación en línea recta (la linealidad $r = 0,992$). Por tanto, está claro que puede obtenerse una curva de calibración usando la composición de reactivo de litio según la presente invención obtenida en el ejemplo 1 y una muestra patrón de litio.

40 Debido a que la línea de regresión muestra una buena linealidad, la calibración correcta de concentración de litio puede llevarse a cabo representando gráficamente dos puntos de una muestra patrón de litio y de un blanco.

45 No se usó disolvente orgánico en el ejemplo 1. Por tanto, el ejemplo 1 es diferente del documento patente 3 en el que se usó un disolvente orgánico soluble en agua tal como dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF) y dimetilacetamida (DMA). Por tanto, se encontró que un hecho tal que la tetrafenilporfirina F28 es un agente quelante eficaz en este ejemplo 1. Este hecho se confirmó mediante los siguientes experimentos 1 y 2.

Experimento 1

50 Para probar que la concentración de litio en suero puede determinarse de manera precisa, se prepararon las siguientes tres composiciones de reactivo (A) a (C) mediante el mismo procedimiento que en el ejemplo 1:

(A) una composición de reactivo que contiene dimetilsulfóxido (DMSO) en lugar de trietanolamina del ejemplo 1,

55 (B) una composición de reactivo que no contiene ni dimetilsulfóxido (DMSO) ni trietanolamina del ejemplo 1, y

(C) una composición de reactivo que contiene trietanolamina del ejemplo 1 pero no contiene dimetilsulfóxido (DMSO).

Se representaron gráficamente las curvas de calibración mediante el mismo método que en el ejemplo 1 en las

mismas condiciones de medición que en el ejemplo 1. Se usaron varias muestras de suero que tenían concentraciones de litio diferentes como muestras de prueba y se determinó la concentración de litio en las muestras de prueba.

5 La figura 2 (tabla 1) muestra los resultados de valores medidos obtenidos cuando se usaron las composiciones de reactivo (A) a (C) anteriores. La tabla 1 muestra también los resultados de valores medidos obtenidos cuando se usa un analizador automatizado (D) para la comparación. La tabla 1 revela un hecho tal que los valores medidos obtenidos en las composiciones de reactivo (A) y (C) anteriores tiene una buena correlación con los valores medidos obtenidos mediante el analizador automatizado (D).

10 Por tanto, se confirmó a partir del experimento 1 que la composición de reactivo (B) que no contiene ni dimetilsulfóxido (DMSO) ni trietanolamina no induce la coloración incluso si se incluye el agente quelante eficaz de tetrafenilporfirina F28, y que la concentración de litio en suero puede determinarse de manera precisa en el caso de la composición de reactivo (C) que contiene trietanolamina según la presente invención, pero no contiene dimetilsulfóxido (DMSO).

Método de medición

20 En este caso, se explicará un método y un aparato para medir la concentración de litio.

Se añadieron 2 μ l de una muestra de prueba a 240 μ l de la composición de reactivo obtenida en el ejemplo 1 para preparar una disolución de prueba que tenía un valor de pH de 10,8. Se hizo reaccionar disolución de prueba con muestra de prueba durante 10 minutos a temperatura ambiental. Se midió la absorbancia usando un lector de microplacas de tipo SH-1000 de COLONA Co., Ltd. a las siguientes longitudes de onda diferentes (a) a (d), siendo una referencia un blanco que no contiene composición de reactivo:

(a) a una longitud de onda de 340 nm (figura 3)

(b) a una longitud de onda de 384 nm (figura 4)

(c) a una longitud de onda de 412 nm (figura 5)

(d) a una longitud de onda de 492 nm (figura 6)

35 La absorbancia obtenida a una longitud de onda de 550 nm se muestra en la figura 1. Las figuras 1, 3, 4, 5 y 6 muestran los resultados. El eje vertical indica la absorbancia y el eje horizontal indica la concentración de Li (mM) en suero.

40 La figura 7 y la figura 8 son gráficos que muestran los cambios en el espectro cuando se forma el complejo tetrafenilporfirina F28-litio a una densidad respectiva (desde 0,9 mM hasta 3,5 mM). En la figura 7 y la figura 8, la longitud de onda de medición principal de 340 nm (figura 3), de 384 nm (figura 4), de 412 nm (figura 5), de 492 nm (figura 6) y de 550 nm (figura 1) se indican mediante las respectivas flechas. En la figura 7 y la figura 8, el eje vertical indica la absorbancia y el eje horizontal indica la longitud de onda.

