

Otros criterios para una buena determinación de analitos en química sanguínea

* Wilma Téllez - Rosario Peñaloza
** René Rojas

* DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA - I.B.B.A.
** FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUIMICA-UMSA

ABSTRACT

Spectrophotometric methods are generally preferred for chemical-clinical analysis because they are simple, relatively specific, with inexpensive instruments; but knowledge of operation conditions and characteristics of each technique are required.

We have studied some spectrophotometric characteristics to obtain precise results in the clinical laboratory: linearity, sensitivity, parallelism, spectral absorption, recording of the wavelength and some operation conditions like the kinetic reaction and stability of the product in certain compounds, utilizing primary standards and human serum.

The results allowed us to select the suitable wavelength for each compound and to establish the optimal time of reaction in La Paz.

RESUMEN

Los métodos espectrofotométricos siguen siendo de elección para la mayoría de los análisis químico-clínicos debido a que son relativamente específicos, simples y requieren equipo menos costoso y especializado teniendo cuidado de aplicarlos rigurosamente, conociendo las condiciones de operación y características de cada uno de los métodos.

A fin de lograr la máxima confiabilidad de los resultados se procedió al estudio de algunas características de espectrofotometría como ser: linealidad, sensibilidad, barrido de longitud de onda, paralelismo, espectro de máxima absorción y al estudio de algunas condiciones de operación como: cinética de reacción y estabilidad del producto en ciertos metabolitos, utilizando patrones primarios y suero humano. Los resultados nos han permitido elegir la longitud de onda adecuada para cada metabolito, así como establecer tiempos óptimos de reacción para nuestro medio.

INTRODUCCION

A pesar de los muchos adelantos recientes en cuanto a instrumentos, los métodos espectrofotométricos siguen siendo los de elección para la mayoría de los análisis químico-clínicos. En general, los métodos basados en desarrollo de color son relativamente específicos, simples, rápidos y requieren equipo menos costoso y especializado siendo el único requisito cumplir con las leyes de Lambert y Beer (1). La relación lineal entre absorbancia y concentración expresada por esta ley es aplicable solamente bajo ciertas condiciones técnicas que deben ser rigurosamente respetadas como ser: monocromatismo del rayo incidente, soluciones de concentraciones no mayores de 10^{-2} M, estabilidad química de las sustancias, ausencia de difusión y reflexión de la luz y elección de longitud de onda adecuada. (1,2.).

Asimismo, la mayor confiabilidad de los resultados obtenidos en un laboratorio clínico se logra co-

GLUCOSA

ESPECTRO DE ABSORCION
METODO O-TOLUIDINA
PRINCIPIO DE REACCION

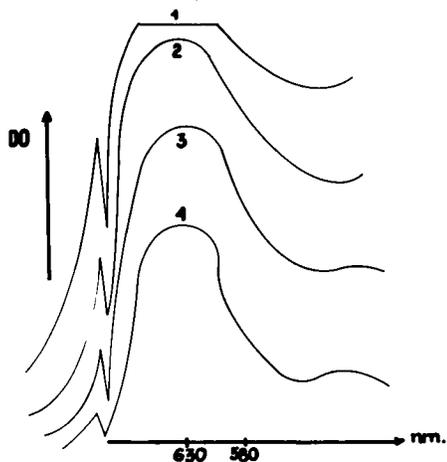
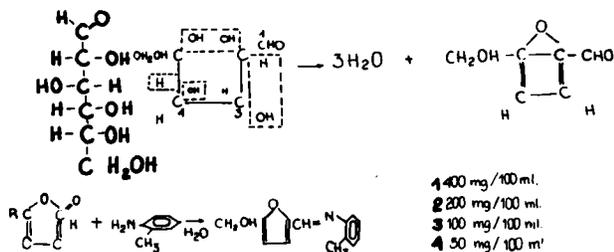


Fig. 2

1.2. Paralelismo

Haciendo espectros de absorción de la Urea a diferentes concentraciones de estandar observamos que a 540 nm, la relación entre absorbancia y concehtración es directamente proporcional, es decir, existe un paralelismo entre dichas concentraciones. (Fig. 3)

1.3. Sensibilidad

Realizando espectros de absorción con diferentes concentraciones de estandar dentro los rangos normales en humanos observamos que a 40 y 60 mg % la absorción alcanza su máximo (D.O = próximo a 2.0), hecho que constituye una limitación en la práctica porque muestras más concentradas ya no cumplen con la ley de Lambert y Beer y necesariamente deben ser diluidas. (Fig. 3)

