

52
28j



**Universidad Nacional Autónoma
de México**

FACULTAD DE QUIMICA

**"TECNICAS ALTERNATIVAS PARA VERIFICAR LA CALIBRACION
DE ESPECTROFOTOMETROS EN QUIMICA CLINICA"**



T E S I S

Que para obtener el título de EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA
Químico Farmacéutico Biólogo

p r e s e n t a

OCTAVIO SAUL MORALES ARIAS



**TESIS CON
FALSA DE ORIGEN**

México, D. F.

1988



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

C O N T E N I D O

I.	Objetivo	1
II.	Introducción	1A
III.	Generalidades	5
IV.	Material y Métodos	52
V.	Resultados	63
VI.	Discusión	115
VII.	Conclusiones	130
VIII.	Apéndice	131
IX.	Bibliografía	136

O B J E T I V O

El propósito de este trabajo es demostrar que con el empleo de soluciones indicadoras es factible verificar la exactitud de longitud de onda y la linealidad fotométrica en espectrofotómetros de uso químico clínico.

I INTRODUCCION

Durante muchos años el principal medio de medir una reacción fotoquímica ha sido la colorimetría. Esto probablemente se debe a que el primer instrumento confiable para medir la concentración de un compuesto fue el colorímetro de Dubosq en 1859.

Este hecho impulsó de manera asombrosa el empleo de técnicas espectroscópicas en la química, a tal grado, que hoy en día constituyen una herramienta de trabajo indispensable, sin la cual, es difícil imaginar los problemas que enfrentaría el químico al realizar una determinación.

Estas técnicas no solo facilitaron el trabajo cotidiano del químico, sino que con la ayuda de ellas, se pudieron efectuar mediciones e identificaciones nunca antes imaginadas. Podemos establecer la estructura de compuestos, análisis de mezclas, determinación de pureza en forma rápida y sencilla. Así también; podemos determinar la concentración de un "analito" o la actividad de una enzima en forma confiable, segura y exacta.

Los espectrofotómetros y fotómetros básicamente están compuestos de dos partes fundamentales:

- 1) El espectrómetro, que tiene como función producir energía radiante y seleccionar la longitud de onda adecuada, de acuerdo a la muestra que se mida y a la reacción que ésta produzca.
- 2) La otra parte es el sistema de detección de los cambios energéticos o sea el fotómetro propiamente dicho.

En base a estos principios que forman a un espectrofotómetro es necesario que el usuario se familiarice con cada parte, con el fin de poder en un momento dado detectar alguna falla.

Desde que se desarrollaron los primeros espectrofotómetros, a fines de los 30's y principios de los 40's, hubo necesidad de verificar su funcionamiento. A medida que iban surgiendo nuevas técnicas para la determinación de

sustancias fue desarrollándose tanto los instrumentos como los métodos para mantener en óptimas condiciones los instrumentos de medición.

En 1963, un comité compuesto por miembros de la Sociedad Americana de Pruebas de Materiales (ASTM-American Society of Testing Materials), representada por académicos y químicos industriales así como fabricantes de instrumentos, desarrollaron una serie de recomendaciones para ser probadas en cada espectrofotómetro, las cuales fueron adoptadas y han resultado uno de los estándares más importantes en la industria (38, 39, 9). Un segundo paso notable fué el que tomó la National Bureau of Standards (NBS), cuando introdujo dos patrones de exactitud fotométrica, de acuerdo a las recomendaciones del comité ASTM.

Numerosos reportes han sido publicados con respecto a las técnicas de comprobación o verificación de los espectrofotómetros, lo cual habla mucho de la importancia que presentan dichos aparatos, así como su debido control que tiene que llevarse.

Las estadísticas nos demuestran que el 95% de los estudios clínicos realizados se hacen por medio de mediciones espectrofotométricas y el 90% de los espectrofotómetros empleados no llevan un debido control de su funcionamiento.

Estas cifras significativas nos hacen reflexionar acerca de la imperiosa necesidad de llevar un programa de control de calidad instrumental básico, en donde se cubran los parámetros más importantes que nos permitan detectar cualquier anomalía, y de ésta forma el espectrofotómetro siempre cumpla con sus especificaciones adquiridas al salir de la fábrica.

Todo esfuerzo se debe hacer con el fin de aumentar la comunicación entre quien lo construye, lo distribuye, las sociedades profesionales y el personal de laboratorio. Nuestro objetivo debe ser el proveer los medios para comprobar y mantener en óptimas condiciones los instrumentos, a fin de que la calidad en el cuidado de la salud se mejore en este tiempo y en el venidero.

De acuerdo a las recomendaciones expuestas por el Panel de Expertos en Espectroscopia, es necesario controlar los siguientes parámetros: exactitud de la longitud de onda, exactitud fotométrica, precisión fotométrica, paso de banda, luz espúria o extraña y nivel de ruido.

De los cuales nuestra atención se centrará en la exactitud de la longitud de onda, exactitud fotométrica, precisión fotométrica y luz espúria. Por ser los parámetros que presentan mayor importancia y que requieren de un control periódico (semanal), además de presentar dificultades en cuanto a la técnica, ya que requieren de materiales (filtros, sustancias) demasiado caros y difíciles de adquirir (poco asequibles), por lo que es necesario desarrollar técnicas alternativas que cubran dichas desventajas y que resulten tan seguras y confiables como las ya comprobadas y recomendadas.

Hoxter (29) propuso el empleo de soluciones indicadoras para encontrar puntos isobélicos o de intersección y de esta forma nos permita comprobar la exactitud de la longitud de onda, obteniendo excelentes resultados y sugiriendo diferentes sustancias aplicables para dicho parámetro. Sólo que todos sus resultados se comprobaron en un aparato de mayor resolución, mayor sensibilidad, paso de banda estrecho y con empleo de graficador.

Es pues nuestro propósito, comprobar lo propuesto por Hoxter, pero en diferentes aparatos, de distinta sensibilidad, paso de banda, etc., desde los más sencillos hasta los más sofisticados.

Las soluciones que se utilizaron para la calibración fueron: naranja de metilo, rojo congo, azul de bromotimol y $K_2Cr_2O_7$, además de muestra biológica (plasma).

Con lo que se pretende demostrar la utilidad de ellas a base de los puntos isobélicos para calibrar los espectrofotómetros y de esta forma se incluya como un método alternativo y recomendable.

Los resultados obtenidos, así como las gráficas, se asemejan mucho a los de Hoxter. Por otro lado, se pudo comprobar que dichas soluciones al en-

contrar sus puntos isosbéticos no nada mas nos da información de la exactitud de la longitud de onda, sino que también nos demuestra que son útiles para la precisión fotométrica o dicho técnicamente la linealidad de la respuesta del detector. Lo cual el llevar el Control de Calidad instrumental se hace más sencillo y más rápido con el empleo de esta soluciones indicadoras.

- 1.- Radiación electromagnética y su interacción con la materia.
- 2.- Leyes de absorción de energía radiante.
- 3.- Instrumentación para espectroscopía.
- 4.- Mantenimiento de espectrofotómetros.

II.1 Radiación electromagnética (EM) y su interacción con la materia.

La mayoría de los métodos instrumentales de análisis químicos, - - - emplean la radiación EM como un medio para determinar la identidad, estructura y cantidad de especies químicas.

El ejemplo más común de radiación EM, es la luz (radiación visible), que es un campo de fuerza en el espacio con una frecuencia, velocidad e intensidad característica; y por lo tanto, ocupa sólo una pequeña región del espectro EM, que cubre aproximadamente 15 órdenes de magnitud de energía. Así en la trayectoria de un haz de radiación cualquier partícula que tenga una carga eléctrica o un momento magnético se sentirá, ya sea atraída o repelida por la radiación.

La fuerza es perpendicular a la dirección de propagación de la radiación. La presentación de la idea de frecuencia implica:

- a) una variedad de frecuencias y
- b) naturaleza de las ondas.

La enorme variedad de frecuencias EM conocidas, constituyen el espectro EM total, como se ilustra en la figura 1.

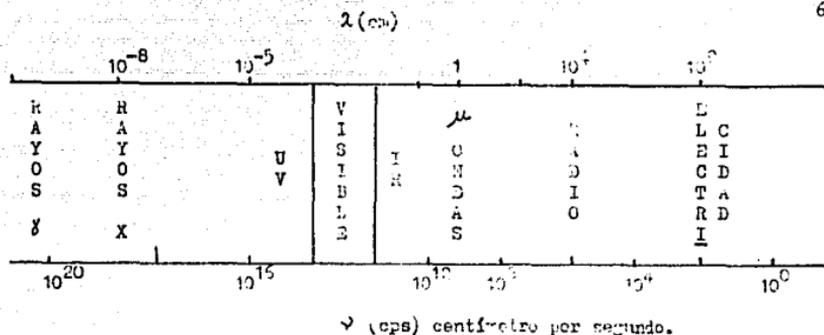


FIG. 1

La luz se ha estudiado por siglos y mucho se conoce de sus propiedades, pero hasta el momento no se ha dado una contestación correcta a la pregunta ¿Qué es la luz?

En uno de sus aspectos, como es el caso de enfocar la luz en un lente y reflejarse a través de un espejo, la luz se describe como un fenómeno de onda.

En otro aspecto, tal como en la emisión o absorción de la luz por átomos o moléculas, a la luz sólo se le considera como una fuente de paquetes discretos de energía. Por tanto, se dice que la luz tiene una naturaleza dual, que exhibe ambas características de onda y de partícula. Esta dualidad no se concreta a la región visible del espectro EM, sino que puede ser demostrada para toda la radiación EM.

Un cuanto de energía es la cantidad de energía absorbida por un átomo, cuando asciende a un estado de energía inmediato superior. Esta misma cantidad (un cuanto) es emitida por el átomo cuando regresa a su anterior estado, o sea su estado basal.

La energía es emitida como radiación en forma de fotón, o en forma de luz de una frecuencia proporcional a la cantidad de energía. Por ejemplo, cuando se excita un átomo por medio de luz o incluso bombardeándolo con partículas de movimiento rápido, emiten un exceso de energía como fotones o radia-

ción EM (ultravioleta, luz visible o infrarroja). Supóngase un átomo de hidrógeno que está en su mínimo estado de energía (estado basal), puede absorber un cuanto de energía para elevarse al estado de energía inmediato superior, que es un estado excitado, cuando el átomo de hidrógeno regresa a su estado basal, se puede desprender un cuanto de energía en forma de fotón. Este fotón contendrá diferente energía correspondiente a diferente frecuencia.

II.1.1. Radiación como fenómeno de onda.

Desde el punto de vista de Clark Maxwell, una onda EM de frecuencia (ν) es una corriente alterna asociada con un efecto magnético. La interacción de la onda con sus alrededores puede ser discutida en términos de vectores eléctricos y magnéticos que representan el campo de fuerza.

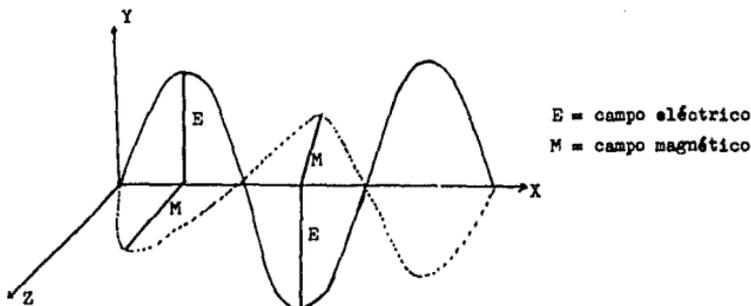


FIG. 2

El ser de plano polarizado significa que el vector E vibra en un sólo plano y el vector M en otro.

Por lo tanto, en el modelo ondulatorio se describe a la radiación EM como ondas que viajan a la misma velocidad (c): 3×10^{10} cm/seg. en el vacío. Dichas ondas se clasifican convenientemente en función de su longitud de onda que pueden definirse como la distancia entre el máximo y el mínimo de la cur

va, o dicho de otro modo, la distancia entre cualquier par de puntos equivalentes de la curva.

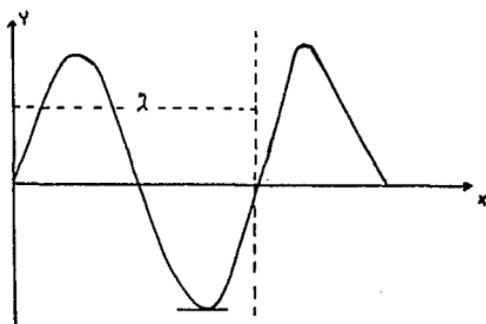


FIG. 3

El tiempo requerido para que la onda avance la distancia λ es: $t = \lambda/c$, por lo tanto, la onda avanza una distancia igual a λ y la ecuación anterior se resume en λ/c seg., el recíproco de esta cantidad se conoce como la frecuencia (ν).

$$(1) \quad \nu = \frac{c}{\lambda} \quad \text{o} \quad \nu \lambda = c$$

Tanto la longitud de onda como la frecuencia, caracterizan una onda de luz. La unidad empleada para la longitud de onda es el centímetro y para la frecuencia son los ciclos por segundo, no siendo ésta última muy conveniente. Para diferentes regiones del espectro se emplean unidades particulares — que facilitan su manejo. Así en el U.V. (Ultravioleta) y visible se emplean nanómetros y Å° .

UNIDADES

U.V.	Å°	angstrom	10^{-10} m
Visible	nm	nanómetro	10^{-9} m
I.R. (Infrarojo)	m	micrómetro	10^{-6} m
	cm^{-1}		1/cm

	<u>LONGITUD DE ONDA (λ)</u>	<u>ENERGIA</u>
U.V. Vacío	100 - 200 nm	286 - 143 Kcal.
Cuarzo	200 - 350 nm	143 - 83 Kcal.
Visible	350 - 800 nm	82 - 36 Kcal.

Otra cantidad que se emplea para describir la onda, es el recíproco de la longitud de onda $\frac{1}{\lambda}$. Cuando la λ se expresa en centímetros $\frac{1}{\lambda}$ da el número de onda por cm, y se conoce como número de onda ($\bar{\nu}$).

$$(2) \quad \bar{\nu} = \frac{1}{\lambda} = c \nu$$

Mientras mayor sea la longitud de onda, menor es el número de ondas por cm.

II.1.2 Cambios cuantizados de energía.

Los intentos para explicar la distribución de energía que pueden emitir las partículas al vibrar en un cuerpo caliente no habían sido satisfactorias. Planck, aportó el punto de vista de que la energía de las partículas - que oscilan es "cuantizada", es decir, que podían únicamente poseer cantidades discretas de energía. Sostuvo que podían producirse tránsitos entre estas energías y que la variación entre ellas cuando el oscilador pasaba a otro estado energético, se relacionaba con la frecuencia de la radiación de acuerdo con la relación.

$$(3) \quad \Delta E = h\nu$$

Donde ΔE es la variación de energía, h una constante llamada de Planck, que tiene un valor de 6.6256×10^{-27} erg/seg., y ν es la frecuencia de la radiación.

Esta ecuación teórica nos permite medir la distribución de la energía

radiante emitida por un cuerpo o materia.

Por otra parte, Einstein reconoció en la ecuación de Planck la unión de las dos teorías de la luz. La pérdida de energía ΔE puede identificarse como la energía de un cuanto de radiación, que es un concepto de la teoría corpuscular. Esta energía puede evaluarse a partir de la frecuencia de la radiación, que está relacionado con el movimiento ondulatorio.

La luz amarilla, por ejemplo, puede describirse como una onda con frecuencia de oscilación de 5.2×10^{14} ciclos/seg., o formada por un flujo de cuantos o fotones, cada uno de los cuales posee una energía de:

$$(4) \quad \Delta E = (6.6256 \times 10^{-27}) (5.2 \times 10^{14}) = 3.4 \times 10^{-12} \text{ erg.}$$

La importancia de esta ecuación es que con ella fue posible esclarecer el origen de los espectros atómicos.

II.1.3 Cambios de energía en el sistema.

Todo sistema elemental, sea núcleo, átomo o molécula, cuando está razonablemente aislado parece tener varios estados energéticos discretos. Para cambiar de uno a otro, el sistema debe estar expuesto a la radiación o ser bombardeado con otras partículas que tengan energía, por lo menos equivalente a las diferencias de energía de los estados.

Toda radiación de emisión o de absorción se origina por los cambios de energía de dicho sistema.

Una radiación de emisión se obtiene cuando un material es sometido a temperaturas muy altas o incluso bombardeado con partículas muy rápidas, de tal forma que logran excitarlo para volver después de un tiempo a niveles más estables y emitir luz en forma de fotón. Puesto que para cada especie existirá un gran número de estados excitados posibles, se producirán muchas radiaciones de diferente frecuencia al volver a niveles más estables. La colec-

ción de radiaciones emitidas por una especie, recibe el nombre de espectro de emisión.

Sólo los átomos, iones o moléculas separadas, emiten espectros "lineales" bien definidos que tengan importancia analítica. Los sistemas condensados, tales como un trozo de hierro o un cristal de cloruro de sodio, no producen frecuencias o calentamientos discretos; por el contrario emiten un espectro "continuo". Estas son radiaciones llamadas de "cuerpo negro" que dependen más de la temperatura, que de la naturaleza o composición química.

Una radiación de absorción se obtiene cuando una especie aislada, — ion, átomo o molécula que exhibe un conjunto de niveles de energía definidos, absorberá sólo cuantos de energía electromagnéticos que corresponden a la — excitación de un nivel a otro. Y la colección de radiaciones absorbidas por dicha especie, se conoce con el nombre de espectro de absorción.

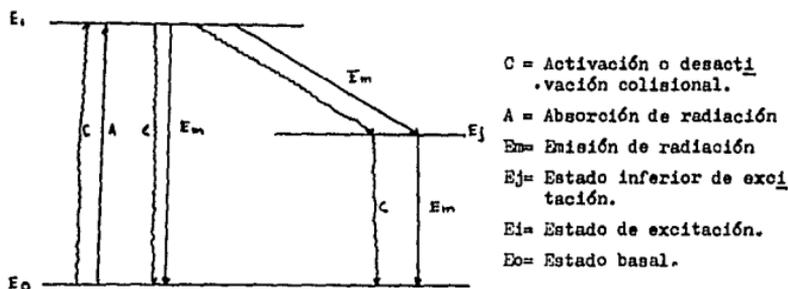


FIG. 4

En la Fig. 4, se explican los cambios energéticos en un sistema elemental que originan las radiaciones de emisión y de absorción.

Existen algunas moléculas, átomos o iones que al llegar a su estado de excitación o activación son más estables, el regreso a su estado basal se

lleva a cabo en forma muy lenta, pasando por un estado inferior (E_j) o de -- transición, emitiendo luz y se le conoce como Emisión de Fluorescencia.

II.1.4 Niveles de energía de una molécula diatómica.

Cuando la materia absorbe radiación se incrementa su energía. Este aumento se debe al fotón de radiación que se absorbió, y se expresa como:

$$(5) \quad \Delta E = h \frac{c}{\lambda}$$

Para saber como emplea la materia la radiación absorbida, recordemos que la energía contenida en ésta se distribuye en:

Energía de transición
Energía de rotación
Energía de vibración
Energía electrónica

Al momento que la materia absorbe energía ésta se incrementa en alguno o algunos de estos tipos de energía.

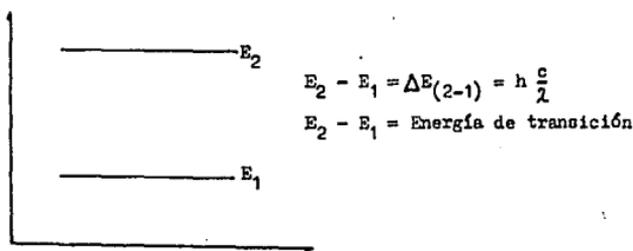


FIG. 5

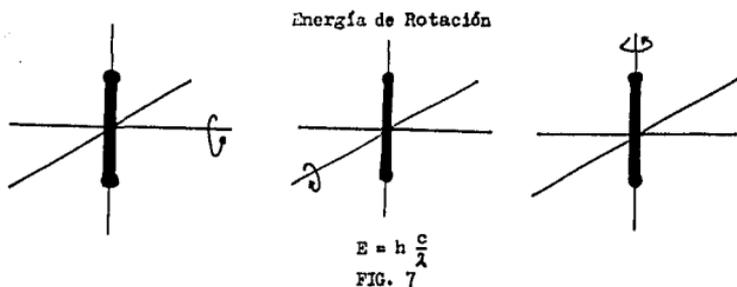
Los niveles de energía de transición, son tan cercanos uno a otro -- que se extienden sin interrupción, no siendo tan importantes para nuestro estudio las restricciones cuánticas.

Energía de Transición



FIG. 6

La energía de rotación es la energía cinética que poseen las moléculas debido a su rotación sobre un eje a través de su centro de gravedad.



La diferencia de energía entre los niveles vibratorios corresponden a la radiación en la región de microonda ($\lambda = 1$ cm con una energía del orden de 2.858 Kcal/mol). La energía de vibración es la energía cinética y potencial que poseen las moléculas debido al movimiento vibratorio. A los átomos de una molécula se les puede considerar como puntas de masa unidas por un resorte.

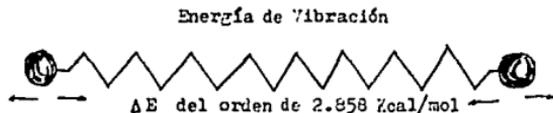


FIG. 8

En este modelo la constante de fuerza del resorte es comparable a la fuerza de unión. Aquí la energía típica es del orden de 2.858 Kcal y corresponde a la región del I.R. (infrarrojo).

Todas las formas de energía atómica o molecular están cuantizadas, - es decir, sólo hasta ciertos niveles energéticos se está permitido absorber - energía. Así cuando se absorba energía en la región I.R., las moléculas pasarán de un nivel vibratorio a otro y cuando se absorba energía en U.V., se pasará de un nivel electrónico a otro.

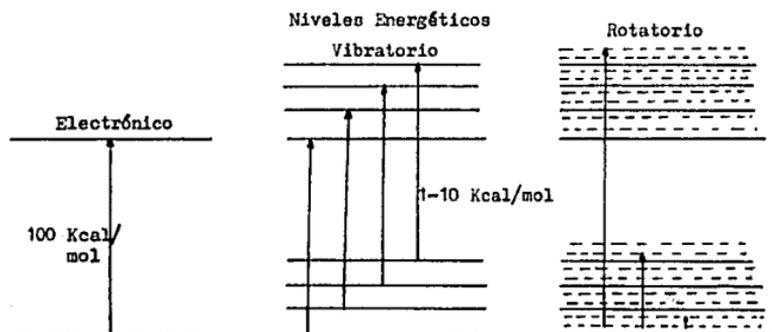


FIG. 9

Existen grandes diferencias entre la energía correspondiente a los - niveles vibratorio, rotatorio y electrónico.

La energía de transición, es la energía cinética que poseen los átomos y las moléculas debido a la energía cinética y potencial de sus electrones. La energía cinética es debida a su movimiento y la potencial a su interacción con el núcleo.

La energía de un electrón está determinada por el nivel en el cual se encuentra y éstos están descritos por los números cuánticos.

- n - principal 1, 2, 3
- l - momento angular 0, 1, 2
- m - momento magnético
- s - spin $\pm 1/2$

La energía de un electrón está determinada por n y l.

II.2 Leyes de absorción de la energía radiante.

Existen dos leyes principales de absorción de la luz que son muy importantes para la espectroscopía. La primera es la ley de Bouguer o Lambert, establece que la proporción de la luz absorbida por un medio es independiente de la intensidad de la luz incidente y cada capa sucesiva del medio absorbe una fracción igual de ésta última. Por ejemplo, si la intensidad de la luz incidente sobre cualquier medio es el 100% y la fracción de luz absorbida por cada espesor unitario del medio es el 50% de la intensidad incidente, la intensidad disminuirá sucesivamente, como se observa en la Fig. 10.

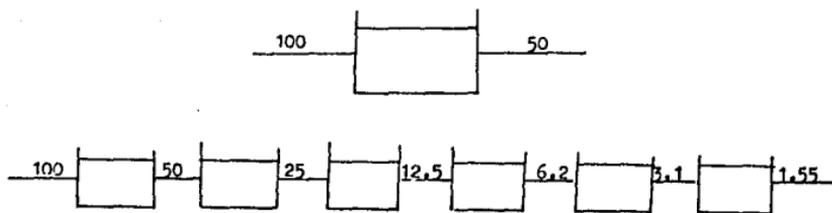


FIG. 10

Si ésto se trazara en una gráfica se obtendría una curva como la de la Fig. 11.

