



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 316 716**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/32 (2006.01)

G01N 21/78 (2006.01)

G01N 31/00 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/66 (2006.01)

G01N 33/92 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03700460 .3**

96 Fecha de presentación : **06.01.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1466987**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **13.10.2004**

54

Título: **Método de colorimetría.**

30

Prioridad: **28.12.2001 JP 2001-400379**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.04.2009

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.04.2009

73

Titular/es: **Arkray, Inc.**
57, Nishiaketa-cho, Higashikujo, Minami-ku
Kyoto-shi, Kyoto 601-8045, JP

72

Inventor/es: **Nagakawa, Kenji;**
Tsujimoto, Tomomichi;
Nishino, Susumu;
Teramoto, Masaaki y
Kawase, Yoshiyuki

74

Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 316 716 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).

ES 2 316 716 T3

DESCRIPCIÓN

Método de colorimetría.

5 La presente invención se refiere a un método colorimétrico y un reactivo usado para el mismo.

Técnica antecedente

10 En el campo de exámenes clínicos o bioquímicos se emplea un análisis colorimétrico como un método para analizar componentes tales como glucosa, colesterol o similares en una muestra. Por ejemplo, generalmente el análisis colorimétrico de glucosa es como sigue: una glucosa oxidasa reacciona con glucosa (sustrato) para generar gluconolactona y peróxido de hidrógeno; y el peróxido de hidrógeno se detecta mediante un reactivo colorante, tal como un reactivo de Trinder, en presencia de peroxidasa. Este método, en el que se mide la concentración de un sustrato indirectamente mediante peróxido de hidrógeno, no está limitado a glucosa, sino que también se usa para analizar otros componentes tales como colesterol.

15 Sin embargo, el análisis colorimétrico convencional implica los siguientes problemas. En primer lugar, el tiempo requerido para la medición es largo porque requiere mucho tiempo hasta que termina una reacción de color debido a la medición indirecta de un analito mediante peróxido de hidrógeno. Por ejemplo, la medición de glucosa requiere de 30 a 60 segundos. En segundo lugar, es difícil ajustar las condiciones porque se deben estabilizar dos sistemas de reacción de enzima diferentes simultáneamente. Finalmente, el análisis colorimétrico convencional requiere oxígeno y el suministro inadecuado de oxígeno puede conducir a una reacción insuficiente.

Descripción de la invención

25 Con lo anterior en mente, es un objetivo de la presente invención proporcionar un método colorimétrico que tenga un sistema de reacción única y pueda conseguir un análisis breve y proporcionar valores fiables con el análisis.

30 Un método colorimétrico de la presente invención incluye permitir que una oxidoreductasa actúe sobre un analito y un complejo de metal de transición que cambia de color transfiriendo un electrón y realizar un análisis cualitativo o cuantitativo del analito midiendo un cambio de color en el complejo de metal de transición debido a la transferencia de electrones del analito al complejo de metal de transición en el que al menos un ligando en el complejo de metal de transición se selecciona de amoníaco, un compuesto biperidilo, un compuesto imidazol, un compuesto fenantrolina, un compuesto etilenodiamina, aminoácidos, un compuesto triazina, un compuesto biquinolina, un compuesto piridilazo, un compuesto nitroso y un compuesto oxina.

35 Este método tiene un sistema de reacción única, de modo que el sistema de reacción es sencillo y estable y el tiempo hasta que finaliza una reacción de color es breve. Por lo tanto, el tiempo de medición se reduce (por ejemplo, cuando se usa glucosa como un analito, la medición se puede realizar en el intervalo de aproximadamente 5 segundos). Adicionalmente, este método no requiere peróxido de hidrógeno y en principio no está afectado por la cantidad de oxígeno, asegurando de este modo valores altamente fiables con el análisis.

45 Se describe un reactivo para el anterior método colorimétrico, que incluye una oxidoreductasa y una sustancia que puede cambiar de color que cambia de color transfiriendo un electrón. Una pieza de ensayo puede incluir este reactivo. Comparada con una pieza de ensayo convencional para análisis colorimétrico que requiere peróxido de hidrógeno, dicha pieza de ensayo puede conseguir un tiempo de análisis muy breve y asegurar valores altamente fiables con el análisis.

50 Se ha propuesto un método de análisis que usa un complejo metálico de biperidilo como una sustancia emisora de luz (por ejemplo, en el documento JP 10-253633 A). Sin embargo, este método difiere bastante de la presente invención en el campo técnico porque la presente invención se refiere a un método colorimétrico. Se ha propuesto otra técnica que permite a un complejo metálico de biperidilo producir/borrar color por aplicación directa desde un electrodo (por ejemplo, en el documento JP 57-192483 A). Sin embargo, esta técnica también difiere bastante de la presente invención en el campo técnico porque la presente invención utiliza transferencia de electrones mediante una oxidoreductasa.

55 El documento EP 0100 217 describe un proceso para la determinación cuantitativa de sustrato tratado con oxidasa usando un complejo de hierro de porfirina o un quelato iónico de complexano y un reactivo productor de color que se tiene que reducir.

60 Los documentos US 4.701.420, WO 94/17199 y JP 3043096 describen composiciones analíticas que comprenden quelatos iónicos férricos. Después de la reducción del ión férrico a ión ferroso, el ión ferroso forma un complejo con un ligando de coordinación de ión ferroso para formar un complejo coloreado.

65 Los documentos EP 0 602 488 y WO 96/25514 describen mediadores electroquímicos que comprenden un metal de transición y un ligando biperidina o fenantrolina.

ES 2 316 716 T3

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un gráfico que muestra la dependencia de la reflectancia de la concentración de glucosa en un ejemplo de la presente invención.

La Figura 2 es un gráfico que muestra la dependencia de la reflectancia de la concentración de glucosa en otro ejemplo de la presente invención.

La Figura 3 es un gráfico que muestra un cambio de color en otro ejemplo más de la presente invención.

La Figura 4 es un gráfico que muestra un cambio de color en otro ejemplo más de la presente invención.

La Figura 5 es un gráfico que muestra un cambio de color en otro ejemplo más de la presente invención.

La Figura 6 es un gráfico que muestra un cambio de color en otro ejemplo más de la presente invención.

La Figura 7 es un gráfico que muestra la dependencia de la reflectancia de la concentración de glucosa en otro ejemplo más de la presente invención.

Las Figuras 8A a 8F son gráficos que muestran un cambio de color en otro ejemplo más de la presente invención.

Las Figuras 9A a 9D son gráficos que muestran un cambio de color en otro ejemplo más de la presente invención.

Las Figuras 10A a 10C son gráficos que muestran un cambio de color en otro ejemplo más de la presente invención.

La Figura 11 es un gráfico que muestra un cambio de color en otro ejemplo más de la presente invención.

La Figura 12 es un gráfico que muestra un cambio de color en otro ejemplo más de la presente invención.

Las Figuras 13A a 13C son gráficos que muestran un cambio de color en otro ejemplo más de la presente invención.

La Figura 14 es un gráfico que muestra un cambio de color en otro ejemplo más de la presente invención.

La Figura 15 es un gráfico que muestra un cambio de color en otro ejemplo más de la presente invención.

Las Figuras 16A a 16E son gráficos que muestran un cambio de color en otro ejemplo más de la presente invención.

Las Figuras 17A y 17B son gráficos que muestran un cambio de color en otro ejemplo más de la presente invención.

Las Figuras 18A a 18C son gráficos que muestran un cambio de color en otro ejemplo más de la presente invención.

Mejor modo de realizar la invención

En un método colorimétrico de la presente invención, la sustancia que puede cambiar de color que cambia de color transfiriendo un electrón es un complejo de metal de transición. El complejo de metal de transición es preferiblemente un complejo de cobre, un complejo de hierro, un complejo de rutenio, un complejo de osmio o una mezcla que contiene al menos dos de estos complejos. Es preferible que un átomo de coordinación de un ligando en el complejo de metal de transición sea al menos uno seleccionado del grupo que consiste en nitrógeno, oxígeno y azufre. El ligando se selecciona del grupo que consiste en amoníaco, un compuesto bipyridilo, un compuesto imidazol, un compuesto fenantrolina, un compuesto etilenodiamina, aminoácidos, un compuesto triazina, un compuesto biquinolina, un compuesto piridilazo, un compuesto nitroso y un compuesto oxina. Se puede sustituir al menos un átomo de hidrógeno que ocupa una posición diferente a la posición de coordinación del ligando por un sustituyente. Los ejemplos del sustituyente incluyen un grupo alquilo, un grupo arilo, un grupo alilo, un grupo fenilo, un grupo hidroxilo, un grupo alcoxi, un grupo carboxilo, un grupo carbonilo, un grupo sulfona, un grupo sulfonilo, un grupo nitro, un grupo nitroso, una amina primaria, una amina secundaria, una amina terciaria, un grupo amino, un grupo acilo, un grupo amido y un grupo halógeno. El complejo de metal de transición puede incluir dos o más tipos de ligandos, es decir, puede ser un complejo de ligando mixto.

En un método colorimétrico de la presente invención, la oxidorreductasa es preferiblemente una deshidrogenasa o una oxidasa. La velocidad de reacción puede aumentar con la cantidad de enzima. El analito es, por ejemplo, glucosa, colesterol, ácido úrico, ácido láctico, ácido pirúvico, creatina o creatinina. En este caso, la oxidorreductasa puede ser una deshidrogenasa o una oxidasa que se corresponde con el respectivo analito.

En un método colorimétrico de la presente invención, es preferible usar un mediador adicionalmente a la sustancia que puede cambiar de color que cambia de color transfiriendo un electrón. Aunque la sustancia que puede cambiar de color puede servir como un mediador, tiene la función no sólo de transferir un electrón sino también de cambiar color. Por lo tanto, el mediador adicional difiere de la sustancia que puede cambiar de color. El mediador aumenta la velocidad de transferencia de electrones, que, a su vez, aumenta la velocidad del cambio de color de la sustancia

ES 2 316 716 T3

que puede cambiar de color. Por tanto, es posible usar menos oxidorreductasa y obtener una ventaja en cuanto a costes. El mediador es, por ejemplo, un complejo de osmio, un complejo de rutenio o similares. Más adelante se describirán ejemplos específicos del mediador. Cuando se usa la sustancia que puede cambiar de color con el mediador, es preferible usar un complejo de cobre como la sustancia que puede cambiar de color y usar un complejo de osmio o de rutenio como el mediador.

Una pieza de ensayo incluye preferiblemente un gel inorgánico así como el reactivo. La sustancia que puede cambiar de color que cambia de color transfiriendo un electrón se reduce por transferencia de electrones y, por tanto, cambia de color. Sin embargo, cuando el oxígeno está presente en el entorno, el color puede perder intensidad debido a la reoxidación de la sustancia que puede cambiar de color. El gel inorgánico puede ser útil para evitar la pérdida de intensidad.

Más adelante en este documento se describirá la presente invención con más detalle mediante ejemplos específicos.

Como se ha descrito anteriormente, la sustancia que puede cambiar de color que cambia de color transfiriendo un electrón es un complejo de metal de transición en la presente invención. Entre los complejos de metal de transición particularmente adecuados para la sustancia que puede cambiar de color están un complejo de cobre, un complejo de hierro, un complejo de rutenio y un complejo de osmio.

Complejo de cobre

El color del complejo de cobre cambia, por ejemplo, de azul (Cu^{2+}) a marrón rojizo (Cu^+) mediante transferencia de electrones que está causada por una enzima. Los ejemplos de un ligando en el complejo de cobre incluyen amoniaco, un compuesto biperidilo, un compuesto imidazol, un compuesto fenantrolina, un compuesto etilendiamina, aminoácidos, un compuesto triazina, un compuesto biquinolina, un compuesto piridilazo, un compuesto nitroso, un compuesto oxina, un compuesto benzotiazol, un compuesto acetilacetona, un compuesto antraquinona, un compuesto xanteno, ácido oxálico y un derivado de cada uno de los compuestos. Se puede usar un ligando mixto con dos o más tipos de estos ligandos.

Para el compuesto biperidilo, el número de coordinación es 4 ó 6. Con vistas a la estabilidad se deben coordinar dos biperidilos en dos posiciones de coordinación en el complejo, respectivamente. Los átomos de hidrógeno que se unen a los anillos de piridina pueden estar no sustituidos o sustituidos. La introducción de un sustituyente hace posible controlar, por ejemplo, la solubilidad y el potencial de oxidación-reducción del complejo. Los ejemplos de la posición del sustituyente incluyen la posición 4,4' y posición 5,5'. Los ejemplos del sustituyente incluyen un grupo alquilo (tal como un grupo metilo, un grupo etilo o un grupo propilo), un grupo arilo, un grupo alilo, un grupo fenilo, un grupo hidroxilo, un grupo alcoxi (tal como un grupo metoxi o un grupo etoxi), un grupo carboxilo, un grupo carbonilo, un grupo sulfona, un grupo sulfonilo, un grupo nitro, un grupo nitroso, una amina primaria, una amina secundaria, una amina terciaria, un grupo amino, un grupo acilo, un grupo amido y un grupo halógeno (tal como bromo, cloro o yodo).

Los ejemplos de un complejo de cobre biperidilo incluyen $[\text{Cu}(\text{biperidil})_2]$, $[\text{Cu}(4,4'\text{-dimetil-2,2'}\text{-biperidil})_2]$, $[\text{Cu}(4,4'\text{-difenil-2,2'}\text{-biperidil})_2]$, $[\text{Cu}(4,4'\text{-diamino-2,2'}\text{-biperidil})_2]$, $[\text{Cu}(4,4'\text{-dihidroxi-2,2'}\text{-biperidil})_2]$, $[\text{Cu}(4,4'\text{-dicarboxi-2,2'}\text{-biperidil})_2]$, $[\text{Cu}(4,4'\text{-dibromo-2,2'}\text{-biperidil})_2]$, $[\text{Cu}(5,5'\text{-dimetil-2,2'}\text{-biperidil})_2]$, $[\text{Cu}(5,5'\text{-difenil-2,2'}\text{-biperidil})_2]$, $[\text{Cu}(5,5'\text{-diamino-2,2'}\text{-biperidil})_2]$, $[\text{Cu}(5,5'\text{-dihidroxi-2,2'}\text{-biperidil})_2]$, $[\text{Cu}(5,5'\text{-dicarboxi-2,2'}\text{-biperidil})_2]$, $[\text{Cu}(5,5'\text{-dibromo-2,2'}\text{-biperidil})_2]$, $[\text{Cu}(\text{biperidil})_3]$, $[\text{Cu}(4,4'\text{-dimetil-2,2'}\text{-biperidil})_3]$, $[\text{Cu}(4,4'\text{-difenil-2,2'}\text{-biperidil})_3]$, $[\text{Cu}(4,4'\text{-diamino-2,2'}\text{-biperidil})_3]$, $[\text{Cu}(4,4'\text{-dihidroxi-2,2'}\text{-biperidil})_3]$, $[\text{Cu}(4,4'\text{-dicarboxi-2,2'}\text{-biperidil})_3]$, $[\text{Cu}(4,4'\text{-dibromo-2,2'}\text{-biperidil})_3]$, $[\text{Cu}(5,5'\text{-dimetil-2,2'}\text{-biperidil})_3]$, $[\text{Cu}(5,5'\text{-difenil-2,2'}\text{-biperidil})_3]$, $[\text{Cu}(5,5'\text{-diamino-2,2'}\text{-biperidil})_3]$, $[\text{Cu}(5,5'\text{-dihidroxi-2,2'}\text{-biperidil})_3]$, $[\text{Cu}(5,5'\text{-dicarboxi-2,2'}\text{-biperidil})_3]$ y $[\text{Cu}(5,5'\text{-dibromo-2,2'}\text{-biperidil})_3]$.

Para el compuesto imidazol, el número de coordinación es 4. Los átomos de hidrógeno que se unen a los anillos de imidazol pueden estar no sustituidos o sustituidos. La introducción de un sustituyente hace posible controlar, por ejemplo, la solubilidad y el potencial de oxidación-reducción del complejo. Los ejemplos de la posición del sustituyente incluyen la posición 2, posición 4 y posición 5. Los ejemplos del sustituyente incluyen un grupo alquilo (tal como un grupo metilo, un grupo etilo o un grupo propilo), un grupo arilo, un grupo alilo, un grupo fenilo, un grupo hidroxilo, un grupo alcoxi (tal como un grupo metoxi o un grupo etoxi), un grupo carboxilo, un grupo carbonilo, un grupo sulfona, un grupo sulfonilo, un grupo nitro, un grupo nitroso, una amina primaria, una amina secundaria, una amina terciaria, un grupo amino, un grupo acilo, un grupo amido y un grupo halógeno (tal como bromo, cloro o yodo).

Los ejemplos de un complejo de cobre imidazol incluyen $[\text{Cu}(\text{imidazol})_4]$, $[\text{Cu}(4\text{-metil-imidazol})_4]$, $[\text{Cu}(4\text{-fenil-imidazol})_4]$, $[\text{Cu}(4\text{-amino-imidazol})_4]$, $[\text{Cu}(4\text{-hidroxi-imidazol})_4]$, $[\text{Cu}(4\text{-carboxi-imidazol})_4]$ y $[\text{Cu}(4\text{-bromo-imidazol})_4]$.

Los aminoácidos incluyen, por ejemplo, arginina (L-Arg). Un complejo de cobre que contiene arginina generalmente tiene la ventaja de una solubilidad elevada. El ligando mixto puede ser una combinación de los compuestos biperidilo y los compuestos imidazol o una combinación de los compuestos biperidilo y los aminoácidos, tal como $[\text{Cu}(\text{imidazol})_2(\text{biperidil})]$ o $[\text{Cu}(\text{L-Arg})_2(\text{biperidil})]$. Se puede usar el ligando mixto para impartir diversas propiedades al complejo, por ejemplo, la arginina mejora la solubilidad del complejo.

ES 2 316 716 T3

Complejo de hierro

El color del complejo de hierro cambia, por ejemplo, de amarillo (Fe^{3+}) a rojo (Fe^{2+}) mediante transferencia de electrones que es causada por una enzima. Los ejemplos de un ligando en el complejo de hierro incluyen amoniaco, un compuesto biperidilo, un compuesto imidazol, un compuesto fenantrolina, un compuesto etilenodiamina, aminoácidos, un compuesto triazina, un compuesto biquinolina, un compuesto piridilazo, un compuesto nitroso, un compuesto oxina, un compuesto benzotiazol, un compuesto acetilacetona, un compuesto antraquinona, un compuesto xanteno, ácido oxálico y un derivado de cada uno de los compuestos. Se puede usar un ligando mixto con dos o más tipos de estos ligandos.

Para el compuesto biperidilo, el número de coordinación es 6. Los átomos de hidrógeno que se unen a los anillos de piridina pueden estar no sustituidos o sustituidos. La introducción de un sustituyente hace posible controlar, por ejemplo, la solubilidad y el potencial de oxidación-reducción del complejo. Los ejemplos de la posición del sustituyente incluyen la posición 4,4' y posición 5,5'. Los ejemplos del sustituyente incluyen un grupo alquilo (tal como un grupo metilo, un grupo etilo o un grupo propilo), un grupo arilo, un grupo alilo, un grupo fenilo, un grupo hidroxilo, un grupo alcoxi (tal como un grupo metoxi o un grupo etoxi), un grupo carboxilo, un grupo carbonilo, un grupo sulfona, un grupo sulfonilo, un grupo nitro, un grupo nitroso, una amina primaria, una amina secundaria, una amina terciaria, un grupo amino, un grupo acilo, un grupo amido y un grupo halógeno (tal como bromo, cloro o yodo).