UREA

ESPECTRO ABSORCION
METODO ENZIMATICO COLOR METRICO
PRINCIPIO DE REACCION

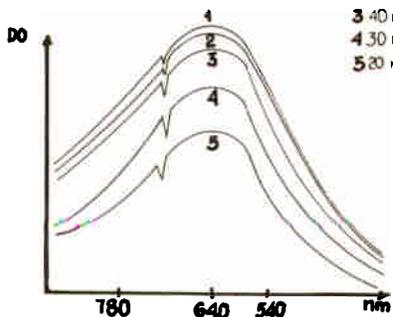
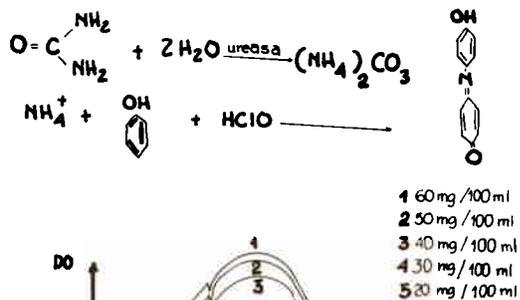
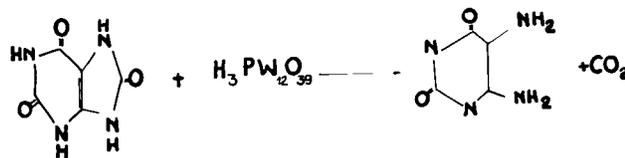