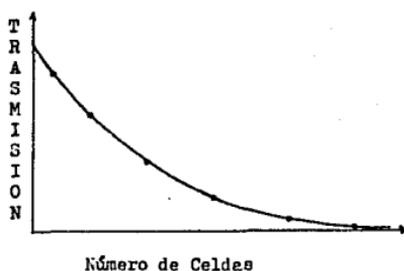


FIG. 11

La segunda ley, la de Beer, introduce el concepto de número de especies absorbentes, (concentración). Considérese un rayo de luz incidente (I_0) que atraviesa una celda con un paso de luz b y que absorbe una cantidad (I) - de luz incidente. (Fig. 12).

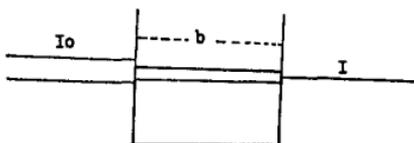


FIG. 12

Tomemos incrementos pequeños del medio que correspondan a decrementos pequeños de la intensidad. El número de especies absorbentes (n) permanecen constantes y tendremos lo siguiente:

$$(6) \quad -\frac{dI}{I} \sim dn$$

Al introducir una constante se transforma en igualdad y tendremos — que:

$$(7) \quad -\frac{dI}{I} = kdn$$

Integrando entre los límites de I y n .

$$(8) \quad \int_{I_0}^I -\frac{dI}{I} = k \int_0^N dn ; dn = N$$

Donde N representa el número total de las especies absorbentes. Entonces N se puede representar como la concentración (c) y el espesor de la celda (b) en centímetros, integrando se tiene:

$$(9) \quad -\ln \frac{I}{I_0} = kN$$

$$\text{Si } N = C$$

$$(10) \quad -\ln \frac{I}{I_0} = kcb$$

Cambiando el signo:

$$(11) \quad \ln \frac{I_0}{I} = kcb$$

Intercambiando ln por log, podemos introducir el factor de cambio en una nueva constante (a).

$$(12) \quad \log \frac{I_0}{I} = abc$$

En donde (a) se denomina como constante de absorptividad, que se definirá de acuerdo a las unidades en que se exprese c.

$$(13) \quad \text{para } c = \text{moles/Litro}$$

$$\log \frac{I_0}{I} = \epsilon cb$$

ϵ entonces será el coeficiente de extinción molar equivalente a moles/litro cm.

De las ecuaciones anteriores 12 y 13, podemos determinar la absorción (A) o extinción (E).

$$(14) \quad \log \frac{I_0}{I} = A \delta E$$

Este valor de absorción A según la nomenclatura americana o de extinción (E) según lo expresan los europeos, es lo que se determina experimentalmente en el instrumento, o que se puede calcular a partir de los valores de transmisión (T), ya que:

$$(15) \quad T = \frac{I}{I_0} \text{ y por tanto}$$

$$(16) \quad \log \frac{I_0}{I} = \log \frac{1}{T}$$

podemos escribir

$$(17) \quad A = \log \frac{1}{T}$$

$$(18) \quad A = \log \frac{1}{T} = abc$$

$$(19) \quad E = \log \frac{1}{T} = \epsilon dc \quad d = b$$

A ó E depende de c y b , mientras que a ó ϵ es una constante que depende de la naturaleza de la sustancia.

En la ecuación de la recta y al graficar E frente a c para una b -- constante, nos dará una línea recta.

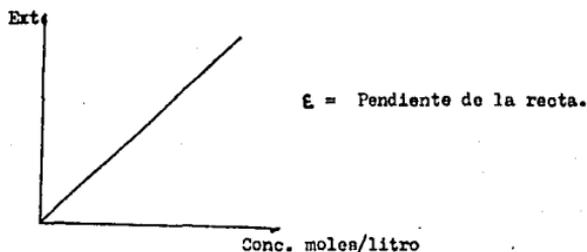


FIG. 13

Por otro lado, considerando que cuando se emplean celdillas de medición de paso de luz (b) constante y a $\delta \epsilon$ una característica propia e invariable de las sustancias a medir, se puede considerar (ab) como una constante K.

$$(20) \quad A = abc \quad \text{como} \quad A = Kc$$

$$(21) \quad E = \epsilon dc \quad \text{como} \quad E = Kc$$

En estas condiciones la absorción de luz o energía es directamente proporcional a la concentración, y podemos considerar que:

$$(22) \quad \frac{A_1}{A_2} = \frac{C_1}{C_2}$$

A_1 = absorción del problema.

A_2 = absorción del patrón (concentración conocida).

C_1 = concentración del problema.

C_2 = concentración del patrón (conocida)

por lo tanto:

$$(23) \quad C_1 = \frac{A_1}{A_2} \times C_2$$

Hay ocasiones en que se desea emplear factores a partir de una solución de concentración conocida. Estos factores se calculan observando que $A = kc$, k es el factor correspondiente a una solución de concentración conocida (c), que posee un valor de extinción o absorción igual a A.

El factor puede calcularse de la siguiente manera:

$$(24) \quad k = \frac{A}{c}$$

En estos casos debe notarse que el empleo de un factor va asociado al grado de pureza de la sustancia empleada como estandar.

La ley de Beer es válida solamente dentro de ciertos límites, ya que cuando las condiciones no son iguales se presentan desviaciones a la misma; - estas desviaciones pueden ser tanto de orden químico como instrumental.

Entre las principales causas químicas que desvian la ley de Beer podemos considerar:

- Interacción del material absorbente entre sí (formación de complejos).
- Interacción del absorbente con el solvente.
- Interacción del absorbente con sustancias extrañas.
- Variación del índice de refracción con la concentración.
- Desviación de equilibrios posibles que afectan a determinados absorbentes (iones).

Las causas instrumentales que pueden conducir a la desviación de dicha ley son:

- Inexactitud de la longitud de onda.
- Baja respuesta del detector.
- Disminución de la fuente de poder.
- Presencia de luz espúria.
- Mediciones en intervalos de concentración extremos.

II.3 Instrumentación para espectroscopia.

Se había mencionado anteriormente que la espectroscopia estudia la interacción de la materia con la radiación electromagnética y éste es el principio en que se basan todos los métodos espectroscópicos.

El valor informativo de los diversos métodos espectroscópicos, que tienen por objeto analizar la naturaleza y estructura de la muestra en examen, es diferente, dado que un método espectroscópico generalmente no puede determinar más de una propiedad de la molécula.

Hoy en día, se cuenta con algunos métodos que a continuación se describirán, de acuerdo al orden de energía decreciente de la radiación empleada:

Análisis Estructural por Rayos X: "La medida de todas las cosas", - el análisis de la estructura cristalina que requiere de mucho tiempo (en moléculas complicadas puede durar meses) permite determinar la estructura en forma ÚNICA. La sustancia a medir ha de ser cristalina. Debido a la larga duración y al trabajo que supone, en la práctica se empieza con otros métodos espectroscópicos que requieren solamente algunos minutos.

Análisis de Fluorescencia de Rayos X: permite determinar simultáneamente en forma cualitativa y cuantitativa todos los elementos más pesados que el Fluor. La sensibilidad no es muy elevada y existen además dificultades de bidas a efectos de matriz. Aparato costoso. Método ideal para las determinaciones de rutina.

Espectroscopia U.V. y Visible: correspondiente a los espectrómetros ultravioleta visible usuales, y sólo se obtiene información sobre los dobles enlaces de las estructuras moleculares. Si se mide solamente a una longitud de onda, pueden determinarse cuantitativamente compuestos absorbentes de rayos U.V. y compuestos de color.

Espectroscopia de Absorción Atómica: método muy sensible para la determinación cuantitativa de metales o semimetales, generalmente después de pulverizar la solución acuosa de la sal del metal en una llama o cubeta de grafito y de esta forma medirse la radiación específica del elemento en la región visible.

Espectrometría de Llama: excitación de metales alcalinos y alcalino térreos por pulverización de las respectivas soluciones en la llama y subsiguiente determinación espectroscópica en la región visible.

Espectroscopia Infrarroja: excitación de los átomos presentes en una molécula a realizar vibraciones, cuyas frecuencias son características de determinados tipos de enlaces (ej. enlaces dobles, triples y enlaces elemento

hidrógeno) por lo tanto, informan sobre las unidades estructurales de la molécula y en su caso, sobre propiedades simétricas.

Espectroscopía de Microondas: excitación de compuestos gaseosos a estados de rotación.

Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN): método importante para determinar la estructura de muestras líquidas o disueltas que presenten núcleos atómicos con momento magnético (^1H , ^{13}C , ^{19}F , ^{31}P). Las muestras se introducen en un campo magnético muy fuerte y se irradian con ondas de radio (gran longitud de onda, baja energía) que son absorbidas cuando la energía irradiada corresponda a la diferencia de energía al "volcarse" el momento magnético del núcleo atómico que se encuentra en un campo magnético exterior. El ambiente químico (envoltura electrónica) y los núcleos magnéticos vecinos, influyen en el campo magnético en el lugar del núcleo a medir y con ello en la situación, es decir, la frecuencia de la señal de absorción.

Un espectro RMN, proporciona una amplia información cualitativa y —cuantitativa sobre los compuestos y sus estructuras.

II.3.1 Instrumentación para la región U.V. - visible.

En la Química Clínica, se emplean fundamentalmente métodos espectroscópicos U.V. y visible, versando este estudio en dichos métodos que a continuación se describirán:

Todos los instrumentos están diseñados sobre bases semejantes y constituidos de dos partes principales:

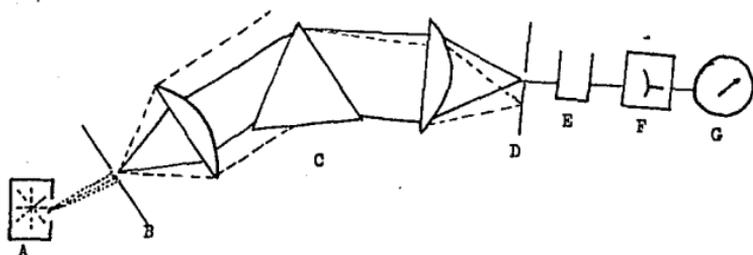
a) Una de ellas es para producir energía radiante y seleccionar —la longitud de onda adecuada en el experimento, al cual se llama espectrómetro, con una fuente de radiación que emite un espectro continuo o línea continua y puede ser de dos tipos: a base de un monocromador o de un filtro (35).

b) La otra parte, es el sistema de detección de los cambios energéticos, o sea, el espectrómetro de filtro con fuente de radiación y puede ser de espectro continuo o de línea espectral (35) comúnmente conocido como fotómetro de filtro.

Los componentes principales de un instrumento (espectrofotómetro y fotómetro) son:

- a) Fuente de energía (radiación)
- b) Sistema disperso de luz
- c) Sistema de detección y medición

En la Fig. 14, se describen las partes en que se compone un espectrofotómetro y/o fotómetro.



- A - Fuente de luz
 B - Abertura de entrada (hendidura)
 C - Monocromador o un sistema de filtros (fotómetros)
 D - Abertura de salida (hendidura)
 E - Cubeta
 F - Detector
 G - Medidor

FIG. 14

a) Fuente de energía (radiación)

La función de la fuente de luz es proporcionar energía radiante en forma de luz visible o no visible, para ser distribuida por medio de un sistema disperso (filtros o monocromadores) en longitudes de onda discretas, y después hacerse incidir en la celda analítica que contiene la solución cuya absorción va a medirse.

Las principales fuentes de energía son: la lámpara de Mercurio que produce radiaciones electromagnéticas en la región ultravioleta \pm 190 a 325 nm, la lámpara de Tungsteno que produce energía entre 325 y 850 nm y las de Nearst (óxido de circonio, torio y cerio), Glovers (carburo de silicio) y arco de carbono que produce la radiación en la región infrarrojo \pm 900 a 2600 nm.

Recientemente se está usando una fuente de luz de Deuterio y aunque su intensidad no es tan grande como la del arco de Mercurio, es aproximadamente el triple que la de una lámpara de Hidrógeno.

Así también, se encuentran las fuentes luminosas de yoduro confinado en cuarzo, para mediciones en las regiones visibles y U.V., que por el hecho de tener cuarzo como envoltura, pueden usarse en la región U.V. del espectro. Estas fuentes son de alta intensidad y larga duración. Frecuentemente pueden servir durante 2000 a 3000 horas sin ser necesario reemplazarlas.

b) Sistema disperso de luz.

Es la parte del fotómetro o espectrofotómetro encargado de separar la luz en longitudes de onda discretas. Dependiendo del aparato será el tipo de sistema de dispersión de luz, en el caso de los fotómetros se emplean filtros y en el caso de los espectrofotómetros se usan monocromadores.

Filtros

El método empleado durante muchos años fueron los filtros. Estos —

son vidrios de color que pueden absorber todas las radiaciones de longitud de onda diferentes a la de interés. Se puede decir que existen dos tipos principales:

- 1) Los que son de vidrio y los de gelatina.
Se basan en la transmisión selectiva de determinadas longitudes de onda.
- 2) Filtros de interferencia.

1) Filtros de vidrio y gelatina.

La gelatina coloreada se deposita como una capa entre dos placas de vidrio. Puede usarse para eliminar el color de la luz que es complementario del color de la gelatina. Análogamente, se puede usar vidrio coloreado para preparar filtros que funcionan de la misma manera que los de gelatina. Ambos filtros permiten sólo transmisión de un pequeño porcentaje de la luz incidente y tienen pasos de banda relativamente anchos, hasta de 50 nm. En general los filtros de vidrio se prefieren a los de gelatina, por poseer mayor rigidez.

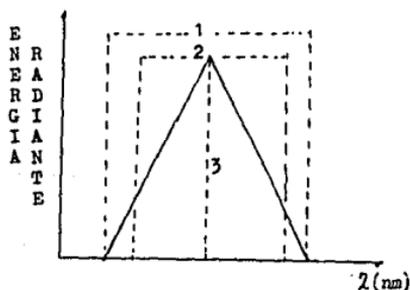
2) Filtros de interferencia.

Se emplean estos filtros en vez de prismas o rejillas para obtener pureza espectral. Dichos filtros se hacen por depósito de delgadas películas de plata semitransparentes, a cada lado de un dieléctrico, como fluoruro de magnesio. Un dieléctrico es un material aislante que no permite el paso de la corriente eléctrica. Cuando la luz, perpendicular a la superficie plateada entra en el filtro atravesará el dieléctrico y se reflejará a la segunda superficie de plata, pasando de nuevo por el dieléctrico para incidir en la primera capa de plata, por la cual será reflejada de nuevo. Finalmente, la luz es transmitida a través de la película de plata semitransparente e incidirá en el fotómetro. Fig. 15.

1) Prismas

Los prismas de vidrio son muy útiles en la región visible y cercana al U.V., en la región pura de éste último, se utiliza el cuarzo. El espectro que emerge es de un sólo orden para los prismas, lo cual provee el menor desgaste de energía radiante. La energía incidente se traduce como en un plano paralelo horizontal por medio de un sistema de lentes y una hendidura o abertura de entrada. La energía radiante que se dispersa a través del prisma consiste de una serie de imágenes formadas para cada longitud de onda que emergen de la hendidura o abertura de entrada. Para después aislar una banda espectral de dicha dispersión y dirigirse hacia la hendidura de salida. Por razones ópticas ambas hendiduras deben ser curvas. Teóricamente, deberían ser muy estrechas, pero en la práctica se encuentran suficientemente amplias como para poder pasar la energía necesaria que permita hacer mediciones exactas. Esto es un factor limitante en cuanto al poder de resolución del instrumento, ya que a hendiduras amplias, amplias serán las bandas espectrales. En el caso de los prismas a longitudes de onda larga, la hendidura debe ser estrecha para obtener anchos de bandas similares. Esto se debe a que los prismas muestran una mayor dispersión a medida que la longitud de onda disminuye.

Cuando ambas hendiduras (entrada y salida) son de igual anchura, la energía radiante que emerge de la de salida se asemeja a un triángulo isósceles. Fig. 16.



- 1) Ancho de banda total
- 2) Ancho de banda nominal
- 3) Longitud de onda nominal

FIG. 16

La longitud de onda nominal (3) (valor de la lectura en la escala — del instrumento) equivale a la mitad de las longitudes de onda que pasan a — través de la hendidura de salida y corresponde a la banda de máxima extinción cuando sus bandas son simétricas. El ancho de banda nominal (2) incluye un — 75% de energía total que emerge y corresponde a la mitad de la anchura.

Debido a las aberraciones ópticas, la energía radiante que emerge no se representa tan simétricamente a un triángulo, por lo que la anchura de ban da efectiva es ligeramente mayor a la nominal. Algunos espectrofotómetros — contienen un graficador que relaciona la longitud de onda, la anchura de ban- da y la anchura de la hendidura, y permiten aislar anchuras de banda efecti- vas de aproximadamente 0.5 a 1.5 nm, dentro del rango de 220 a 950 nm.

Rejillas

Una rejilla consiste de una superficie metálica o de vidrio con un — gran número de líneas paralelas igualmente separadas. Una rejilla es cara, — pero a partir de una rejilla maestra se pueden hacer duplicados recubiertos — al final del proceso por una capa fina de plástico. Estas rejillas se usan — comúnmente en instrumentos comerciales y son más baratas que los prismas. Es tas rejillas pueden operar ya sea en forma de rejillas de transmisión o de re- flexión, estas últimas se emplean en la región pura del U.V., por lo que la — energía radiante no pasa por la rejilla. Cuando la luz blanca choca con una rejilla, ésta se dispersa en un espectro (fenómeno de dispersión) similar al de un filtro de interferencia. Como la energía se dispersa, la anchura de la hendidura y la de banda es constante para el espectro, por lo que las hendi duras permanecen fijas, siendo éstas rectas. Como en el caso de los filtros — de interferencia se producen varios órdenes de espectro, los de primer orden son los que más se forman. La distribución de la energía que emerge de la — hendidura de salida se asemeja también a un triángulo y la descripción será — la misma que la de los prismas.

Algunos monocromadores comunes de rejillas tienen una anchura media de banda de 35 nm, algunos de 20, 10, 8, 2 nm y otros de 0.5 nm, o menos. Las rejillas tienen el inconveniente de permitir el paso de luz parásita en mayor

proporción que los prismas. La luz parásita o espúria puede definirse como la energía radiante de las longitudes de onda no deseadas, que alcanzan al detector. (Más adelante se explica este efecto).

Pequeñas imperfecciones en la superficie óptica del monocromador producen luz espúria. Un prisma tiene sólo pocas caras que se pueden pulir en circunstancias muy estrictas. Por otra parte, una rejilla tiene miles de superficies cuya perfección es difícil de controlar.

c) Sistema de detección y medición.

Los dos instrumentos de uso más común para medir la intensidad de la luz en las regiones U.V. y visible del espectro, son la celda de capa de barrera y los tubos fotomultiplicadores. Las celdas de capa de barrera se emplean en instrumentos menos sensibles, en los espectrofotómetros de mayor sensibilidad están dotados de tubos fotomultiplicadores.

Celdas de capa de barrera.

El funcionamiento de estas celdas se basa en que al incidir la luz sobre ciertos metales o semiconductores, fluyen electrones en proporción a la intensidad de la luz incidente. La celda consiste de una fina capa de plata sobre una capa del semiconductor de selenio. Estos metales se montan sobre un soporte de hierro, el cual es pobre en electrones y por ellos es el electrodo positivo. La plata depositada sobre la capa de selenio, en donde incidirá la luz, es el electrodo cargado negativamente. Cuando la luz incide sobre la capa fina semitranslúcida del metal de plata, ocurre flujo de electrones del semiconductor de selenio al soporte de hierro, pero no en la dirección contraria. Se mide este flujo que es directamente proporcional a la intensidad de la luz incidente sobre la celda fotoeléctrica.

La sensibilidad de la celda de capa de barrera es similar a la del ojo humano. La máxima sensibilidad en ambos ocurre a 550 nm. Estas celdas se usan normalmente a altos niveles de iluminación y en general no se amplifi

ca la salida de las celdas fotoeléctricas. Son muy estables, pero su respuesta a cambios de intensidad de la luz es lenta. Otro inconveniente de las celdas fotoeléctricas es que tienden a mostrar "fatiga". Esto sucede principalmente cuando en un nivel constante extremadamente alto de intensidad, la salida eléctrica de la celda disminuye con el tiempo. Por lo tanto, las celdas de capa de barrera no han de usarse con iluminación extremadamente alta.

Tubos fotomultiplicadores.

Un fotomultiplicador es un tubo electrónico capaz de amplificar de modo significativo la intensidad de una corriente. Se contruye usando como cátodo un metal sensible a la luz, capaz de absorberla y emitir electrones en proporción a la energía radiante que incide en la superficie del material sensible a la luz. Los electrones producidos en esta primera etapa pasan a otra secundaria (superficie), en donde cada electrón produce entre cuatro y seis electrones más. Cada uno de ellos, al pasar a la siguiente etapa, producirán de nuevo de cuatro a seis electrones cada uno. Cada electrón produce cascadas al pasar por las etapas del fotomultiplicador y así, la corriente producida por este tubo puede ser un millón de tantos de la corriente inicial. En los fotomultiplicadores comunes el número de etapas o dinodos puede llegar a ser de 10 a 15. Fig. 17.

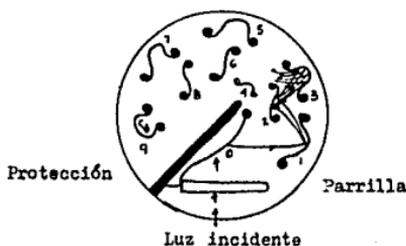


FIG. 17

Cuando funciona un tubo de esta clase, se aplica voltaje entre el fotocátodo y a cada una de las etapas sucesivas. En estos instrumentos el aumento de voltaje de cada etapa del fotomultiplicador es de 50 a 100 voltios — más que el de la etapa anterior. A un tubo fotomultiplicador se le aplica — aproximadamente un voltaje de 1500 voltios.

Estos tubos tienen tiempos de respuesta extremadamente rápidos, son muy sensibles y no muestran tanta fatiga como otros detectores, por lo que — han de protegerse cuidadosamente de toda luz dispersa y de la diurna.

A causa del tiempo rápido de su respuesta es aplicable a haces de — luz interrumpidos, y así tienen ventajas importantes cuando se usan como detectores, en espectrofotómetros de luz U.V. y visible. Asimismo, tienen sensibilidad suficiente por un intervalo de longitudes de onda más amplio, que — en el caso de detectores de celda fotoeléctrica.

Cuando se les aplica voltaje y se bloquea totalmente la luz que les — llega, suelen producir alguna corriente, llamada corriente oscura. Es deseable que esta corriente en los fotomultiplicadores sea del nivel más bajo posible, pues de lo contrario, ésta se amplificaría y aparecería como un ruido de fondo.

Celdas analíticas o cubetas.

Esta parte del sistema quizá es una de las más descuidadas. De aquí pueden originarse gran cantidad de problemas prácticos.

Las celdas pueden ser de vidrio blando, de borosilicato, de cuarzo o de plástico. Las de vidrio blando se usan para soluciones que son ácidas. — Las soluciones fuertemente alcalinas han de medirse en celdas de vidrio de borosilicato, que tienen más resistencia a los álcalis. Una vez terminadas las mediciones las celdas deben limpiarse.

Las celdas de vidrio son inadecuadas para mediciones en la región

ultravioleta, aunque algunas (Corex) pueden usarse para hacer mediciones a -- 340 nm. Sólo las de cuarzo o plástico, que no absorben radiación ultravioleta, pueden usarse para mediciones por debajo de 320 nm. Se puede pensar en -- la necesidad de usar cuarzo en la región ultravioleta, recordando que es imposible broncearse por la luz solar que ha atravesado una ventana de vidrio, ya que el bronceado se produce por la radiación ultravioleta del sol y es absorbida por el vidrio de ventana ordinario.

Recientemente se han desarrollado algunos materiales plásticos que -- no absorben energía radiante de 200 a 700 nm, y si lo hacen es muy poca. En general, las celdas de estos materiales son de bajo costo y desechables, y es seguro que se usarán en mayor cantidad en el futuro (como es el caso de auto--matización).

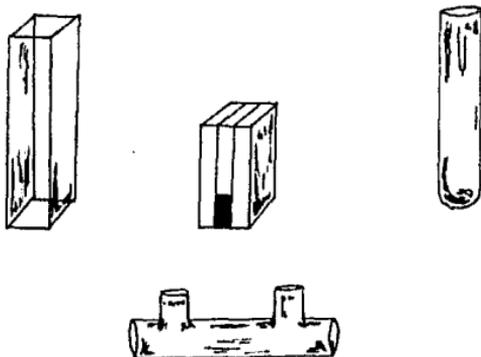
Cubeta Cuadrada.- Tienen caras ópticas de planos paralelos y una -- vía luminosa constante. Carecen generalmente de aberraciones ópticas, tales como el efecto del lente y los errores variables de refracción, lo que permite tener juegos de cubetas adecuados a circunstancias muy precisas. Este tipo de cubeta es caro, y se emplean principalmente en aparatos muy precisos.