Los ejemplos de un complejo de hierro biperidilo incluyen $[\text{Fe}(\text{biperidil})_3]$, $[\text{Fe}(4,4'\text{-dimetil-2,2'}\text{-biperidil})_3]$, $[\text{Fe}(4,4'\text{-difenil-2,2'}\text{-biperidil})_3]$, $[\text{Fe}(4,4'\text{-diamino-2,2'}\text{-biperidil})_3]$, $[\text{Fe}(4,4'\text{-dihidroxi-2,2'}\text{-biperidil})_3]$, $[\text{Fe}(4,4'\text{-dicarboxi-2,2'}\text{-biperidil})_3]$, $[\text{Fe}(4,4'\text{-dibromo-2,2'}\text{-biperidil})_3]$, $[\text{Fe}(5,5'\text{-dimetil-2,2'}\text{-biperidil})_3]$, $[\text{Fe}(5,5'\text{-difenil-2,2'}\text{-biperidil})_3]$, $[\text{Fe}(5,5'\text{-diamino-2,2'}\text{-biperidil})_3]$, $[\text{Fe}(5,5'\text{-dihidroxi-2,2'}\text{-biperidil})_3]$, $[\text{Fe}(5,5'\text{-dicarboxi-2,2'}\text{-biperidil})_3]$ y $[\text{Fe}(5,5'\text{-dibromo-2,2'}\text{-biperidil})_3]$.

Para el compuesto imidazol, el número de coordinación es 6. Los átomos de hidrógeno que se unen a los anillos de imidazol pueden estar no sustituidos o sustituidos. La introducción de un sustituyente hace posible controlar, por ejemplo, la solubilidad y el potencial de oxidación-reducción del complejo. Los ejemplos de la posición del sustituyente incluyen la posición 2, posición 4 y posición 5. Los ejemplos del sustituyente incluyen un grupo alquilo (tal como un grupo metilo, un grupo etilo o un grupo propilo), un grupo arilo, un grupo alilo, un grupo fenilo, un grupo hidroxilo, un grupo alcoxi (tal como un grupo metoxi o un grupo etoxi), un grupo carboxilo, un grupo carbonilo, un grupo sulfona, un grupo sulfonilo, un grupo nitro, un grupo nitroso, una amina primaria, una amina secundaria, una amina terciaria, un grupo amino, un grupo acilo, un grupo amido y un grupo halógeno (tal como bromo, cloro o yodo).

Los ejemplos de un complejo de hierro imidazol incluyen $[\text{Fe}(\text{imidazol})_6]$, $[\text{Fe}(4\text{-metil-imidazol})_6]$, $[\text{Fe}(4\text{-fenil-imidazol})_6]$, $[\text{Fe}(4\text{-amino-imidazol})_6]$, $[\text{Fe}(4\text{-hidroxi-imidazol})_6]$, $[\text{Fe}(4\text{-carboxi-imidazol})_6]$ y $[\text{Fe}(4\text{-bromo-imidazol})_6]$.

Los aminoácidos incluyen, por ejemplo, arginina (L-Arg). Un complejo de hierro que contiene arginina generalmente tiene la ventaja de una solubilidad elevada. El ligando mixto puede ser una combinación de los compuestos biperidilo y los compuestos imidazol o una combinación de los compuestos biperidilo y los aminoácidos, tal como $[\text{Fe}(\text{imidazol})_2(\text{biperidil})_2]$ o $[\text{Fe}(\text{L-Arg})_2(\text{biperidil})_2]$. Se puede usar el ligando mixto para impartir diversas propiedades al complejo, por ejemplo, la arginina mejora la solubilidad del complejo.

Complejo de rutenio

Los ejemplos de un ligando en el complejo de rutenio incluyen amoniaco, un compuesto biperidilo, un compuesto imidazol, un compuesto fenantrolina, un compuesto etilenodiamina, aminoácidos, un compuesto triazina, un compuesto biquinolina, un compuesto piridilazo, un compuesto nitroso, un compuesto oxina, un compuesto benzotiazol, un compuesto acetilacetona, un compuesto antraquinona, un compuesto xanteno, ácido oxálico y un derivado de cada uno de los compuestos. Se puede usar un ligando mixto con dos o más tipos de estos ligandos.

Para el compuesto biperidilo, el número de coordinación es 6. Los átomos de hidrógeno que se unen a los anillos de piridina pueden estar no sustituidos o sustituidos. La introducción de un sustituyente hace posible controlar, por ejemplo, la solubilidad y el potencial de oxidación-reducción del complejo. Los ejemplos de la posición del sustituyente incluyen la posición 4,4' y posición 5,5'. Los ejemplos del sustituyente incluyen un grupo alquilo (tal como un grupo metilo, un grupo etilo o un grupo propilo), un grupo arilo, un grupo alilo, un grupo fenilo, un grupo hidroxilo, un grupo alcoxi (tal como un grupo metoxi o un grupo etoxi), un grupo carboxilo, un grupo carbonilo, un grupo sulfona, un grupo sulfonilo, un grupo nitro, un grupo nitroso, una amina primaria, una amina secundaria, una amina terciaria, un grupo amino, un grupo acilo, un grupo amido y un grupo halógeno (tal como bromo, cloro o yodo).

Los ejemplos de un complejo de rutenio biperidilo incluyen $[\text{Ru}(\text{biperidil})_3]$, $[\text{Ru}(4,4'\text{-dimetil-2,2'}\text{-biperidil})_3]$, $[\text{Ru}(4,4'\text{-difenil-2,2'}\text{-biperidil})_3]$, $[\text{Ru}(4,4'\text{-diamino-2,2'}\text{-biperidil})_3]$, $[\text{Ru}(4,4'\text{-dihidroxi-2,2'}\text{-biperidil})_3]$, $[\text{Ru}(4,4'\text{-dicarboxi-2,2'}\text{-biperidil})_3]$, $[\text{Ru}(4,4'\text{-dibromo-2,2'}\text{-biperidil})_3]$, $[\text{Ru}(5,5'\text{-dimetil-2,2'}\text{-biperidil})_3]$, $[\text{Ru}(5,5'\text{-difenil-2,2'}\text{-biperidil})_3]$, $[\text{Ru}(5,5'\text{-diamino-2,2'}\text{-biperidil})_3]$, $[\text{Ru}(5,5'\text{-dihidroxi-2,2'}\text{-biperidil})_3]$, $[\text{Ru}(5,5'\text{-dicarboxi-2,2'}\text{-biperidil})_3]$ y $[\text{Ru}(5,5'\text{-dibromo-2,2'}\text{-biperidil})_3]$.

ES 2 316 716 T3

Para el compuesto imidazol, el número de coordinación es 6. Los átomos de hidrógeno que se unen a los anillos de imidazol pueden estar no sustituidos o sustituidos. La introducción de un sustituyente hace posible controlar, por ejemplo, la solubilidad y el potencial de oxidación-reducción del complejo. Los ejemplos de la posición del sustituyente incluyen la posición 2, posición 4 y posición 5. Los ejemplos del sustituyente incluyen un grupo alquilo (tal como un grupo metilo, un grupo etilo o un grupo propilo), un grupo arilo, un grupo alilo, un grupo fenilo, un grupo hidroxilo, un grupo alcoxi (tal como un grupo metoxi o un grupo etoxi), un grupo carboxilo, un grupo carbonilo, un grupo sulfona, un grupo sulfonilo, un grupo nitro, un grupo nitroso, una amina primaria, una amina secundaria, una amina terciaria, un grupo amino, un grupo acilo, un grupo amido y un grupo halógeno (tal como bromo, cloro o yodo).

Los ejemplos de un complejo de rutenio imidazol incluyen $[\text{Ru}(\text{imidazol})_6]$, $[\text{Ru}(4\text{-metil-imidazol})_6]$, $[\text{Ru}(4\text{-fenil-imidazol})_6]$, $[\text{Ru}(4\text{-amino-imidazol})_6]$, $[\text{Ru}(4\text{-hidroxi-imidazol})_6]$, $[\text{Ru}(4\text{-carboxi-imidazol})_6]$ y $[\text{Ru}(4\text{-bromo-imidazol})_6]$.

Los aminoácidos incluyen, por ejemplo, arginina (L-Arg). Un complejo de rutenio que contiene arginina generalmente tiene la ventaja de una solubilidad elevada. El ligando mixto puede ser una combinación de los compuestos bipyridilo y los compuestos imidazol o una combinación de los compuestos bipyridilo y los aminoácidos, tal como $[\text{Ru}(\text{imidazol})_2(\text{bipiridil})_2]$ o $[\text{Ru}(\text{L-Arg})_2(\text{bipiridil})_2]$. Se puede usar el ligando mixto para impartir diversas propiedades al complejo, por ejemplo, la arginina mejora la solubilidad del complejo.

20 *Complejo de osmio*

El color del complejo de osmio cambia, por ejemplo, de naranja (Os^{3+}) a marrón oscuro (Os^{2+}) mediante transferencia de electrones que está causada por una enzima. Los ejemplos de un ligando en el complejo de osmio incluyen amoniaco, un compuesto bipyridilo, un compuesto imidazol, un compuesto fenantrolina, un compuesto etilenodiamina, aminoácidos, un compuesto triazina, un compuesto biquinolina, un compuesto piridilazo, un compuesto nitroso, un compuesto oxina, un compuesto benzotiazol, un compuesto acetilacetona, un compuesto antraquinona, un compuesto xanteno, ácido oxálico y un derivado de cada uno de los compuestos. Se puede usar un ligando mixto con dos o más tipos de estos ligandos.

Para el compuesto bipyridilo, el número de coordinación es 6. Los átomos de hidrógeno que se unen a los anillos de piridina pueden estar no sustituidos o sustituidos. La introducción de un sustituyente hace posible controlar, por ejemplo, la solubilidad y el potencial de oxidación-reducción del complejo. Los ejemplos de la posición del sustituyente incluyen la posición 4,4' y posición 5,5'. Los ejemplos del sustituyente incluyen un grupo alquilo (tal como un grupo metilo, un grupo etilo o un grupo propilo), un grupo arilo, un grupo alilo, un grupo fenilo, un grupo hidroxilo, un grupo alcoxi (tal como un grupo metoxi o un grupo etoxi), un grupo carboxilo, un grupo carbonilo, un grupo sulfona, un grupo sulfonilo, un grupo nitro, un grupo nitroso, una amina primaria, una amina secundaria, una amina terciaria, un grupo amino, un grupo acilo, un grupo amido y un grupo halógeno (tal como bromo, cloro o yodo).

Los ejemplos de un complejo de osmio bipyridilo incluyen $[\text{Os}(\text{bipiridil})_3]$, $[\text{Os}(4,4'\text{-dimetil-2,2'-bipiridil})_3]$, $[\text{Os}(4,4'\text{-difenil-2,2'-bipiridil})_3]$, $[\text{Os}(4,4'\text{-diamino-2,2'-bipiridil})_3]$, $[\text{Os}(4,4'\text{-dihidroxi-2,2'-bipiridil})_3]$, $[\text{Os}(4,4'\text{-dicarboxi-2,2'-bipiridil})_3]$, $[\text{Os}(4,4'\text{-dibromo-2,2'-bipiridil})_3]$, $[\text{Os}(5,5'\text{-dimetil-2,2'-bipiridil})_3]$, $[\text{Os}(5,5'\text{-difenil-2,2'-bipiridil})_3]$, $[\text{Os}(5,5'\text{-diamino-2,2'-bipiridil})_3]$, $[\text{Os}(5,5'\text{-dihidroxi-2,2'-bipiridil})_3]$, $[\text{Os}(5,5'\text{-dicarboxi-2,2'-bipiridil})_3]$ y $[\text{Os}(5,5'\text{-dibromo-2,2'-bipiridil})_3]$.

Para el compuesto imidazol, el número de coordinación es 6. Los átomos de hidrógeno que se unen a los anillos de imidazol pueden estar no sustituidos o sustituidos. La introducción de un sustituyente hace posible controlar, por ejemplo, la solubilidad y el potencial de oxidación-reducción del complejo. Los ejemplos de la posición del sustituyente incluyen la posición 2, posición 4 y posición 5. Los ejemplos del sustituyente incluyen un grupo alquilo (tal como un grupo metilo, un grupo etilo o un grupo propilo), un grupo arilo, un grupo alilo, un grupo fenilo, un grupo hidroxilo, un grupo alcoxi (tal como un grupo metoxi o un grupo etoxi), un grupo carboxilo, un grupo carbonilo, un grupo sulfona, un grupo sulfonilo, un grupo nitro, un grupo nitroso, una amina primaria, una amina secundaria, una amina terciaria, un grupo amino, un grupo acilo, un grupo amido y un grupo halógeno (tal como bromo, cloro o yodo).

Los ejemplos de un complejo de osmio imidazol incluyen $[\text{Os}(\text{imidazol})_6]$, $[\text{Os}(4\text{-metil-imidazol})_6]$, $[\text{Os}(4\text{-fenil-imidazol})_6]$, $[\text{Os}(4\text{-amino-imidazol})_6]$, $[\text{Os}(4\text{-hidroxi-imidazol})_6]$, $[\text{Os}(4\text{-carboxi-imidazol})_6]$ y $[\text{Os}(4\text{-bromo-imidazol})_6]$.

Los aminoácidos incluyen, por ejemplo, arginina (L-Arg). Un complejo de osmio que contiene arginina generalmente tiene la ventaja de una solubilidad elevada. El ligando mixto puede ser una combinación de los compuestos bipyridilo y los compuestos imidazol o una combinación de los compuestos bipyridilo y los aminoácidos, tal como $[\text{Os}(\text{imidazol})_2(\text{bipiridil})_2]$ o $[\text{Os}(\text{L-Arg})_2(\text{bipiridil})_2]$. Se puede usar el ligando mixto para impartir diversas propiedades al complejo, por ejemplo, la arginina mejora la solubilidad del complejo.

La anterior explicación de los complejos de metal de transición se basa en el tipo de metal de transición y la presente invención no se limita al mismo. Más adelante en este documento se describirán los complejos de metal de transición basándose en sus ligandos.

ES 2 316 716 T3

Un ligando que contiene átomos de coordinación N, O y S tiene grupos tales como =N-OH, -COOH, -OH, -SH y >C=O en la molécula. Los ejemplos de complejos metálicos que incluyen este tipo de ligando son quelato NN, quelato NO, quelato NS, quelato OO, quelato OS, quelato SS (bidentado), quelato N (unidentado) y quelato NNN (tridentado). La combinación es diversa. Cuando un ligando tiene un doble enlace, Cu, Fe, Ru y Os del complejo tiende a tener la función de transferir electrones. El ligando preferiblemente tienen un anillo aromático. El ligando puede ser cualquiera de los anteriores sustituyentes. Por ejemplo, la introducción de un grupo sulfona puede mejorar la solubilidad del complejo metálico. El complejo metálico se puede formar mezclando dos o más tipos de ligandos y se puede usar como un complejo de ligando mixto. Por ejemplo, cuando uno de los ligandos es un aminoácido, el complejo metálico puede tener una buena afinidad con una enzima. Adicionalmente, diversos átomos de halógeno (tales como Cl, F, Br e I) pueden estar unidos a parte del sitio del metal central. El siguiente es un ejemplo de los complejos metálicos de transferencia que se clasifican mediante el tipo de coordinación.

Forma de coordinación NN

15 Derivado de fenantrolina

Cu + 1,10-fenantrolina

Fe + 1,10-fenantrolina

20

Cu + batofenantrolina

Fe + batofenantrolina

25

Cu + ácido batofenantrolina sulfónico

Fe + ácido batofenantrolina sulfónico

Derivado de bipyridilo

30

Cu + 2,2'-bipyridilo

Fe + 2,2'-bipyridilo

35

Fe + 4,4'-diamino-2,2'-bipyridilo

Ru + 4,4'-diamino-2,2'-bipyridilo

Derivado de triazina

40

Cu + TPTZ (2,4,6-tripiridil-S-triazina)

Fe + TPTZ (2,4,6-tripiridil-S-triazina)

45

Fe + PDTS (3-(2-piridil)-5,6-bis(4-sulfofenil)-1,2,4-triazina)

Derivado de biquinolina

Cu + cuproina (2,2'-biquinolina)

50

Derivado de piridilazo

Fe + nitro-PAPS (2-(5-nitro-2-piridilazo)-5-[N-n-propil-N-(3-sulfopropil) amino] fenol)

55

Forma de coordinación NO

Fe + nitroso-PSAP (2-nitroso-5-[N-n-propil-N-(3-sulfopropil) amino] fenol)

60

Fe + nitroso-ESAP (2-nitroso-5-[N-etil-N-(3-sulfopropil) amino] fenol) Fe + 1-nitroso-2-naftol

Forma de coordinación NS

65

Fe + ácido 2-amino-4-tiazol acético

ES 2 316 716 T3

Forma de coordinación OO

Fe + ácido 1,2-naftoquinona-4-sulfónico

5

Forma de ligando mixto

Os + Cl, imidazol, 4,4'-dimetil-2,2'-bipiridilo

10

Os + imidazol, 4,4'-dimetil-2,2'-bipiridilo

Cu + L-arginina, 2,2'-bipiridilo

15

Cu + etilenodiamina, 2,2'-bipiridilo

Cu + imidazol, 2,2'-bipiridilo

20 A continuación se aplica el método colorimétrico de la presente invención a una pieza de ensayo. En este caso se usa un complejo de cobre como la sustancia que puede cambiar de color que cambia de color transfiriendo un electrón y se usa glucosa como el analito. Otros analitos tales como colesterol se analizan básicamente de la misma manera excepto porque se cambia la oxidorreductasa de acuerdo con los analitos.

25 En primer lugar se prepara un complejo de cobre bipiridilo usando un producto disponible en el mercado o empleando la siguiente manera. Por ejemplo, se mezclan CuCl_2 y 2,2'-bipiridilo (bpi) en un baño de agua a aproximadamente 60°C a 90°C y se sintetizan hasta formar $[\text{Cu}(\text{bpi})_2]\text{Cl}_2$. La proporción molar de CuCl_2 a 2,2'-bipiridilo (bpi) es, por ejemplo, 1 : 2. La concentración de la solución acuosa del complejo de cobre bipiridilo varía, por ejemplo, del 1 al 10% en peso. Se disuelve un aglutinante en la solución acuosa del complejo de cobre bipiridilo y después se disuelve glucosa deshidrogenasa (GDH) en la solución de aglutinante, produciendo de este modo una solución de reactivo. 30 Los ejemplos del aglutinante incluyen hidroxipropilcelulosa (HPC), alcohol polivinílico (PVA), polivinil pirrolidona (PVP), poliacrilamida y albúmina sérica bovina (BSA) y se prefiere HPC. La concentración del aglutinante varía, por ejemplo, del 0,5 al 5% en peso. La concentración de GDH varía, por ejemplo, de 1000 a 50000 U/ml. Una lámina porosa (por ejemplo, papel de filtro) se impregna con la solución de reactivo y se seca, de tal forma que se pueda producir una pieza de ensayo para análisis de glucosa. Antes de la impregnación con la solución de reactivo, es preferible que 35 la lámina porosa se impregne con una solución de gel inorgánico y se seque. El gel inorgánico puede ser esmectita o similares. La concentración del gel inorgánico en la solución varía, por ejemplo, del 1 al 5% en peso, preferiblemente del 1 al 3% en peso y más preferiblemente del 1,5 al 2% en peso. La solución de gel inorgánico también puede incluir un tensioactivo anfótero tal como CHAPS. La concentración del tensioactivo anfótero con respecto a la solución de gel inorgánico total varía, por ejemplo, del 0,1 al 2% en peso, preferiblemente del 0,1 al 1% en peso y más preferiblemente del 0,2 al 0,4% en peso. La cantidad de gel inorgánico impregnado en la lámina porosa varía, por ejemplo, de 1 a 50 mg/cm^3 , preferiblemente de 10 a 30 mg/cm^3 y más preferiblemente de 15 a 20 mg/cm^3 , cuando se mide en base al volumen de huecos en la lámina porosa. La lámina porosa puede ser una película porosa asimétrica en la que el tamaño de poro varía en la dirección del espesor o en la dirección de superficie de la lámina. El color original de esta pieza de ensayo es azul. Cuando se aplica una muestra que contiene glucosa (por ejemplo, sangre) a la pieza de 45 ensayo, el color cambia a marrón rojizo de acuerdo con la concentración de glucosa. Por lo tanto, se puede realizar el análisis cualitativo o cuantitativo de la glucosa usando el cambio de color. El tiempo requerido para el análisis es de aproximadamente 2 a 3 segundos después de la aplicación de la muestra. Si la pieza de ensayo se impregna con un gel inorgánico, es posible evitar la pérdida de intensidad causada por reoxidación después del cambio de color y, por ejemplo, aumentar el tiempo desde el final de una reacción de color al inicio de la medición del color producido de 50 este modo.