45 La sensibilidad máxima para el complejo metálico de tetrafenilporfirina se obtiene a un intervalo de longitudes de onda de la denominada banda de Soret (aproximadamente desde 380 nm hasta 460 nm). Sin embargo, en la presente invención, no se usa este intervalo de banda de Soret sino una longitud de onda de 550 nm o se usa en el intervalo de proximidad de desde 530 nm hasta 560 nm, de manera que no son necesarios operaciones de dilución y medios de dilución complicados o una planta de fabricación auxiliar en la presente invención.

50 Todavía más, la mejor linealidad de la curva de calibración puede obtenerse cuando se usa una longitud de onda de 550 nm o en el intervalo de proximidad de desde 530 nm hasta 560 nm en comparación con la banda de Soret de aproximadamente desde 380 nm hasta 460 nm, de manera que puede calcularse la concentración precisa fácilmente mediante un simple colorímetro o espectrofotómetro. Todavía más, debido a que el cambio en el color desde amarillo hasta rojo es muy nítido, el nivel de concentración puede detectarse fácilmente a simple vista.

55 En la técnica convencional, es necesario un aparato a gran escala para uso exclusivo para medir la concentración de litio. En la presente invención, la concentración de litio puede medirse fácilmente mediante un colorímetro portátil o espectrofotómetro de luz ultravioleta visual que se usa ampliamente. La presente invención puede construirse en forma de un kit de POCT.

Ahora, se describirá uno de los métodos de corrección para corregir un error del método para medir la concentración de litio según la presente invención.

65 Se sabe que hay dos picos de absorción a aproximadamente 540 nm y aproximadamente de 560 nm a 650 nm (banda β y banda α respectivamente) originados a partir de la hemoglobina como factor de interferencia en las

muestras de prueba tales como suero hemolizado. Si la composición de reactivo según la presente invención se pone en contacto con una muestra que contiene hemoglobina muy concentrada, se producirá un error positivo con respecto a un valor medido real, debido a que la absorción a 550 nm que es la longitud de onda fotométrica de la presente invención y la absorción a 540 nm provocada por la banda β y la banda α de hemoglobina se superponen. Concretamente, la sensibilidad medida a 550 nm = la sensibilidad del complejo litio-tetrafenilporfirina F28 a 550 nm + la sensibilidad provocada por la hemoglobina a 550 nm = un error positivo provocado por la hemoglobina.

El presente inventor encontró un hecho tal que las dos sensibilidades de hemoglobina a 550 nm y 600 nm son casi idénticas. Concretamente, la sensibilidad de hemoglobina a 550 nm = la sensibilidad de hemoglobina a 600 nm. Por tanto, el presente inventor encontró que la sensibilidad de hemoglobina a 550 nm puede compensarse con la sensibilidad de hemoglobina a 600 nm.

Por tanto, una sensibilidad precisa a 550 nm puede calcularse corrigiendo la sensibilidad de la hemoglobina a 550 nm mediante la siguiente ecuación:

la sensibilidad precisa a 550 nm = la sensibilidad del complejo litio-tetrafenilporfirina F28 a 550 nm + la sensibilidad de hemoglobina a 550 nm - la sensibilidad de hemoglobina a 600 nm

La sensibilidad de hemoglobina a 600 nm se usa preferiblemente como valor de corrección usado en la compensación anterior. Sin embargo, es posible usar la longitud de onda vecina de alrededor de 600 nm que muestra casi la misma sensibilidad en la longitud de onda del centro de 550 nm.

La longitud de onda de medición es preferible o principalmente a 550 nm tal como se mencionó anteriormente. Sin embargo, tal como puede observarse a partir de los espectros de la figura 7 y la figura 8, el valor cuantitativo de litio puede calcularse mediante los medios de cálculo midiendo otra longitud de onda distinta de 550 nm. Por ejemplo, la sensibilidad a una longitud de onda de 570 nm, o a una longitud de onda en la proximidad de desde 565 nm hasta 650 nm, o la sensibilidad a una longitud de onda de 340 nm, o a una longitud de onda en la proximidad de desde 310 nm hasta 350 nm, o la sensibilidad a una longitud de onda de 380 nm, o a una longitud de onda en la proximidad de desde 350 nm hasta 400 nm, o la sensibilidad a una longitud de onda de 476 nm, o a una longitud de onda en la proximidad de desde 460 nm hasta 510 nm puede usarse para calcular el valor cuantitativo de litio.

Experimento 2

Comparación de los valores medidos para muestras de suero de control mediante lector de placas

Se midió la concentración de litio para las siguientes muestras de suero de control en las que se valoran las concentraciones de litio:

- Pathonorm L (SERO AS)
- Pathonorm H (SERO AS)
- Seronorm humano (SERO AS)

Se añadieron 2 μ l de cada muestra de prueba en 240 μ l de la composición de reactivo de litio que se preparó mediante el mismo método que en el ejemplo 1 para preparar una disolución de prueba que tenía un valor de pH de 10,8. Después se continuó la reacción durante 10 minutos a temperatura ambiental, se midió la absorbancia usando un lector de microplacas de tipo SH-1000 de COLONA Co., Ltd. a una longitud de onda de 550 nm.