Es importante mencionar que las caras ópticamente pulidas de una cubeta cuadrada pueden rayarse o grabarse y no deberán manejarse con rudeza. La limpieza se lleva a cabo con detergente suave y si fuera necesario, con una solución de HCl 3 N y etanol en proporción 1:1.

La aplicación suave con una torunda de algodón es frecuentemente -- útil. Se evitará el empleo de soluciones fuertes, como la mezcla crómica.

Cubeta Cilíndrica.- Este tipo de cubeta es la más empleada, de bajo costo y adecuada para la mayoría de los fines, si se usa con cuidado. Sin embargo, tiene algunos inconvenientes. Además de la reflexión, refracción y -- pérdida de absorción que se encuentran en las cubetas de la superficie de -- planos paralelos, pero que es uniforme, las cubetas cilíndricas tienen tendencia a errores variables de reflexión, como los efectos de una lente.

Los tubos de vidrio son irregulares por ser redondos y porque sus superficies no están pulidas. Estos factores se combinan para que la calibración y selección de cubetas en grupos apareados sea casi una necesidad. Este tipo de cubetas son también muy sensibles a la posición del rayo de luz e incluso, si están marcadas deben de orientarse en la misma dirección para reducir errores posibles.



Tipos de Celdas
FIG. 18

II.4 Mantenimiento de los Espectrofotómetros.

Desde que se desarrollaron los primeros espectrofotómetros, a fines de los 30's y comienzos de los 40's (39), fue necesario controlarlos. La comprobación o verificación de su funcionamiento dió principio cuando aumentó el número de técnicas que éstos empleaban.

Numerosas fuentes sobre colorimetría se aprovecharon, como en el caso de los libros de texto. Conforme nuevos instrumentos aparecían, las técnicas paulatinamente aumentaron requiriendo por lo consiguiente de nuevos y mejores métodos.

En 1963, un comité compuesto por miembros de la Sociedad Americana -

de Prueba de Materiales (ASTM-American Society of Testing Materials), representada por académicos y químicos industriales así como fabricantes de instrumentos, desarrollaron una serie de recomendaciones para la calibración de espectrofotómetros, las cuales fueron adoptadas y han resultado uno de los estándares más importantes en la industria (40, 41). Un segundo paso notable fue el que tomó la National Bureau of Standards (NBS), cuando introdujo los estándares de exactitud fotométrica, de acuerdo a las recomendaciones del comité ASTM.

En el caso de la Química Clínica, numerosos reportes se han publicado con respecto a las técnicas de comprobación del funcionamiento de los espectrofotómetros. Los reportes de Rand (1), Mernke (42) y Beeler (43) han sido de inmenso valor. "Practical spectrophotometry standards" escrito por el Dr. Rand, sin duda alguna es uno de los artículos más completos pues contiene las técnicas para mantener en buen funcionamiento los espectrofotómetros.

Definición de los parámetros más importantes y su significado

Es muy importante antes de ajustar un instrumento el conocer las condiciones en que se desenvuelve el espectrofotómetro. De esta manera estaremos más familiarizados con el aparato que trabajamos rutinariamente.

Límites de longitud de onda

Este término describe la "habilidad" de un espectrofotómetro de producir longitudes de onda en términos de un límite superior y un inferior. Todas las longitudes de onda dentro del rango establecido, deben ofrecer suficiente energía para el propio funcionamiento del aparato.

Por ejemplo, un espectrofotómetro o fotómetro podría especificar de 400 a 700 nm, mientras un espectrofotómetro UV/Visible podría especificar de 190 a 900 nm. Los límites están en función de la fuente de poder empleado, de las características ópticas, de la rejilla y de la respuesta del detector.

Por lo tanto, los instrumentos únicamente deben usarse dentro de los límites especificados. Consecuentemente, un instrumento con un rango de longitud de onda de 400 a 700 nm no puede emplearse para medir a una longitud de onda de 340 nm.

Exactitud de la longitud de onda

Este parámetro nos indica qué tanto se desvía el promedio de lecturas que se hacen a una longitud de onda de la banda de máxima absorción o línea de emisión de un estándar conocido.

Por lo tanto, si la calibración de la longitud de onda se especifica como ± 1.0 nm a 435.8 nm, la exactitud de la longitud de onda no es tan buena como un instrumento que especifica ± 0.5 nm. Si un espectrofotómetro indica una exactitud de ± 1.0 nm, la transmisión máxima podría encontrarse entre — 434.8 y 436.8 nm. La exactitud de la longitud de onda no sería crítica para espectrofotómetros que operan en la región de 400 a 800 nm, donde los cromógenos tienen la peculiaridad de poseer bandas anchas. En cambio, si se trabaja en la región UV donde las bandas de absorción son muy estrechas, la exactitud de la longitud de onda sería crítica.

Precisión de la longitud de onda

Es la habilidad del espectrofotómetro de reproducir la lectura a una banda de absorción o línea de emisión de una longitud de onda conocida. La precisión de la longitud de onda de un espectrofotómetro podría variar de — ± 0.05 a 1.0 nm.

La importancia de este parámetro radica en que no sólo la indicación de la longitud de onda debe ser exacta, sino que también debe repetirse. Cuando el usuario desea adoptar un método a una longitud de onda dada, es muy importante que cada vez que la prueba se corra, el instrumento siempre reproducirá la misma longitud de onda (\pm una tolerancia). Una falla puede disminuir

la sensibilidad del método y producir un error, causando un resultado falseado.

Ancho de banda espectral

Se considera como un medio del poder radiante que emerge del monocromador entre la base lineal cero y el pico de emisión o la banda de máxima absorción. En la Fig. 19, el ancho de banda espectral se identifica como $\lambda_2 - \lambda_1$. En la Fig. 20, se ilustra el ancho de banda espectral empleando la línea de emisión de Mercurio a 546.07 nm.

El ancho de banda o paso de banda nos indica la anchura del espectro que pasa a través de la muestra. Consecuentemente, un instrumento con un paso de banda de 2 nm detecta la energía en una porción mucho más estrecha del espectro que un instrumento que tiene un paso de banda de 20 nm. Mientras — que un paso de banda de 20 nm se usa en la región visible, donde los cromógenos exhiben bandas de absorción tan amplias como 100 nm o más, lo cual no se acepta en la región UV, donde las bandas de absorción son de estructura fina de una amplitud de 1 nm.

Además, se sabe que para producir valores de absorción de un cromógeno dentro de una exactitud deseada, el ancho de banda espectral de un espectrofotómetro debe ser de un décimo o menos de la mitad de la altura del pico de máxima absorción. Esto significa que para medir la absorción teórica de la coenzima nicotinamida-adenina dinucleótido (NADH) a 340 nm, con 60 nm de la mitad de la altura del pico máximo de absorción, un espectrofotómetro debe tener un paso de banda de 6 nm o menor. En la Fig. 21, se representa el efecto de la "amplitud de la banda" en un instrumento con un paso de banda ancho, así como pérdida de absorción en el pico de 340 nm.

Para mayor ilustración del paso de banda vamos a suponer que un instrumento tuviera un ancho de banda espectral de 2 nm, la línea de emisión de Mercurio a 435.8 nm exhibiría una anchura a la mitad de la altura del pico — ($\lambda_2 - \lambda_1$) de 2.0 nm, en un lado con 436.8 nm y del otro con 434.8 nm. (Ver — Fig. 19).

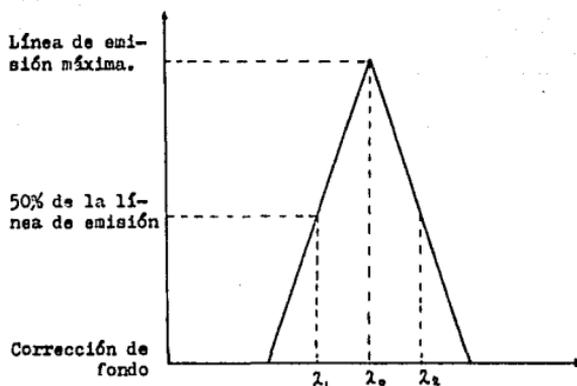


FIG. 19 Medición del ancho de banda espectral ($\lambda_2 - \lambda_1$)

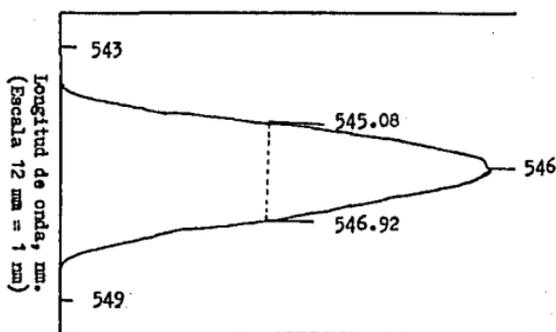


FIG. 20 Medida del ancho de banda espectral de un espectrofotómetro de paso de banda estrecho. Condiciones: porcentaje de transmisión, línea de emisión de mercurio, a 546.07 nm; respuesta rápida (0.25 seg), velocidad de barrido 20 nm/min; velocidad de carta 240 nm/min. Ancho de banda espectral ($\lambda_2 - \lambda_1$) = 1.84 nm a 545 nm.

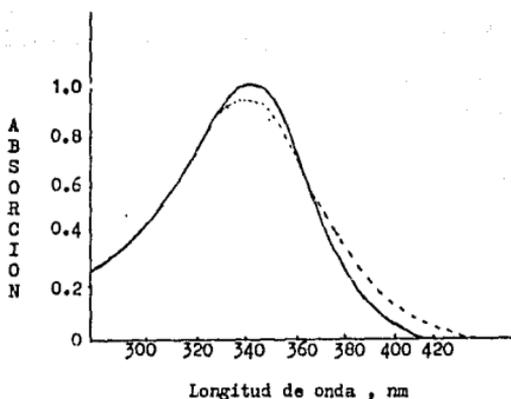


FIG. 21 Efecto relativo del paso de banda sobre el espectro de absorción de NADH (Línea sólida) empleando un espectrofotómetro con un paso de banda de 2 nm. La línea punteada se obtuvo a partir de un espectrofotómetro de paso de banda de 20 nm.

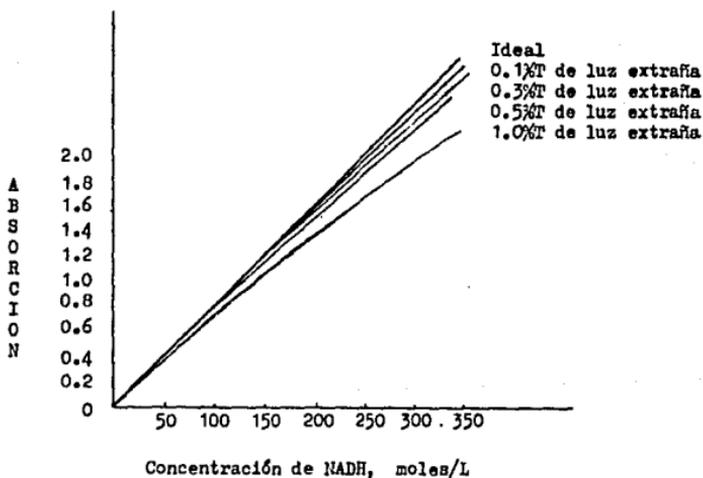


FIG. 22 Efecto relativo de la luz extraña en una muestra con alta absorción.

Luz extraña o energía radiante

Se puede definir como la energía radiante no deseada, medida por el detector, que esta fuera de la región espectral aislada por el paso de banda del instrumento. Esta energía puede ser causada por la fluorescencia misma de la muestra, así como por factores complejos asociados en el diseño del aparato.

El efecto más significativo de luz extraña es la cantidad de luz transmitida por la muestra, dando la impresión de una menor cantidad de luz que absorberá material (cromóforo).

La luz extraña es dependiente de la concentración de la muestra, su efecto relativo es generalmente superior a valores de transmisión baja (T) (absorción alta y concentración alta), como se muestra en la Fig. 22. En valores de absorción de 1A o menores, los niveles de luz extraña son de $0.5\%T$, observándose un ligero efecto. En valores de absorción alta se observa una no linealidad fotométrica debido a la magnitud de la luz extraña (Fig. 22).

Gráficamente los efectos del paso de banda y luz extraña, se podrían observar como los de la Fig. 23. Por lo tanto, el resultado de esta combinación es muy importante y el usuario debe conocer como medirlos.

Un punto final que debe mencionarse acerca de la luz extraña, es el que se podría observar como resultado de un incorrecto ajuste de la escala ($0\%T/100\%T$). El ajuste incorrecto dará el efecto de una energía radiante extraña alta en concentraciones altas. (energía baja). El error causado por el ajuste incorrecto es un fenómeno aditivo y puede originar un error positivo o negativo, como se ilustra en la Fig. 24.

Exactitud fotométrica

Se entiende como exactitud fotométrica a la habilidad de un espectrofotómetro para indicar correctamente el nivel de energía presentado por el de

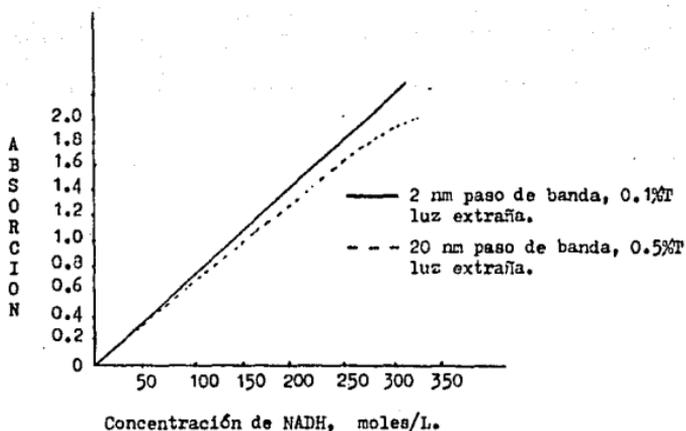


FIG. 23 Efecto relativo del paso de banda y luz extraña del NADH a 340 nm.

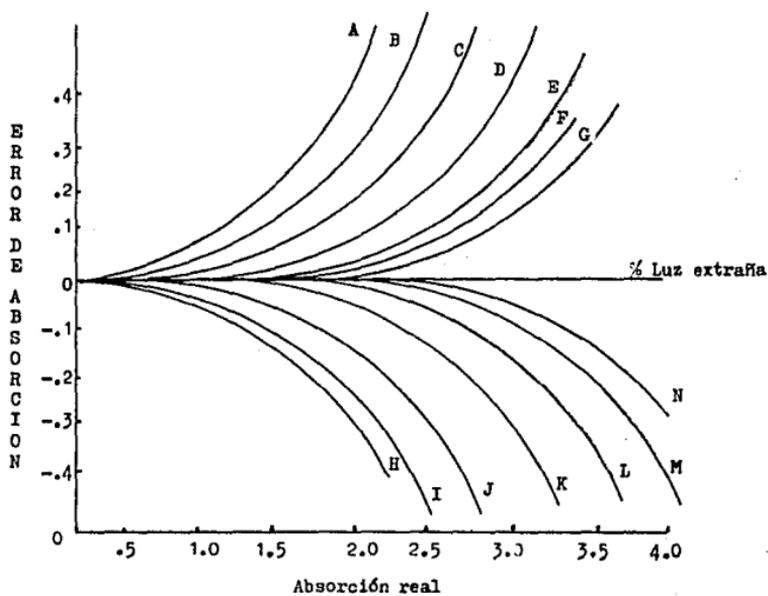


FIG. 24 Efecto de un ajuste incorrecto (0%T)

lector. Más simple, se establece como el error absoluto en la medida de la absorción o %T de un estándar de valor conocido. Muchas compañías de instrumentos emplean como referencia los estándares de la NBS (SRM-9306) para calibrar sus espectrofotómetros.

La medida de la exactitud fotométrica nos da información de qué tan bien un instrumento puede medir exactamente un estándar o estándares.

Linearidad fotométrica

Este parámetro nos permite comprobar el funcionamiento del instrumento por medio de una solución conocida que conforme a la ley de Beer dará una línea recta que parte del origen al graficar absorción contra concentración (A vs C). Los errores que pueden ocasionar una respuesta no lineal, es el mal ajuste de la escala ($0\%T/100\%T$) y presencia de luz extraña.

La técnica más común para la comprobación de la linealidad fotométrica es a base de diluciones a partir de una concentración de 0.2 g/L de $K_2Cr_2O_7$ diluidos en 0.01N de H_2SO_4 medido a 257 nm a 3.0 de absorción (3.0A). El dicromato de potasio medido a 350 nm en una absorción del 1.0A, requiere de una concentración de 0.1 g/L. El resultado de la gráfica A contra C debe ser similar a la de la Fig. 25.

Precisión fotométrica

Este parámetro representa la capacidad del sistema fotométrico para reproducir el mismo valor en determinaciones sucesivas. Todas las mediciones deben de hacerse continuamente con el mismo instrumento y el mismo material.

Sin una precisión fotométrica, un espectrofotómetro no puede tener una exactitud fotométrica. Si el instrumento reproduce los datos, entonces, una muestra debe de leer el mismo valor repetidas veces (\pm una tolerancia). La precisión fotométrica se especifica en absorción o %T con una tolerancia -

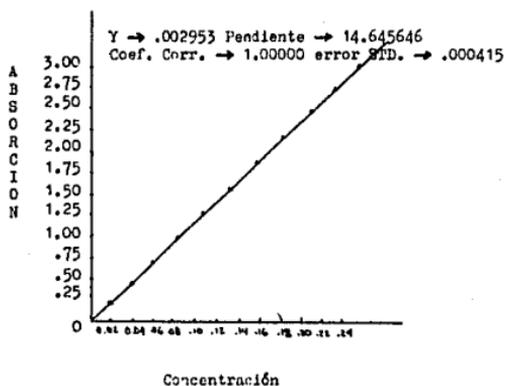


FIG. 25 Linealidad fotométrica empleando $K_2Cr_2O_7$



FIG. 26 Estabilidad de la base lineal a cero de absorción. Condiciones: 347 nm, 2 nm de paso de banda, tiempo de respuesta 1 seg., 10 cm/hr a 15 hrs., escala completa 0.02A.

(ej. $\pm 0.001A$ a $0-0.5A$).

A medida que se incrementa la absorción, la precisión fotométrica podría deteriorarse por causas de aumento del nivel de ruidos presentes en el instrumento.

Nivel de ruido

Se conoce como la variación que sufren las lecturas fotométricas por causa de interferencia por ruido. La magnitud del ruido puede variar al cruzar el espectro y se detecta a niveles bajos de energía.

Estabilidad de la base lineal

Se entiende como la desviación que sufre la lectura después de ser reajustada en el espectrofotómetro, dentro de un período de tiempo especificado.

La estabilidad de la base lineal afecta al usuario cuando el 100%T o el cero de absorción continúa desviándose durante una serie de lecturas, afectando por lo tanto el valor de la lectura de cada muestra o causando inconveniencias por tener que reajustar constantemente el 100%T/cero de absorción. El ajuste típico para el control de la estabilidad se muestra en la Fig. 26.

Energía aprovechable

Es la cantidad de luz monocromática alcanzada por el detector a través de una muestra de referencia a una longitud de onda específica. La cantidad de energía dependerá del cambio de longitud de onda, de las restricciones que sufre el haz de luz a causa del tamaño de la cubeta y por la absorción de la muestra de referencia. Así también, la energía aprovechable se verá reducida por incrementos de luz extraña y ruido. Por lo tanto; cuando el instrumento es operado con microceldas o celdas de flujo, es necesario comprobar

calibrar la cantidad de energía que sale del monocromador.

Tiempo de respuesta

El tiempo de respuesta de un espectrofotómetro es el tiempo necesario para que llegue la información al fotodetector y éste pueda responder, mínimo del 98% del valor real.

Por tal motivo, se necesita que constantemente se verifiquen o calibren los espectrofotómetros. Este mantenimiento debe de incluir básicamente:

- a) La calibración de la longitud de onda (Exactitud de la longitud de onda).
- b) Linearidad de respuesta del detector (Precisión fotométrica).
- c) Luz extraña o espúria o energía radiante extraña (35).

II.4.1 Calibración de la longitud de onda.

El control periódico es necesario para asegurar que la longitud de onda del instrumento exactamente refleje la energía que pasa a través de la abertura de salida del monocromador.

Para la calibración de la longitud de onda, se utilizan varios métodos. El más exacto es reemplazar la lámpara por una fuente de energía radiante que tenga una línea de emisión fuerte a longitudes de onda definidas. Las fuentes de energía más útiles son las lámparas de vapor de mercurio y deuterio o hidrógeno. (55)

En el caso de las lámparas de hidrógeno, presentan 3 líneas definidas a 380 y 486 nm, que son fácilmente detectables (3). Una lámpara de deuterio emite las mismas líneas a longitudes de onda ligeramente más largas (aproximadamente una parte en 2000) (3). (56)

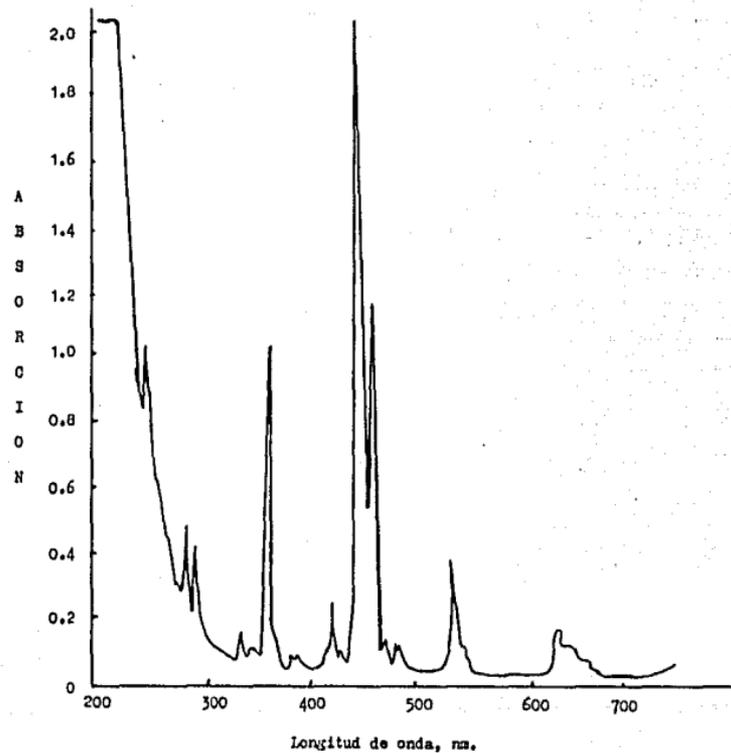


FIG. 27 Espectro del Oxido de Holmio.

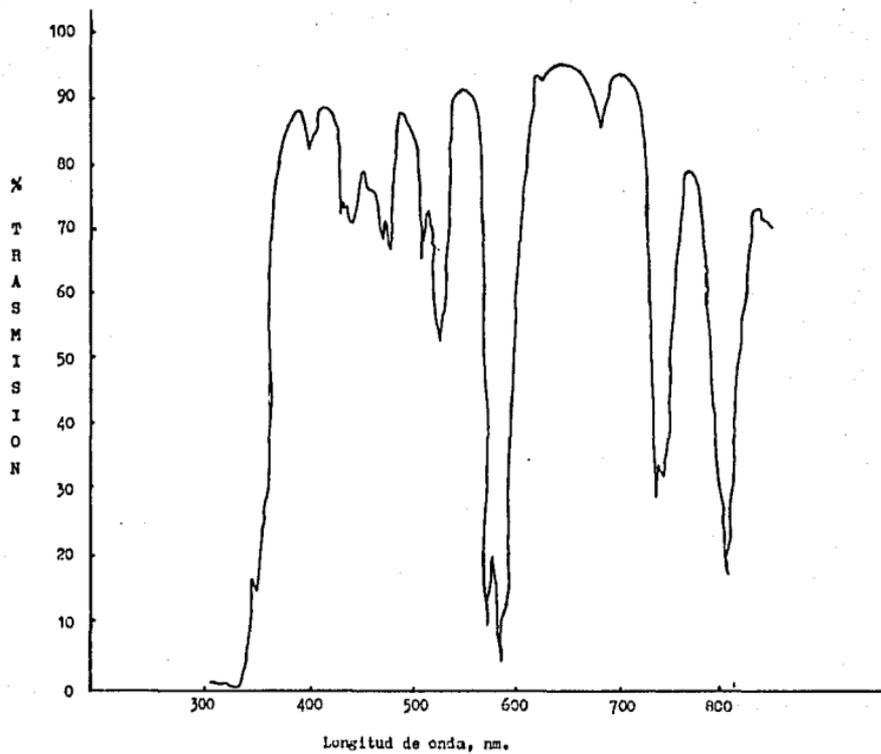


FIG. 23 Espectro del filtro de Didimio.