El gel inorgánico se selecciona preferiblemente de minerales de arcilla expansible. Entre los minerales de arcilla expansible, bentonita, esmectita, vermiculita o mica de flúor sintética son las más preferidas. En particular, se prefiere esmectita sintética tal como hectorita sintética o saponita sintética o mica sintética (la mica natural generalmente es un mineral de arcilla no expansible) tal como la mica sintética expansible (o mica de Na) tipificada por mica de flúor sintética. 55

A continuación, el método colorimétrico de la presente invención se aplica a análisis de sistemas líquidos. En este caso se usa un complejo de cobre como la sustancia que puede cambiar de color que cambia de color transfiriendo un electrón y se usa glucosa como el analito. Otros analitos tales como colesterol se analizan básicamente de la misma manera excepto porque se cambia la oxidorreductasa de acuerdo con los analitos. 60

En primer lugar se sintetiza un complejo de cobre $[\text{Cu}(\text{bpi})_2]\text{Cl}_2$ de tal manera como se ha descrito anteriormente. Después se prepara una solución de reactivo disolviendo el complejo de cobre y GDH en una solución tampón. Aunque los mismos se pueden disolver en agua, se prefiere la solución tampón. El pH de la solución tampón varía, por ejemplo, de 6 a 8 y preferiblemente 6,5 a 7. La concentración del complejo de cobre varía, por ejemplo, de 0,1 a 60 mM, preferiblemente de 0,2 a 10 mM y más preferiblemente de 0,3 a 0,6 mM. La concentración de GDH varía, por ejemplo, de 10 a 1000 U/ml, preferiblemente de 50 a 500 U/ml y más preferiblemente de 100 a 200 U/ml. Cuando se añade una 65

ES 2 316 716 T3

muestra que contiene glucosa (por ejemplo, sangre) a la solución de reactivo, el color de la solución de reactivo cambia de azul a marrón rojizo de acuerdo con la concentración de glucosa en un tiempo breve, por ejemplo, 5 segundos o menos. Este cambio se puede observar visualmente o se puede medir con un dispositivo de medición óptico tal como un espectrofotómetro. La cantidad de la muestra añadida varía, por ejemplo, de 1 a 100 μl , preferiblemente de 3 a 10 μl y más preferiblemente de 5 a 10 μl con respecto a 1 ml de solución de reactivo.

Como se ha descrito anteriormente, es preferible usar un mediador tal como un complejo de osmio o un complejo de rutenio adicionalmente a la sustancia que puede cambiar de color que cambia de color transfiriendo un electrón en el método colorimétrico de la presente invención. Para una pieza de ensayo, la cantidad de mediador con respecto a la solución de reactivo total varía, por ejemplo, de 0,1 a 50 mM, preferiblemente de 0,5 a 10 mM y más preferiblemente de 1 a 3 mM. Para análisis de sistemas líquidos, la cantidad de mediador con respecto a la solución de reactivo total varía, por ejemplo, de 0,1 a 10 mM, preferiblemente de 0,1 a 1 mM y más preferiblemente de 0,1 a 0,3 mM. Estos intervalos de concentración óptima dependen del tipo de mediador que se usará.

Ejemplos

Más adelante en este documento se describirán ejemplos de la presente invención. En cada uno de los ejemplos, PQQ representa pirroloquinolina quinona y otros reactivos se explican con detalle en la siguiente tabla.

Reactivo	Fabricante	Nota (nombre, etc.)
PQQGDH	TOYOBO Co., Ltd.	PQQ-glucosa deshidrogenasa
GOD	Sigma	Glucosa oxidasa tipo X-S
Piruvato oxidasa	BoehringerMannheim	
Glucosa	Wako Pure Chemical Industries, Ltd.	D(+)-glucosa
Ácido pirúvico	Wako Pure Chemical Industries, Ltd.	Piruvato de litio monohidrato

Ejemplo 1

Se preparó una solución acuosa de $[\text{Cu}(\text{bpi})_2]\text{Cl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (80 mM) mezclando CuCl_2 y 2,2'-bipiridilo en una proporción molar de 1 : 2 en un baño de agua a aproximadamente 80°C. Se disolvió HPC-M en la solución acuosa del complejo de cobre biperidilo al 2% en peso y después se calentó a 50°C y se enfrió a 25°C. Adicionalmente, se disolvió GDH en esta solución acuosa a 50000 U/ml, produciendo de este modo una solución de reactivo. A continuación, una película porosa asimétrica ("BTS-25", fabricada por US Filter) en la que el tamaño de poro varía en la dirección de espesor se impregnó desde la superficie que incluye poros más pequeños con el 2% en peso de una solución acuosa de gel inorgánico ("Laponite XLG", fabricada por Rockwood Additives Limited) y después se secó. Además se aplicaron 2 μl de la solución de reactivo a la superficie de la película porosa que incluye poros más grandes y después se secó al aire para formar un punto circular (azul claro). Esta parte de punto se cortó e intercaló entre películas PET con orificios, de tal forma que se obtuvo una pieza de ensayo deseada para análisis de glucosa.

Se aplicó suero que tenía cuatro concentraciones de glucosa diferentes (0 mg/ml, 2 mg/ml, 4 mg/ml y 6 mg/ml,) a la pieza de ensayo y se midió el color producido en la pieza de ensayo 5 segundos después de la aplicación usando un dispositivo de medición de reflectancia (longitud de onda: 470 nm). El gráfico en la Figura 1 muestra los resultados. Como se muestra en la Figura 1, la pieza de ensayo produjo color de acuerdo con la concentración de glucosa en el intervalo de 5 segundos a partir de la aplicación. Este color (marrón rojizo) correspondiente a la concentración de glucosa también se observó visualmente. El tiempo requerido para producir el color fue de 2 a 3 segundos. El suero que contenía glucosa se preparó de la siguiente manera. Plasma de sangre humana se sometió a glicólisis completamente, se congeló y se fundió para producir suero. Después se añadió glucosa al suero en diferentes concentraciones como se ha descrito anteriormente.

ES 2 316 716 T3

Ejemplo 2

Se disolvió cloruro de cobre (II) (0,01 mol) en agua caliente (30 ml), a la que se añadió 2,2'-bipiridilo (0,02 mol) y se agitó. Después, la solución se enfrió para precipitar hexahidrato en forma de cristales, produciendo de este modo $[\text{Cu}(\text{bpi})_2]\text{Cl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. El siguiente reactivo de reacción (1 ml) incluyendo este complejo de cobre se puso en una microcelda que tiene una longitud de trayectoria óptica de 10 mm y se midió el espectro de absorción a una longitud de onda de 300 nm a 900 nm con un espectrofotómetro ("V-550", fabricado por JASCO Corporation) y se identificó como un blanco (oxidado). Se añadió una solución acuosa de glucosa 500 mM (10 μl) a la microcelda durante la agitación y se midió el espectro inmediatamente. El gráfico en la Figura 2 muestra los resultados. Como se muestra en la Figura 2, el complejo de cobre se redujo mediante la reacción enzimática y se observó la producción de color en una región de longitud de onda corta.

Composición de reactivo de reacción

15	$[\text{Cu}(\text{bpi})_2]\text{Cl}_2$	0,4 mM
	PIPES (pH 7,0)	50 mM
20	PQQGDH	200 U/ml

Ejemplo 3

Se añadieron cloruro de cobre (II) (0,01 mol) y 2,2'-bipiridilo (0,033 mol) a una pequeña cantidad de agua y se calentaron hasta que se disolvieron completamente. Después, la solución se enfrió para precipitar $[\text{Cu}(\text{bpi})_3]\text{Cl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en forma de cristales. El reactivo de reacción siguiente (1 ml) incluyendo este complejo de cobre se puso en una microcelda que tiene una longitud de trayectoria óptica de 10 mm y se midió el espectro de absorción a una longitud de onda de 300 nm a 900 nm con un espectrofotómetro ("V-550", fabricado por JASCO Corporation) y se identificó como un blanco (oxidado). Se añadió una solución acuosa de glucosa 500 mM (10 μl) a la microcelda durante la agitación y se midió el espectro inmediatamente. El gráfico en la Figura 3 muestra los resultados. Como se muestra en la Figura 3, el complejo de cobre se redujo mediante la reacción enzimática y se observó la producción de color en una región de longitud de onda corta.

Composición de reactivo de reacción

35	$[\text{Cu}(\text{bpi})_3]\text{Cl}_2$	0,4 mM
40	PIPES (pH 7,0)	50 mM
	PQQGDH	200 U/ml

Ejemplo 4

Se disolvió cloruro de cobre (II) (0,01 mol) en agua caliente (10 ml), se disolvió etilendiamina (en, 0,01 mol) en agua caliente (10 ml) y se disolvió 2,2'-bipiridilo (0,01 mol) en etanol caliente (10 ml). Las tres soluciones se mezclaron entre sí para preparar una solución azul. Esta solución se enfrió y concentró, produciendo de este modo cristales de aguja de $[\text{Cu}(\text{en})(\text{bpi})]\text{Cl}_2$. El siguiente reactivo de reacción (1 ml) incluyendo este complejo de cobre se puso en una microcelda que tiene una longitud de trayectoria óptica de 10 mm y se midió el espectro de absorción a una longitud de onda de 300 nm a 900 nm con un espectrofotómetro ("V-550", fabricado por JASCO Corporation) y se identificó como un blanco (oxidado). Se añadió una solución acuosa de glucosa 500 mM (10 μl) a la microcelda durante la agitación y se midió el espectro inmediatamente. El gráfico en la Figura 4 muestra los resultados. Como se muestra en la Figura 4, el complejo de cobre se redujo mediante la reacción enzimática y se observó la producción de color en una región de longitud de onda corta.

Reactivo de reacción

60	$[\text{Cu}(\text{en})(\text{bpi})]\text{Cl}_2$	0,4 mM
	PIPES (pH 7,0)	50 mM
65	PQQGDH	200 U/ml

ES 2 316 716 T3

Ejemplo 5

Se preparó una solución acuosa de cloruro de cobre disolviendo 511 mg (3,0 mmol, 1,0 eq.) de cloruro de cobre (II) dihidrato en agua caliente (10 ml). Además se disolvieron 408 mg (6,0 mmol, 2,0 eq.) de imidazol en agua (10 ml) y se disolvieron 69 mg (3,0 mmol, 1,0 eq.) de 2,2'-bipiridilo en etanol (10 ml) y después se mezclaron las dos soluciones entre sí. Esta solución mixta se añadió a la solución acuosa de cloruro de cobre, produciendo de este modo una solución azul intenso de $[\text{Cu}(\text{Him})_2(\text{bpi})]\text{Cl}_2$. El siguiente reactivo de reacción (1 ml) incluyendo este complejo de cobre se puso en una microcelda que tiene una longitud de trayectoria óptica de 10 mm y se midió el espectro de absorción a una longitud de onda de 300 nm a 900 nm con un espectrofotómetro ("V-550", fabricado por JASCO Corporation) y se identificó como un blanco (oxidado). Se añadió una solución acuosa de glucosa 500 mM (10 μl) a la microcelda durante la agitación y se midió el espectro inmediatamente. El gráfico en la Figura 5 muestra los resultados. Como se muestra en la Figura 5, el complejo de cobre se redujo mediante la reacción enzimática y se observó la producción de color en una región de longitud de onda corta.

15

Reactivo de reacción

$[\text{Cu}(\text{Him})_2(\text{bpi})]\text{Cl}_2$ 1 mM

20

PIPES (pH 7,0) 50 mM

PQQGDH 1000 U/ml

25 Ejemplo 6

Se disolvió cloruro de cobre (II) (0,01 mol) en agua caliente (10 ml), se disolvió L-arginina (0,01 mol) en agua caliente (10 ml) y se disolvió 2,2'-bipiridilo (0,01 mol) en etanol caliente (10 ml). Las tres soluciones se mezclaron entre sí para preparar una solución azul intenso. Esta solución se enfrió y concentró, produciendo de este modo cristales de aguja de $[\text{Cu}(\text{L-Arg})(\text{bpi})]\text{Cl}_2$. El siguiente reactivo de reacción (1 ml) incluyendo este complejo de cobre se puso en una microcelda que tiene una longitud de trayectoria óptica de 10 mm y se midió el espectro de absorción a una longitud de onda de 300 nm a 900 nm con un espectrofotómetro ("V-550", fabricado por JASCO Corporation) y se identificó como un blanco (oxidado). Se añadió una solución acuosa de glucosa 500 mM (10 μl) a la microcelda durante la agitación y se midió el espectro inmediatamente. El gráfico en la Figura 6 muestra los resultados. Como se muestra en la Figura 6, el complejo de cobre se redujo mediante la reacción enzimática y se observó la producción de color en una región de longitud de onda corta.

40

Reactivo de reacción

$[\text{Cu}(\text{L-Arg})(\text{bpi})]\text{Cl}_2$ 1 mM

PIPES (pH 7,0) 50 mM

45

PQQGDH 1000 U/ml

Ejemplo 7

50

Una película porosa asimétrica ("BTS-25", fabricada por US Filter) en la que el tamaño de poro varía en la dirección de espesor se impregnó desde la superficie que incluye poros más pequeños con el 2% en peso de una solución acuosa de gel inorgánico que tenía la siguiente composición y después se secó. Además se aplicaron 2 μl de la solución de reactivo que tenía la siguiente composición a la superficie de la película porosa que incluye poros más grandes y después se secó al aire para formar un punto circular (azul claro). Esta parte de punto se cortó e intercaló entre películas PET con orificios, de forma tal que se obtuvo una pieza de ensayo deseada para análisis de glucosa.

60

65

ES 2 316 716 T3

Composición de la solución acuosa de gel inorgánico
Esmectita (que es igual que la usada en el Ejemplo 1)

5 1,8% en peso

CHAPS (agente con actividad superficial) 0,4% en peso

10 Composición de la solución de reactivo

[Cu(bpi)₂]Cl₂ 80 mM

15 [OsCl(Him)(dmbpi)₂]Cl₃ 3 mM

PQQ-GDH 1000 U/ml

BSA 5%

20 CHAPS 0,4%

25 Se aplicó suero que tenía cuatro concentraciones de glucosa diferentes (0 mg/ml, 2 mg/ml, 4 mg/ml y 6 mg/ml) a la pieza de ensayo y se midió el color producido en la pieza de ensayo 5 segundos después de la aplicación usando un dispositivo de medición de reflectancia (longitud de onda: 470 nm). El gráfico en la Figura 7 muestra los resultados. Como se muestra en la Figura 7, la pieza de ensayo produjo color de acuerdo con la concentración de glucosa inmediatamente después de la aplicación. Este color (marrón rojizo) correspondiente a la concentración de glucosa también se observó visualmente. Además, la producción de color tuvo lugar en un instante. El suero que contenía glucosa se preparó de la siguiente manera. Plasma de sangre humana se sometió a glicólisis completamente, se congeló y se fundió para producir suero. Después se añadió glucosa al suero en diferentes concentraciones como se ha descrito anteriormente.

35 Ejemplo 8

Una solución acuosa de glucosa 500 mM (10 μ l) se añadió a una solución de reactivo (100 μ l) que tenía la siguiente composición. Después se observó visualmente un cambio en el color de la solución de reactivo de verde (el color original) a marrón rojizo en el intervalo de un minuto. El color original de la solución de reactivo se preparó mezclando el amarillo de una coenzima (FAD) incluida en GOD y el azul de cobre.

45 Composición de la solución de reactivo

GOD (fabricada por Sigma, actividad específica 209 U/mg)

50 mg/ml

50 [Cu(bpi)₂]Cl₂ 40 mM

PIPES (pH 7,0) 50 mM

CHAPS 0,1% en peso

55

Ejemplo 9

60 Una solución acuosa de glucosa 500 mM (10 μ l) se añadió a una solución de reactivo (100 μ l) que tenía la siguiente composición. Después se observó visualmente un cambio en el color de la solución de reactivo de verde (el color original) a marrón rojizo en el intervalo de 5 segundos. El color original de la solución de reactivo se preparó mezclando el amarillo de una coenzima (FAD) incluida en GOD y el azul de cobre.

65

ES 2 316 716 T3

Composición de la solución de reactivo

GOD (fabricada por Sigma, actividad específica 209 U/mg)

		50 mg/ml
5	[Cu(bpi) ₂]Cl ₂	40 mM
10	[OsCl(Him)(dmbpi) ₂]Cl ₂	0,3 mM
	PIPES (pH 7,0)	50 mM
15	CHAPS	0,1% en peso

Ejemplo 10

Se preparó un complejo de cobre usando diversos ligandos. Se mezclaron cloruro de cobre (II) y cada uno de los siguientes ligandos en una proporción molar de 1 : 2, se disolvieron en agua purificada y se incubaron durante 10 minutos en un baño de agua a aproximadamente 80°C de tal forma que los ligandos se coordinaron al metal. De este modo se obtuvieron las soluciones de complejo.

	Ligando	Fabricante	Complejo
25	1,10-fenantrolina	Wako Pure Chemical Industries, Ltd.	[Cu(1,10-fenantrolina) ₂]
30	batofenantrolina	Wako Pure Chemical Industries, Ltd.	[Cu(batofenantrolina) ₂]
35	sal disódica del ácido batofenantrolina sulfónico	Nacalai Tesque, Inc.	[Cu(ácido batofenantrolina sulfónico) ₂]
40	2,2'-bipiridilo	Wako Pure Chemical Industries, Ltd.	[Cu(2,2'-bipiridil) ₂]
45	TPTZ	DOJINDO LABORATORIES	[Cu(TPTZ) ₂]
	cuproina	Wako Pure Chemical Industries, Ltd.	[Cu(cuproina) ₂]

50 Ejemplo 11

Se preparó un complejo de ligando mixto de cobre usando cada uno de los siguientes ligandos y los compuestos bipiridilo. Se mezclaron cobre, cada uno de los siguientes ligandos y los compuestos bipiridilo en una proporción molar de 1 : 2 : 1, se disolvieron en agua purificada y se incubaron durante 10 minutos en un baño de agua a aproximadamente 80°C de tal forma que los ligandos y los compuestos bipiridilo se coordinaron al metal. De este modo se obtuvieron las soluciones de complejo.

	Ligando	Fabricante	Complejo
60	L-arginina	Nacalai Tesque, Inc.	[Cu(L-Arg)(bpi)]
	etilenodiamina	Nacalai Tesque, Inc.	[Cu(en)(bpi)]
65	imidazol	Wako Pure Chemical Industries, Ltd.	[Cu(Him)(bpi)]

ES 2 316 716 T3

Ejemplo 12

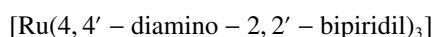
Se preparó un complejo de hierro usando diversos ligandos. Se mezclaron cloruro de hierro (III) y cada uno de los siguientes ligandos en una proporción molar de 1 : 3, se disolvieron en agua purificada y se incubaron durante 10 minutos en un baño de agua a aproximadamente 80°C de tal forma que los ligandos se coordinaron al metal. De este modo se obtuvieron las soluciones de complejo.

Ligando	Fabricante	Complejo
1,10-fenantrolina	Wako Pure Chemical Industries, Ltd.	[Fe(1,10-fenantrolina) ₃]
batofenantrolina	Wako Pure Chemical Industries, Ltd.	[Fe(batofenantrolina) ₃]
sal disódica de ácido batofenantrolina sulfónico	Nacalai Tesque, Inc.	[Fe(ácido batofenantrolina sulfónico) ₃]
2,2'-bipiridilo	Wako Pure Chemical Industries, Ltd.	[Fe(2,2'-bipiridil) ₃]
4,4'-diamino-2,2'-bipiridil (DA-bpi)	Arkray, Inc.	[Fe(4,4'-diamino-2,2'-bipiridil) ₃]
TPTZ	DOJINDO LABORATORIES	[Fe(TPTZ) ₃]
PDTS	DOJINDO LABORATORIES	[Fe(PDTS) ₃]
nitroso-PSAP	DOJINDO LABORATORIES	[Fe(nitroso-PSAP) ₃]
nitroso-ESAP	DOJINDO LABORATORIES	[Fe(nitroso-ESAP) ₃]
1-nitroso-2-naftol	KANTO KAGAKU	[Fe(1-nitroso-2-naftol) ₃]
ácido acético de 2-amino-4-tiazol	Lancaster	[Fe(ácido 2-amino-4-tiazol acético) ₃]
ácido de 1,2-naftoquinona-4 sulfónico	Nacalai Tesque, Inc.	[Fe(ácido 1,2-naftoquinona-4-sulfónico) ₃]
nitro-PAPS	DOJINDO LABORATORIES	[Fe(nitro-PAPS) ₃]

Ejemplo 13

Se prepararon dos tipos de complejos de rutenio de la siguiente manera. [Ru(NH₃)₆].