La figura 9 (tabla 2) muestra los resultados de valores medidos cuando se realizó la calibración usando una muestra patrón que contenía 0,86 mM de ion de litio (carbonato de litio). La tabla 2 revela un hecho tal que los valores medidos obtenidos por la composición de reactivo de litio del ejemplo 1 preparada según la presente invención tienen buena correlación con los valores garantizados.

Ejemplo 2 (reactivo 2)

En otra composición de reactivo de litio (reactivo 2) preparada en este ejemplo 2, se aumentó la proporción de trietanolamina y se cambiaron un poco las proporciones del estabilizador y del agente de enmascaramiento. Esta composición de reactivo de litio (reactivo 2) contiene los siguientes componentes (% en peso):

Reactivo quelante:	tetrafenilporfirina F28:	0,01% en peso
Modificador multifuncional	trietanolamina	3,7% en peso
Estabilizador (tensioactivo no iónico):	Triton X-100® (polioxietilenoetilfenil éter)	1,5% en peso
Estabilizador (tensioactivo aniónico):	(dodecilsulfato de sodio)	1% en peso

Agente de enmascaramiento: EDTA-2K 0,045% en peso

Esta composición no contiene disolvente orgánico. Se añadió hidróxido de sodio a la composición de reactivo de litio anterior para ajustar el pH a pH 10,8 y luego, se añadió agua purificada hasta el volumen total de 1 litro para obtener una composición de reactivo de litio (reactivo 2) que no contenía disolvente orgánico.

5 Se añadieron 2 µl de una muestra de prueba que contenía carbonato de litio cuya concentración de litio se conoce en 240 µl de la composición de reactivo de litio (reactivo 2) y se agitó suficientemente. Después se continuó la reacción durante 10 minutos a temperatura ambiental, se midió la absorbancia usando un lector de microplacas de tipo SH-1000 de COLONA Co., Ltd. a una longitud de onda de 476 nm.

10 La figura 10 muestra la absorbancia en función de la concentración de litio de la muestra de prueba. La figura 10 muestra que la absorbancia disminuye en función de la concentración de litio de la muestra de prueba y que se obtiene buena linealidad. O, puede realizarse una curva de calibración usando la composición de reactivo de litio (reactivo 2) del ejemplo 2 y una muestra patrón de litio. Todavía más, la calibración precisa de concentración puede realizarse representando gráficamente dos puntos de la muestra patrón y de un blanco.

Ejemplo 3 (reactivo 3)

20 Esta composición de reactivo de litio (reactivo 3) es diferente del ejemplo 1 en que se usó dietanolamina en lugar de trietanolamina. Esta composición de reactivo de litio (reactivo 3) contiene los siguientes componentes (% en peso):

Reactivo quelante:	tetrafenilporfirina F28:	0,01% en peso
Modificador multifuncional	dietanolamina	3,7% en peso
Estabilizador (tensioactivo no iónico):	Triton X-100® (polioxietilenoetilfenil éter)	1% en peso
Estabilizador (tensioactivo aniónico):	(dodecilsulfato de sodio)	1% en peso
Agente de enmascaramiento:	EDTA-2K	0,04% en peso

25 Esta composición tampoco contiene disolvente orgánico. El término "modificador multifuncional" se usa también en esta composición, porque la dietanolamina anterior tiene varias funciones de dispersante, agente de tamponamiento, emulsionante y agente de complejación y se cree que la dietanolamina puede tener una cualquiera o más funciones entre ellas.

30 A una mezcla de los componentes anteriores, se añadió hidróxido de sodio para ajustar el pH a pH 10,8 y se añadió agua purificada hasta el volumen total de 1 litro para obtener una composición de reactivo de litio que no contenía disolvente orgánico.

35 Se añadieron 2 µl de una muestra de prueba que contenía carbonato de litio cuya concentración de litio se conoce en 240 µl de la composición de reactivo de litio (reactivo 3) y se agitó suficientemente. Después se continuó la reacción durante 10 minutos a temperatura ambiental, se midió la absorbancia usando un lector de microplacas de tipo SH-1000 de COLONA Co., Ltd. a una longitud de onda de 550 nm.