El segundo método es a base de filtros de tierras raras, tales como el óxido de Holmio y Didimio Fig. 27 y 28. El óxido de Holmio presenta bandas de absorción definidas aproximadamente a 241, 279, 287, 333, 361, 418, — 453, 536 y 656 nm (7). En el caso del Didimio que se utiliza comúnmente en los Coleman, el cual debe sus propiedades ópticas peculiares al hecho de que contiene pequeñas cantidades de Neodimio y Praseodimio, dos tierras raras — (usualmente contiene trazas de Samario) y cuya combinación se reconoce como Didimio (12). Tiene amplias bandas de absorción a 573, 586, 685, 741 y 804 — nm (7).

Estos filtros los producen las casas comerciales especializadas en aparatos, de tal forma que se inserta directamente en el compartimiento de la muestra. La desventaja de estos filtros es localizar longitudes de onda de transmisión mínima, siendo más difícil que localizar longitudes de onda de — transmisión máxima, además de sólo calibrar a una sola longitud de onda. (60)

Debido a la posibilidad de deterioro de los filtros, la exactitud de la longitud de onda se debe controlar periódicamente (cada semana).

El tercer método es a base de soluciones. Por ejemplo bajo condiciones bien definidas, una solución de óxido de samario presenta un espectro característico con 13 bandas de absorción (7). También se han empleado soluciones de sulfato de cobre, sulfato de amonio, cobalto y perclorato crómico, tratando de cubrir parte de la región visible. Estas soluciones no han sido del todo satisfactorias y otros estándares líquidos están bajo desarrollo y evaluación (10). (57 y 59)

La desventaja de las soluciones químicas son los picos de absorción que generalmente son amplios y la desviación espectral podría resultar por — contaminación o por errores en la preparación.

Después de haber calibrado a base de los métodos anteriores, como un estándar secundario, se puede emplear una solución estable cromogénica.

Uno de los métodos podría ser a base del uso de los puntos isobésti

cos (5), que se define como la longitud de onda a la cual la absorptividad de una sustancia a pH's diferentes es la misma (13). Estos puntos tienen la ventaja de abarcar tanto la región visible como la ultravioleta, se preparan a base de soluciones indicadoras a diferentes pH's y son estables y baratas.

Sin tomar en cuenta el método empleado para la calibración de la exactitud de la longitud de onda, es necesario calibrar más de una. En el caso de instrumentos que contienen prismas, sus separaciones de las longitudes de onda no son lineales, lo cual es necesario calibrar por lo menos a tres. La calibración a dos, es suficiente para el caso de aparatos a base de rejillas, ya que dan una separación lineal que abarcan la región ultravioleta y visible.

II.4.2. Linearidad de la respuesta del detector.

Una función propia de un espectrofotómetro o fotómetro es que debe proporcionar una relación lineal entre la energía radiante absorbida y la lectura del instrumento. La linealidad instrumental es un prerrequisito indispensable, tanto para la exactitud espectrofotométrica como analítica.

Se han propuesto varios métodos para comprobar que la respuesta del detector del aparato es lineal en el rango de longitudes de onda empleadas.

Uno de estos métodos que se usan para comprobar dicha linealidad, es por medio de soluciones de concentración conocida que cumplan con la ley de Beer. (Seco. II.2).

La linealidad fotométrica se comprueba también por medio de métodos laboriosos y tediosos que creó la necesidad de recurrir a otro tipo de métodos que fueran prácticos, accesibles y aprovechables en el laboratorio clínico.

En 1969, el Subcomité de Espectrofotometría del Comité de Estándares de la Asociación Americana de Química Clínica, sugirió que la linealidad foto

métrica se puede comprobar a base de soluciones indicadoras de compuestos - - apropiados (7, 12).

Los compuestos sugeridos para este propósito incluyen (12, 13):

	Log. de onda (nm)
Oxihemoglobina	415
p-nitrofenol	405
sulfato de amonio cobalto	512
sulfato de cobre	650
cianometá hemoglobina	540

Por otra parte Frings (13), sugirió el empleo del colorante verde de alimentos para comprobar la linealidad fotométrica, encontrando máximos de extinción a 257, 410 y 630 nm. Con el uso de esta solución se tiene la ventaja de calibrar tanto la región U.V. como la visible. Además de ser económicas, prácticas y seguras, su absorción no depende el pH ni de la temperatura (13).

II.4.3 Radiación espúria o extraña

La radiación extraña (llamada también luz espúria o parásita), se ha intentado definir de varias maneras. Podría ser como la radiación no deseada esto es, otra luz que no es requerida para el análisis detectando longitudes de onda que no interesan (15, 16), también se definiría como toda la energía radiante que llega al detector sin pasar a través de la muestra (7).

En el último reporte de la Federación Internacional de Química Clínica (1797) denominan a la luz espúria como energía radiante falsa y la determinan como: la energía radiante que proviene de la fuente luminosa y llega al detector con longitudes de onda que no corresponden a las seleccionadas para propósitos de medición (35).

Creemos que será necesario revisar y analizar dicho término, ya que

no es aplicable a espectrómetros que usan filtros para la selección espectral en los que la luz falsa o extraña es causada por transmisión del medio que lo rodea. Además la energía radiante externa está excluida de esta definición.

Para propósitos prácticos y de unificación de nomenclatura emplearemos en este trabajo el término de luz o energía extraña.

La cantidad de luz extraña presente a longitudes de onda específicas se expresa en porcentaje de la radiación total detectada (16). Por lo tanto, a mayor luz extraña menor será la luz incidente. Así tenemos que: 1% de la luz extraña indica la cantidad (0.01) de luz incidente no absorbida, es decir:

$$I_s = 0.01 I^o$$

donde: I_s es la intensidad de luz extraña.

I^o es la luz incidente.

La luz extraña que exceda de 1% no es aceptable y se debe ajustar inmediatamente. Existen muchas otras fuentes de radiación extraña que disminuyen la intensidad de la fuente de energía y la respuesta del detector.

La fuente principal que origina luz extraña es la que llega del exterior, cuando el instrumento se emplea a longitudes de onda en el rango visible y que el detector la absorba para después ser medida. Ej. Algunos aparatos requieren de una tapadera negra para que al momento de medir cubra la celula y evitar la luz exterior, como Coleman y Leitz.

Otro tipo de fuente que podría originar luz extraña es una lámpara - impropia, esto contribuye al incremento de la luz espúria de acuerdo a la - - - edad de la lámpara. El efecto de una lámpara de bajo poder se detecta por - una respuesta no lineal al controlar la respuesta del detector (Secc. II.4.2).

La luz extraña también se origina del monocromador por dispersión de la luz debido a una superficie óptica sucia o imperfecta o por reflexión de -

las aberturas, del colimador o cualquier otro componente.

El efecto de la luz extraña sobre valores de absorción (A), se puede apreciar en la Fig. 22, en donde se relaciona la absorción aparente con la real para 0, 1 y 5% de energía incidente no absorbida. A medida que la luz extraña aumenta, la desviación de la ley de Beer también aumenta. Como la absorción real es infinita (por lo tanto la concentración será infinita) la absorción aparente tendrá límites. En el caso de la luz extraña de 1 y 5 tendrán absorciones aparentes de 2 y 1.3 aproximadamente. En esta misma figura, se puede observar las serias consecuencias que ocasiona la presencia de luz extraña, la cual disminuye la exactitud a concentraciones altas. Debido a esto último, la respuesta del detector es no lineal.

Los métodos para detectar la luz espúria se hacen a base de sustancias o filtros. El método más práctico es a base de soluciones estándares.

Con el empleo del estandar de níquel (sulfato de níquel) de concentración relativa de 1 a 400 nm debe absorber casi todo y la lectura será menos del 10%. Repitiendo esta lectura cada semana, una tendencia a subir indicará la aparición de luz espúria.

Igualmente con el mismo estandar, calibraremos a 700 nm y también debe de dar una absorción muy alta, la comprobación real, se ve al quitar el filtro cercano al I.R. (NIR), que debe estar puesto encima de los 650 nm, entonces no se elimina el espectro de 2^o orden, y aumenta la transmisión, pues hay varias longitudes de onda del espectro que llegan a la muestra.

De acuerdo al objetivo enunciado al inicio de esta tesis, de enfocar la calibración de los espectrofotómetros en base a dos parámetros importantes, claves para el buen funcionamiento de los instrumentos como son: a) exactitud de la longitud de onda y b) linealidad fotométrica por medio de soluciones coloridas o indicadoras. Por lo que se subdividirá el capítulo para una mejor descripción y comprensión del mismo.

III.1 Exactitud de la longitud de onda.

Inicialmente se utilizaron los métodos que recomiendan las compañías de instrumentos para comprobar el buen funcionamiento de su espectrofotómetro.

Se trabajó con el filtro de Didimio que sugiere la Coleman Instruments Division Perkin Elmer (No. 6-400) que sirve para calibrar exclusivamente sus instrumentos Coleman Jr a una longitud de onda específica.

La calibración se realizó de la siguiente forma:

1. Encender para precalentar (10 a 15 min.)
2. Seleccionar con el monocromador la longitud de onda a 585 nm.
3. Seleccionar el filtro (VIS)
4. Controlar los botones de ajuste grueso (coarse) que se encuentra en el extremo inferior y fino (fine) en la parte media.
5. Ajuste a 585 nm con el filtro de Didimio.
 - a) Taponando obstruido el paso de luz, ajustar a 0%. Puede hacerse con la rejilla de la escala, si no es muy grande el de ajuste; o con el cero mecánico.
 - b) Sacar el filtro y poner la cubierta para celdas (negra), para ajustar a 100%T con los botones grueso y fino.
 - c) Repetir los pasos a y b, para controlar los ajustes a 0 y — 100%T.

- d) Colocar el filtro de Didimio y anotar el valor de $\%T$ mínimo. Cuando el aparato es nuevo este valor corresponde a $4\%T$. En caso de no obtenerlo, debe pensarse en cambiar la lámpara y continuar con el paso 6.
6. Manteniendo el filtro de Didimio en el aparato y la longitud de onda a 585 nm, llevar con el botón de ajuste grueso y con el fino a $50\%T$.
 7. Girar despacio el monocromador hasta fijar entre 580 y 590 nm. Observar a que longitud de onda corresponde el valor mínimo.
 8. Si el mínimo no fuera a 585 nm, es necesario compensar la desviación, regresando a $50\%T$ con los botones de ajuste grueso y fino y sin mover el monocromador, que indica el mínimo de la longitud de onda encontrado.
 9. Llevar el monocromador a 585 nm. Se observará un desplazamiento en la escala de $\%T$, que es necesario corregir.
 10. Quitar la tapa trasera del espectrofotómetro habiéndose despojado de anillo, reloj o cualquier objeto metálico.
 11. Sin mover ningún botón del tablero, ajustar el $50\%T$ con el tornillo grande amarillo (cremallera situada en la parte de atrás). - Se requiere girar de 6-8 toques/nm, que se perciben al tacto.
 - a) Hacia la derecha, si el mínimo está desplazado hacia la izquierda.
 - b) Hacia la izquierda, si el mínimo está desplazado hacia la derecha.
 12. Si el mínimo corresponde a 585 nm, se coloca la tapa posterior y se cierra.

Para confirmar el ajuste, se observa que el $\%T$ corresponda a $\leq 4\%T$, o se pueden hacer lecturas en las diferentes longitudes de onda del espectro de Didimio. Fig. 28.

Posteriormente se trabajó con soluciones estandares que vienen selladas y calibradas a una concentración y se miden a una longitud de onda especí

fica. Este juego de estandares proviene de Harleco, Gibbstown, N.Y. U.S.A. (No. 64666) y calibran tanto la exactitud de la longitud de onda como la fotométrica.

Contiene tres estandares a diferentes concentraciones:

Solución	Color	Long. de onda (nm)
Sulfato de níquel	verde	670
Sulfato de amonio cobalto	rojo	520
Perclorato crómico	azul	420

Con el empleo del juego de estandares espectrofotométricos, se calibraron los aparatos de acuerdo al método que indica el equipo.

1. Leer todas las soluciones a la longitud de onda indicada, empleando el blanco de agua que se incluye en el equipo para ajustar a cero de absorción o transmisión.
2. Graficar las absorciones obtenidas contra la concentración relativa (1.00, 0.75, 0.50 y 0.25), para cada una de las tres diferentes longitudes de onda.

Las absorciones obtenidas, pueden ser comparadas con las teóricas, - que se incluyen en la siguiente tabla:

Concentración Relativa ()	Absorción o Extinción	% T
1.00	0.824 - 0.602	15.0 - 25.0
0.75	0.602 - 0.456	25.0 - 35.0
0.50	0.409 - 0.10	39.0 - 49.0
0.25	0.215 - 0.149	61.0 - 71.0

Valores obtenidos en Bausch & Lomb, Spectronic 20, 70 y 100 y para - Espectrofotómetros Coleman Jr II.

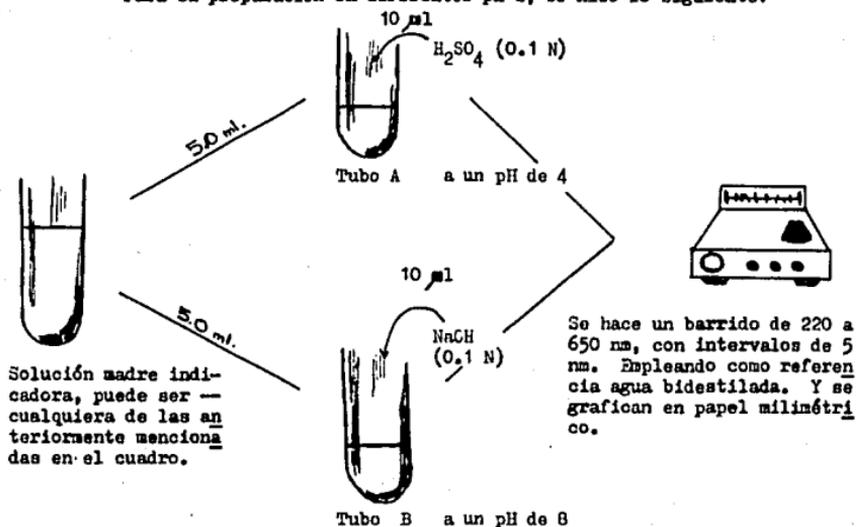
A continuación se describe un método para la obtención de los puntos isosbásticos a base de soluciones indicadoras, donde el material de vidrio — que se utiliza es mínimo y su realización es sencilla.

Las soluciones indicadoras utilizadas son:

Solución	No. Artículo	Concentración	
		umol/l	mg/l
$K_2Cr_2O_7$	204864	101.6	30
Naranja de metilo (N.M.)	1322	20.6	6.7
Rojo congo (R.C.)	1342	20	14
Azul de bromotimol (ABT)	3026	40	25

Proceden de Merck México.

Para su preparación en diferentes pH's, se hizo lo siguiente:

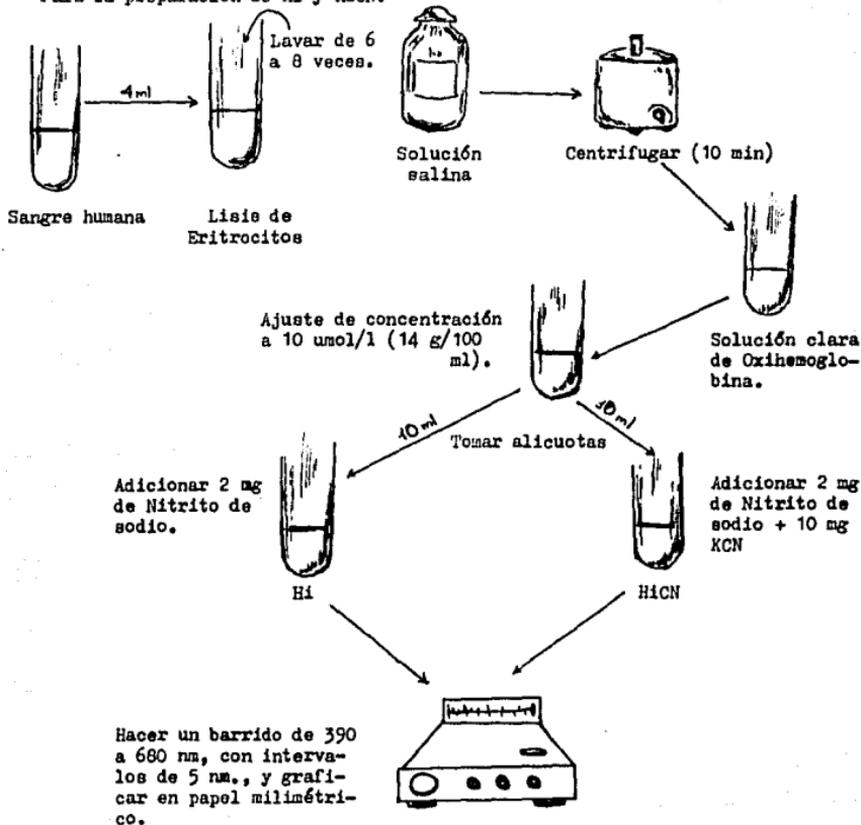


Conservación

Preparar 25 ml y guardarlos en un frasco ambar.



Para la preparación de Hi y HiCN.



Sobre el papel milimétrico se grafica en la abscisa la longitud de onda y en la ordenada la absorción.

III.2 Linearidad Fotométrica

Para la comprobación de la linealidad fotométrica se utilizaron diferentes compuestos, incluso las soluciones indicadoras medidas en el punto - isobéptico donde no hay interferencia y puede cumplirse con la ley de Lambert y Beer.

Las sustancias empleadas fueron:

	No. Artículo
$K_2Cr_2O_7$	204864
Naranja de metilo	1322
Rojo congo	1342
Glucosa	3393
Creatinina	3385
p-Nitrofenilfosfato	3304

Preparación de las soluciones.

$K_2Cr_2O_7$, pesar 20 mg en un litro de H_2SO_4 0.01N y se hacen las siguientes diluciones:

Tubo	Solución (ml)	H_2SO_4 0.01N (ml)	Concentración	
			umol/l	mg/l
1	0.5	9.5	3.4	1.0
2	1.0	9.0	6.8	2.0
3	1.5	8.5	10.2	3.0
4	2.0	8.0	13.6	4.0
5	2.5	7.5	17.0	5.0
6	3.0	7.0	22.4	6.0

Blanco de H_2SO_4 0.01N

Longitud de onda - 350 nm

Paso de luz - 1 cm (de vidrio)

Naranja de metilo, pesar 6.7 mg en un litro de agua destilada y se hacen las siguientes diluciones:

Tubo	Solución (ml)	Agua destilada (ml)	Concentración	
			umol/l	mg/l
1	1.0	4.0	0.061	20
2	2.0	3.0	0.122	40
3	3.0	2.0	0.183	60
4	4.0	1.0	0.244	80
5	5.0	-	0.305	100

Blanco - Agua destilada

Longitud de onda - 465 nm

Paso de luz - 1 cm (vidrio)

Rojo congo, pesar 14 µg en un litro de agua destilada y se hacen las siguientes diluciones:

Tubo	Solución (ml)	Agua destilada (ml)	Concentración	
			umol/l	mg/l
1	1.0	4.0	0.029	20
2	2.0	3.0	0.057	40
3	3.0	2.0	0.086	60
4	4.0	1.0	0.114	80
5	5.0	-	0.143	100

Blanco - Agua destilada

Longitud de onda - 540 nm

Paso de luz - 1 cm (vidrio)

Glucosa, se valoró con el método de GOD-PAP de Merck.

Patrón mg/100ml	Solución patrón ml	Reactivo de color ml	I n c u b a c i ó n
200	0.01	2.0	20 min. a temperatura ambiente.
100	0.01	2.0	
50	0.01	2.0	
27.27	0.01	2.0	

Blanco - Reactivo de color

Longitud de onda - 510 nm

Paso de luz - 1 cm (vidrio)

Creatinina, se valoró con el método cinético de Merck a partir de un patrón de creatinina de 1.0 mg/100ml se hicieron las siguientes diluciones:

Tubo	Patrón (ml)	Agua destilada (ml)	Concentración	
			umol/l	mg/100ml
1	0.10	0.90	8.84	0.10
2	0.25	0.75	22.1	0.25
3	0.50	0.50	44.2	0.50
4	0.75	0.25	66.3	0.75
5	1.00	—	88.4	1.00

De estas diluciones se determinó la cantidad de creatinina.

Tubo	Patrón diluido (ml)	Ac. Píricico (ml)	Amortiguador (ml)	
1	0.5	1.0	1.0	Esperar y a los 5 min. medir.
2	0.5	1.0	1.0	
3	0.5	1.0	1.0	
4	0.5	1.0	1.0	
5	0.5	1.0	1.0	

Tubo	Patrón diluido (ml)	Ac. Píerico (ml)	Amortiguador (ml)
Blanco	0.5 (agua destilada)	1.0	1.0

Longitud de onda - 492 nm

Paso de luz - 1 cm (vidrio)

p-Nitrofenilfosfato, 5.0 ml del patrón se aforan con 200 ml de NaOH 0.02N, para hacer las siguientes diluciones:

Tubo	Patrón (ml)	NaOH 0.02N (ml)	Actividad por volumen U/L	ukat/1
1	1.0	9.0	10	166.7
2	2.0	8.0	20	333.4
3	3.0	7.0	30	500.1
4	6.0	4.0	60	1000.2
5	10.0	-	100	1666.7

Blanco - NaOH 0.02N

Longitud de onda - 405 nm

Paso de luz - 1 cm (vidrio)

Aparatos Empleados

Para la comprobación y control de fotómetros y espectrofotómetros, - se utilizaron diferentes aparatos (analógicos y digitales) en cuenta a resolución (paso de banda) y sistema óptico.

Aparato	Paso de banda	Tipo de cubeta
Beckman 26	0.2 nm	Quarzo cuadrada (1 cm)
Coleman 55	2.0 nm	Sílica cuadrada (1 cm)
Perkin Elmer 35	8.0 nm	Vidrio redonda (1 cm)
Zeiss PM2DL	10.0 nm	Vidrio cuadrada (1 cm)
Coleman Jr II 6/20	20.0 nm	Vidrio redonda (1 cm)
Leitz	50.0 nm	Vidrio cuadrada (1 cm)

Métodos empleados para la comprobación de la calibración de los aparatos.

Para comprobar que el método de los puntos isosbéticos es satisfactorio, se trabajó con algunas determinaciones enzimáticas cinéticas y colorimétricas para valorar tanto enzimas como analitos, escogiéndose aleatoriamente.

Métodos Cinéticos (U.V)

- GOT (Transaminasa glutámica oxalacética)
- LDH (Lactato deshidrogenasa)
- GPT (Transaminasa glutámica pirúvica)

Métodos Cinéticos (Visible)

- GT (gamma glutamil transpeptidasa)
- P.alc. (Fosfatasa alcalina)

Métodos colorimétricos

- Glucosa (GOD-PAP)

Glucosa (Gluc-DH)
Colesterol Enzimático
Urea.

Estos métodos son de Merck México, S. A.

Material de control.

Se utilizaron sueros control comerciales con el fin de verificar que los valores encontrados se correlacionen con los valores reportados en la carta del suero control y de esta forma asegurar que las condiciones de trabajo se han controlado y así obtener óptimos resultados.

Sueros control	No. Artículo
Seronorm Routine	16148
Pathonorm H	15056
Seronorm Lipid	15019

De la firma Nyegaard & Co. A/S, Oslo, Noruega.

De acuerdo al orden establecido anteriormente, se obtuvieron resultados de los parámetros siguientes:

IV.1 Exactitud de la longitud de onda

- A) Filtros
- B) Estándares de concentración conocida
- C) Puntos isobásticos

Los resultados obtenidos de los puntos (A) y (B), vienen resumidos en el cuadro 1 y 2, con sus respectivas figuras, para el Coleman Jr II 6/20 y Perkin Elmer 35, donde las ampollitas y el filtro se adaptan perfectamente en el portacubetas de dichos aparatos.