Un complejo de rutenio disponible en el mercado (fabricado por Aldrich, cloruro de hexaaminorutenio (III)) se disolvió en agua para obtener una solución de complejo de [Ru(NH₃)₆].



ES 2 316 716 T3

Ligando

En primer lugar, 11,8 g (63,0 mmol) de 2,2'-bipiridil-N,N'-dióxido (fabricado por Aldrich) se disolvieron lentamente en 120 ml de ácido sulfúrico concentrado enfriado en un baño de hielo y la solución se calentó a 100°C. Después se añadió lentamente gota a gota una solución concentrada de ácido sulfúrico (100 ml) que contenía 64,0 g (630 mmol) de nitrato de potasio y se agitó durante 1 hora mientras se calentaba. Después de la reacción, la solución se enfrió a temperatura ambiente, se vertió sobre hielo triturado y se filtró. De esta forma se obtuvo un sólido de 4,4'-dinitro-2,2'-bipiridil-N,N'-óxido. A continuación se suspendieron 7,0 g (25 mM) de 4,4'-dinitro-2,2'-bipiridil-N,N'-óxido y 6,0 g de carbono de paladio al 10% en etanol (23 ml) en Ar. A esta solución se añadió gota a gota una solución de etanol (47 ml) que contenía 6,3 g (126 mmol) de hidrazina monohidrato, seguido de reflujo durante 8 horas. La solución se enfrió y se filtró. El filtrado se concentró y purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice. De este modo, se obtuvo 4,4'-diamino-2,2'-bipiridilo.

Síntesis

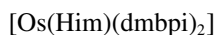
Se puso etilenglicol (10 ml) en un matraz de dos bocas de 50 ml, en el que se disolvieron y agitaron sucesivamente DA-bpi (0,2 g) y RuCl₃ (0,1 g). La solución se calentó mediante un calentador de camisa mientras se agitaba vigorosamente en N₂, seguido de reflujo durante aproximadamente 4 horas.

Purificación

Después de agitar y enfriar en N₂, la solución se trasladó a un matraz de fondo redondo de 100 ml y se lavó con acetona (5 ml) + dietil éter (20 ml). Este lavado de la solución con acetona (5 ml) + dietil éter (20 ml) se repitió hasta que el solvente se eliminó suficientemente. La sustancia diana lavada de este modo se disolvió en etanol y se precipitó mediante la adición de dietil éter. La sustancia diana se filtró mientras se lavaba con dietil éter y se secó a presión reducida. De este modo se obtuvo un sólido de [Ru(4,4'-diamino-2,2'-bipiridil)₃]. Este sólido se disolvió en agua para obtener una solución de complejo.

Ejemplo 14

Se prepararon dos tipos de complejos de osmio de la siguiente manera.

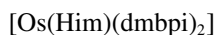


Síntesis

En primer lugar, 2,00 g (4,56 mmol) de (NH₄)₂[OsCl₆] (fabricado por Aldrich) y 1,68 g (9,11 mmol) de 4,4'-dimetil-2,2'-bipiridil (dmbpi, fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) se calentaron a reflujo en etilenglicol (60 ml) durante 1 hora en N₂. Después del enfriamiento hasta temperatura ambiente, se añadió solución de ditionito de sodio 1 M (120 ml) durante 30 minutos, seguido de enfriamiento en un baño de hielo durante 30 minutos. Los precipitados se filtraron a presión reducida y se lavaron suficientemente con agua (de 500 a 1000 ml). Adicionalmente, los precipitados se lavaron dos veces con dietil éter y después se secaron a presión reducida. De este modo se obtuvieron de 1,5 a 1,7 g de [OsCl₂(dmbpi)₂]. A continuación se calentaron a reflujo 1,56 g (2,60 mmol) de [OsCl₂(dmbpi)₂] y 0,36 g (5,2 mmol) de imidazol (Him) en un disolvente mixto agua/metanol (50 ml) en N₂ durante 2 horas. Después del enfriamiento hasta temperatura ambiente, se añadió una solución saturada de NaCl (300 ml). Los precipitados se filtraron a presión reducida, se lavaron con una solución saturada de NaCl y se secaron a presión reducida. De este modo, se obtuvo [Os(Him)(dmbpi)₂]Cl₂.

Purificación

El [Os(Him)(dmbpi)₂]Cl₂ se disolvió en la menor cantidad posible de acetonitrilo/metanol (1 : 1 v/v) y se purificó mediante cromatografía en columna (absorbente: alúmina activada, disolvente de desarrollo: acetonitrilo/metanol). El disolvente se evaporó y se disolvió el residuo en una pequeña cantidad de acetona y se reprecipitó con dietil éter. Los precipitados se filtraron y secaron a presión reducida y después se disolvieron en agua. De este modo se obtuvo una solución de complejo.



Síntesis

En primer lugar, 2,00 g (4,56 mmol) de (NH₄)₂[OsCl₆] y 1,68 g (9,11 mmol) de dmbpi se calentaron a reflujo en etilenglicol (60 ml) en N₂ durante 1 hora. Después del enfriamiento hasta temperatura ambiente, se añadió solución de ditionito de sodio 1 M (120 ml) durante 30 minutos, seguido de enfriamiento en un baño de hielo durante 30 minutos. Los precipitados se filtraron a presión reducida y se lavaron suficientemente con agua (de 500 a 1000 ml). Además, los precipitados se lavaron dos veces con dietil éter y después se secaron a presión reducida. De este modo, se obtuvieron

ES 2 316 716 T3

de 1,5 a 1,7 g de $[\text{OsCl}_2(\text{dmbpi})_2]$. A continuación se calentaron a reflujo 1,56 g (2,60 mmol) de $[\text{OsCl}_2(\text{dmbpi})_2]$ y 0,36 g (5,2 mmol) de imidazol (Him) en un disolvente de 1,2-etanoditiol (50 ml) en N_2 durante 2 horas. Después del enfriamiento hasta temperatura ambiente se añadió una solución saturada de NaCl (300 ml). Los precipitados se filtraron a presión reducida, se lavaron con una solución saturada de NaCl y se secaron a presión reducida. De este modo, se obtuvo $[\text{Os}(\text{Him})_2(\text{dmbpi})_2]\text{Cl}_2$.

Purificación

El $[\text{Os}(\text{Him})_2(\text{dmbpi})_2]\text{Cl}_2$ se disolvió en la menor cantidad posible de acetonitrilo/metanol (1 : 1 v/v) y se purificó mediante cromatografía en columna (absorbente: alúmina activada, disolvente de desarrollo: acetonitrilo/metanol). Se evaporó el disolvente y se disolvió el residuo en una pequeña cantidad de acetona y se reprecipitó con dietil éter. Los precipitados se filtraron y secaron a presión reducida y después se disolvieron en agua. De este modo se obtuvo una solución de complejo.

Ejemplo 15

Se prepararon soluciones de reactivo mezclando un complejo que incluía ligandos de fenantrona en forma de coordinación NN, una enzima y una solución tampón con las siguientes composiciones 1 a 6. El espectro de cada una de las soluciones de reactivo se midió e identificó como un blanco. Además se añadió glucosa en una cantidad equivalente al complejo a cada una de las soluciones de reactivo y se midió el espectro después del cambio de color. Las Figuras 8A a 8F muestran los resultados. Se usaron los complejos preparados en los anteriores ejemplos.

Composición de la solución de reactivo 1 (FIG. 8A)

PQQ-GDH	50 U/ml
$[\text{Cu}(1,10\text{-fenantrolina})_2]$	1 mM
PIPES pH 7	50 mM
Triton X-100	0,5%

Composición de la solución de reactivo 2 (FIG. 8B)

PQQ-GDH	50 U/ml
$[\text{Fe}(1,10\text{-fenantrolina})_3]$	0,1 mM
PIPES pH 7	50 mM
Triton X-100	0,5%

Composición de la solución de reactivo 3 (FIG. 8C)

PQQ-GDH	50 U/ml
$[\text{Cu}(\text{batofenantrolina})_2]$	1 mM
PIPES pH 7	50 mM
Triton X-100	0,5%

(batofenantrolina = 4,7-difenil fenantrolina)

Composición de la solución de reactivo 4 (FIG. 8D)

PQQ-GDH	50 U/ml
$[\text{Fe}(\text{batofenantrolina})_3]$	1 mM
PIPES pH 7	50 mM
Triton X-100	0,5%

(batofenantrolina = 4,7-difenil fenantrolina)

Composición de la solución de reactivo 5 (FIG. 8E)

65

ES 2 316 716 T3

PQQ-GDH 50 U/ml

[Cu(ácido 1 mM

5 batofenantrolina
sulfónico)₂]

PIPES pH 7 50 mM

10 Triton X-100 0,5%

Composición de la solución de reactivo 6 (FIG. 8F)

15 PQQ-GDH 50 U/ml

[Fe(ácido 0,1 mM

20 batofenantrolina
sulfónico)₃]

PIPES pH 7 50 mM

25 Triton X-100 0,5%

Ejemplo 16

30 Se prepararon soluciones de reactivo mezclando un complejo que incluía ligandos de bipyridilo en forma de coordinación NN, una enzima y una solución tampón con las siguientes composiciones 1 a 4. El espectro de cada una de las soluciones de reactivo se midió e identificó como un blanco. Además, se añadió glucosa en una cantidad equivalente al complejo a cada una de las soluciones de reactivo y se midió el espectro después del cambio de color. Las Figuras 9A a 9D muestran los resultados. Se usaron los complejos preparados en los anteriores ejemplos.

35

Composición de la solución de reactivo 1 (FIG. 9A)

PQQ-GDH 50 U/ml

40 [Cu(2,2'-bipyridil)₂] 1 mM

PIPES pH 7 50 mM

45 Triton X-100 0,5%

Composición de la solución de reactivo 2 (FIG. 9B)

PQQ-GDH 50 U/ml

50 [Fe(2,2'-bipyridil)₃] 1 mM

PIPES pH 7 50 mM

55 Triton X-100 0,5%

Composición de la solución de reactivo 3 (FIG. 9C)

60

65

ES 2 316 716 T3

PQQ-GDH 50 U/ml

[Fe(4,4'-diamino-2,2'-

bipiridil)₃]

PIPES pH 7 50 mM

Triton X-100 0,5%

Composición de la solución de reactivo 4 (FIG. 9D)

PQQ-GDH 50 U/ml

[Ru(4,4'-diamino-2,2'-

bipiridil)₃]

PIPES pH 7 50 mM

Triton X-100 0,5%

Ejemplo 17

Se prepararon soluciones de reactivo mezclando un complejo que incluye ligandos de triazina en forma de coordinación NN, una enzima y una solución tampón con las siguientes composiciones 1 a 3. El espectro de cada una de las soluciones de reactivo se midió e identificó como un blanco. Adicionalmente, se añadió glucosa en una cantidad equivalente al complejo a cada una de las soluciones de reactivo y se midió el espectro después del cambio de color. Las Figuras 10A a 10C muestran los resultados. Se usaron los complejos preparados en los anteriores ejemplos.

Composición de la solución de reactivo 1 (FIG. 10A)

PQQ-GDH 50 U/ml

[Cu(TPTZ)₂] 1 mM

PIPES pH 7 50 mM

Triton X-100 0,5%

(TPTZ = 2,4,6-tripiridil-s-triazina)

Composición de la solución de reactivo 2 (FIG. 10B)

PQQ-GDH 50 U/ml

[Fe(TPTZ)₃] 0,1 mM

PIPES pH 7 50 mM

Triton X-100 0,5%

(TPTZ = 2,4,6-tripiridil-s-triazina)

Composición de la solución de reactivo 3 (FIG. 10C)

PQQ-GDH 50 U/ml

[Fe(PDTS)₃] 1 mM

PIPES pH 7 50 mM

Triton X-100 0,5%

(PDTS = 3-(2-piridil)-5,6-bis(4 sulfofenil)-1,2,4-triazina)

ES 2 316 716 T3

Ejemplo 18

Se preparó una solución de reactivo mezclando un complejo que incluía ligandos de biquinolina en forma de coordinación NN, una enzima y una solución tampón con la siguiente composición. El espectro de la solución de reactivo se midió e identificó como un blanco. Además, se añadió glucosa en una cantidad equivalente al complejo a la solución de reactivo y se midió el espectro después del cambio de color. La Figura 11 muestra los resultados. Se usó el complejo preparado en los anteriores ejemplos.

Composición de la solución de reactivo

PQQ-GDH	50 U/ml
[Cu(cuproina) ₂]	1 mM
PIPES pH 7	50 mM
Triton X-100	0,5%

(cuproina = 2,2'-biquinolina)

Ejemplo 19

Se preparó una solución de reactivo mezclando un complejo que incluía ligandos de piridilazo en forma de coordinación NN, una enzima y una solución tampón con la siguiente composición. El espectro de la solución de reactivo se midió e identificó como un blanco. Además, se añadió glucosa en una cantidad equivalente al complejo a la solución de reactivo y se midió el espectro después del cambio de color. La Figura 12 muestra los resultados. Se usó el complejo preparado en los anteriores ejemplos.

Composición de la solución de reactivo

PQQ-GDH	50 U/ml
[Fe(nitro-PAPS) ₃]	0,02 mM
PIPES pH 7	50 mM
Triton X-100	0,5%

(nitro-PAPS = (2-(5-nitro-2-piridilazo)-5-[N-n-propil-N-(3-sulfopropil)aminofenol]))

Ejemplo 20

Se prepararon soluciones de reactivo mezclando un complejo que incluía ligandos en forma de coordinación NO, una enzima y una solución tampón con las siguientes composiciones 1 a 3. El espectro de cada una de las soluciones de reactivo se midió e identificó como un blanco. Además, se añadió glucosa en una cantidad equivalente al complejo a cada una de las soluciones de reactivo y se midió el espectro después del cambio de color. Las Figuras 13A a 13C muestran los resultados. Se usaron los complejos preparados en los anteriores ejemplos.

ES 2 316 716 T3

Composición de la solución de reactivo 1 (FIG. 13A)

PQQ-GDH 50 U/ml

[Fe(nitroso-PSAP)₃] 0,05 mM

PIPES pH 7 50 mM

Triton X-100 0,5%

(nitroso-PSAP = 2-nitroso-5-[N-n-propil-N-(3-sulfopropil)aminofenol])

Composición de la solución de reactivo 2 (FIG. 13B)

PQQ-GDH 50 U/ml

[Fe(nitroso-ESAP)₃] 0,1 mM

PIPES pH 7 50 mM

Triton X-100 0,5%

(nitroso-ESAP = 2-nitroso-5-[N-etil-N-(3-sulfopropil)aminofenol])

Composición de la solución de reactivo 3 (FIG. 13C)

PQQ-GDH 50 U/ml

[Fe(1-nitroso-2-naftol)₃] 0,1 mM

PIPES pH 7 50 mM

Triton X-100 0,5%

Ejemplo 21

Se preparó una solución de reactivo mezclando un complejo que incluía ligandos en forma de coordinación NS, una enzima y una solución tampón con la siguiente composición. El espectro de la solución de reactivo se midió e identificó como un blanco. Además, se añadió glucosa en una cantidad equivalente al complejo a la solución de reactivo y se midió el espectro después del cambio de color. La Figura 14 muestra los resultados. Se usó el complejo preparado en los anteriores ejemplos.

Composición de la solución de reactivo

PQQ-GDH 50 U/ml

[Fe(ácido 2-amino-4-tiazol acético)₃] 1 mM

PIPES pH 7 50 mM

Triton X-100 0,5%

Ejemplo 22

Se preparó una solución de reactivo mezclando un complejo que incluía ligandos en forma de coordinación OO, una enzima y una solución tampón con la siguiente composición. El espectro de la solución de reactivo se midió e identificó como un blanco. Además, se añadió glucosa en una cantidad equivalente al complejo a la solución de reactivo y se midió el espectro después del cambio de color. La Figura 15 muestra los resultados. Se usó el complejo preparado en los anteriores ejemplos.

ES 2 316 716 T3

Composición de la solución de reactivo

PQQ-GDH 50 U/ml

[Fe(ácido 1,2- 1 mM

naftoquinona-4-
sulfónico)₃]

PIPES pH 7 50 mM

Triton X-100 0,5%

Ejemplo 23

Se prepararon soluciones de reactivo mezclando un complejo de ligando mixto, una enzima y una solución tampón con las siguientes composiciones 1 a 5. El espectro de cada una de las soluciones de reactivo se midió e identificó como un blanco. Además, se añadió glucosa en una cantidad equivalente al complejo a cada una de las soluciones de reactivo y se midió el espectro después del cambio de color. Las Figuras 16A a 16E muestran los resultados. Se usaron los complejos preparados en los anteriores ejemplos.

Composición de la solución de reactivo 1 (FIG. 16A)

PQQ-GDH 50 U/ml

[OsCl(Him)(dmbpi)₂] 0,1 mM

PIPES pH 7 50 mM

Triton X-100 0,5%

(Him = imidazol)

(dmbpi = 4,4'-dimetil-2,2'-bipiridilo)

Composición de la solución de reactivo 2 (FIG. 16B)

PQQ-GDH 50 U/ml

[Os(Him)₂(dmbpi)₂] 0,1 mM

PIPES pH 7 50 mM

Triton X-100 0,5%

Composición de la solución de reactivo 3 (FIG. 16C)

PQQ-GDH 50 U/ml

[Cu(L-Arg)₂ (bpi)] 1 mM

PIPES pH 7 50 mM

Triton X-100 0,5%

(L-Arg = L-arginina)

(bpi = 2,2'-bipiridilo)

Composición de la solución de reactivo 4 (FIG. 16D)

ES 2 316 716 T3

PQQ-GDH	50 U/ml
[Cu(en) ₂ (bpi)]	1 mM
PIPES pH 7	50 mM
Triton X-100	0,5%

(en = etilenodiamina)

(bpi = 2,2'-bipiridilo)

Composición de la solución de reactivo 5 (FIG. 16E)

PQQ-GDH	50 U/ml
[Cu(Him) ₂ (bpi)]	1 mM
PIPES pH 7	50 mM
Triton X-100	0,5%

Ejemplo 24

Se prepararon soluciones de reactivo mezclando un complejo, una enzima (glucosa oxidasa (GOD) o piruvato oxidasa) y una solución tampón con las siguientes composiciones 1 y 2. El espectro de cada una de las soluciones de reactivo se midió e identificó como un blanco. Además, se añadió glucosa o ácido pirúvico en una cantidad equivalente al complejo a cada una de las soluciones de reactivo y se midió el espectro después del cambio de color. Las Figuras 17A y 17B muestran los resultados. Se usaron los complejos preparados en los anteriores ejemplos.