40 La figura 11 muestra la absorbancia en función de la concentración de litio de la muestra de prueba. La figura 11 muestra que la absorbancia disminuye en función de la concentración de litio de la muestra de prueba y que se obtiene buena linealidad. O, puede realizarse una curva de calibración usando la composición de reactivo de litio (reactivo 3) del ejemplo 3 y una muestra patrón de litio. La calibración precisa de concentración puede realizarse representando gráficamente dos puntos de la muestra patrón y de un blanco, ya que una línea de regresión muestra buena linealidad.

45 Tal como se explicó en los ejemplos anteriores según esta invención, se confirmó que una cantidad de litio en disoluciones acuosas tales como muestras biológicas y muestras líquidas medioambientales puede determinarse usando un colorímetro simple o de pequeño tamaño y puede juzgarse inmediatamente por observación visual sin usar disolvente orgánico tal como dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF) y dimetilacetamida (DMA).

50 También puede usarse monoetanolamina aunque se usaron trietanolamina y dietanolamina en los ejemplos 1, 2 respectivamente. La monoetanolamina también tiene varias funciones de dispersante, agente de tamponamiento, emulsionante y agente de complejación de manera que la monoetanolamina también es un modificador multifuncional.

55 La presente invención también se refiere a un método de medición y un aparato de medición usando la composición de reactivo dada a conocer en los ejemplos 1 a 3.

La presente invención no está limitada por realizaciones especiales dadas a conocer en los ejemplos 1 a 3 sino que

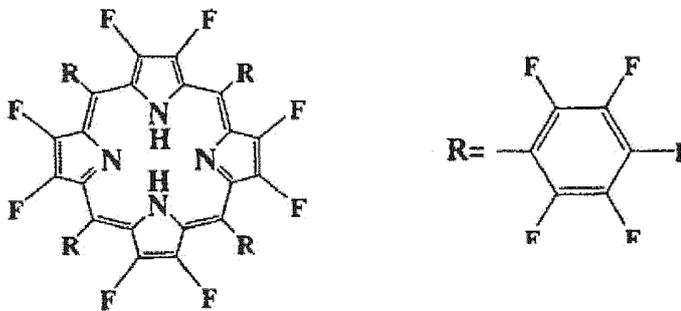
cubre cualquier variación a menos que salga del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Composición de reactivo para detectar y medir litio, caracterizada porque está en forma de una disolución acuosa que comprende los siguientes componentes:

5

1) un compuesto que tiene una estructura representada por la fórmula (I):



(I)

10 en la que todos los hidrógenos unidos a carbonos de una tetrafenilporfirina se sustituyen con átomos de flúor,

2) un compuesto orgánico básico seleccionado de monoetanolamina, dietanolamina y trietanolamina,

15

3) un modificador del pH para ajustar el pH de la disolución mayor que pH 5,

4) opcionalmente un estabilizador,

20

5) opcionalmente un reactivo de enmascaramiento,

y en la que la disolución acuosa no contiene ningún disolvente orgánico adicional.

2. Composición de reactivo para litio según la reivindicación 1, en la que dicho modificador del pH se selecciona de ácidos incluyendo ácido clorhídrico, ácido nítrico, ácido acético, ácido fosfórico, ácido cítrico, ácido carbónico, bicarbonato, ácido oxálico y ácido clorhídrico, medicamento alcalino incluyendo hidróxido de sodio, hidróxido de potasio y amoníaco, y sus sales.

25

3. Composición de reactivo para litio según la reivindicación 1, en la que dicho modificador del pH es un tampón de pH.

30

4. Composición de reactivo para litio según la reivindicación 3, en la que dicho tampón de pH se selecciona de ácido cítrico, ácido carbónico, bicarbonato, ácido fosfórico, ácido succínico, ácido ftálico, cloruro de amonio, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, como tampón de Good, MES, Bis-Tris, ADA, PIPES, ACES, MOPSO, BES, MOPS, TES, HEPES, DIPSO, TAPSO, POPSO, HEPPSO, EPPS, tricina, bicina, TAPS, CHES, CAPSO, CAPS, y sus sales.

35

5. Composición de reactivo para litio según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la composición de reactivo desarrolla un color para el litio en un intervalo de pH de desde pH 5 hasta pH 12.

40

6. Composición de reactivo para litio según la reivindicación 1, que incluye además un estabilizador.

7. Composición de reactivo para litio según la reivindicación 6, en la que dicho estabilizador es un tensioactivo no iónico y/o un tensioactivo aniónico.