Además se trabajó con un aparato desajustado (Fig. 30, Coleman Jr II 6/20). Se revisaron dichos aparatos cada mes, obteniendo variaciones mínimas (de 0.005 - 0.1).

En el caso del aparato desajustado se observa que las curvas no pasan por el origen, indicando una desviación de la longitud de onda. El mínimo de transmisión encontrado a 585 nm, es de 7% con una desviación de ± 2.5 nm, lo cual nos indica que un mínimo de desviación se puede detectar fácilmente.

Por otro lado, comprobamos la presencia de luz espúria o extraña por medio de la solución de sulfato de Niquel de mayor concentración 1.00, midiendo a 400 nm, donde debe de absorber casi todo y su lectura debe ser menor del 4%, lo mismo sucederá a 700 nm, donde absorberá el mínimo de 2% y a 510 nm, mayor del 90% (absorbe mayor luz).

De acuerdo a los resultados encontrados en un aparato desajustado, como ajustado, puede influir la luz extraña que principalmente proviene de luz que llega de una rendija o falla del instrumento o por presencia de polvo.

CUADRO 1

COMPROBACION DE LA EXACTITUD DE LA LONGITUD DE ONDA

Espectrofotómetro Marca: Coleman Jr II

Modelo: 6/20

FECHA	ANALISTA	DIDIMIO		NiSO ₄ Conc. 1.00			λ -420 nm Cr(CIO ₄) ₃ (Azul)				λ -520 nm Co(SO ₄) ₂ (NH ₄)SO ₄ (Rojo)				λ -670 nm NiSO ₄ (Verde)			
		Lectura (% T)	Se ajustó SI No	400 nm % T	510 nm % T	700 nm % T	0.25	0.50	0.75	1.00	0.25	0.50	0.75	1.00	0.25	0.50	0.75	1.00
10- 6-80	O.M.	4	X	3	90	2	0.17	0.35	0.52	0.70	0.165	0.342	0.50	0.665	0.17	0.34	0.51	0.69
8- 7-80	O.M.	5	X	3	90	2	0.17	0.35	0.518	0.685	0.17	0.33	0.50	0.665	0.17	0.35	0.60	0.70
12- 8-80	O.M.	4.5	X	3	90	2	0.175	0.355	0.515	0.69	0.16	0.335	0.51	0.67	0.175	0.35	0.51	0.69
9- 9-80	O.M.	4.5	X	3	90	2	0.175	0.355	0.520	0.69	0.17	0.34	0.51	0.665	0.175	0.345	0.515	0.69
14-10-80	O.M.	5	X	3	90	2	0.17	0.345	0.52	0.685	0.17	0.33	0.495	0.665	0.17	0.35	0.50	0.69
11-11-80	O.M.	5	X	3	90	2	0.17	0.345	0.516	0.68	0.165	0.33	0.495	0.66	0.17	0.35	0.50	0.70
16-12-80	O.M.	7	X	3.5	88	2	0.178	0.34	0.54	0.67	0.18	0.35	0.51	0.66	0.175	0.345	0.51	0.71
16-12-80	O.H.	4	X	3	90	2	0.175	0.35	0.52	0.70	0.17	0.345	0.51	0.67	0.17	0.34	0.51	0.69
10- 2-81	O.M.	4	X	3	90	2	0.17	0.365	0.52	0.70	0.17	0.340	0.51	0.67	0.175	0.345	0.51	0.69
10- 3-81	O.M.	4	X	3	90	2	0.175	0.35	0.52	0.70	0.17	0.34	0.51	0.665	0.17	0.350	0.50	0.695
14- 4-81	O.M.	4.5	X	3	90	2	0.175	0.35	0.515	0.69	0.17	0.335	0.50	0.665	0.175	0.355	0.50	0.70
12- 5-81	O.M.	4.5	X	3	90	2	0.170	0.345	0.52	0.685	0.17	0.33	0.51	0.671	0.17	0.34	0.51	0.67
Aparato desajustado	B		X	3	90	2	0.18	0.34	0.51	0.68	0.18	0.34	0.49	0.65	0.18	0.33	0.49	0.66

O.M. - Octavio Morales

CUADRO 2

COMPROBACION DE LA EXACTITUD DE LA LONGITUD DE ONDA

Espectrofotómetro Marca: Perkin Elmer

Modelo: 35

FECHA	ANALISTA	DIDIMIO		Luz extraña			λ -420 nm Cr(ClO ₄) ₃ (Azul)				λ -520 nm Co(SO ₄) ₂ (NH ₄)SO ₄ (Rojo)				λ -670 nm NiSO ₄ (Verde)				
		Lectura (% T)	Se ajustó		400 nm	510 nm	700 nm												
			SI	No	% T	% T	% T	0.25	0.50	0.75	1.00	0.25	0.50	0.75	1.00	0.25	0.50	0.75	1.00
10- 6-80	O.M.	4	X	2.6	92.6	1.8	0.19	0.375	0.57	0.755	0.185	0.37	0.55	0.74	0.19	0.38	0.57	0.76	
8- 7-80	O.M.	4.1	X	2.4	93	1.7	0.185	0.38	0.58	0.76	0.18	0.36	0.55	0.73	0.185	0.38	0.57	0.76	
12- 8-80	O.M.	4	X	2.6	93	1.8	0.19	0.375	0.56	0.75	0.17	0.36	0.555	0.73	0.19	0.18	0.57	0.755	
9- 9-80	O.M.	4.2	X	2.6	92.9	1.8	0.18	0.37	0.575	0.75	0.175	0.37	0.56	0.735	0.18	0.375	0.575	0.76	
14-10-80	O.M.	4.1	X	2.4	93	1.7	0.175	0.38	0.578	0.76	0.175	0.370	0.36	0.74	0.185	0.38	0.574	0.76	
11-11-80	O.M.	4	X	2.6	92.8	1.8	0.19	0.375	0.56	0.76	0.18	0.375	0.55	0.74	0.19	0.375	0.57	0.76	
16-12-80	O.M.	4	X	2.5	93	1.8	0.18	0.37	0.575	0.755	0.185	0.37	0.55	0.741	0.18	0.381	0.575	0.756	
10- 2-81	O.M.	4	X	2.6	93	1.8	0.185	0.37	0.57	0.751	0.182	0.37	0.54	0.741	0.185	0.376	0.57	0.755	
10- 3-81	C.M.	4	X	2.6	92.7	1.7	0.19	0.375	0.57	0.754	0.185	0.365	0.55	0.740	0.19	0.375	0.57	0.76	
11- 4-81	O.M.	4.2	X	2.6	92.9	1.8	0.185	0.38	0.57	0.755	0.184	0.37	0.55	0.742	0.19	0.375	0.57	0.76	

O.M. - Octavio Morales

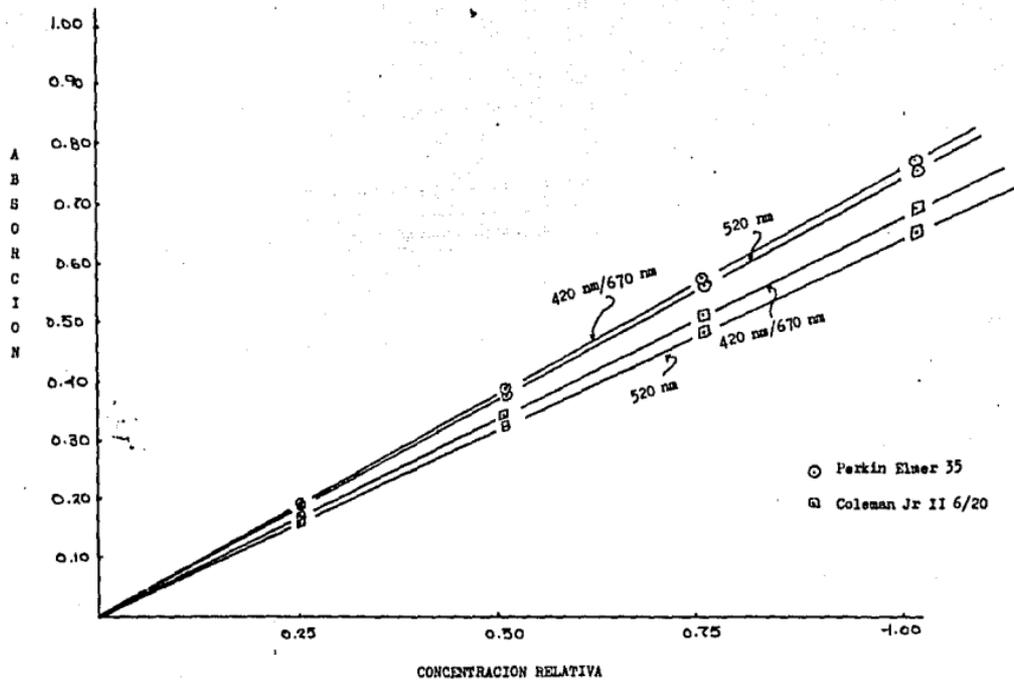


FIG. 29 Exactitud de la longitud de onda a base de soluciones de con
 centración conocida a tres diferentes longitudes de onda.

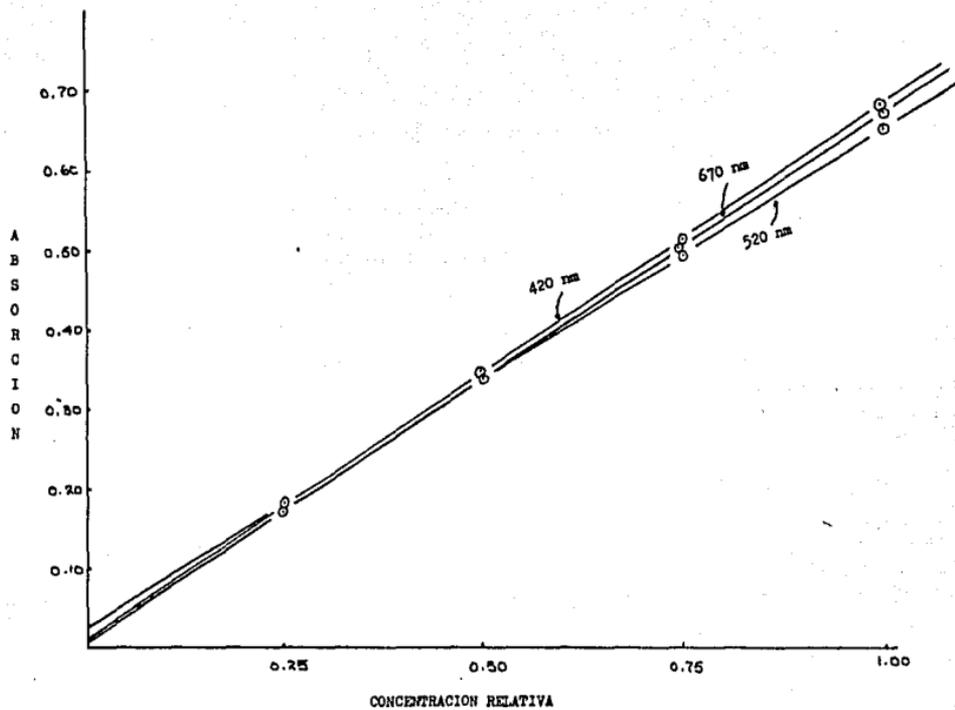


FIG. 30 Inexactitud de la longitud de onda por medio de estándares de concentración conocida en un Coleman Jr II 6/20 desajustado.

Puntos Isobésticos

En el cuadro 3, se encuentran los puntos isobésticos obtenidos en diferentes aparatos y los puntos reportados por Hoxter (5), quien trabajó en un aparato Zeiss PMQ II, con celda de paso de luz de 2 cm y empleando un registrador. Se observa una mínima variación en cada solución con respecto a los puntos reportados por Hoxter:

$K_2Cr_2O_7$	\pm	5 nm
ABT	\pm	10 nm
N.M.	\pm	5 nm
R.C.	\pm	10 nm
HI/HICN	\pm	10 nm

Estas variaciones son debidas a la sensibilidad del aparato empleado; así como, al no tener un registrador que grafique exactamente el punto de intersección, como se puede observar en las figuras de los Coleman 55, Coleman Jr II, Perkin Elmer 35 y Zeiss PM2DL. Sin embargo, en un Beckman 26 se empleó registrador, y se encuentra que hay una variación de ± 2 nm, con respecto a los otros aparatos.

Se determinó su estabilidad de las soluciones empleadas durante 12 meses, obteniendo los siguientes resultados: (Cuadro 4)

Estos datos nos indican que en cada solución su rango de estabilidad y seguridad máxima es de 8 meses, después del cual las extinciones tienden a bajar progresivamente, siendo difíciles de medir. En el caso de la metahemiglobina/Hemiglobina cianuro, su vida media se reduce aproximadamente a 6 meses y esto es comprensible ya que la hemoglobina por acción de la luz y el aire se descompone fácilmente, sufriendo una oxidación.

CUADRO 4

ESTABILIDAD DE LAS SOLUCIONES MIDIENDO SU EXTINCION EN UN ZEISS PM₂DL.

Solución	Agosto	Sept.	Oct.	Nov.	Dic.	Enero	Feb.	Marzo	Abril	Mayo
K ₂ Cr ₂ O ₇ P.I - 340 nm	0.265	0.265	0.265	0.265	0.265	0.265	0.260	0.185	0.160	0.150
ABT P.I - 498 nm	0.185	0.185	0.185	0.185	0.185	0.185	0.173	0.161	0.154	0.144
N.M. P.I - 465 nm	0.48	0.48	0.48	0.48	0.48	0.48	0.44	0.40	0.35	0.25
R.C. P.I - 550 nm	0.24	0.24	0.24	0.24	0.24	0.24	0.24	0.20	0.17	0.10
H ₁ /H _{10N} P.I - 519 nm	--	--	--	--	0.06	0.06	0.06	0.03	0.01	--

P.I. - Puntos Isobéuticos.

Espectros encontrados en la obtención de los puntos isobéuticos en diferentes aparatos.

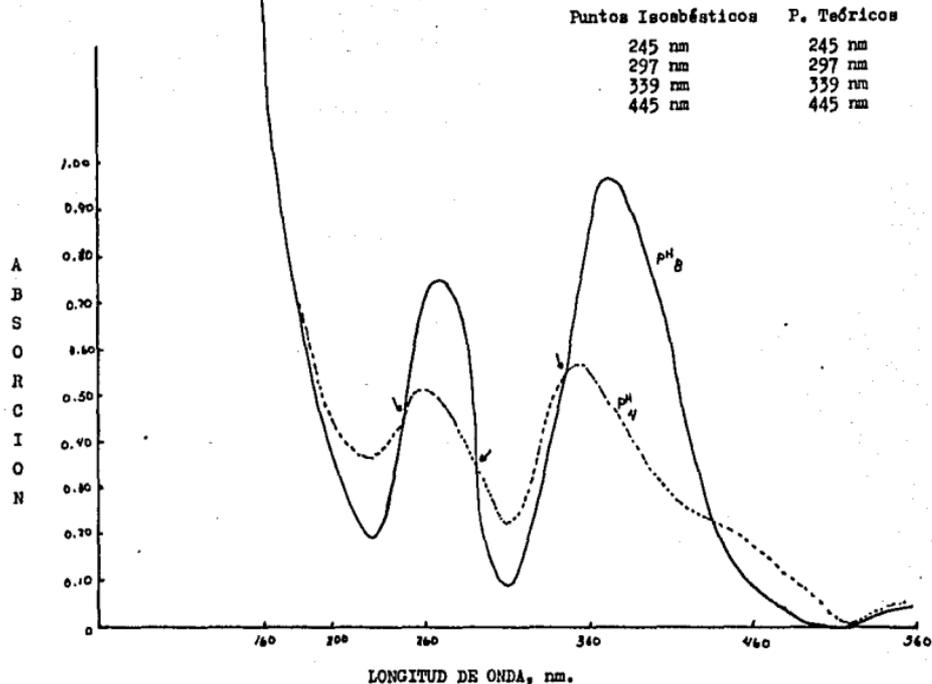


FIG. 31 Puntos isoabsticos del $K_2Cr_2O_7$ en un Beckman 26.
 Condiciones: Paso de banda 2 nm, velocidad de barrido 120 nm/min., velocidad de carta 1 pulg/min, tiempo de respuesta 2 seg., celda de cuarzo 1 cm².

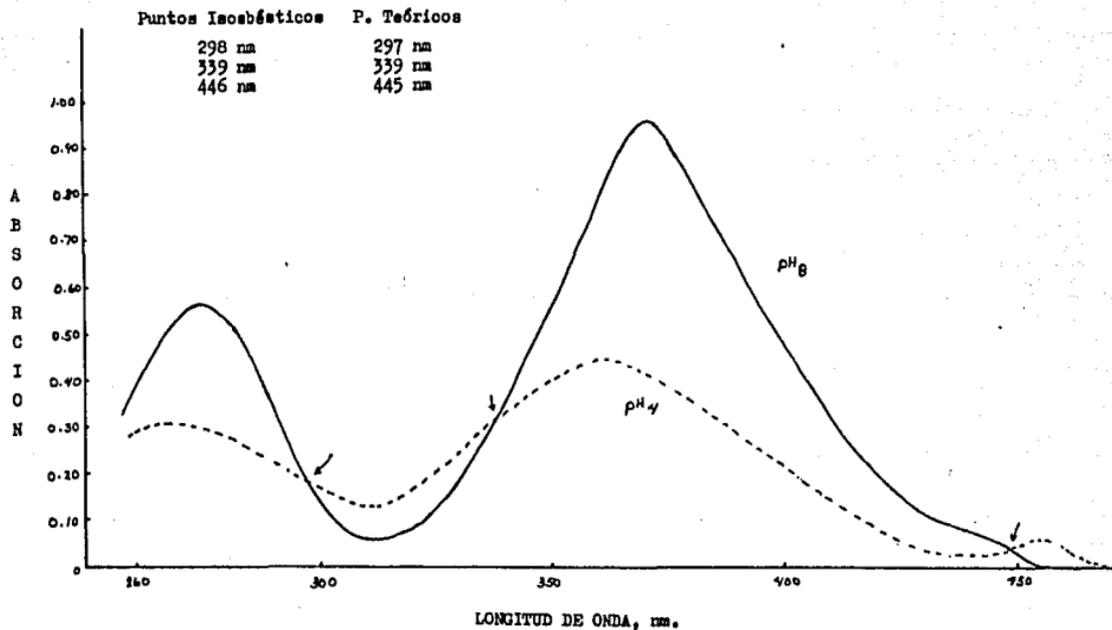


FIG. 32 Puntos Isobstéticos de $K_2Cr_2O_7$ en un Coleman 55, paso de banda 2.0 nm, celda cuadrada de 1 cm^2 cuarzo.

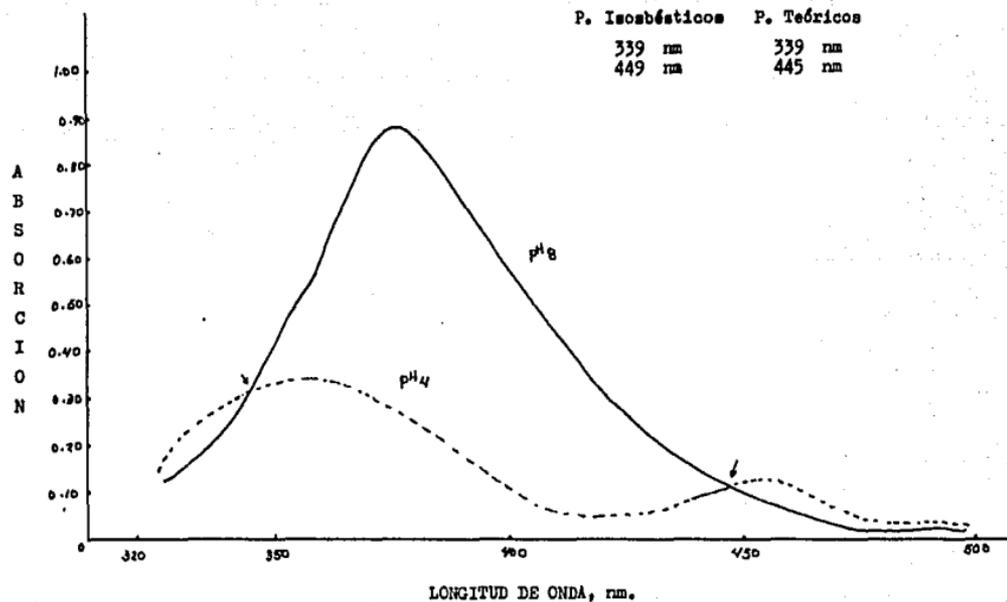


FIG. 33 Puntos isobésticos de $K_2Cr_2O_7$ en un Perkin Elmer 35, paso de banda 8 nm, celda redonda de 1 cm.

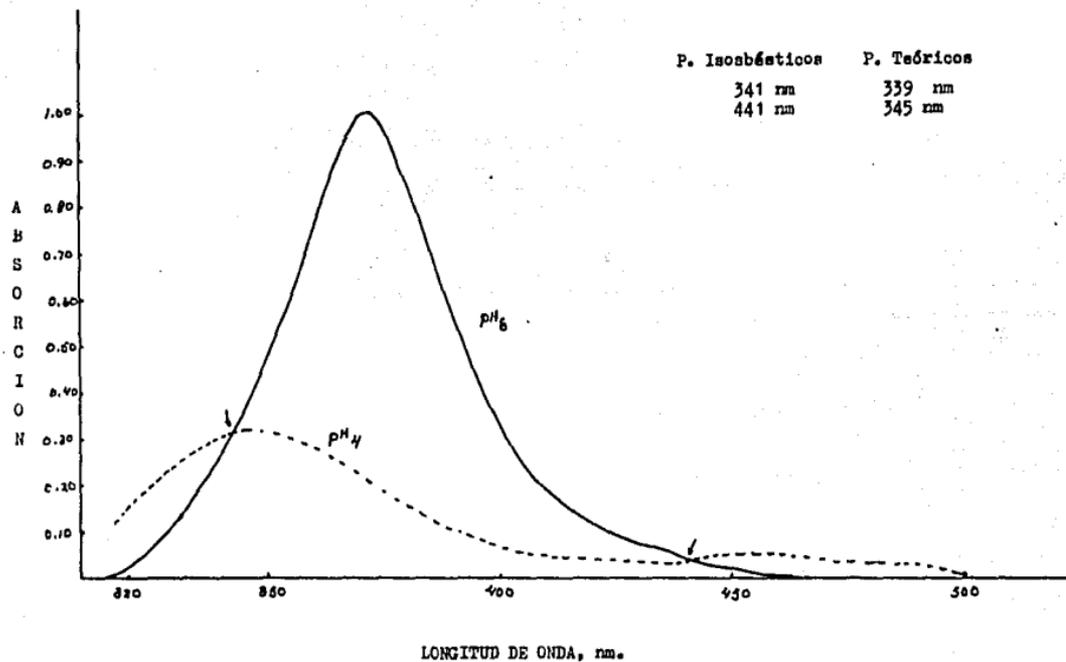


FIG. 34

Puntos isobásticos de $K_2Cr_2O_7$ en un Zeiss PM2DL, paso de banda 10 nm, celda cuadrada de vidrio 1 cm².

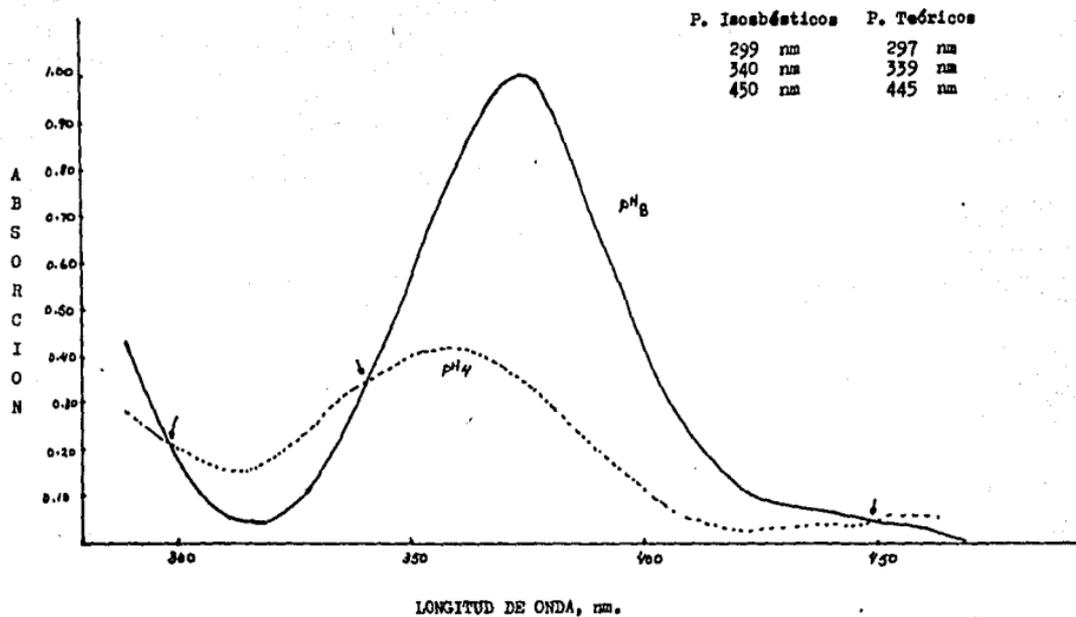


FIG. 35 Puntos isobásticos de $K_2Cr_2O_7$ en un Zeiss FM2DL, paso de banda 10 nm, celda cuadrada de cuarzo de 1 cm^2 .