Composición de la solución de reactivo 1 (FIG. 17A)

GOD	100 U/ml
[Cu(2,2'-bipiridil) ₂]	1 mM
PIPES pH 7	50 mM
Triton X-100	0,5%

Composición de la solución de reactivo 2 (FIG. 17B)

piruvato oxidasa	100 U/ml
[OsCl(Him)(dmbpi) ₂]	0,1 mM
PIPES pH 7	50 mM
Triton X-100	0,5%

(Him = imidazol)

(dmbpi = 4,4'-dimetil-2,2'-bipiridilo)

Ejemplo 25

Se preparó una solución de reactivo con la siguiente composición. Adicionalmente, se prepararon las siguientes soluciones de enzima 1, 2 y 3. Después, se mezclaron 10 μ l de solución acuosa de glucosa (con concentraciones de 0, 10, 20 y 30 mM y concentraciones finales de 0, 0,1, 0,2 y 0,3 mM, respectivamente) y 500 μ l de la solución de reactivo en una dispozell que tiene una longitud de trayectoria óptica de 10 mm, a la que se añadieron 500 μ l de cada una de las soluciones de enzima para causar una reacción entre las soluciones. El cambio de absorbancia se midió durante 50 segundos con un espectrofotómetro (longitud de onda: 600 nm). Las Figuras 18A, 18B y 18C muestran los resultados. Como se muestra en las Figuras 18A, 18B y 18C, la velocidad de reacción aumentó con la cantidad de enzima. Cuando la actividad enzimática fue de 1000 U/ml, la reacción finalizó en aproximadamente 5 segundos. Es posible cuantificar la concentración de glucosa muestreando señales en aproximadamente 5 segundos, tiempo en el que la reacción llega a su fin. La pendiente de los gráficos desde el principio hasta el final de la reacción también se puede usar para cuantificar la concentración de glucosa.

Composición de la solución de reactivo

	Cu(PDTS) ₂	1 mM
5	PIPES pH 7	50 mM
	Triton X-100	0,5%
	Solución de enzima 1 (Fig. 18A)	
10	PQQ-GDH	111 U/ml
	Solución de enzima 2 (Fig. 18B)	
15	PQQ-GDH	333 U/ml
	Solución de enzima 3 (Fig. 18C)	
20	PQQ-GDH	1000 U/ml

Aplicabilidad industrial

Como se ha descrito anteriormente, un método colorimétrico de la presente invención puede realizar análisis sencillos y fiables en un tiempo breve.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un método colorimétrico que comprende:

5 dejar que una oxidoreductasa actúe sobre un analito y un complejo de metal de transición que cambia de color al transfiriendo un electrón y

10 realizar un análisis cualitativo o cuantitativo del analito midiendo un cambio de color en el complejo de metal de transición debido a transferencia de electrones del analito al complejo de metal de transición,

en el que

15 al menos un ligando en el complejo de metal de transición se selecciona de amoníaco, un compuesto bupiridilo, un compuesto imidazol, un compuesto fenantrolina, un compuesto etilendiamina, aminoácidos, un compuesto triazina, un compuesto biquinolina, un compuesto piridilazo, un compuesto nitroso y un compuesto oxina.

20 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el complejo de metal de transición comprende al menos un complejo seleccionado de un complejo de cobre, un complejo de hierro, un complejo de rutenio y un complejo de osmio.

25 3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que al menos un átomo de hidrógeno que ocupa una posición diferente de una posición de coordinación del ligando se sustituye con un sustituyente.

4. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el sustituyente se selecciona de un grupo alquilo, un grupo arilo, un grupo alilo, un grupo fenilo, un grupo hidroxilo, un grupo alcoxi, un grupo carboxilo, un grupo carbonilo, un grupo sulfona, un grupo sulfonilo, un grupo nitro, un grupo nitroso, una amina primaria, una amina secundaria, una amina terciaria, un grupo amino, un grupo acilo, un grupo amido y un grupo halógeno.

30 5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el complejo de metal de transición incluye dos o más tipos de ligandos.

6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la oxidoreductasa es una deshidrogenasa o una oxidasa.

35 7. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el analito es glucosa, colesterol, ácido úrico, ácido pirúvico, ácido láctico, creatina o creatinina y la oxidoreductasa es una deshidrogenasa o una oxidasa que se corresponde al respectivo analito.

40 8. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en el que se usa un mediador adicionalmente al complejo de metal de transición.