45

8. Composición de reactivo para litio según la reivindicación 7, en la que dicho tensioactivo no iónico se selecciona de ésteres de ácido graso de sorbitano, ésteres parciales de ácido graso de pentaeritritol, ésteres de ácido graso de propilenglicol, monoéster de ácido graso de glicerina, polioxietilentalquil éter, polioxietilentalquil fenil éter, polioxietilentalquilpropilenglicol, ésteres parciales de ácido graso de polioxietileno, ésteres parciales de ácido graso de polioxietilensorbitol, ésteres de ácido graso de polioxietileno, dietanolamida de ácido graso, monoetanolamida de ácido graso, amida de ácido graso de polioxietileno, polioxietilenoctilfenil éter (TritonX-100®), p-nonilfenoxipoliglicidol y sus sales.

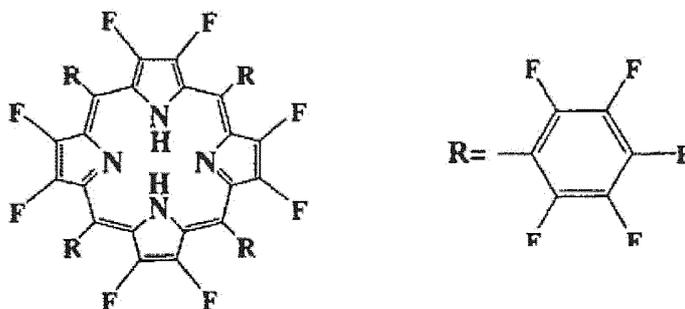
50

9. Composición de reactivo para litio según la reivindicación 7, en la que dicho tensioactivo aniónico es sal de

éster de sulfato de alquilo incluyendo dodecilsulfato de sodio, sal de sulfato de polioxietilenaquí éter incluyendo sulfato de polioxietilenoquí éter de sodio, sulfonato de alquilbenceno incluyendo dodecilsulfonato de sodio y alcanosulfonato.

- 5 10. Composición de reactivo para litio según la reivindicación 8 ó 9, que incluye además un reactivo de enmascaramiento.
11. Composición de reactivo para litio según la reivindicación 10, en la que dicho reactivo de enmascaramiento se elige de etilendiamina, N,N,N',N'-tetrakis(2-piridilmetil)etilendiamina (TPEN), piridina, 2,2-bipiridina, propilendiamina, dietilentriamina, dietilentriamina-N,N,N',N",N"-pentaacetato (DTPA), trietilentetramina, trietilentetramina-N,N,N',N",N"-hexaacetato (TTHA), 1,10-fenantrolina, tetraacetato de etilendiamina (EDTA), O,O'-bis(2-aminofenil)etilenglicol-N,N',N'-tetraacetato (BAPTA), N,N-bis(hidroxi)etilglicina (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), nitrilotrismetilfosfonato (NTPO) y sus sales.
12. Método para medir ion de litio en una muestra de prueba de suero y plasma, caracterizado por poner en contacto la muestra de prueba de suero y plasma con una composición de reactivo para litio que tiene forma de una disolución acuosa que comprende los siguientes componentes:

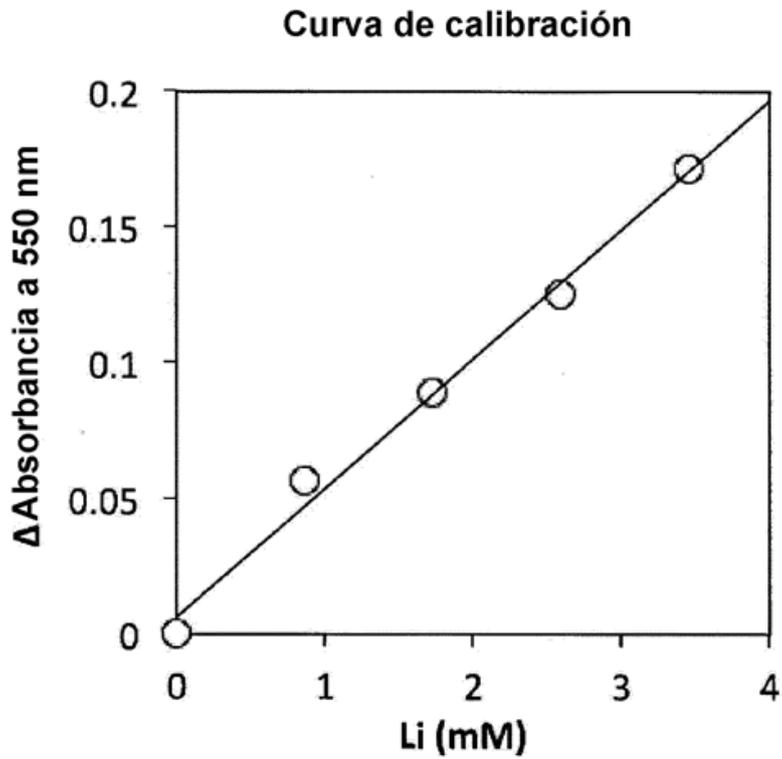
1) un compuesto que tiene una estructura representada por la fórmula (I):