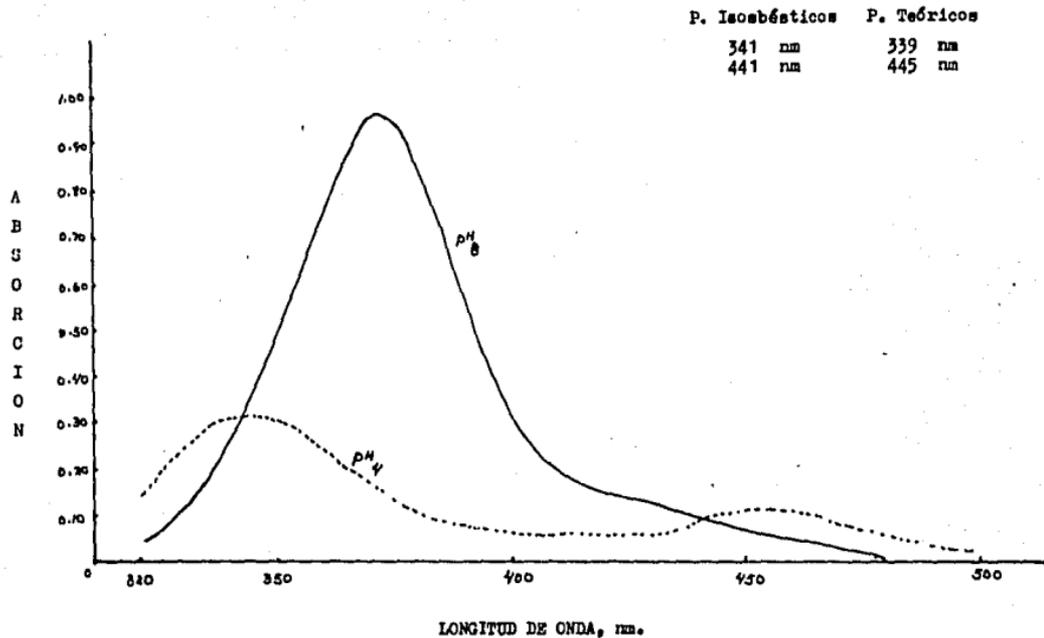


FIG. 36 Puntos isobásticos del $K_2Cr_2O_7$ en un Zeiss PM2DL, paso de banda de 10 nm, celda cuadrada de 1 cm^2 .

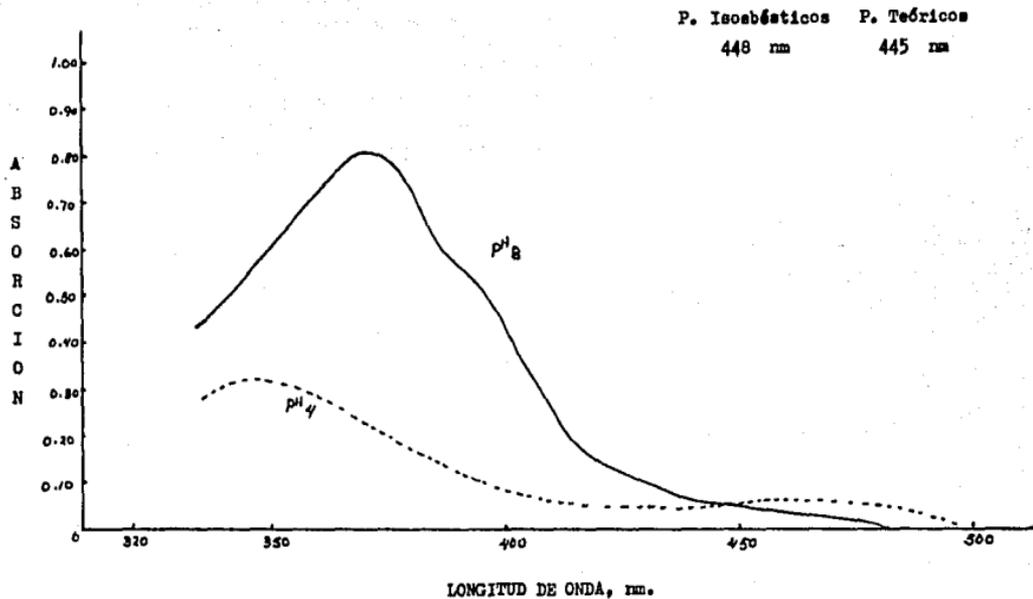


FIG. 37 Puntos isoabstéticos de $K_2Cr_2O_7$ en Coleman Jr II 6/20, paso de banda 20 nm, celda redonda de 1 cm^2 .

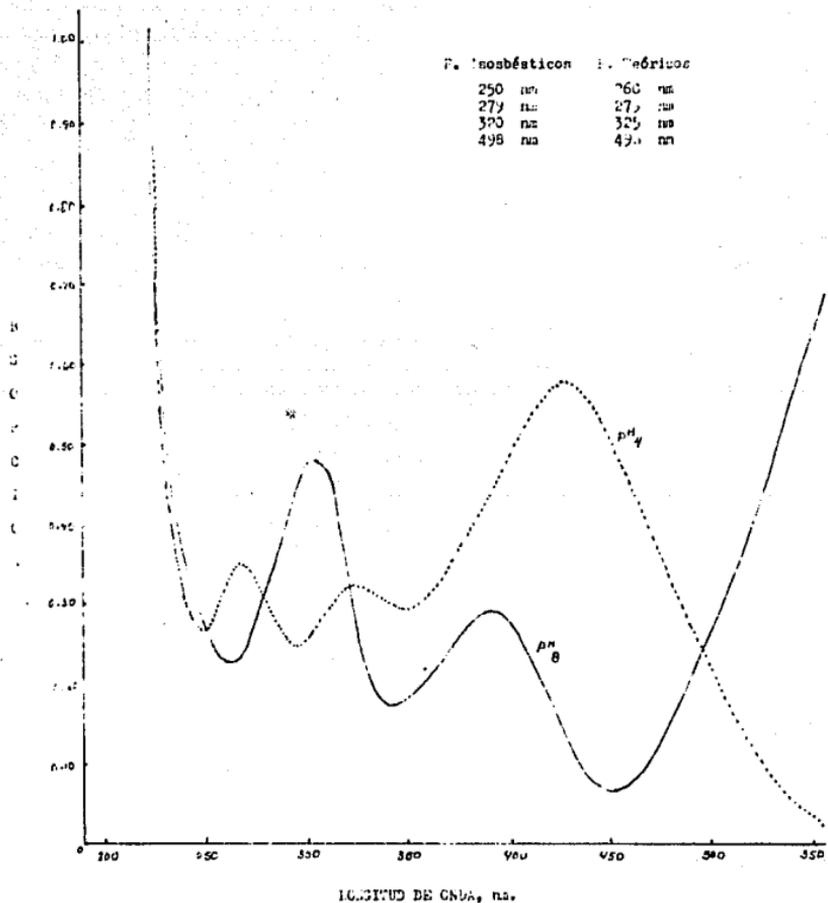


FIG. 7. Puntos isobéuticos de Azul de Bromotimol en un Beckman 26, base de brida 0.2 mμ, tiempo de respuesta 2 seg., velocidad de carta 240 mμ/min., velocidad de barrido 240 mμ/min.

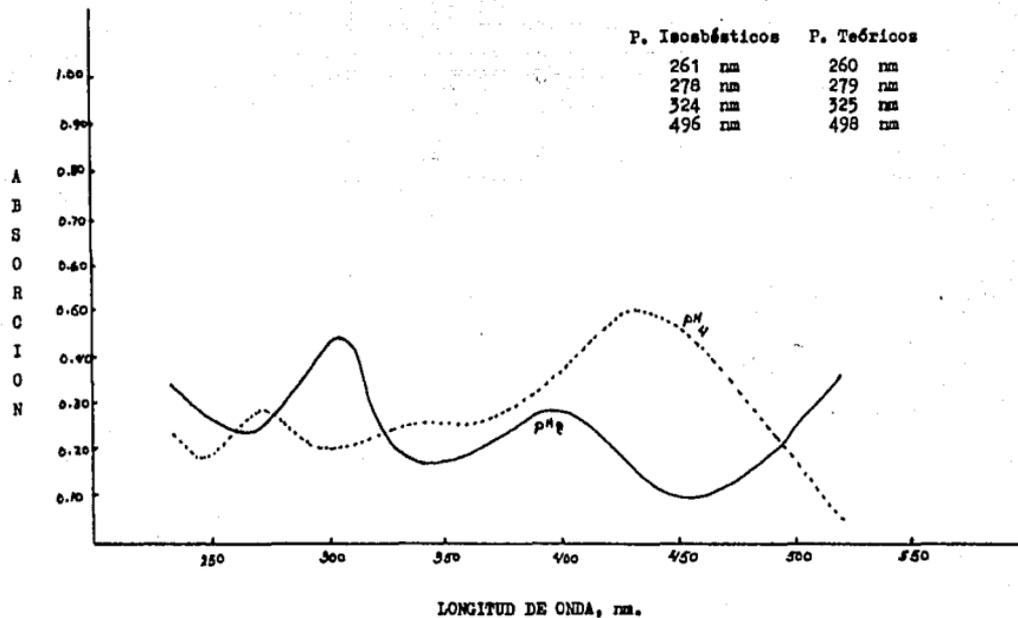


FIG. 39 . Puntos isobásticos de Azul de Bromotimol en un Coleman 55, paso de banda de 2 nm, con celdas cuadradas de sílice de 1 cm².

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

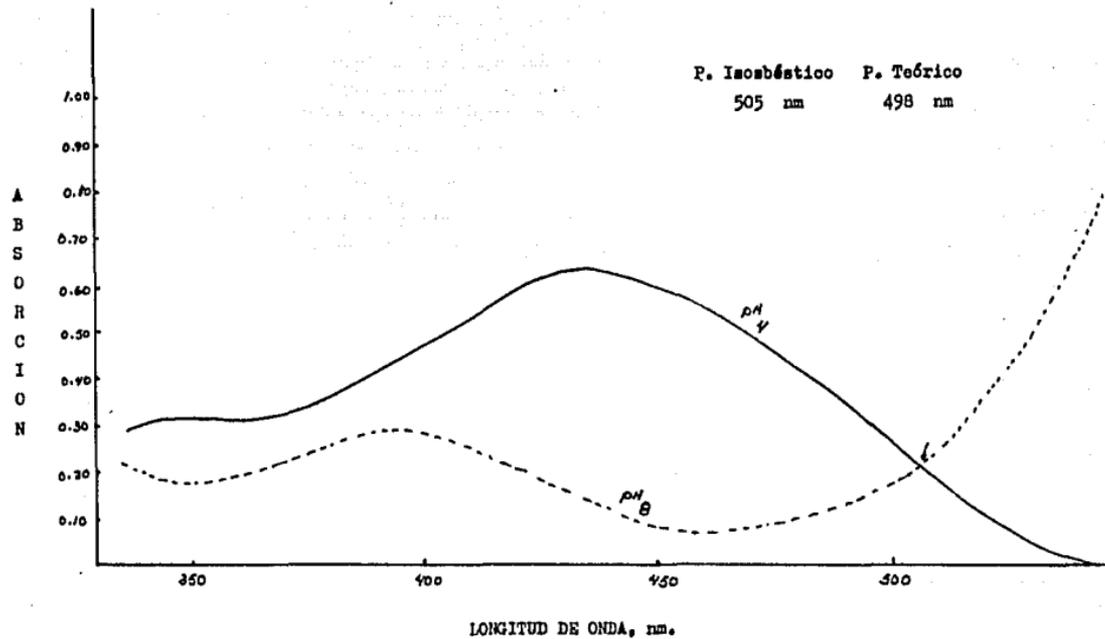


FIG. 40 Puntos isobépticos de Azul de Bromotimol en un Perkin Elmer 35, paso de banda 8 nm, celda redonda de 1 cm.

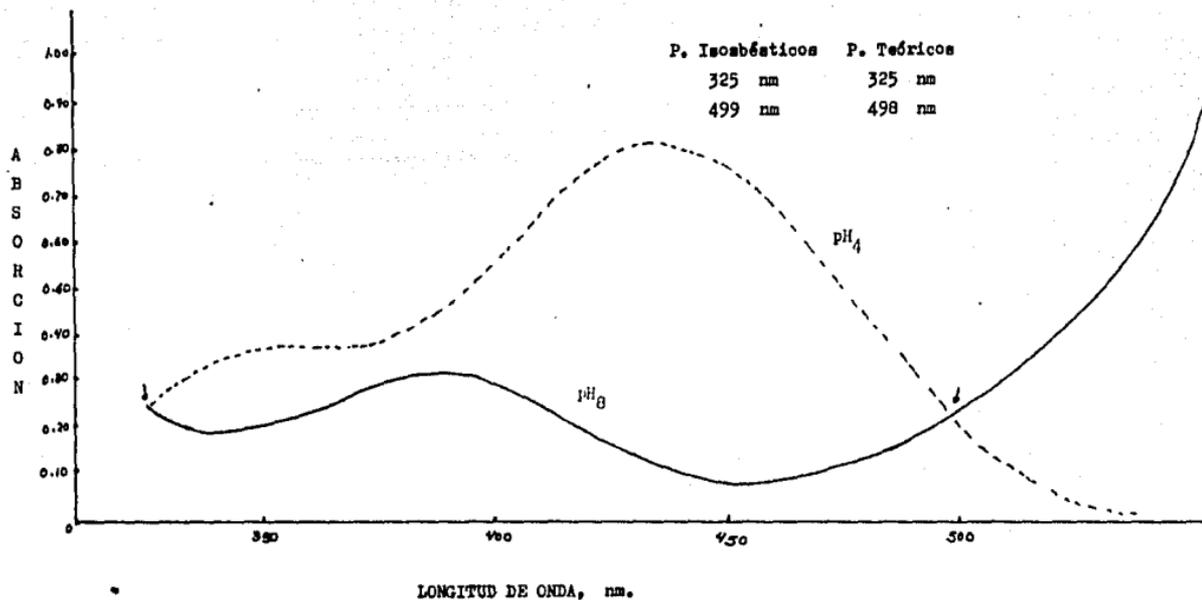


FIG. 41 Puntos isobéticos de Azul de Bromotimol en un Zeiss PM2DL, paso de banda 10 nm, celda cuadrada de 1 cm².

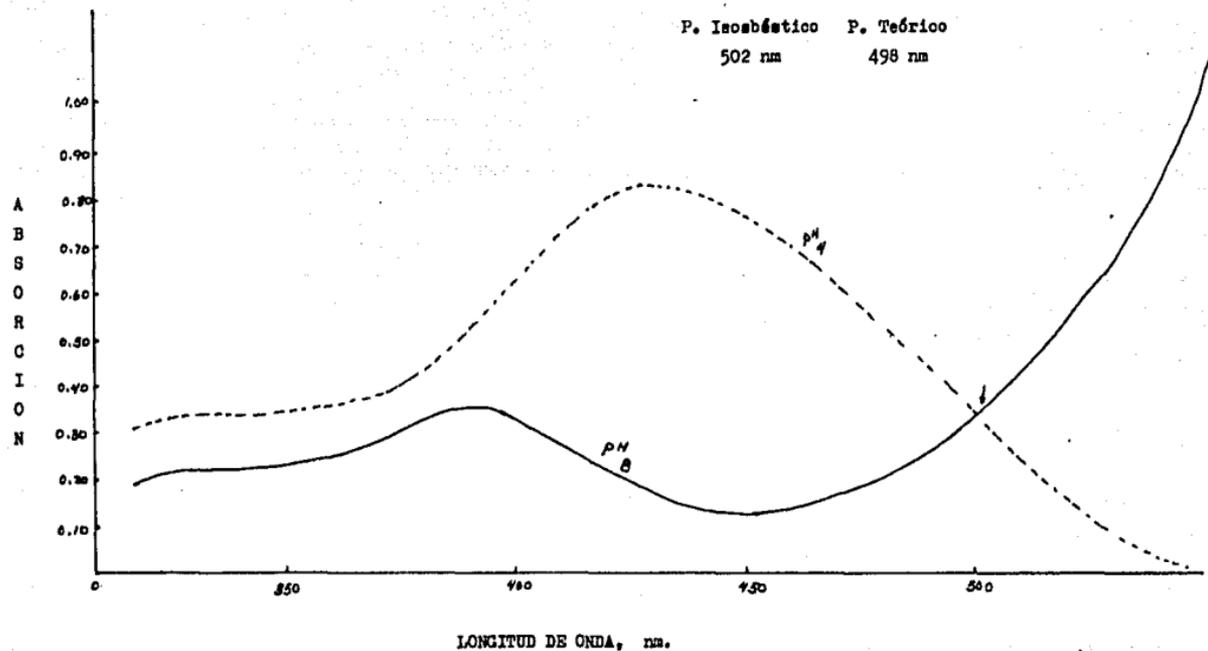


FIG. 42 Puntos isobépticos de Azul de Bromotimol en un Coleman Jr II 6/20, paso de banda 20 nm, con celda redonda de 1 cm.

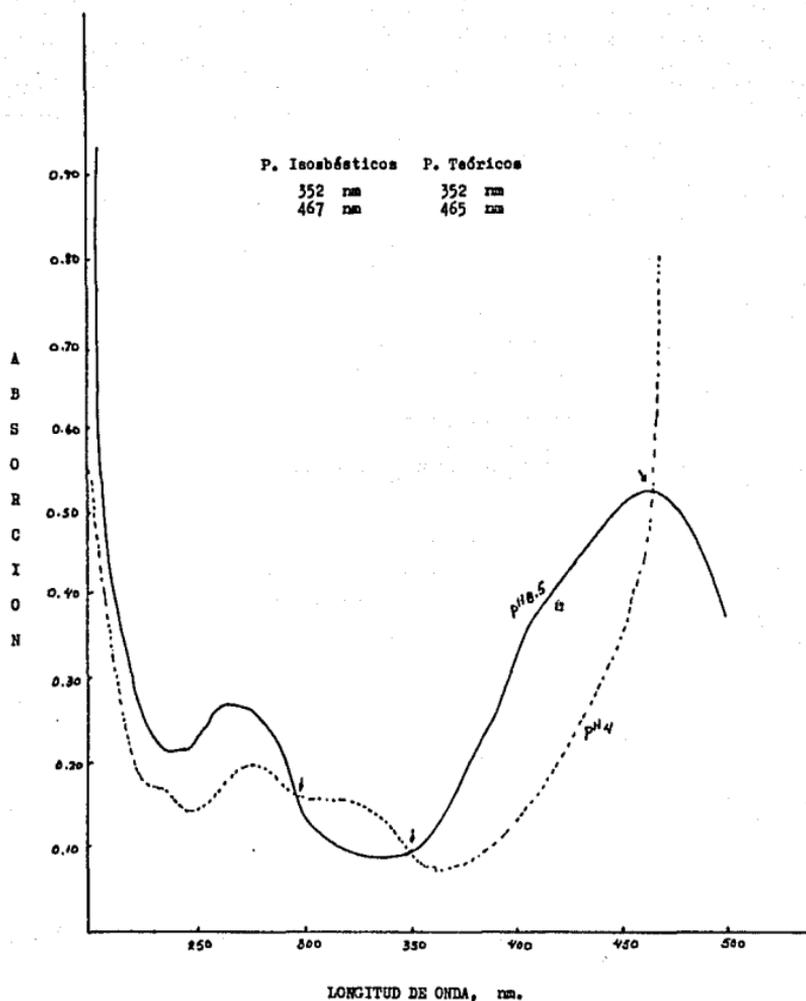


FIG. 43 Puntos isobsticos del Naranja de Metilo en un Beckman 26, paso de banda 0.2 nm, tiempo de respuesta 2 seg., velocidad de caxta 240 nm/min., velocidad de barrido 240 nm/min., celda cuadrada cuarzo 1 cm².

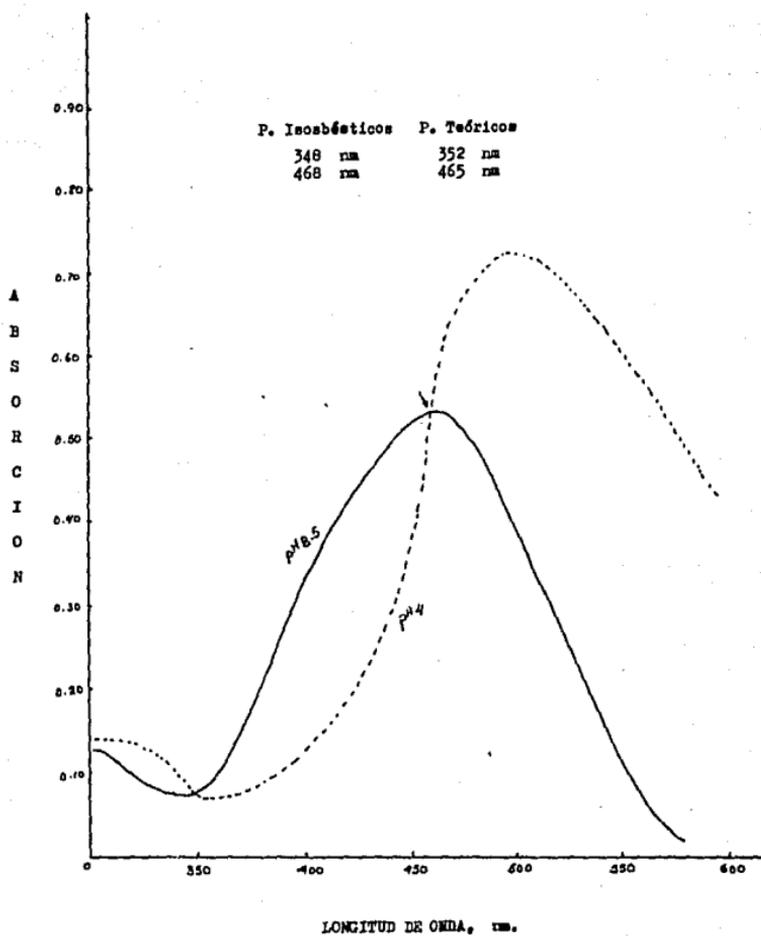


FIG. 44 Puntos isobásticos de Maranja de Metilo en un Coleman 55, paso de banda 2 nm, con celda cuadrada de 1 cm^2 de sílice.

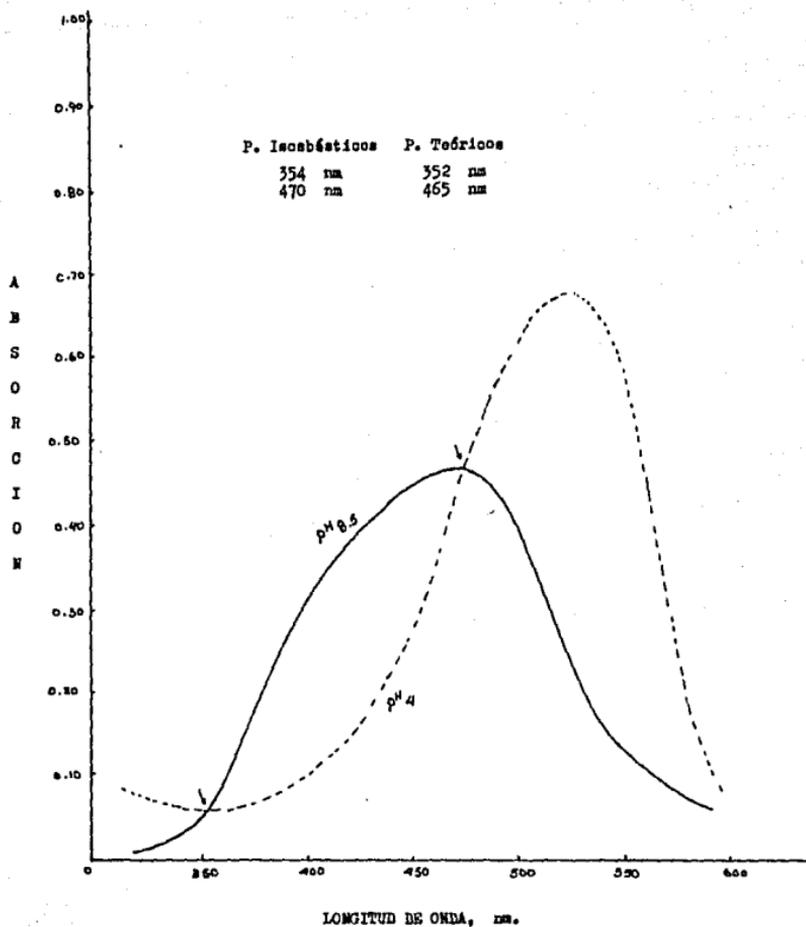


FIG. 45 Puntos isobásticos de Naranja de Metilo en un Perkin Elmer 35, paso de banda 8 nm, con celda redonda de 1 cm.