Fig. 3

ACIDO URICO

ESPECTRO DE ABSORCION
METODO CARAWAY
PRINCIPIO DE REACCION



- 1 SUERO CONTRA BLANCO REACTIVO
- 2 SUERO CONTRA BLANCO AGUA

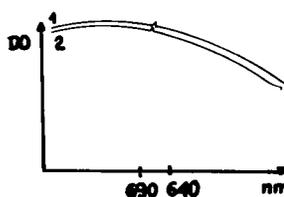


Fig. 4

CREATININA

ESPECTRO DE ABSORCION

METODO CINETICO

PRINCIPIO DE REACCION

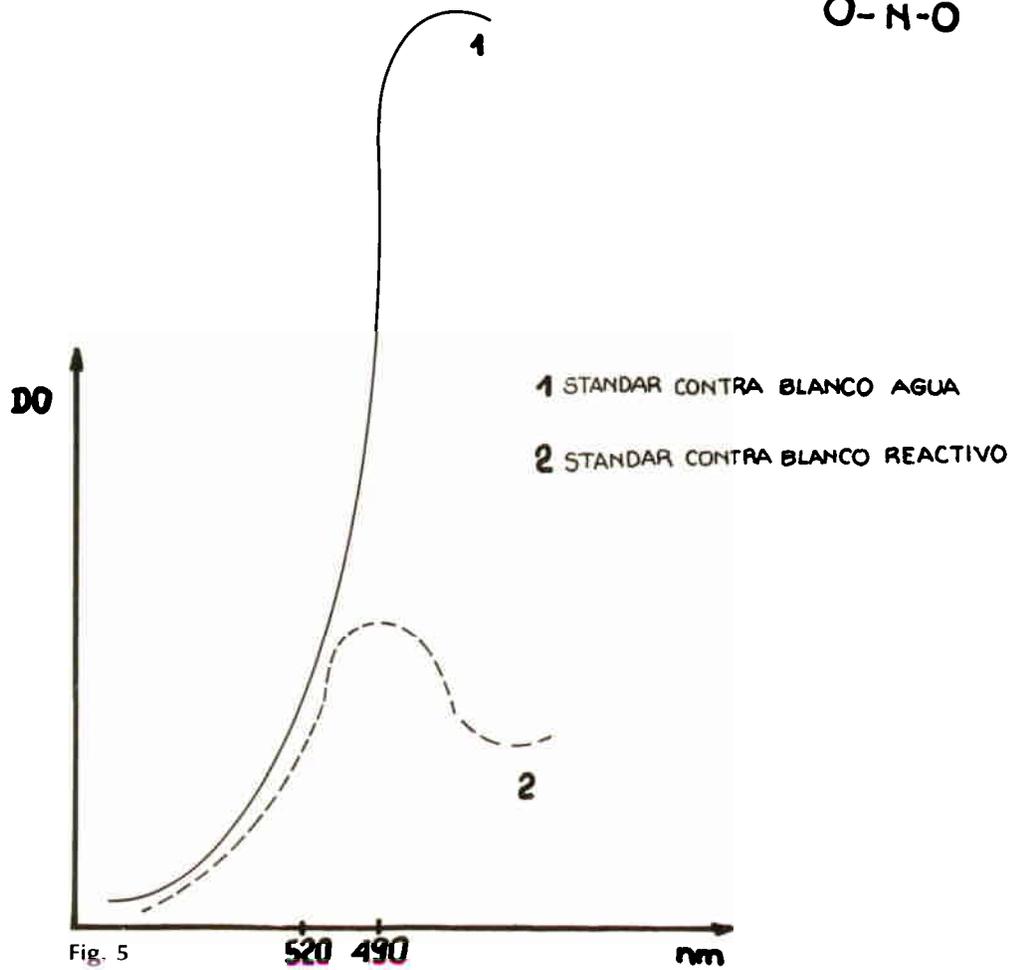
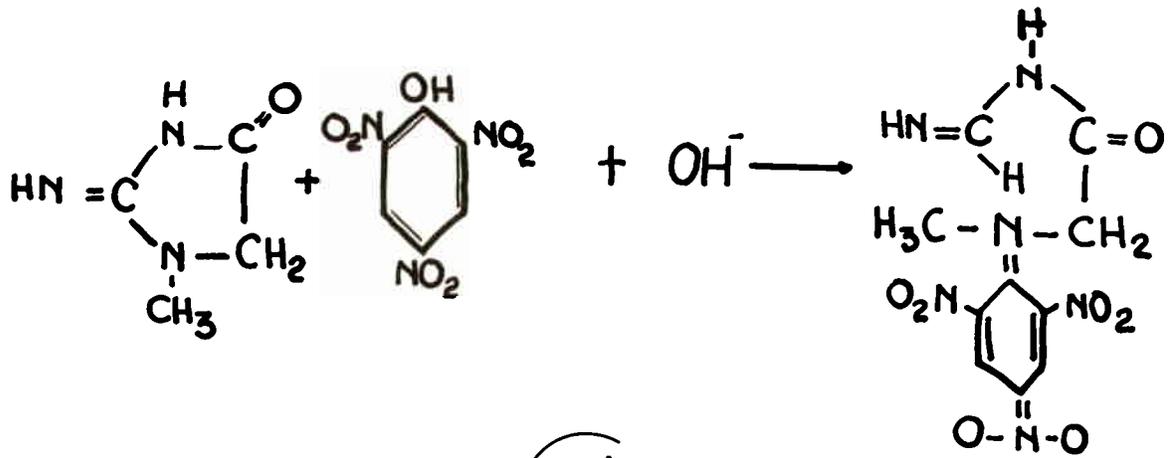