(I)

- 25 en la que todos los hidrógenos unidos a carbonos de una tetrafenilporfirina se sustituyen con flúor,
- 2) un compuesto orgánico básico seleccionado de monoetanolamina, dietanolamina y trietanolamina,
- 3) un modificador del pH para ajustar el pH de la disolución mayor que pH 5,
- 30 4) opcionalmente un estabilizador,
- 5) opcionalmente un reactivo de enmascaramiento,
- 35 para inducir desarrollo de color de un complejo de litio en la disolución acuosa, y midiendo un espectro para calcular un valor cuantitativo de litio, en el que la disolución acuosa no contiene ningún disolvente orgánico adicional.
13. Método según la reivindicación 12, en el que el desarrollo de color del complejo de litio se mide mediante la sensibilidad en el espectro a una longitud de onda de 550 nm o en la proximidad de un intervalo de longitudes de onda de desde 530 nm hasta 570 nm.
- 40 14. Método para medir ion de litio según la reivindicación 13, en el que la sensibilidad a una longitud de onda de 550 nm se corrige mediante la siguiente ecuación:
- 45 la sensibilidad a una longitud de onda de 550 nm = la sensibilidad a una longitud de onda de 550 nm para complejo litio-tetrafenilporfirina F28 + la sensibilidad a una longitud de onda de 550 nm para hemoglobina – la sensibilidad a una longitud de onda de 600 nm para hemoglobina
- 50 15. Método para medir ion de litio según la reivindicación 12, en el que el desarrollo de color del complejo de litio se mide mediante la sensibilidad en el espectro a una longitud de onda de 570 nm o en la proximidad de un intervalo de longitudes de onda de desde 565 nm hasta 650 nm.