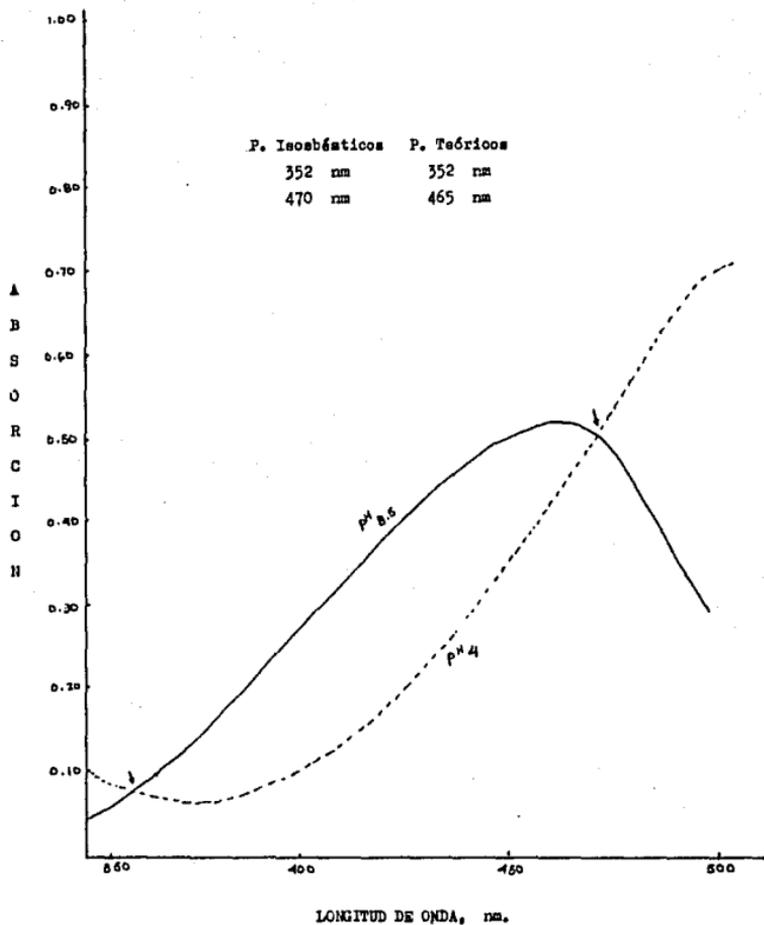


FIG. 45 Puntos isobásticos de Naranja de Metilo en un Zeiss FM2D1, paso de banda 10 nm, con celda cuadrada de 1 cm².

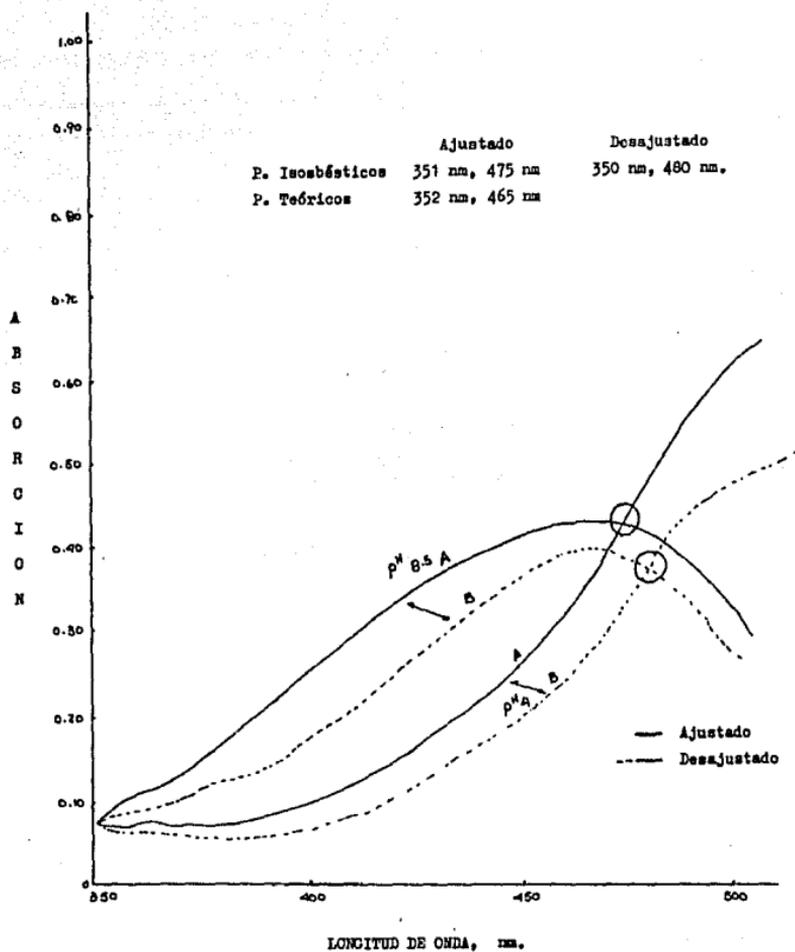


FIG. 47 Puntos isobécticos de Naranja de Metilo en un Coleman Jr II 6/20 paso de banda 20 nm, con celda redonda de 1 cm.

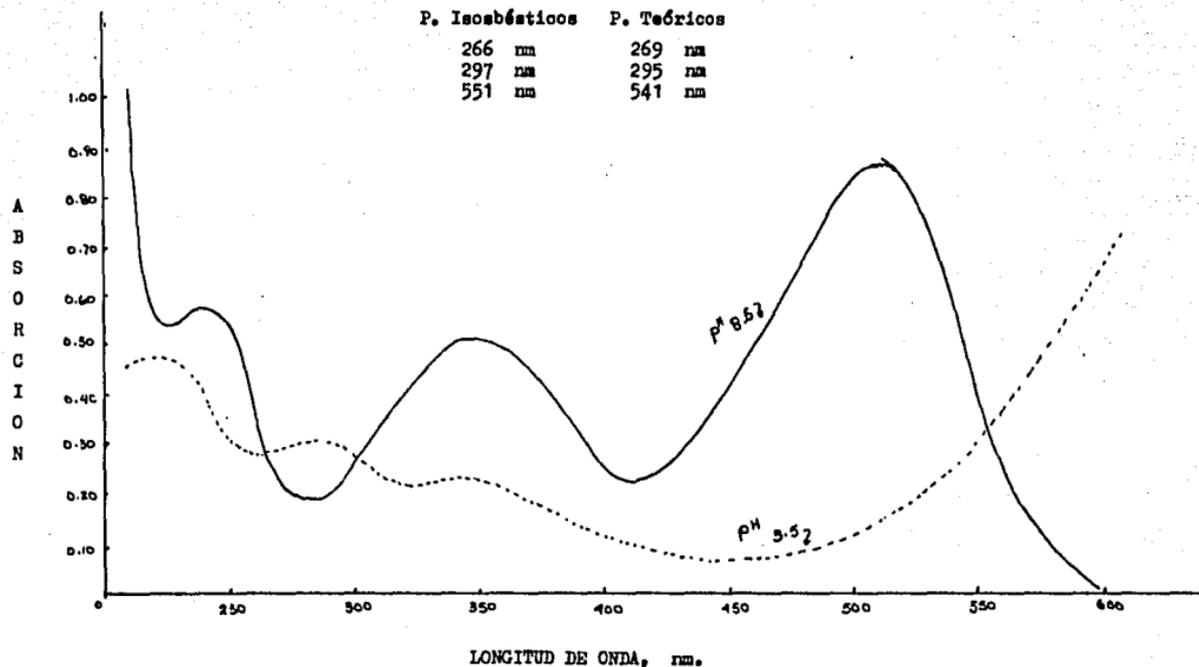


FIG. 48 Puntos isobécticos de Rojo Congo en un Beckman 26, paso de banda 0.2 nm, tiempo de respuesta 2 seg., velocidad de la carta 120 mm/min, velocidad de barrido 120 nm/min, con celda cuadrada de sílice de 1 cm².

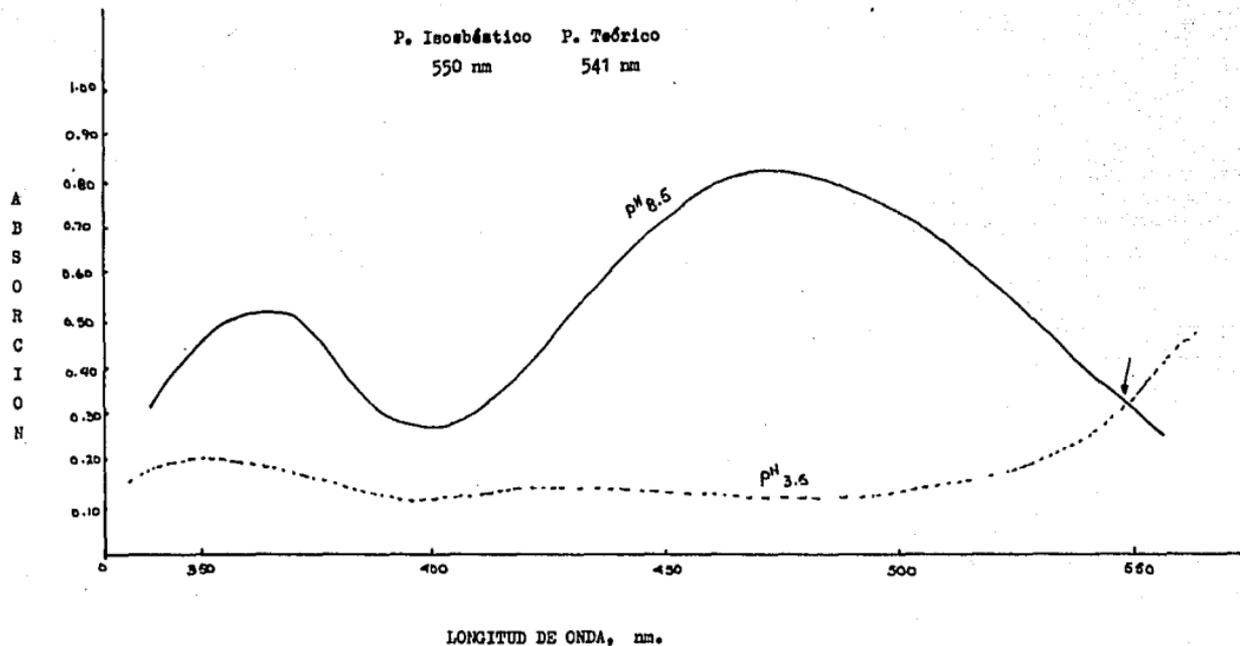


FIG. 49 Puntos isobásticos de Rojo Congo en un Perkin Elmer 35, paso de banda 8 nm, con celda redonda de 1 cm.

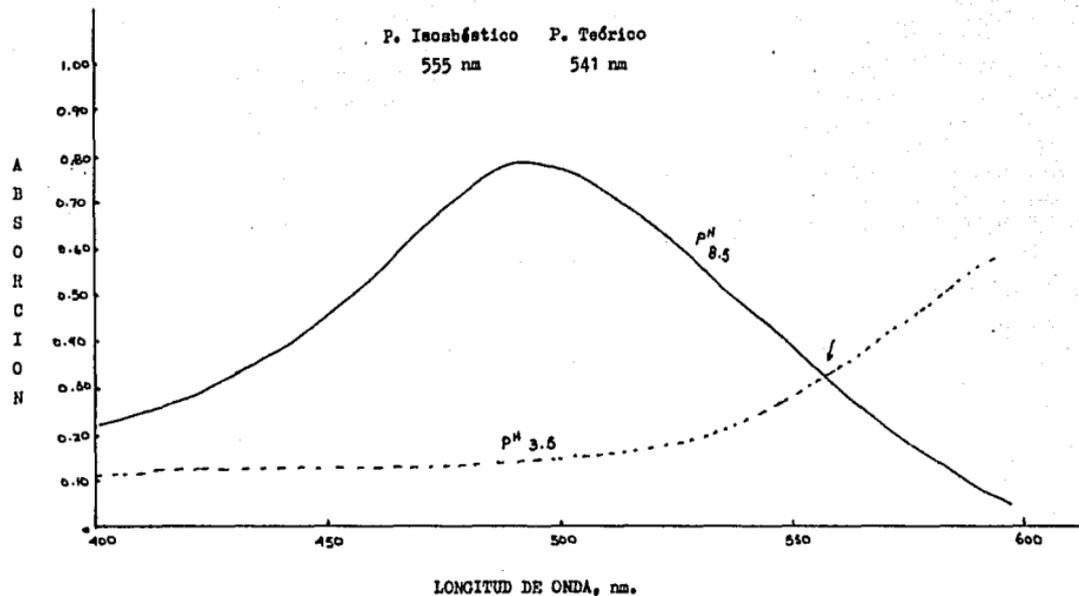


FIG. 50 Punto isosbético de Rojo Congo en un Zeiss PM2DL, paso de banda 10 nm, con celda cuadrada de 1 cm².

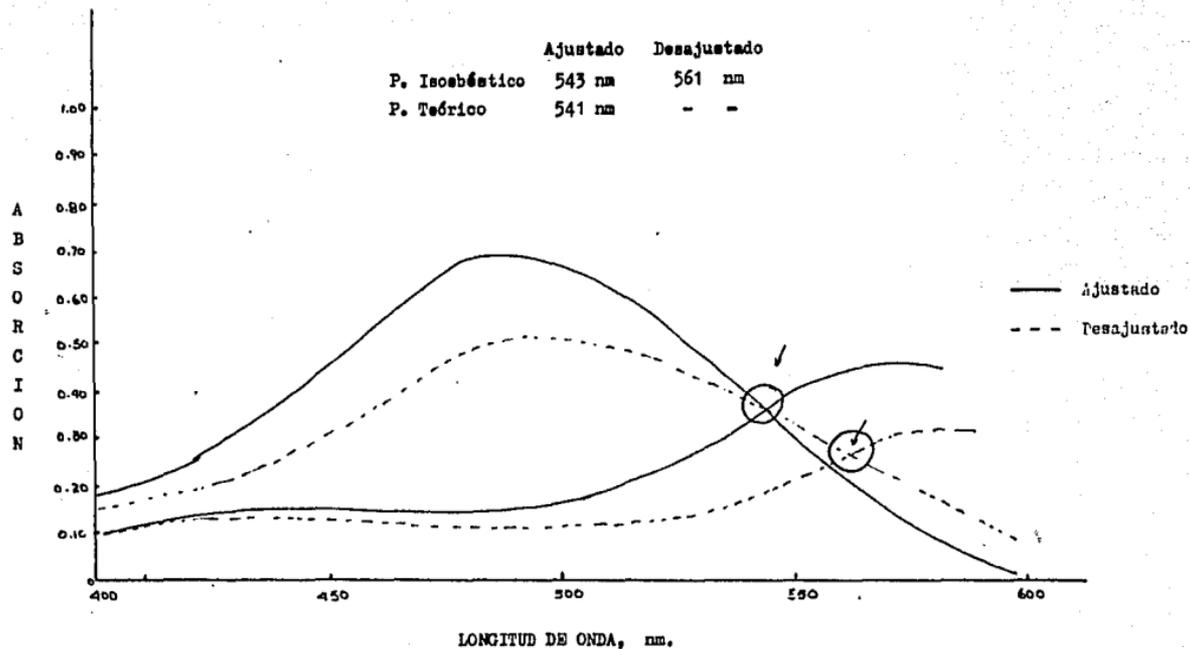


FIG. 51 Puntos isobécticos de Rojo Congo en un Coleman Jr II 6/20, paso de banda 20 nm, con celda redonda de 1 cm.

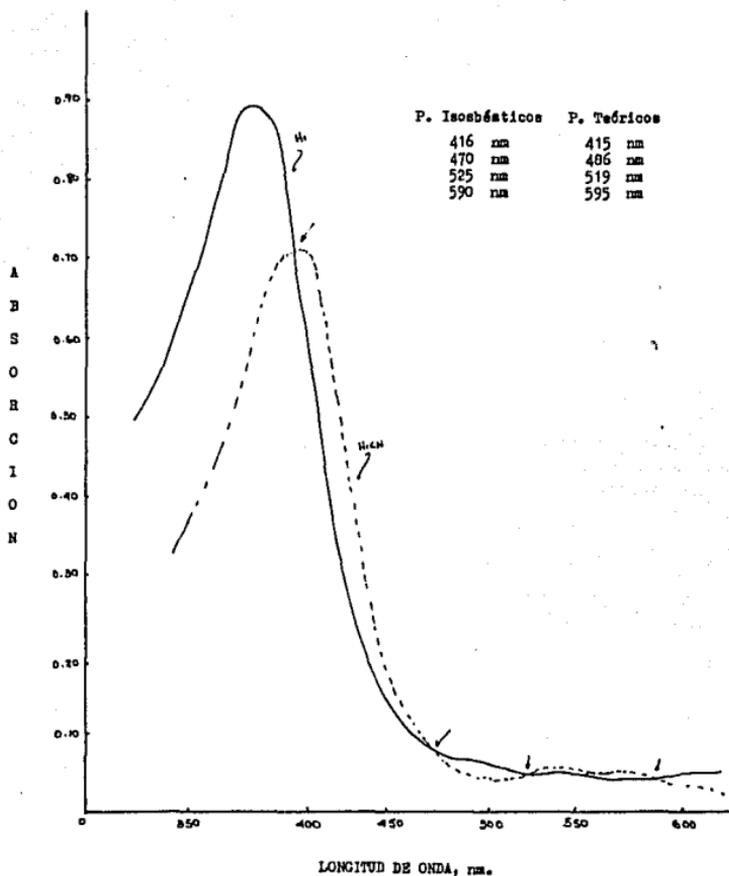


FIG. 52 Puntos isobásticos de HI/HICM en un Beckman 26, paso de banda 0.2 nm, tiempo de respuesta 2 seg., velocidad de carta 50 mm/min., velocidad de barrido 50 nm/min., con celda cuadrada deslizo de 1 cm².

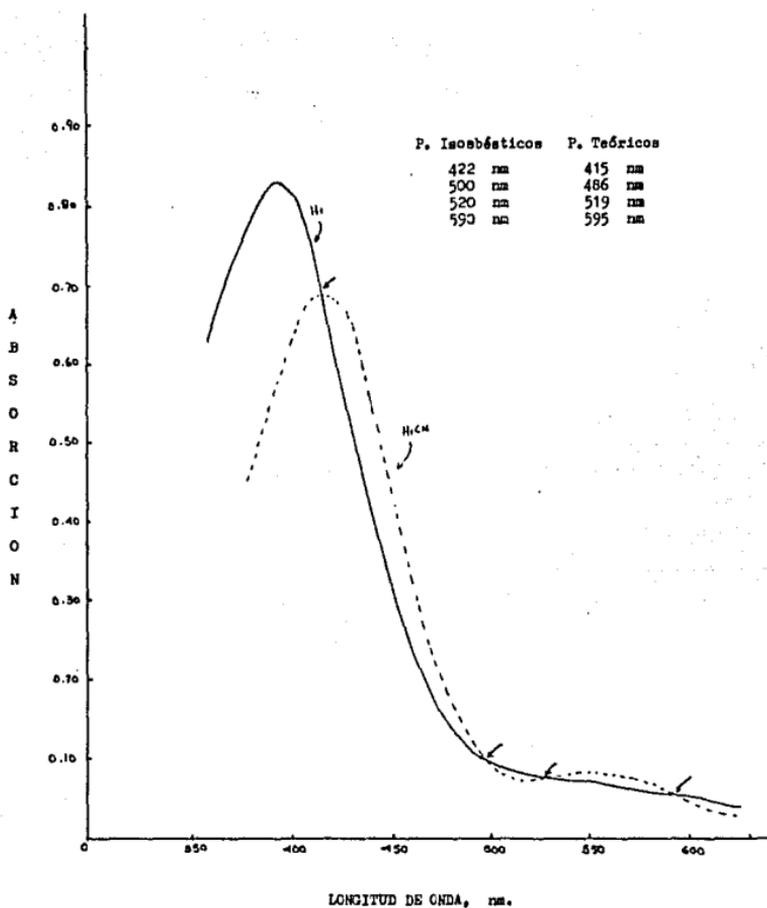


FIG. 53 Puntos isoabéticos de HI/H₂CN en un Perkin Elmer 35, paso de banda 8 nm, con celda redonda de 1 cm.

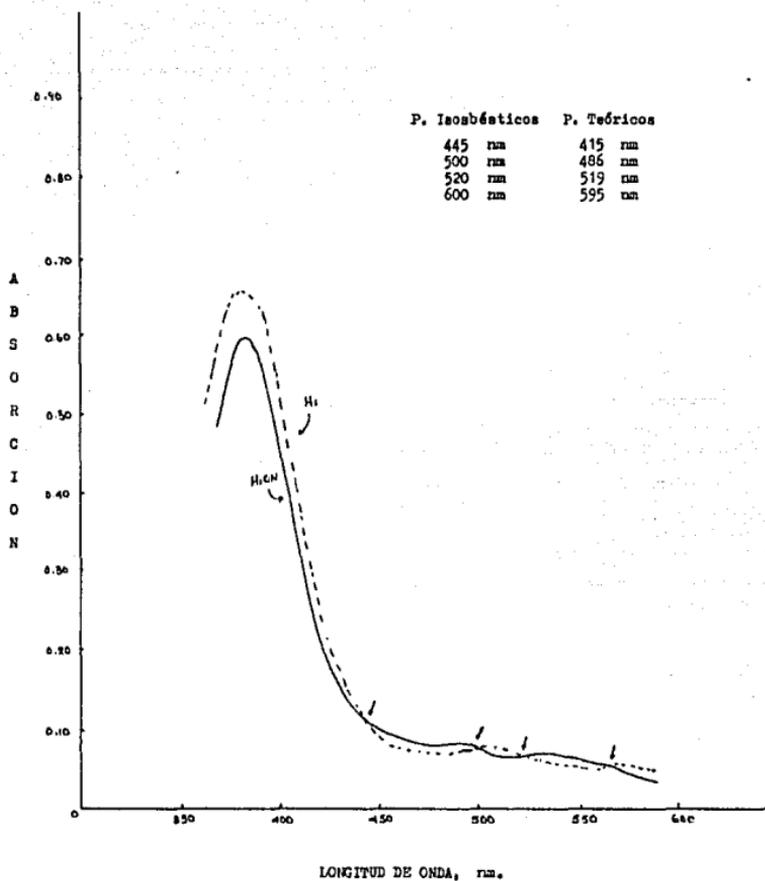


FIG. 54 Punto isobástico de H_1/H_{1CN} en un Zeiss H42DL, paso de banda 10 nm, con celda cuadrada de 1 cm^2 .