45

50

55

60

65

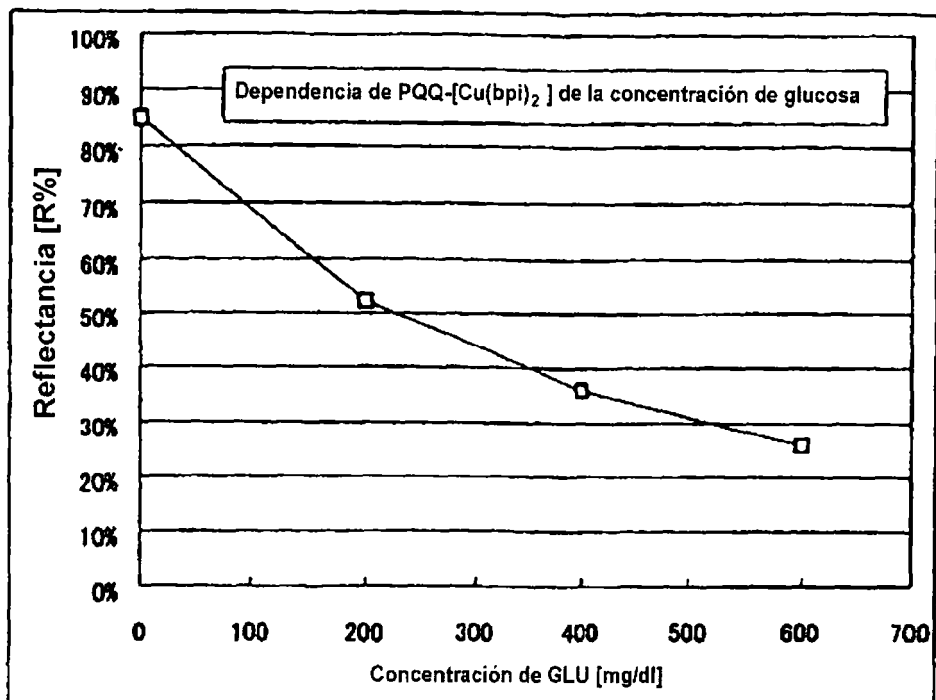


FIG.1

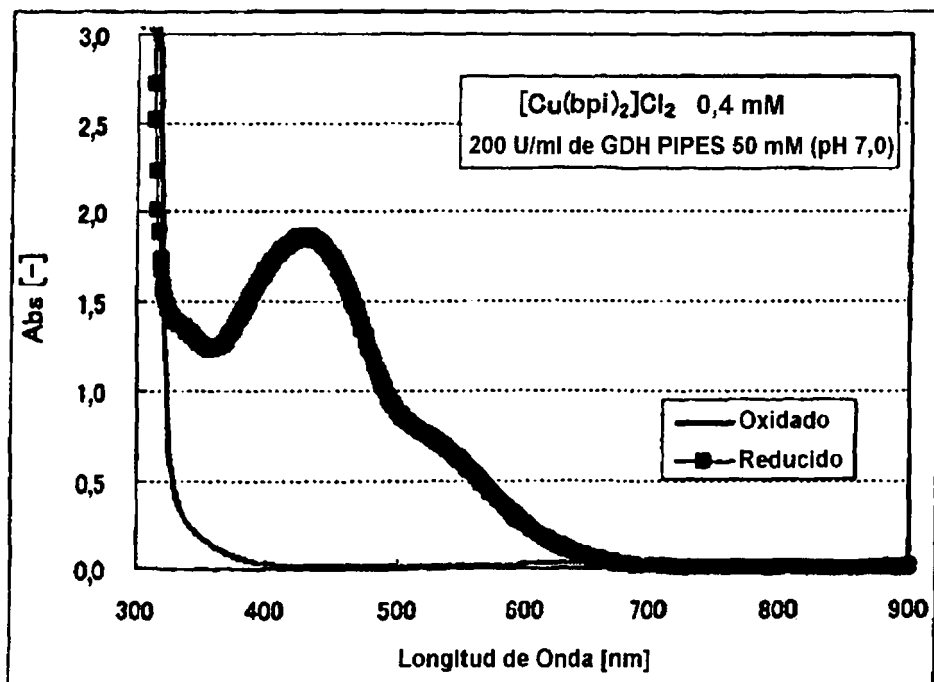


FIG.2

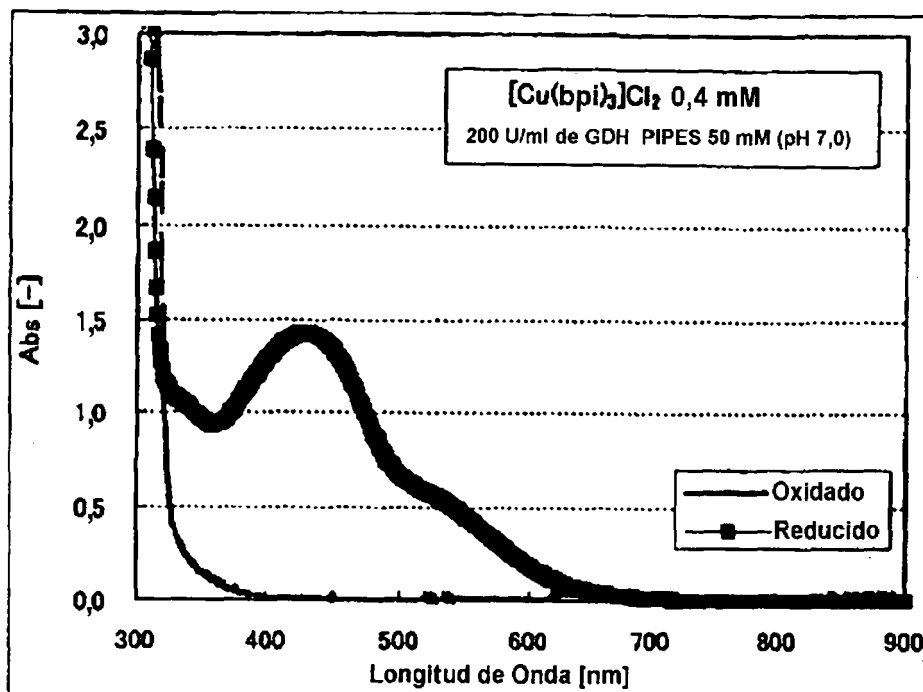


FIG.3

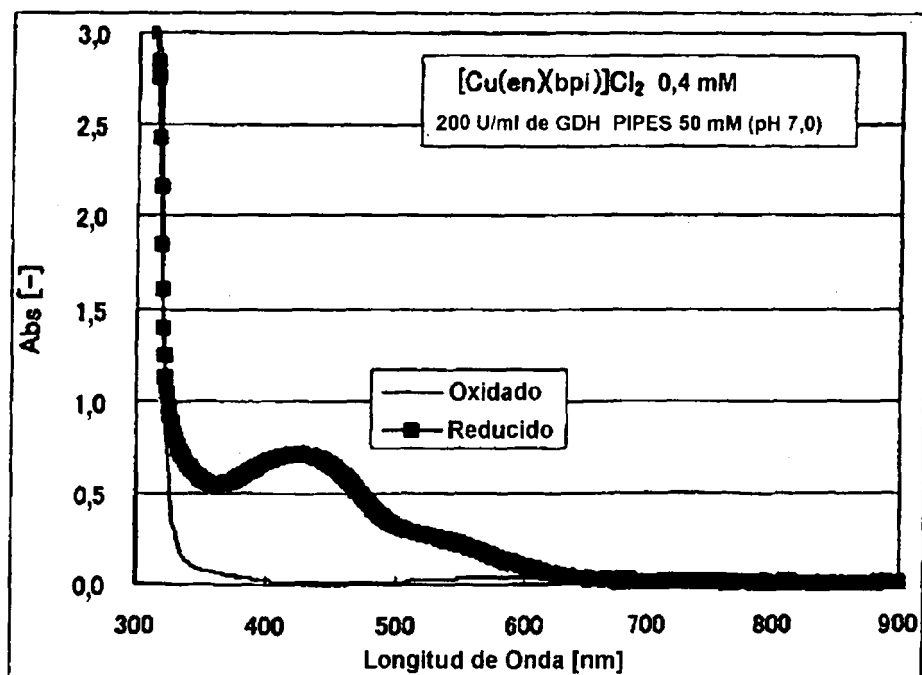


FIG.4

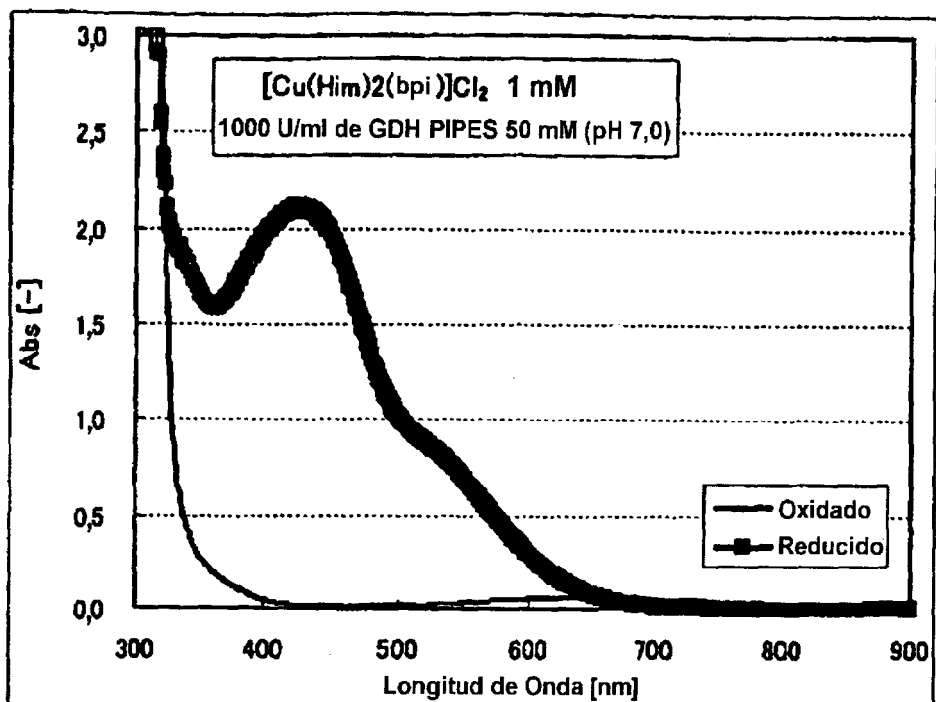


FIG.5

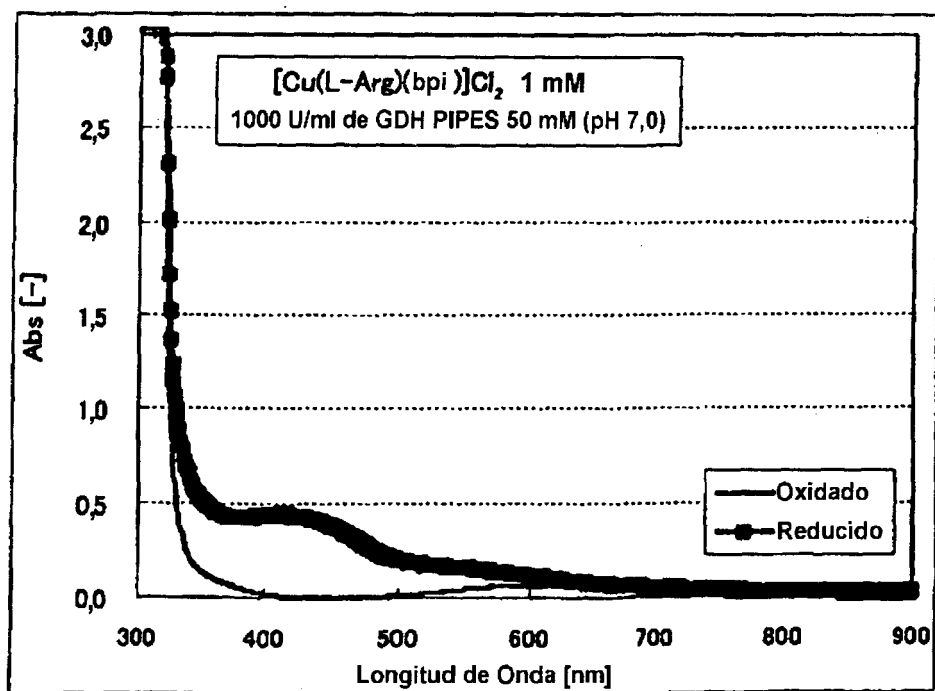


FIG.6

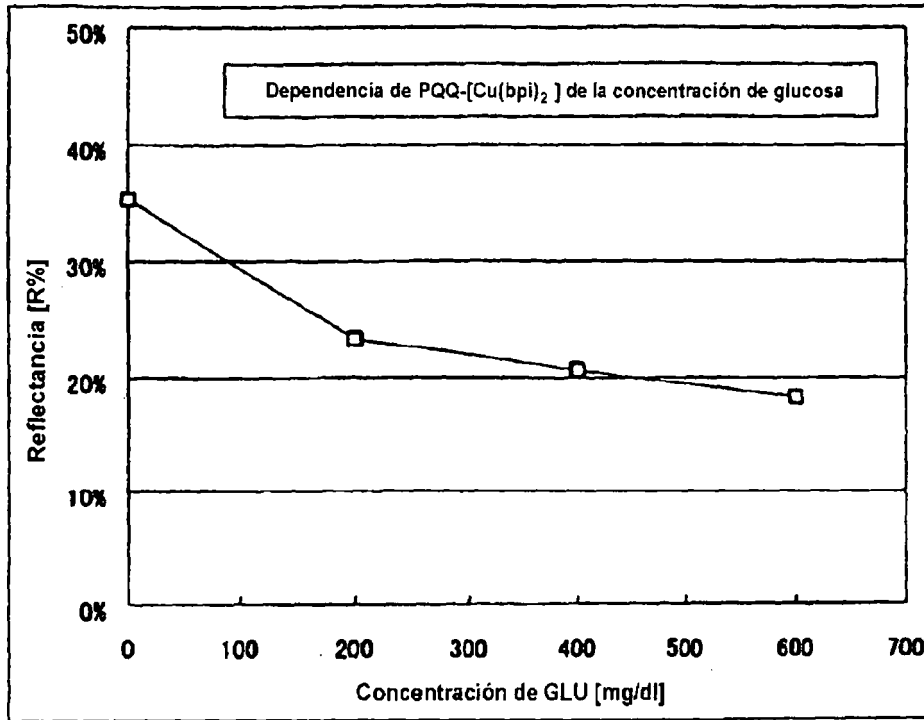


FIG.7

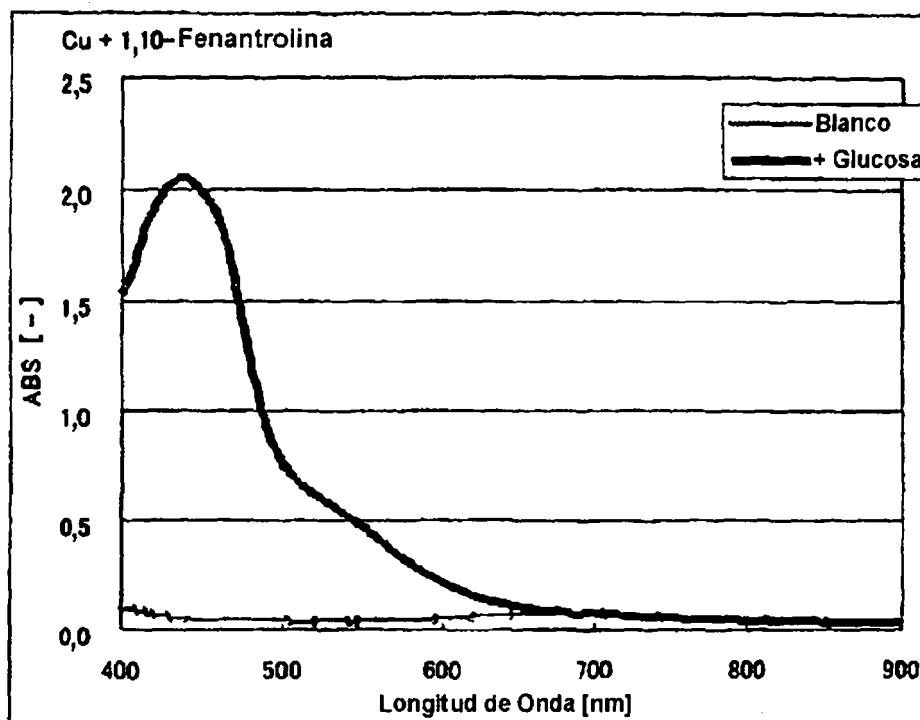


FIG.8A

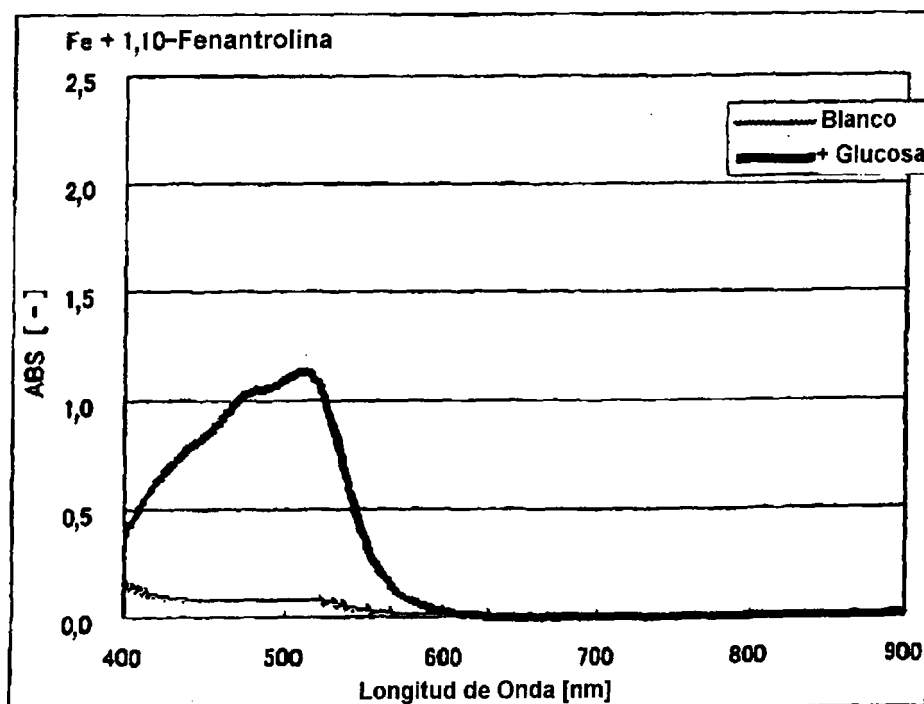


FIG.8B

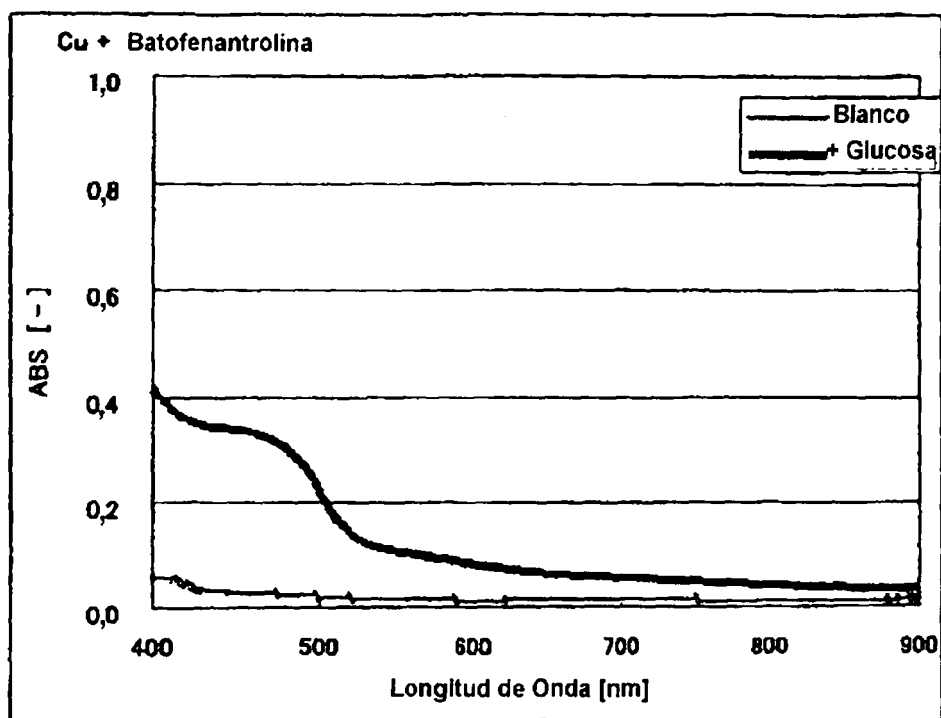


FIG.8C

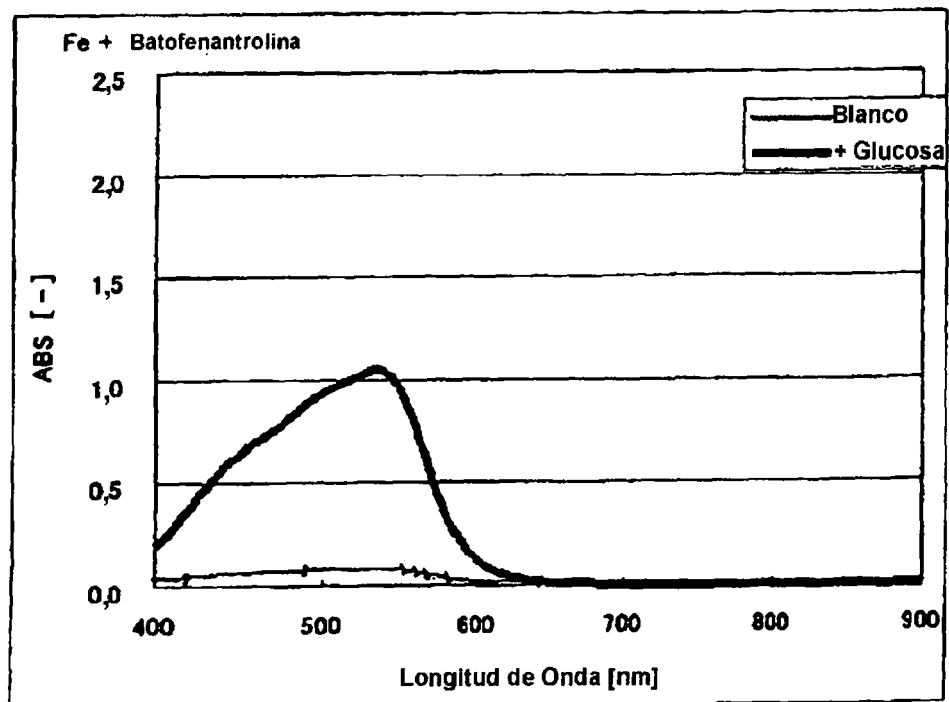


FIG.8D

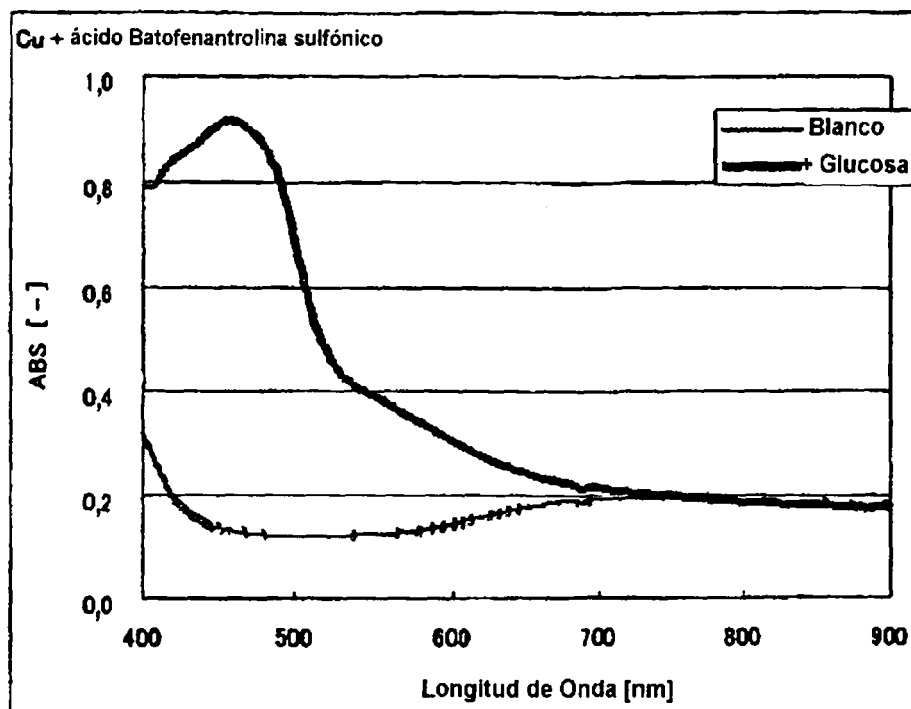


FIG.8E