【Fig.1】



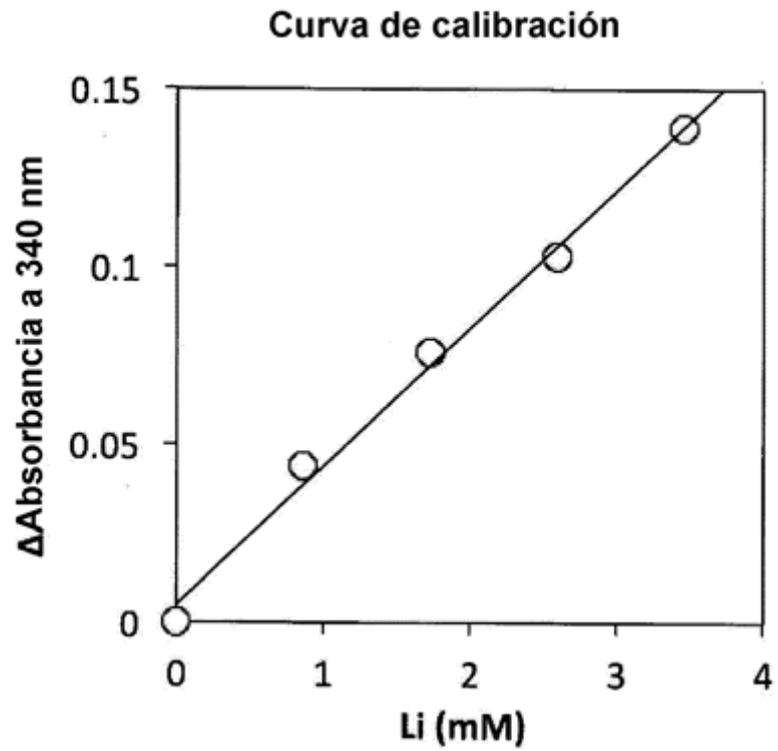
【Fig.2】

【Tabla 1】

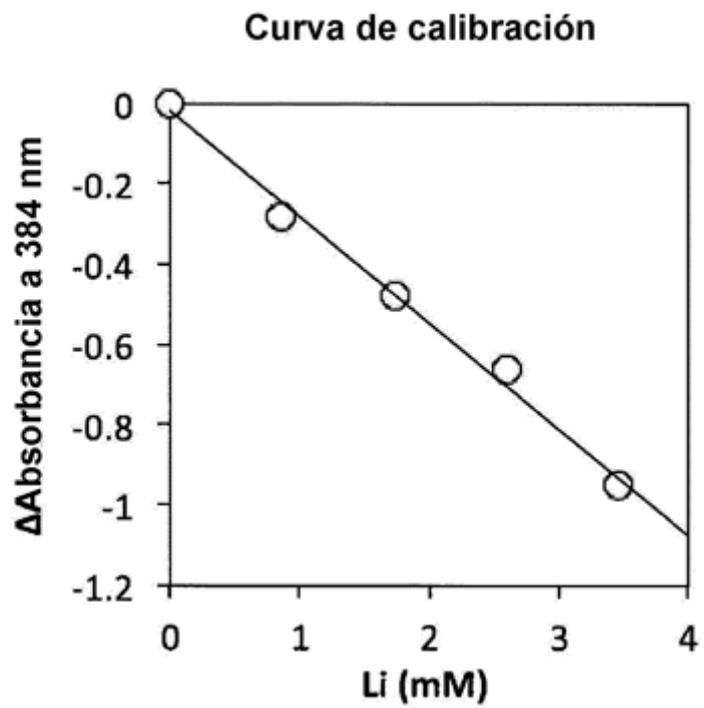
Suero de control	A (Técnica anterior)	B (Sin disolvente)	C (Ejemplo 1)	D (método de absorción atómica)
Pathonorm H	1.54	Cero de sensibilidad	1.52	1.54
Seronorm	0.97	Cero de sensibilidad	1.01	1.00
Seronorm humano	0.76	Cero de sensibilidad	0.72	0.74