Fig. 5

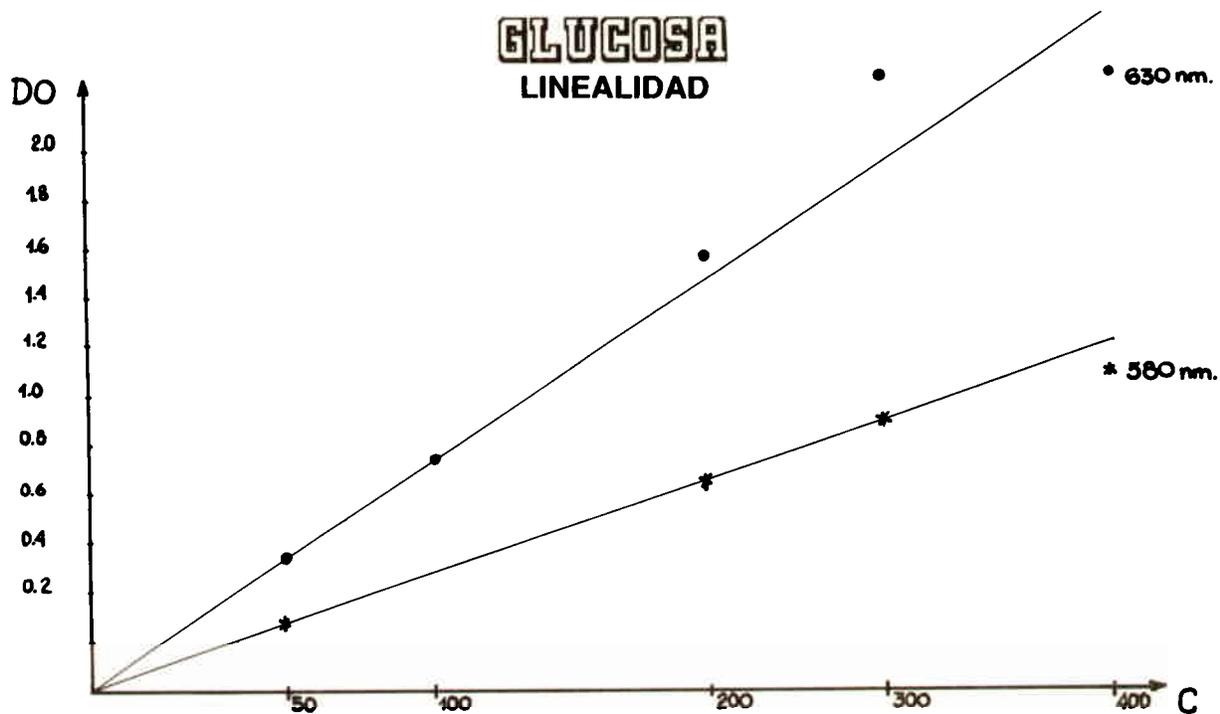


Fig. 6

1.4. Linealidad

Graficando los datos del espectro de absorción en un eje de coordenadas (absorbancia versus concentración) se puede determinar la concentración que todavía cumple con la ley mencionada, así la Glucosa leída a 580 nm tiene linealidad hasta 400 mg % y leída a 630 nm solamente hasta 200 mg% (Fig. 6).

PROTEINAS
TOTALES

- 1 STANDARD CONTRA BLANCO REACTIVO
- 2 STANDARD CONTRA BLANCO AGUA

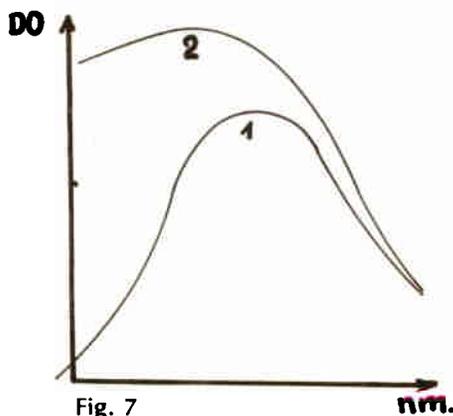


Fig. 7

- 1.5. Espectros de absorción de estandares primarios frente a diferentes blancos
Haciendo espectros de absorción de estandares primarios frente a blanco de agua y blanco reactivo, observamos que la Creatinina y Proteínas totales presentan espectros diferentes (Fig. 5 y 7). El Acido Urico muestra espectros similares con suero de pacientes frente a ambos blancos. (Fig. 4).

2. CONDICIONES DE OPERACION

2.1. Cinética de Reacción

Utilizando estandar primario y suero de pacientes, seguimos el tiempo de reacción de la Glucosa a partir del minuto 8 cuando comienza el desarrollo de color hasta el minuto 17 y 18 en el que no se observa más cambio de absorbancia indicando el final de la reacción. (Fig. 8)

2.2. Tiempo de Estabilidad del Producto Formado

Efectuamos lecturas a partir del primer minuto de finalizada la reacción anterior hasta los 45 minutos sin observar cambios de Absorbancia, tiempo que nos indica la estabilidad del producto. (Fig. 9).