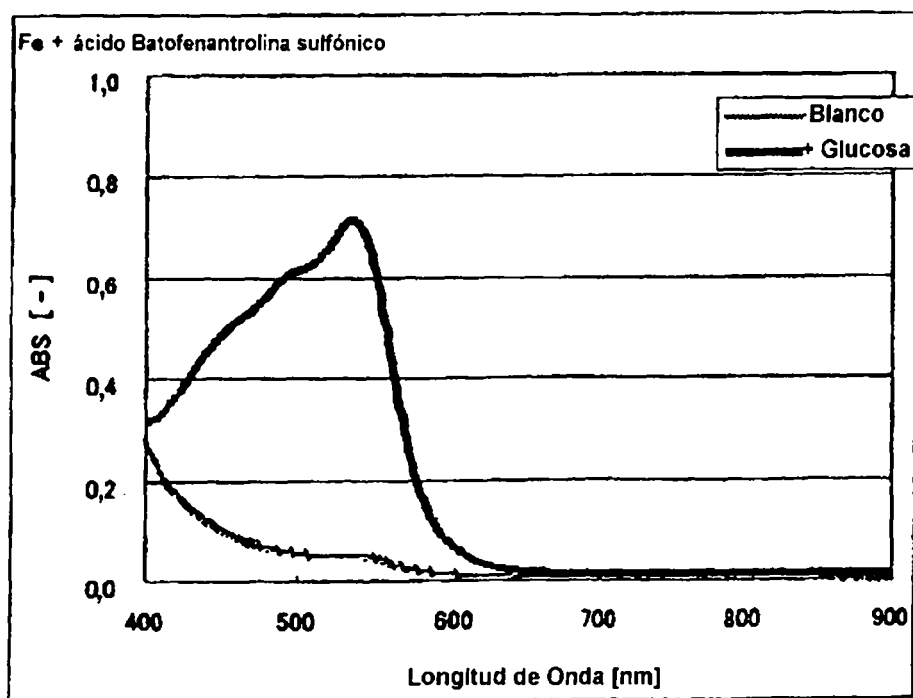


FIG.8F

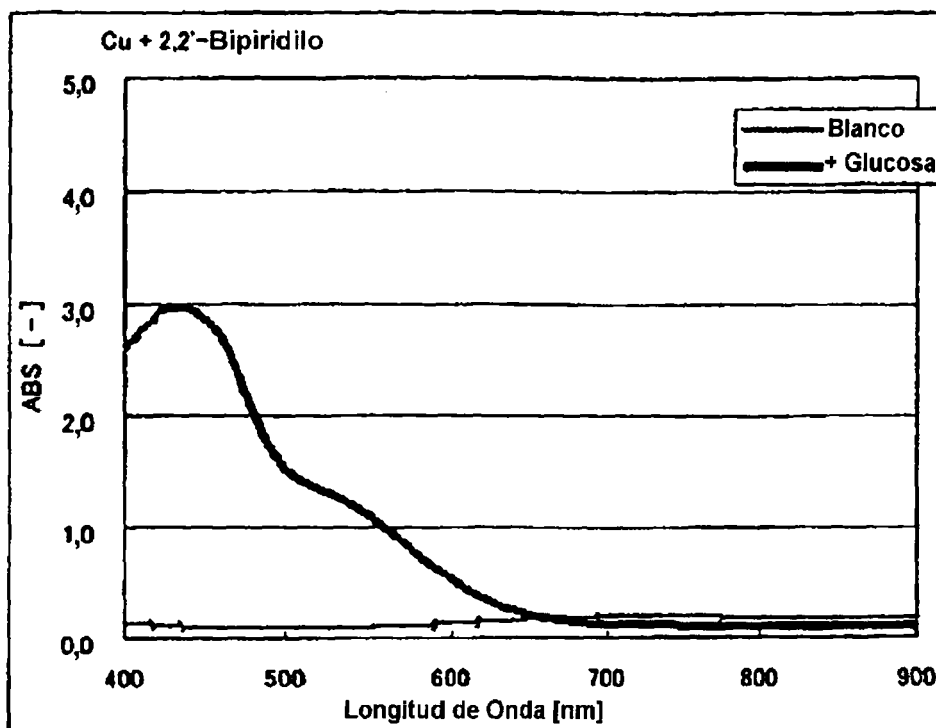


FIG.9A

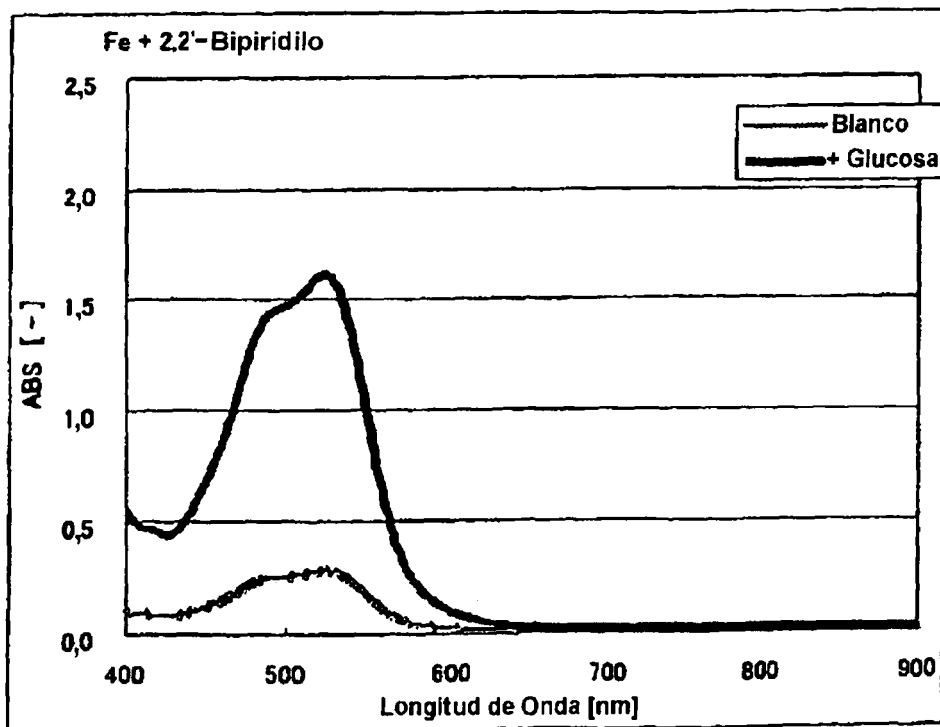


FIG.9B

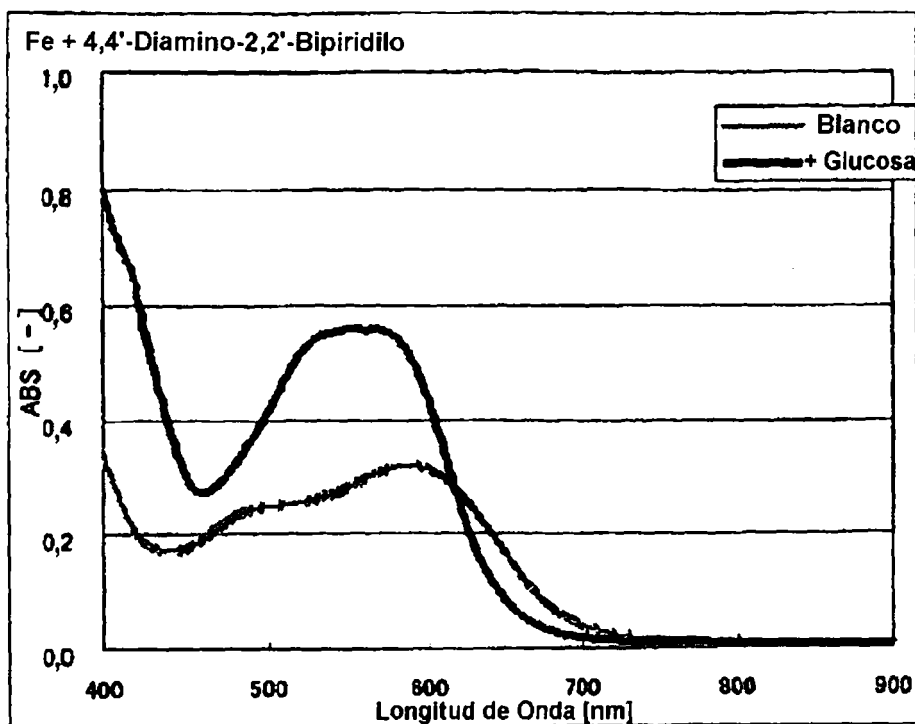


FIG.9C

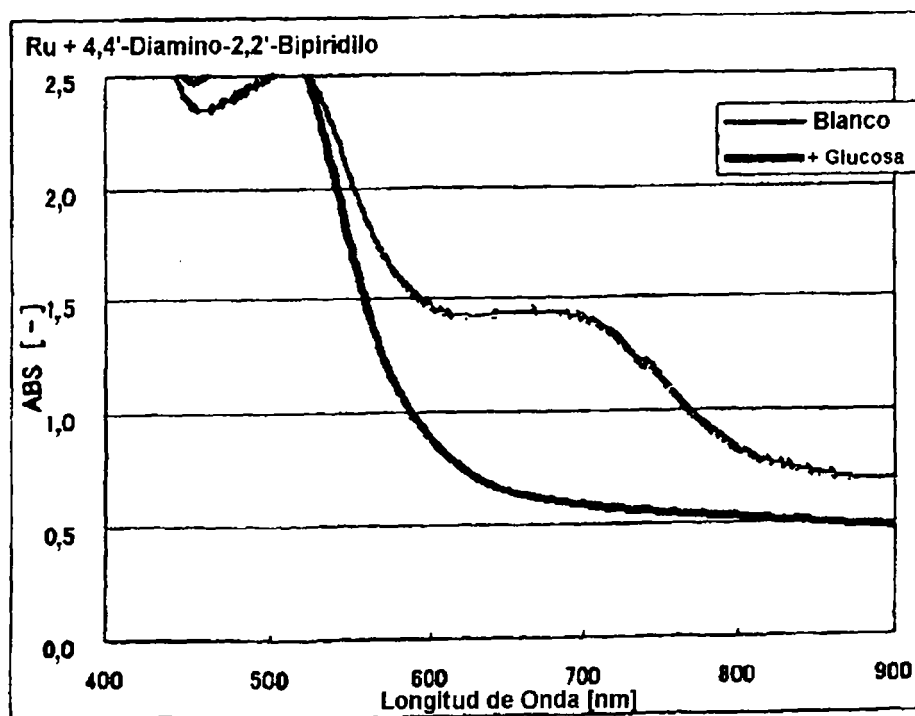


FIG.9D

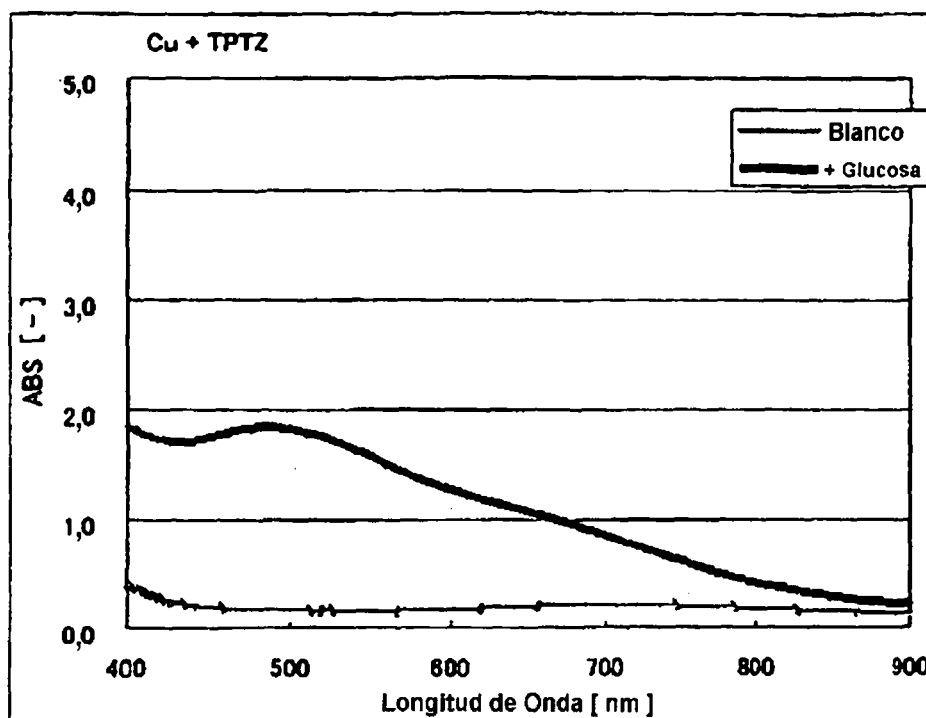


FIG.10A

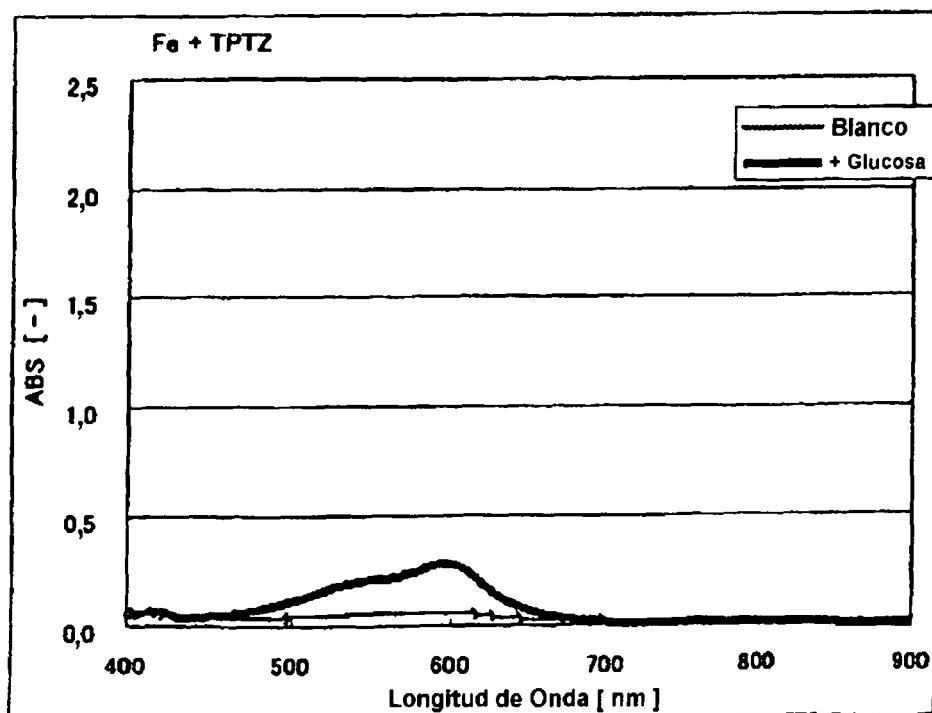


FIG.10B

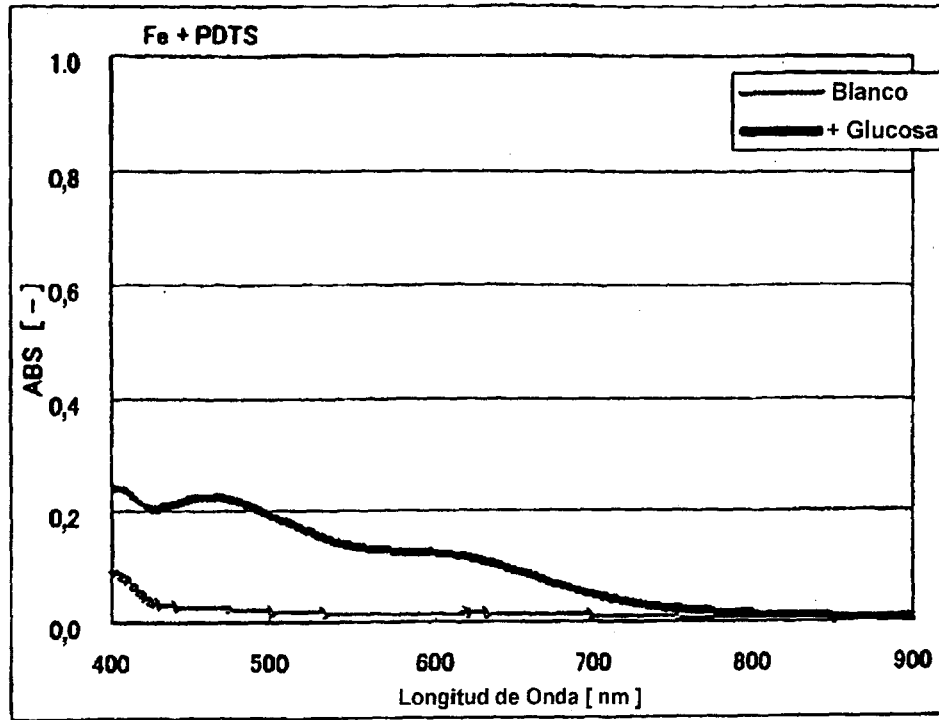


FIG.10C

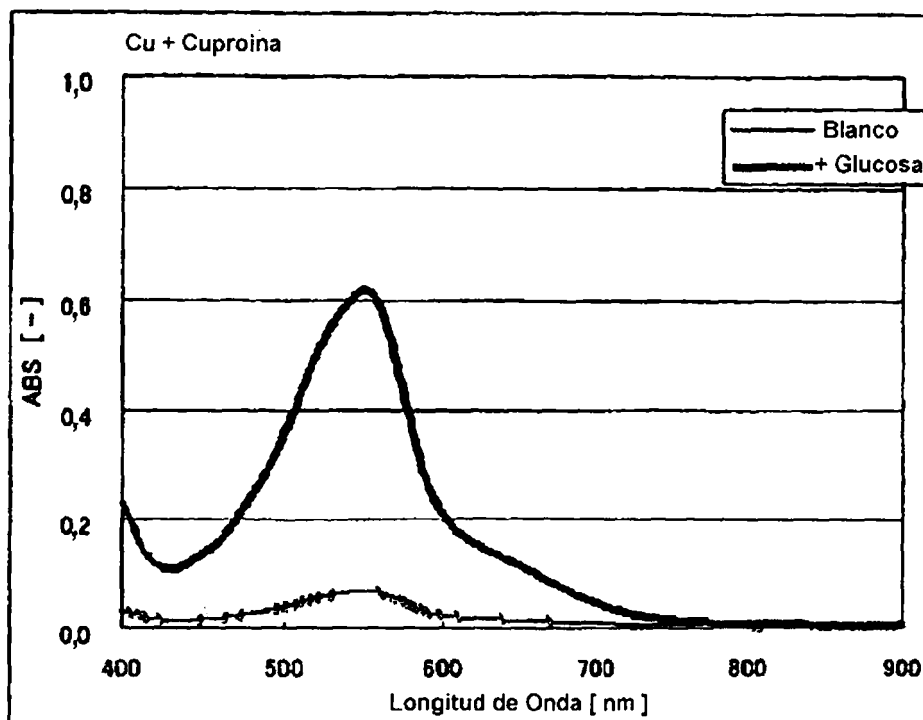


FIG.11

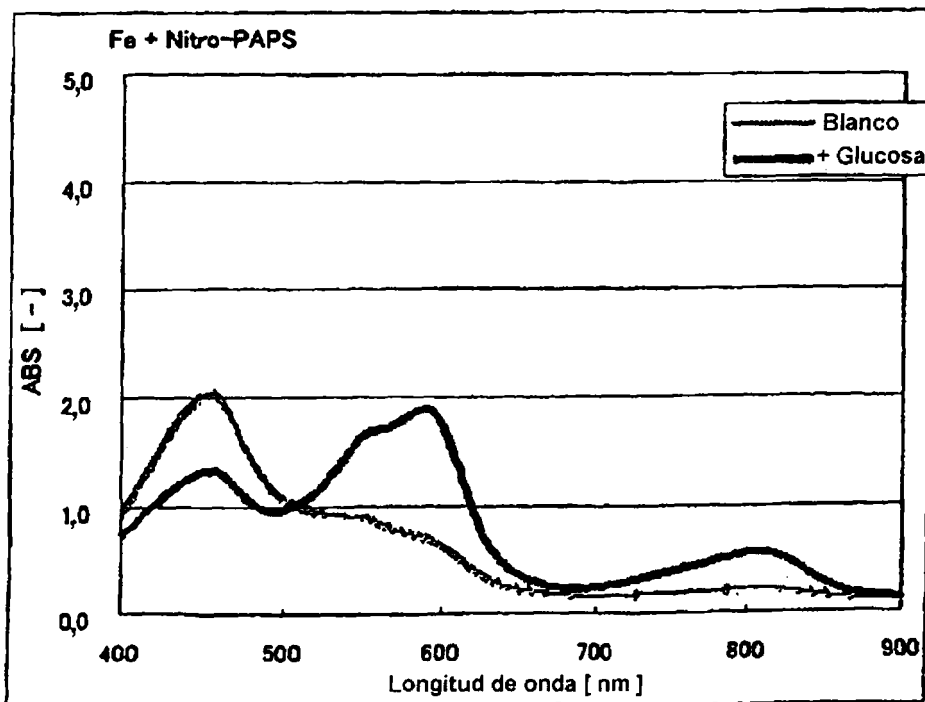


FIG.12

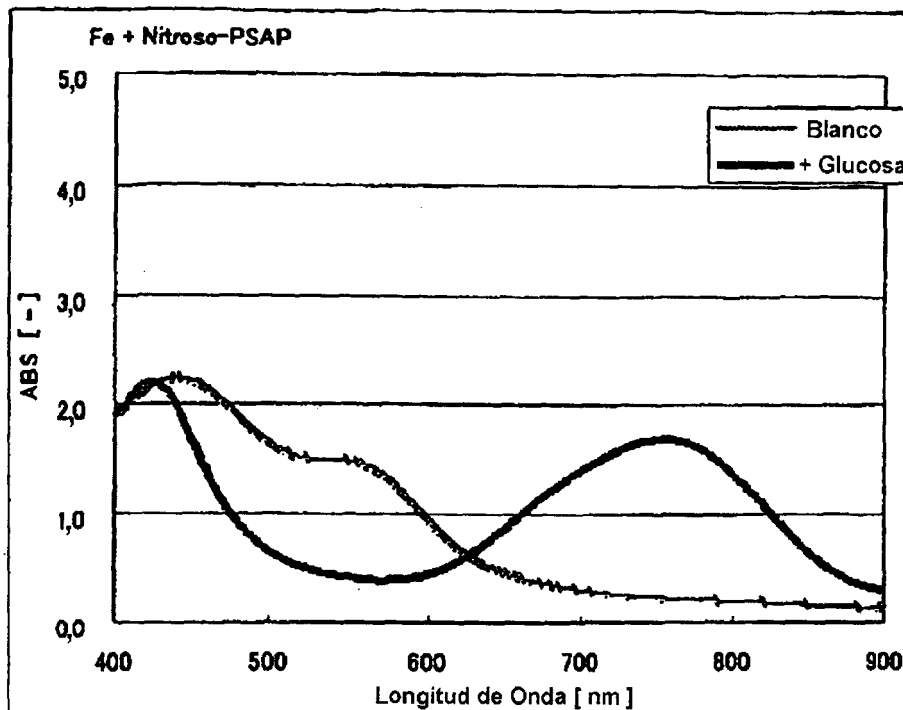


FIG.13A

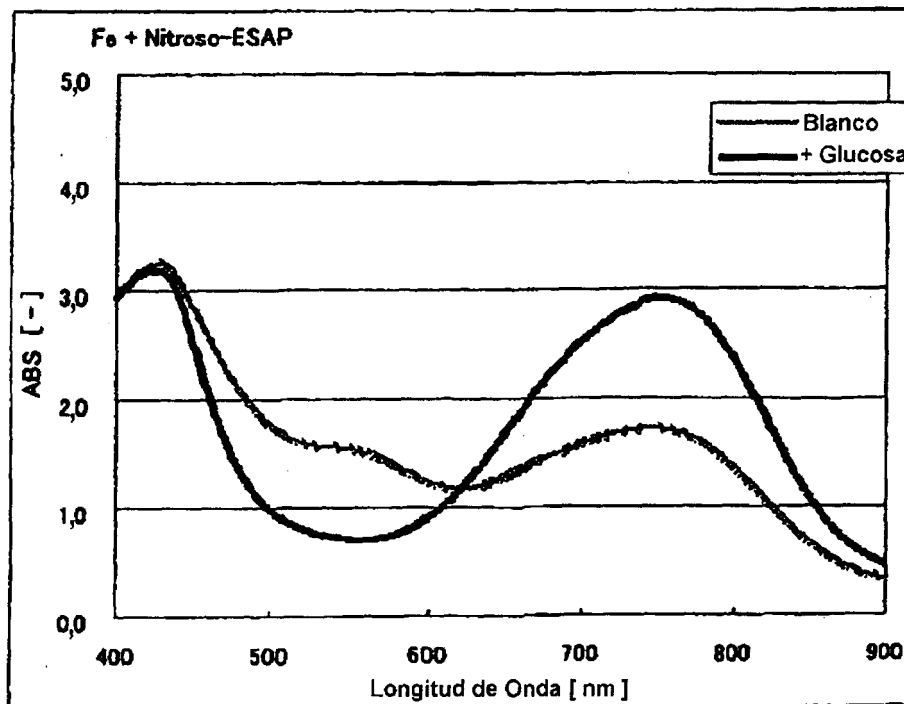


FIG.13B

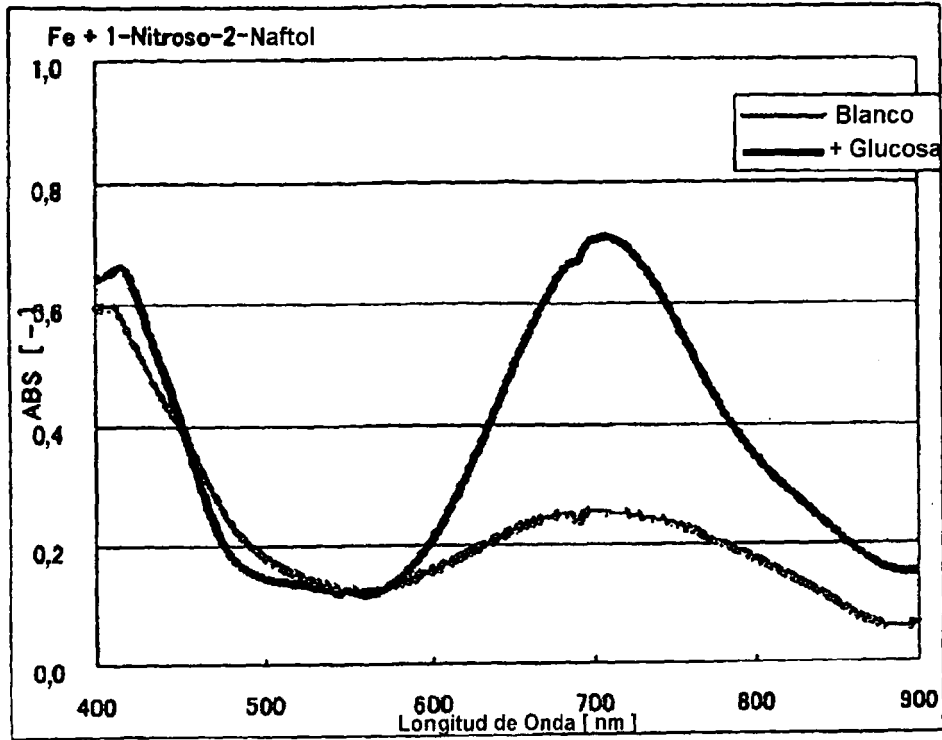