UNIDAD : mM

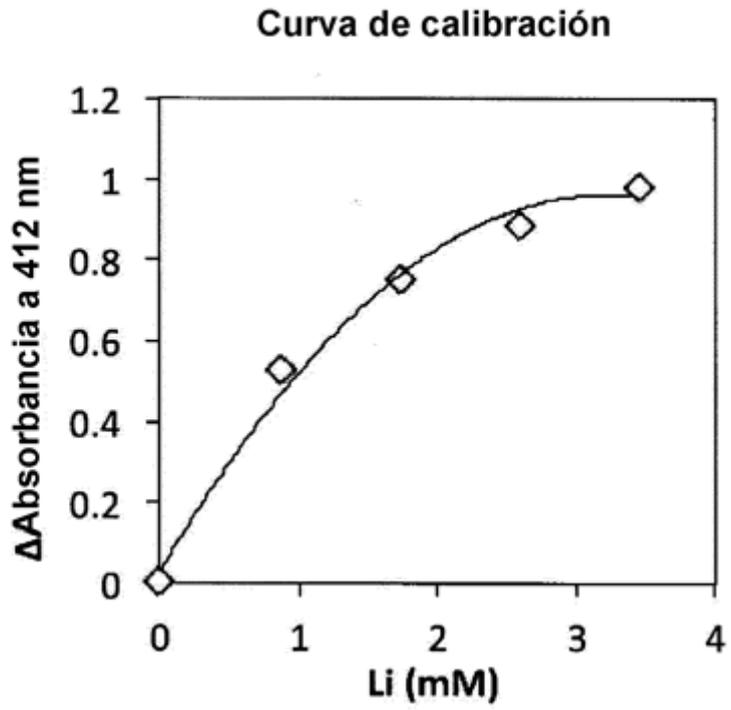
【Fig.3】



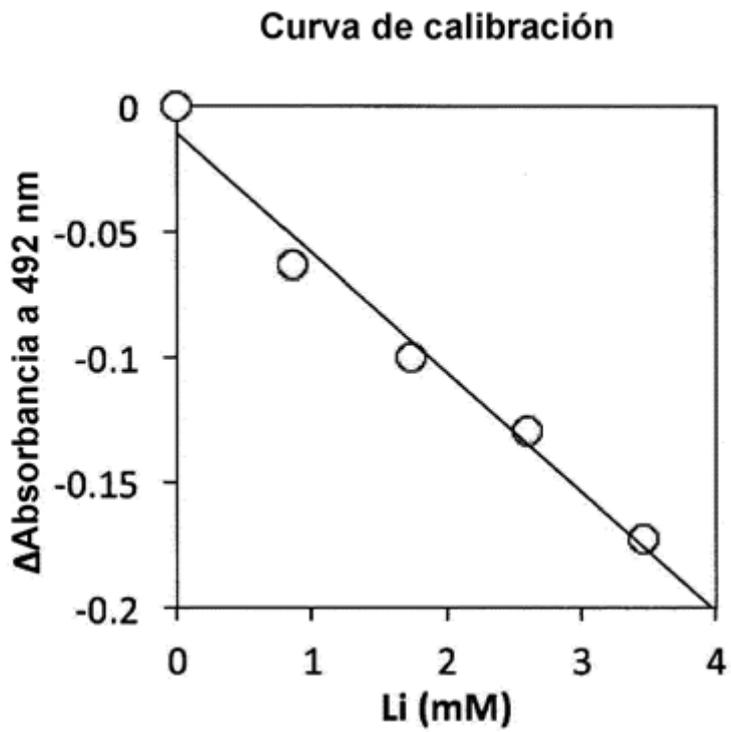
【Fig.4】



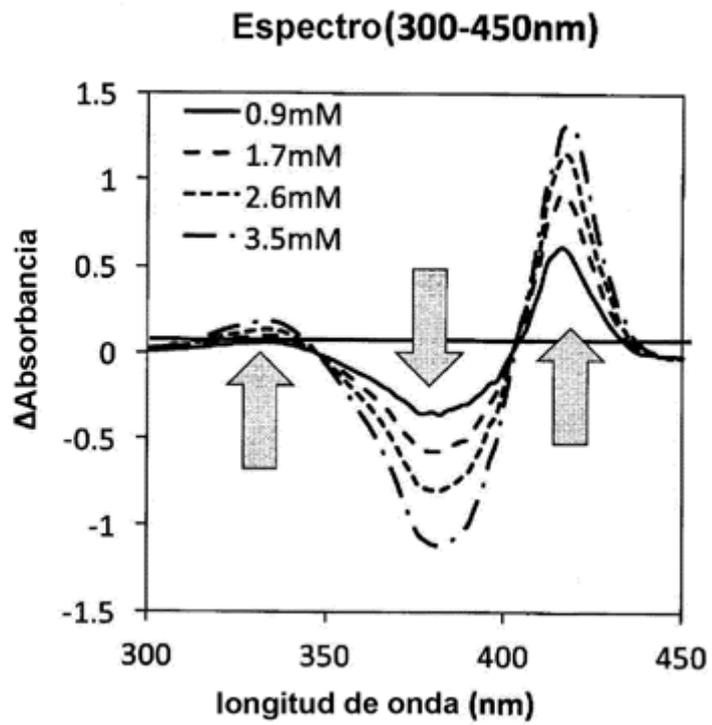
【Fig.5】



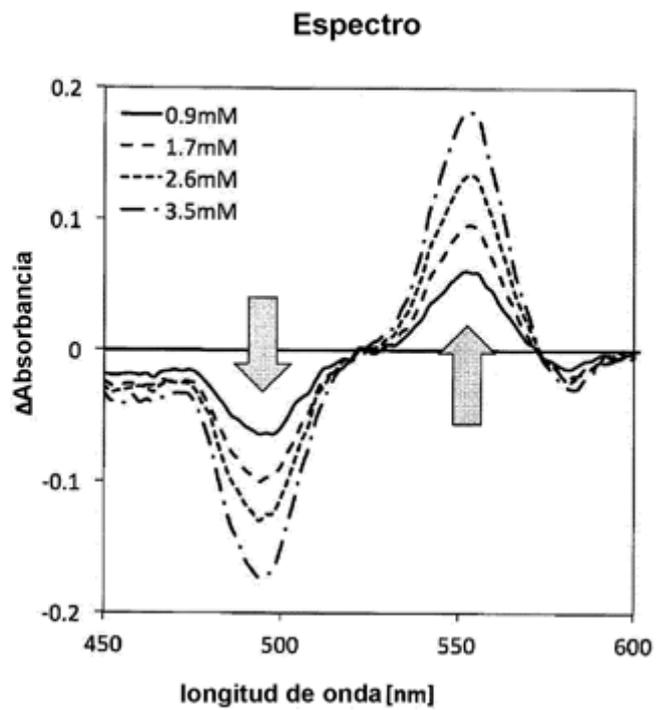
【Fig.6】



【Fig.7】



【Fig.8】



【Fig.9】

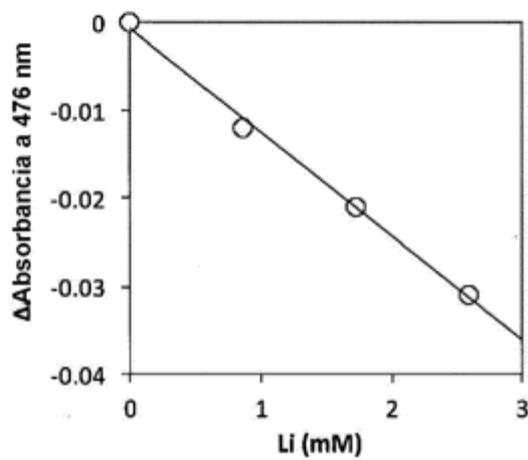
【Tabla 2】

Suero de control	Valor garantizado	Valor medido en el ejemplo 1
Pathonorm L	0	0
Pathonorm H	1.54	1.52
Seronorm humano	0.76	0.78

Unidad : mM

【Fig.10】

Curva de calibración



【Fig.11】

Curva de calibración