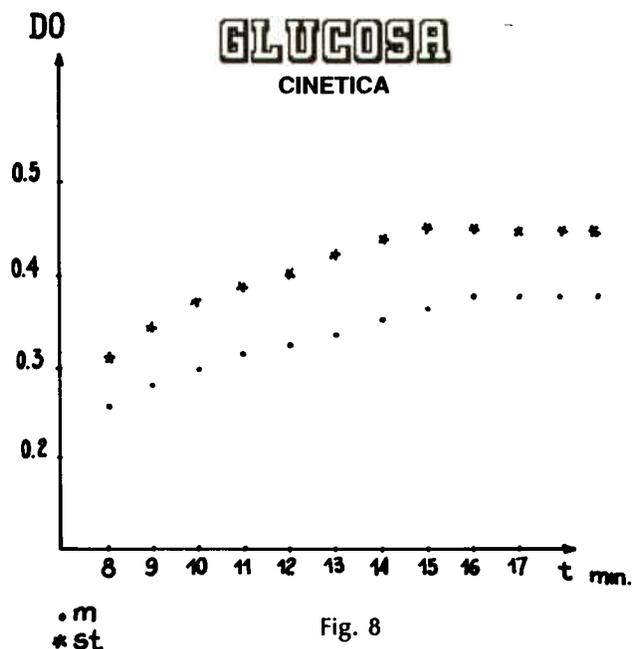


Fig. 8

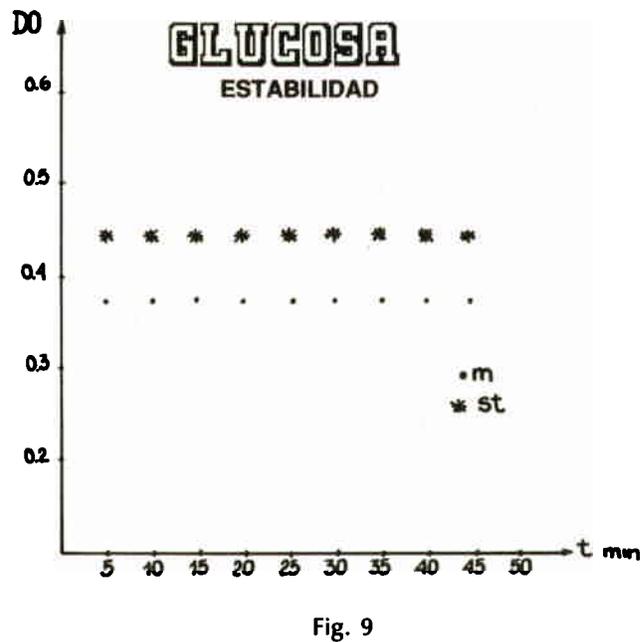


Fig. 9

DISCUSION

Para cualquier determinación colorimétrica no es suficiente la elección de la longitud de onda de máxima absorción, sino que deben tomarse en cuenta las características estudiadas en el presente trabajo y relacionar entre ellas para encontrar una longitud de onda óptima (Cuadro 1) que satisfaga las leyes de la absorción y transmitancia; es decir, que una característica por sí sola no representa un dato definitivo sino que es necesario compatibilizar con las otras características como sucede con la Urea donde no es conveniente utilizar la longitud de onda de máxima absorción. (640 nm) sino más bien una baja (540 nm) debido a que en esta longitud de onda la sensibilidad es menor que nos permite leer concentraciones más elevadas sin necesidad de diluir la muestra, cumpliendo al mismo tiempo la propor-

cionalidad entre concentración y absorbancia sin alejarnos de las condiciones óptimas (Cuadro 1).

Igualmente en la Glucosa se elige una longitud de onda que no corresponde a la máxima absorción de esta manera se logra una reducción en sensibilidad aunque menos que ideal. Esta disminución en la sensibilidad con frecuencia vuelve lineal o prolonga la porción lineal de una curva práctica de trabajo. (3, 4).

Por los resultados obtenidos consideramos que:

1. Es necesario realizar en todos los laboratorios de análisis clínicos espectros de absorción, con el equipo disponible debido a la diversidad de marcas y reactivos.
2. Es importante determinar la linealidad de todos los métodos, porque generalmente se procesan muestras patológicas cuyas concentraciones pueden estar elevadas y en la mayoría de las veces no cumplen la Ley de Lambert y Beer.
3. Es necesario establecer la cinética de reacción y el tiempo de estabilidad del producto para controlar y programar adecuadamente el trabajo según el número de muestras, teniendo en cuenta que los Kits comerciales están estandarizados para el nivel del mar.

CUADRO 1

ANALITOS	LONGITUD DE ONDA ELEGIDA	LONGITUD DE ONDA DE MAXIMA ABSORCION
Acido Urico	640 nm	690 nm
Creatinina	520 nm	490 nm
Glucosa	580 nm	630 nm
Proteinas Totales	540 nm	540 nm
Urea	540 nm	640 nm

BIBLIOGRAFIA

- 1.- DOUGLAS A., SKOOG, DONALD WEST. Introducción a la Química Analítica, Editorial Reverte Argentina S.R.L. 1969. Pag. 499-539.
- 2.- FERNANDEZ C., HERRERA J., CANDAU R., Prácticas del control de calidad interno de Bioquímica Clínica. Análisis Clínicos - Tomo V N° 18. Pag. 22-24.
- 3.- ROJAS RENE. Apuntes del Curso de Control de Calidad. Sociedad de Bioquímica Clínica Filial La Paz, 1982.
- 4.- TIETZ Química Clínica Moderna. Editorial Interamericana, 1972. Pag. 84-96.