FIG.13C

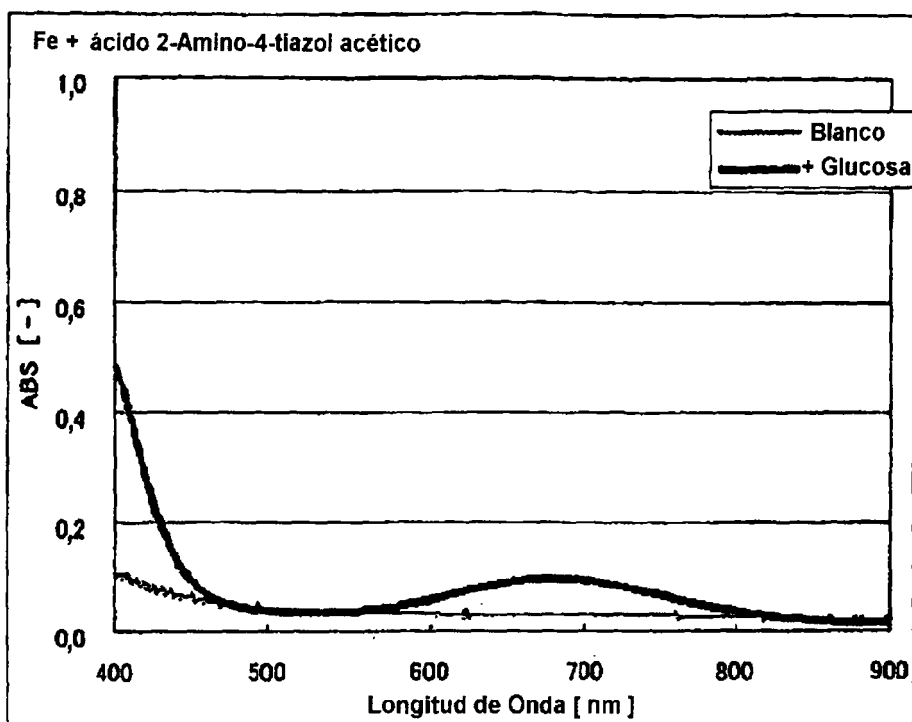


FIG.14

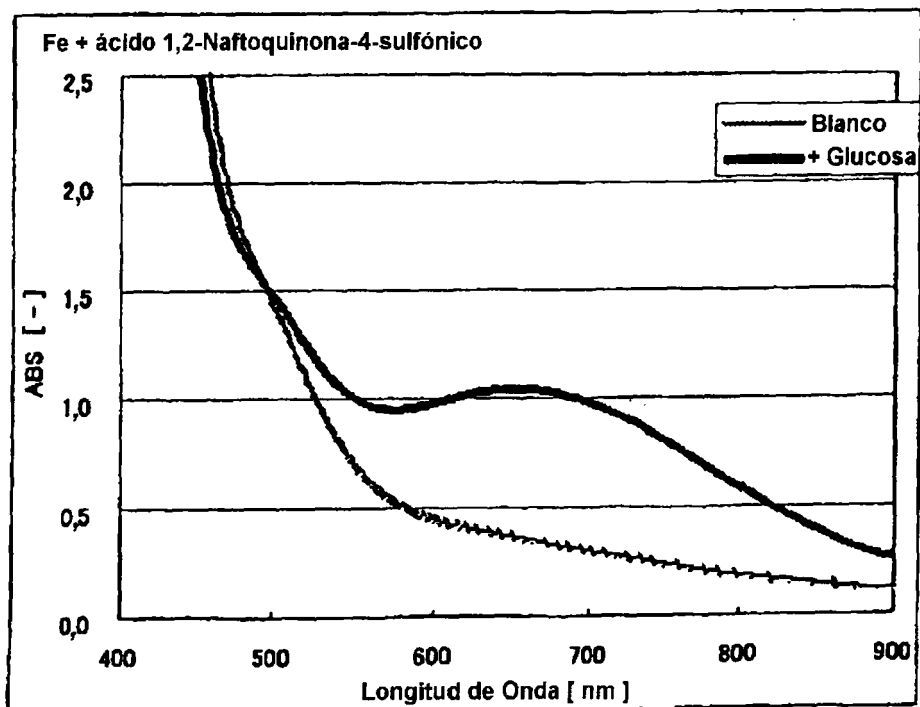


FIG.15

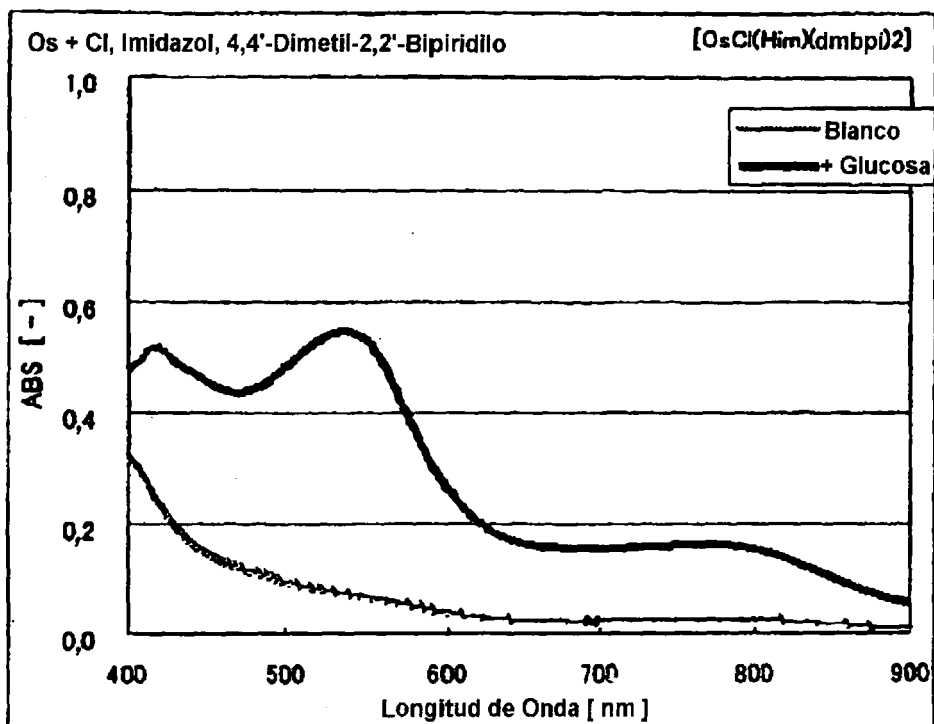


FIG.16A

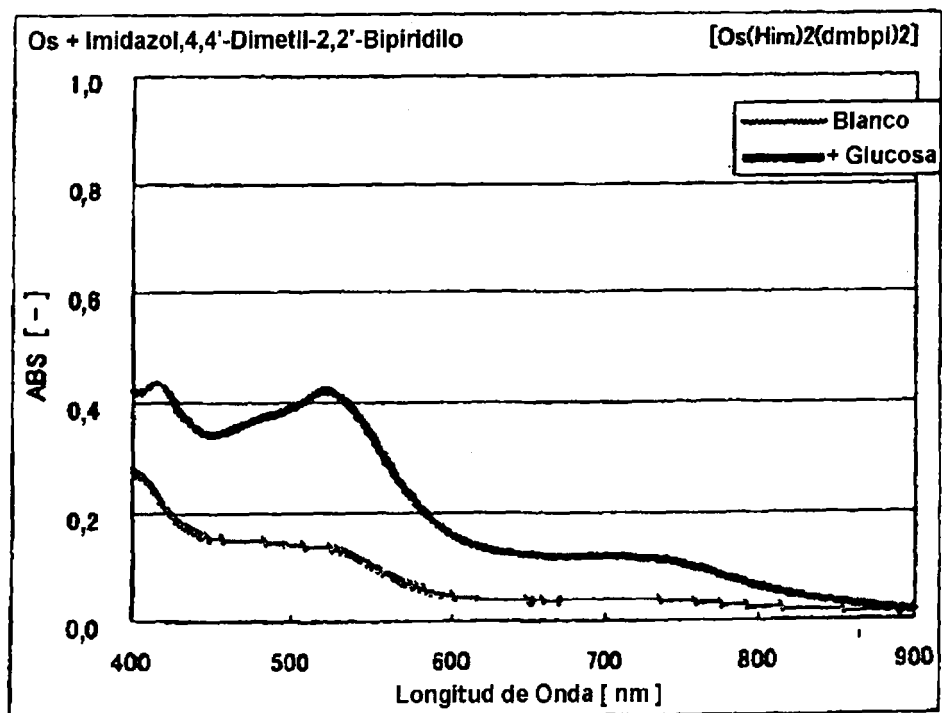


FIG.16B

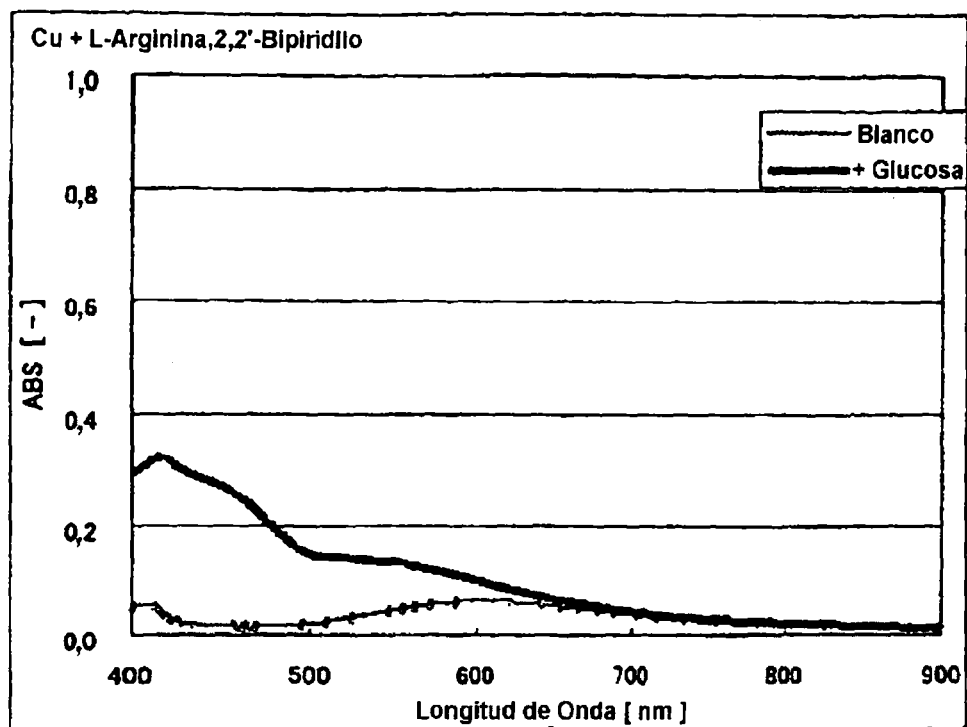


FIG.16C

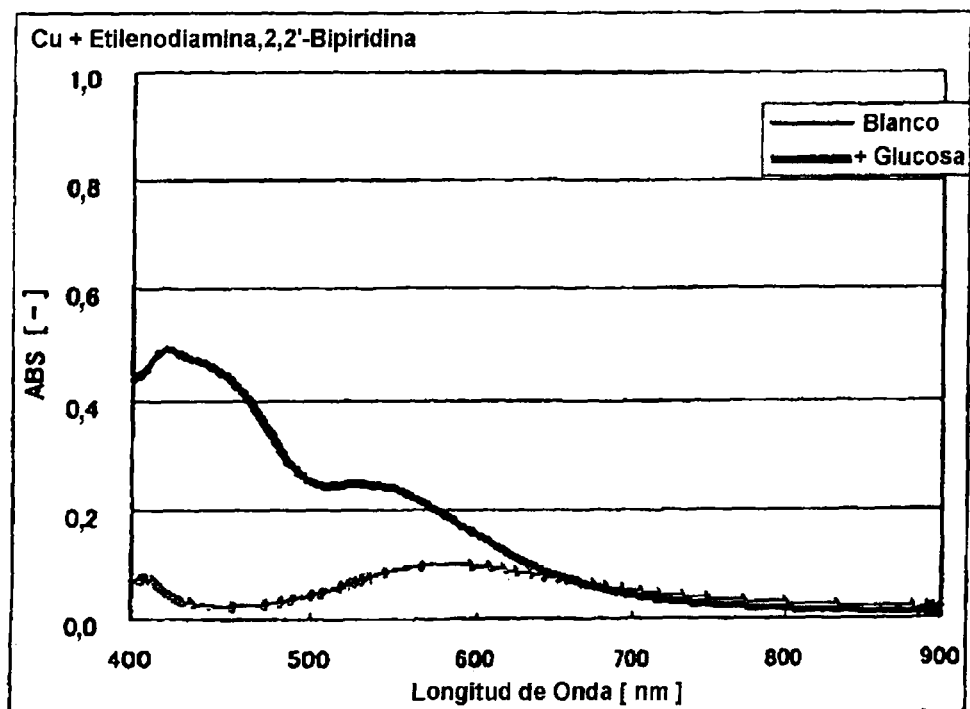


FIG.16D

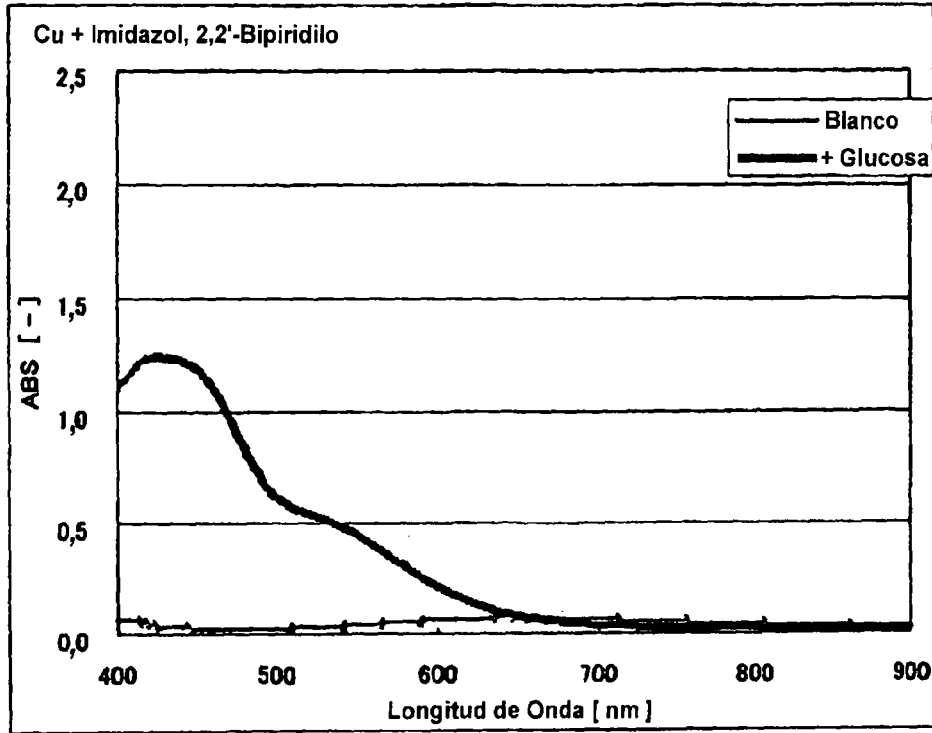


FIG.16E

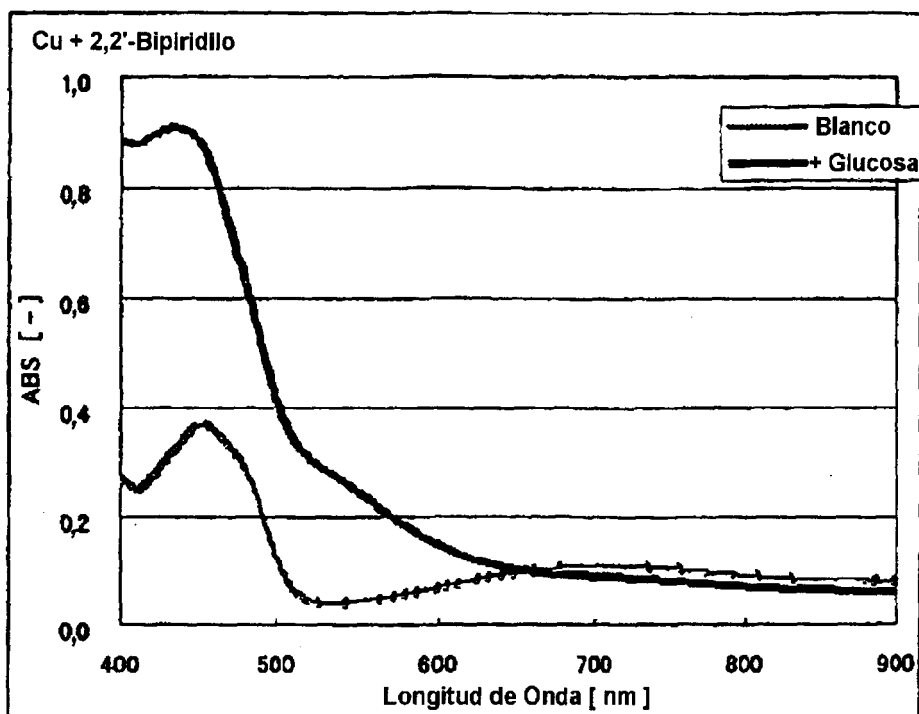


FIG.17A

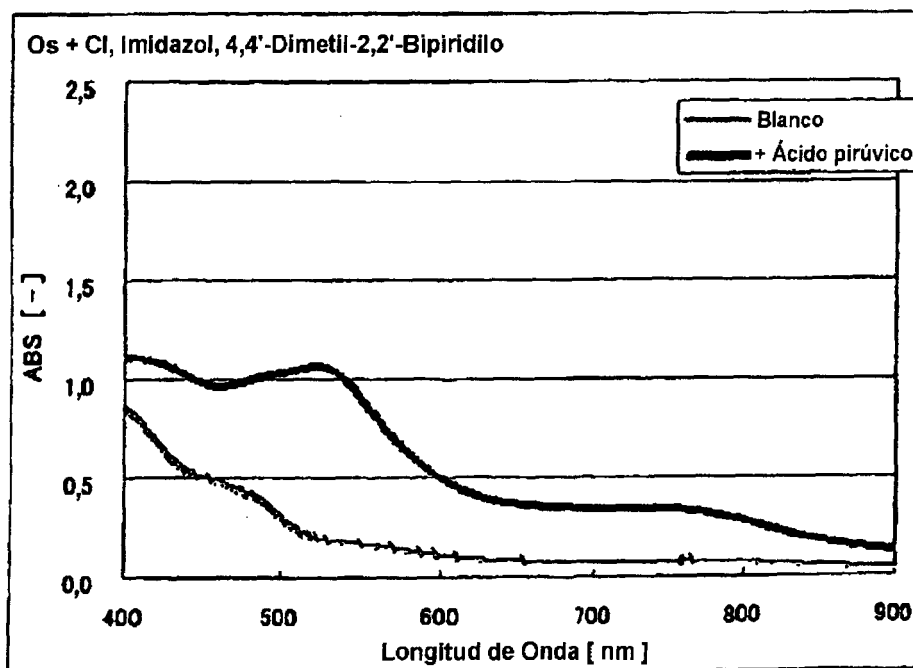


FIG.17B

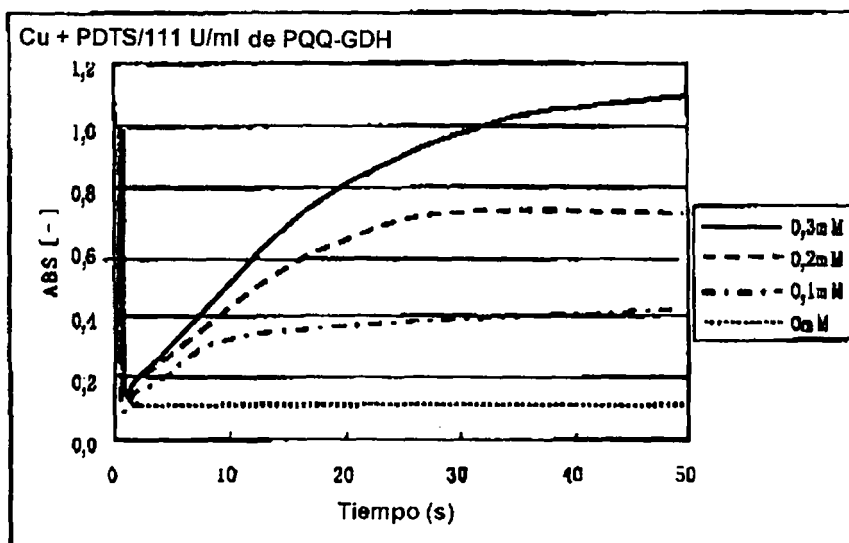


FIG.18A

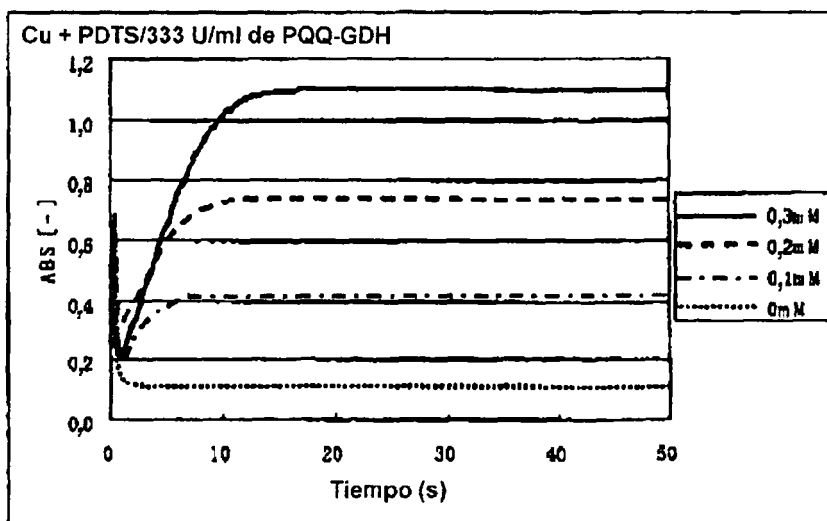


FIG.18B

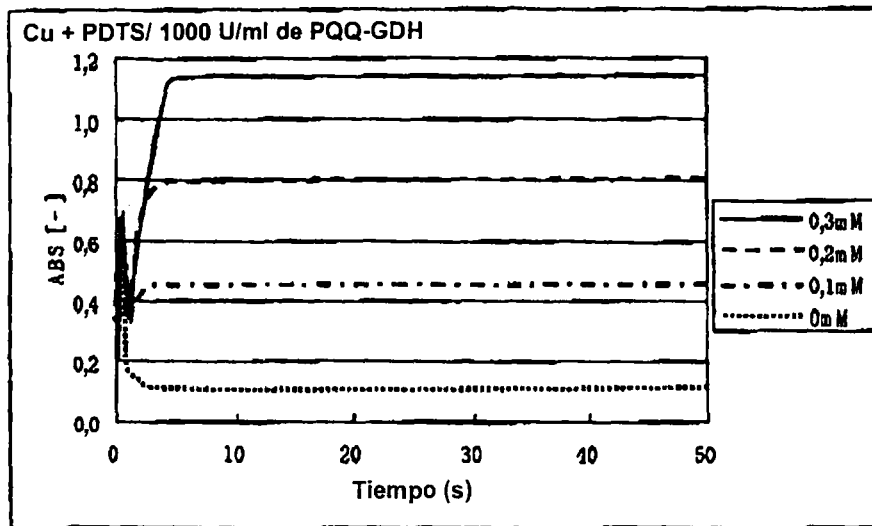


FIG 18C