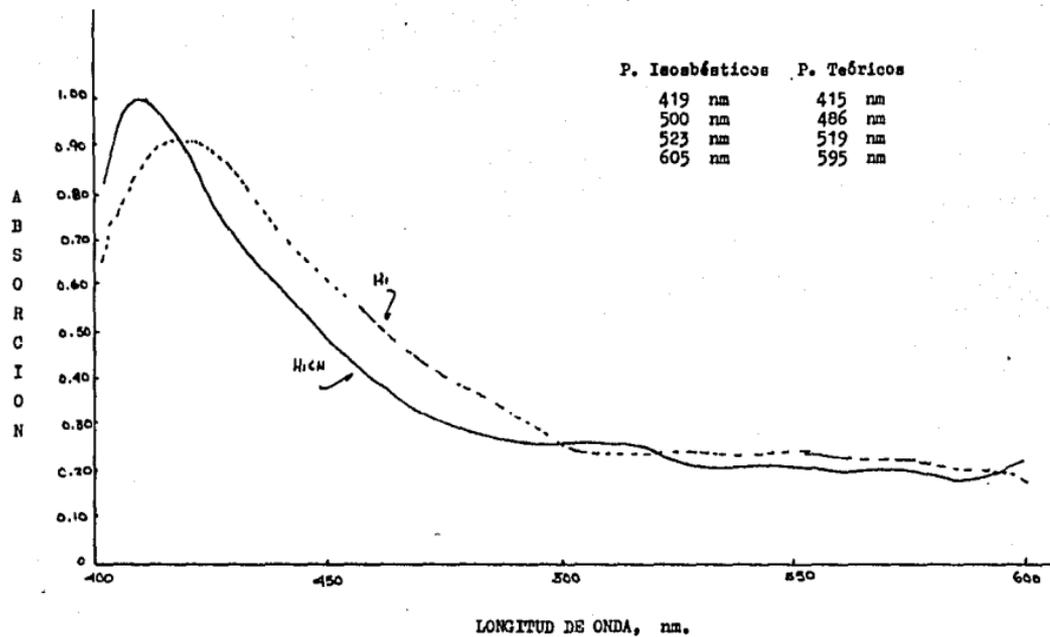


FIG. 55 Puntos isobésticos de HI/H1CN en un Coleman Jr II 6/20, paso de banda 20 nm, con celda redonda de 1 cm.

En las figuras 47 y 51 encontramos dos tipos de espectros empleando el mismo aparato Coleman Jr II 6/20, trabajando con el aparato ajustado y desajustado. Nótese la diferencia en cuanto a la banda de máxima extinción o absorción donde la respuesta es menor cuando está desajustado; por otro lado, por la inexactitud de la longitud de onda, se desvía por lo menos para el Naranja de metilo 10 nm, de un punto isobéptico reportado a 470 nm, en el caso del Rojo congo, se encuentra desviado 18 nm con respecto al reportado a 543 nm.

IV.2 Linearidad fotométrica

Se resumen en los siguientes cuadros las extinciones obtenidas en diferentes espectrofotómetros, incluyendo sus figuras: (Cuadros del 5 al 13).

Podemos observar en el caso de la solución de $K_2Cr_2O_7$, tanto a 350 como a 365 nm, que en todos los aparatos su pendiente es una recta que sale del origen.

En el caso del Naranja de metilo, para comprobar la linealidad fotométrica se empleó la longitud de onda de acuerdo a los puntos isobépticos obtenidos. (Secc. IV.1.c)

Este argumento es válido ya que no hay una interacción del absorbente con el solvente, ni la acción de sustancias extrañas que reaccionaran con el absorbente. Siendo estos, requisitos indispensables para que se cumpla con la Ley de Beer. En las figuras de la 58 a la 60 se demuestra lo anteriormente expuesto, logrando de esta forma darle una mayor utilidad a los puntos isobépticos, el ajustar la linealidad fotométrica.

En cada una de las figuras se puede observar que dependiendo del aparato, de acuerdo a su poder de resolución (paso de banda), tendrán una mayor o menor respuesta y que se puede determinar por el grado de inclinación de la recta. Así, podemos notar que en aparatos más sensibles su pendiente es mayor y parten del origen como sucede con el Beckman 26, Coleman 55, Zeiss PM2DL

CUADRO 5

Solución $K_2Cr_2O_7$
 Longitud de onda - 350 nm

Concentración		Beckman 26	Coleman 55	Perkin Elmer 35	Zeiss H ₂ DL	Coleman Jr 6/20
mg/dL	umol/L					
2	6.8	0.210	0.206	0.188	0.198	0.18
3	10.2	0.317	0.306	0.278	0.295	0.265
4	13.6	0.418	0.410	0.375	0.400	0.358
5	17.0	0.520	0.507	0.458	0.480	0.440
6	22.4	0.630	0.615	0.655	0.585	0.530

CUADRO 6

Solución $K_2Cr_2O_7$
 Longitud de onda - 365 nm

Concentración		Beckman 26	Coleman 55	Perkin Elmer 35	Zeiss FM ₂ DL	Coleman Jr 6/20
mg/dL	umol/L					
2	6.8	0.180	0.170	0.165	0.165	0.16
3	10.2	0.270	0.265	0.250	0.250	0.235
4	13.6	0.360	0.350	0.320	0.328	0.315
5	17.0	0.450	0.430	0.410	0.405	0.395
6	22.4	0.540	0.530	0.495	0.495	0.468

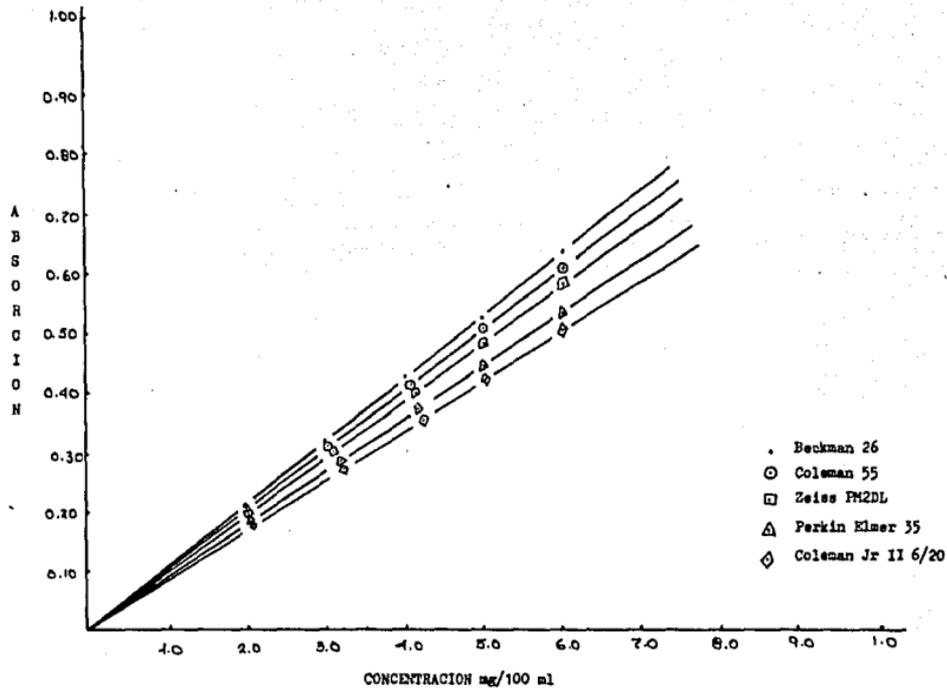


FIG. 56 Linealidad fotométrica empleando $K_2Cr_2O_7$ diluido en H_2SO_4 0.01N a 350 nm en diferentes aparatos.

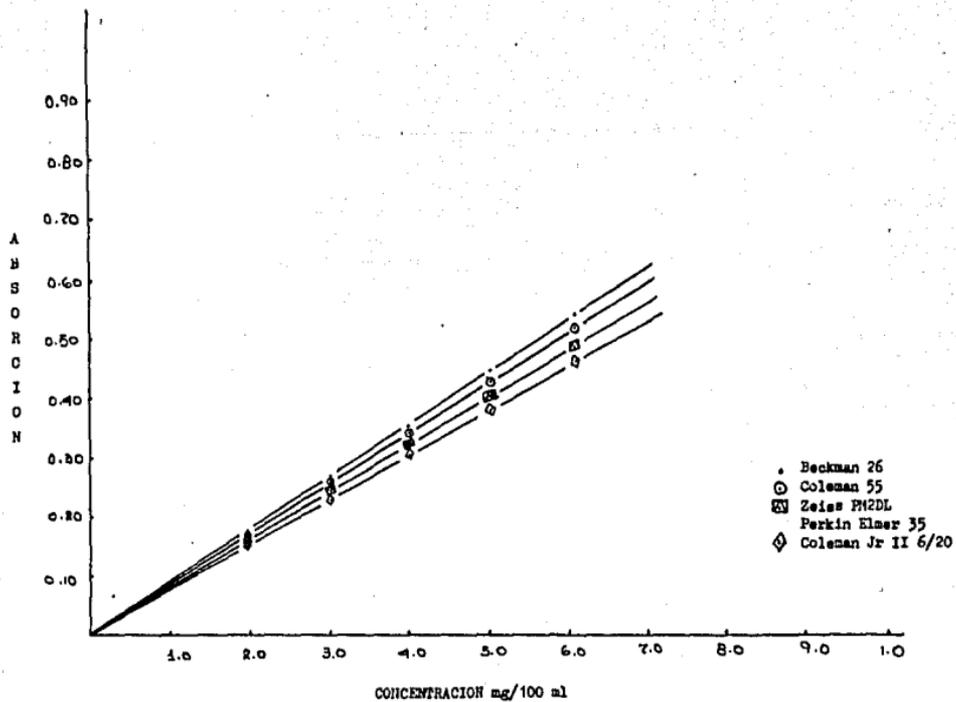


FIG. 57 Linealidad fotométrica empleando $K_2Cr_2O_7$ diluido en H_2SO_4 0.01 N a 365 nm en diferentes aparatos.

CUADRO 7

Solución Naranja de metilo
Longitud de onda - 350 nm

Concentración		Beckman 26	Coleman 55	Perkin Elmer 35	Zeiss FM ₂ DL	Coleman Jr 6/20
mg/dL	mmol/L					
20	0.061	0.14	0.13	0.11	0.12	0.16
40	0.122	0.28	0.26	0.22	0.24	0.30
60	0.183	0.41	0.400	0.34	0.36	0.44
80	0.244	0.54	0.620	0.56	0.48	0.58
100	0.305	0.68	0.650	0.575	0.600	0.70

CUADRO 8

Solución Naranja de metilo
Longitud de onda - 365 nm

Concentración		Beckman 26	Coleman 55	Perkin Elmer 35	Zeiss FM ₂ DL	Coleman Jr 6/20
mg/dL	umol/L					
20	0.061	0.245	0.230	0.17	0.22	0.22
40	0.122	0.480	0.455	0.345	0.435	0.41
60	0.183	0.72	0.695	0.52	0.65	0.60
80	0.244	0.96	0.920	0.69	0.87	0.78
100	0.305	1.195	1.16	0.87	1.110	0.90

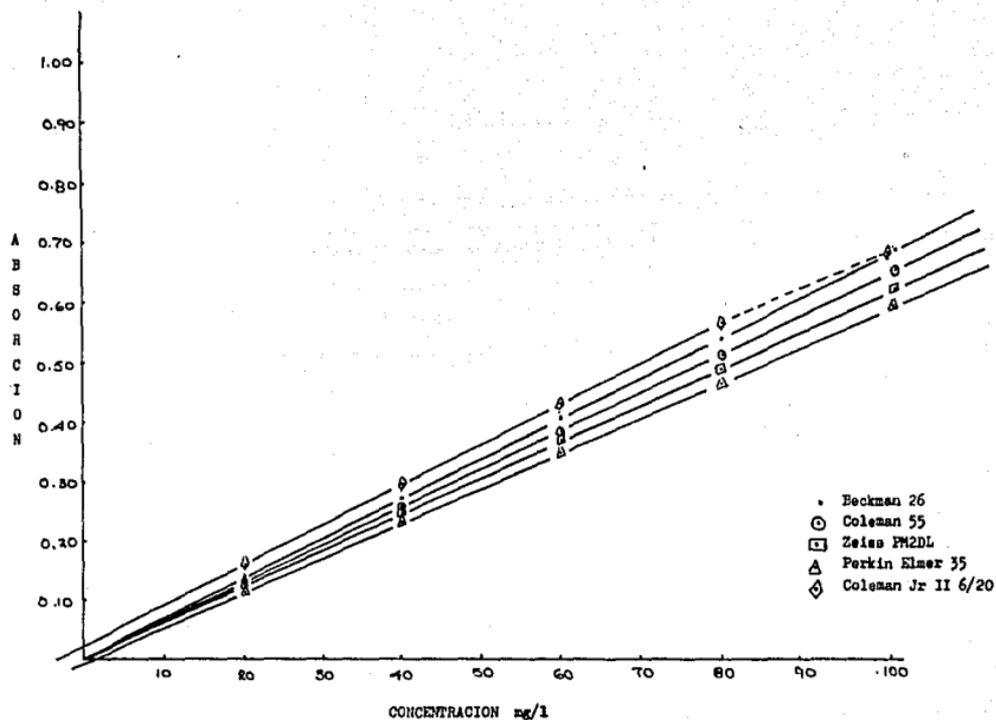


FIG. 58 Linearidad fotométrica empleando Naranja de metilo a 350 mμ, en diferentes aparatos.

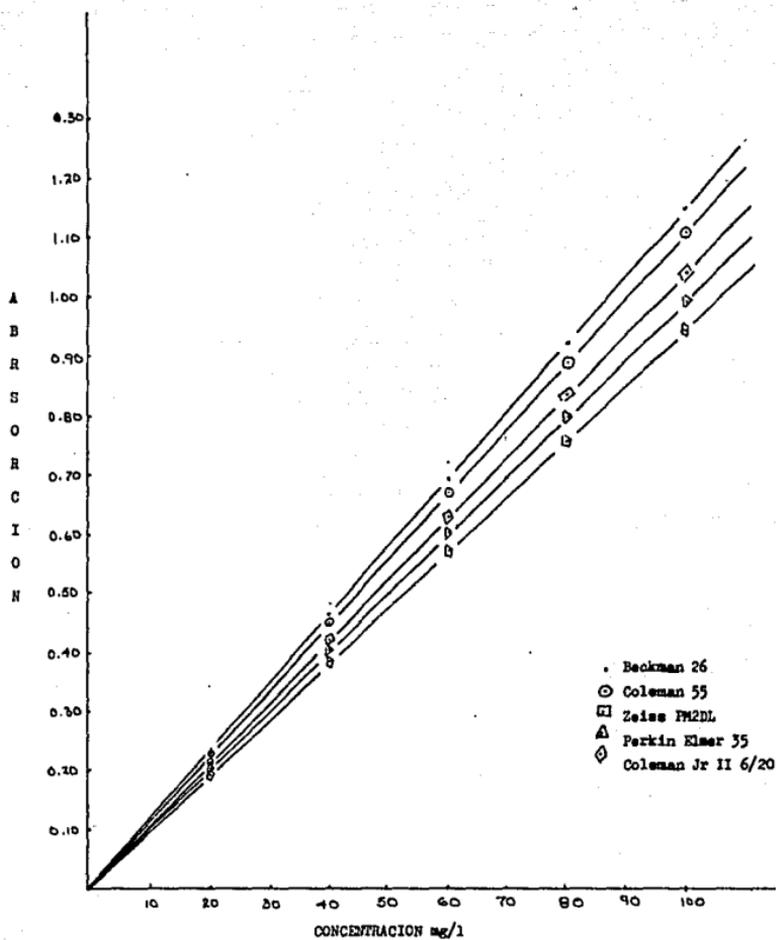


FIG. 59 Linealidad fotométrica empleando Naranja de metilo a 365 nm, en diferentes aparatos.

CUADRO 9

Solución Naranja de metilo

Longitud de onda - 465 nm

Concentración

mg/dL	umol/L	- Beckman 26	Coleman 55	Perkin Elmer 35	Zeiss PM ₂ DL	Coleman Jr 6/20	Leitz
20	0.061	0.11	0.10	0.10	0.10	0.09	0.06
40	0.122	0.22	0.210	0.185	0.205	0.18	0.11
60	0.183	0.33	0.310	0.300	0.305	0.29	0.18
80	0.244	0.44	0.410	0.390	0.410	0.37	0.24
100	0.305	0.55	0.520	0.480	0.510	0.47	0.31

CUADRO 10

Solución Rojo congo

Longitud de onda - 540 nm

Concentración

mg/dL	umol/L	Beckman 26	Coleman 55	Perkin Elmer 35	Zeiss PM ₂ DL	Coleman Jr 6/20	Leitz (550 nm)
20	0.029	0.079	0.07	0.076	0.076	0.075	0.04
40	0.057	0.16	0.15	0.150	0.150	0.145	0.07
60	0.086	0.25	0.25	0.22	0.230	0.220	0.12
80	0.114	0.33	0.32	0.300	0.310	0.290	0.16
100	0.143	0.415	0.39	0.370	0.400	0.360	0.19

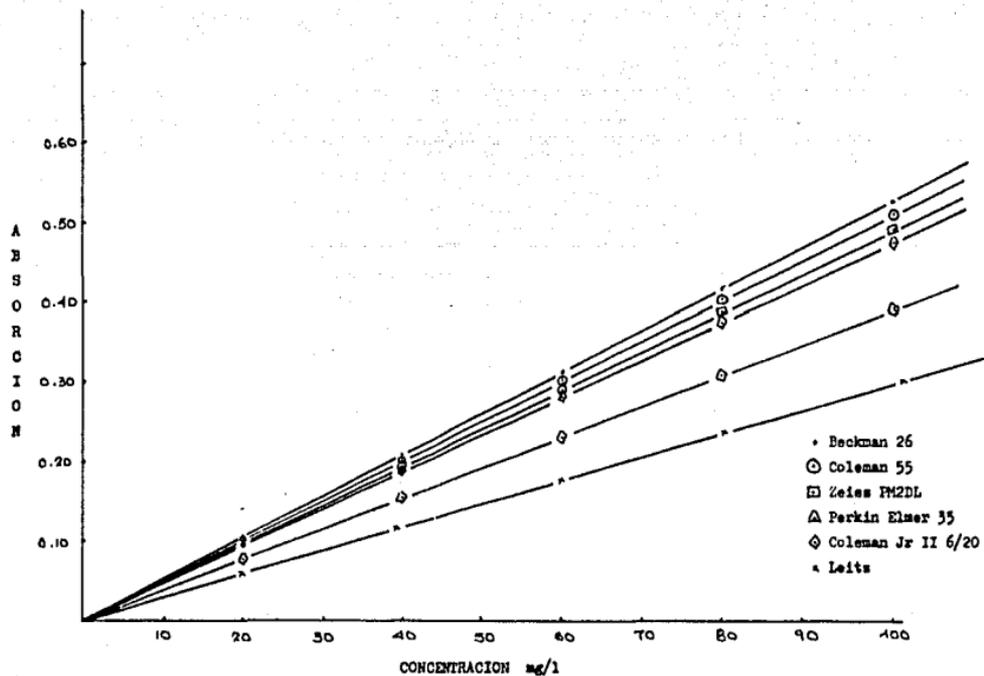


FIG. 60 Linealidad fotométrica empleando Naranja de metilo a 465 nm, en diferentes aparatos.

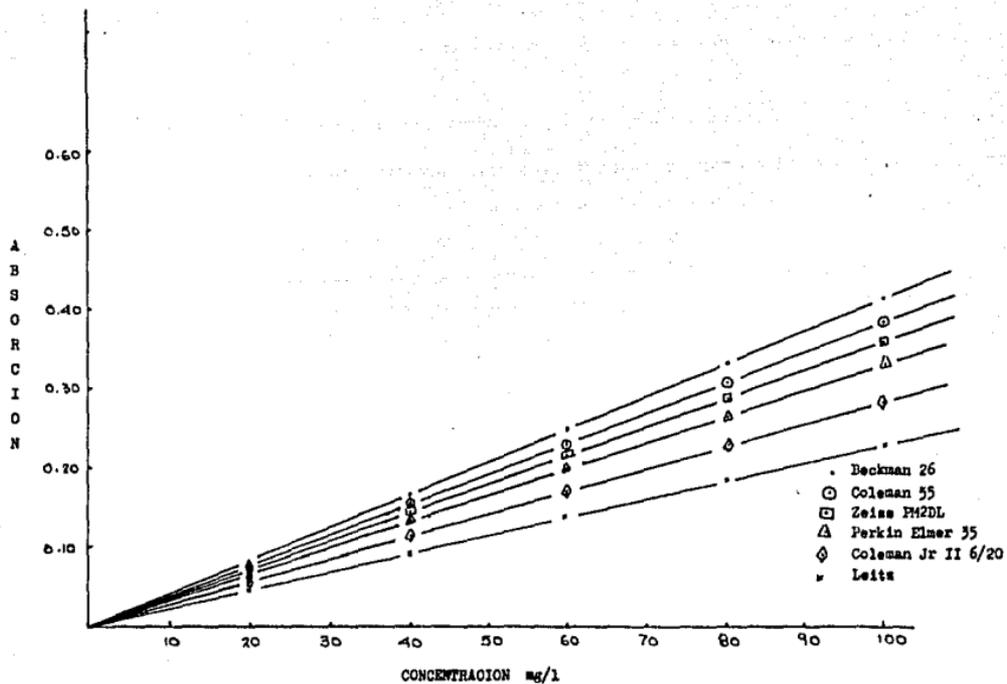


FIG. 61 Linealidad Fotostrica empleando Rojo Congo a 540 mμ, en diferentes aparatos.

CUADRO 11

Solución Glucosa

Longitud de onda - 510 nm

Concentración							Leitz
mg/dL	umol/L	Beckman 26	Coleman 55	Perkin Elmer 35	Zeiss PM ₂ DL	Coleman Jr 6/20	(520 nm)
27.7	1.52	0.10	0.09	0.09	0.09	0.08	0.05
50	2.75	0.105	0.10	0.165	0.16	0.15	0.105
100	5.5	0.375	0.37	0.350	0.36	0.32	0.21
200	11.0	0.76	0.75	0.71	0.70	0.65	0.44

CUADRO 12

Solución Creatinina

Longitud de onda - 490 nm

Concentración							Leitz
mg/dL	umol/L	Beckman 26	Coleman 55	Perkin Elmer 35	Zeiss PM ₂ DL	Coleman Jr 6.20	
0.10	8.84	0.035	0.03	0.034	0.034	0.02	0.02
0.25	22.1	0.08	0.08	0.07	0.075	0.075	0.06
0.50	44.2	0.18	0.17	0.16	0.16	0.14	0.12
0.75	66.3	0.26	0.26	0.23	0.24	0.225	0.19
1.00	88.4	0.35	0.34	0.31	0.33	0.300	0.26

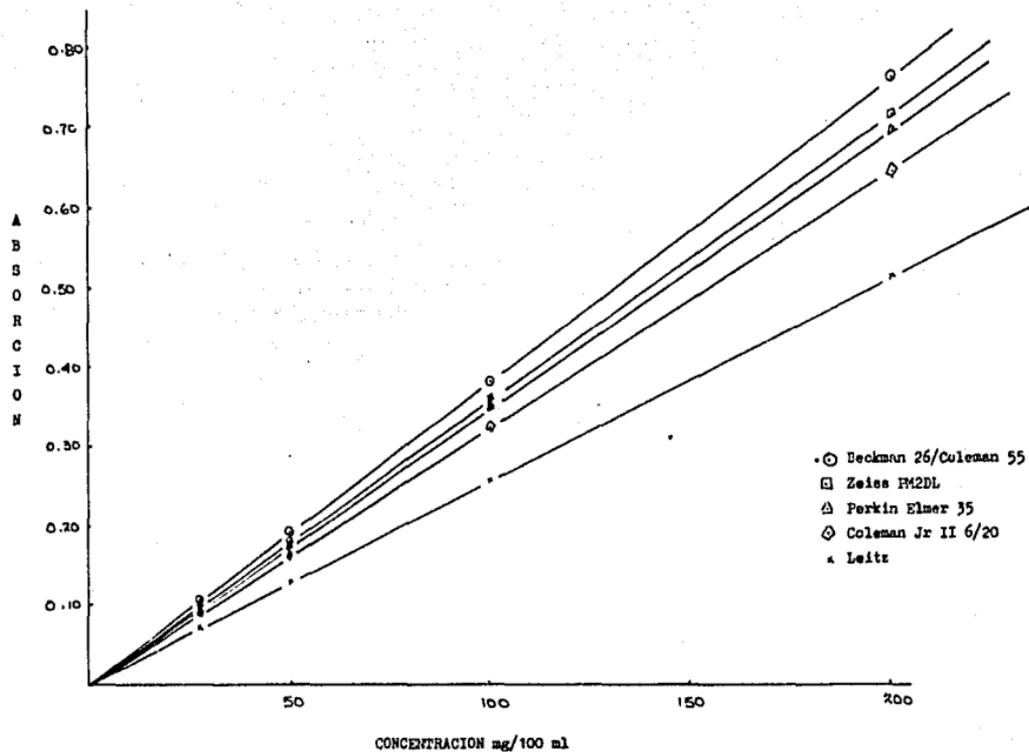


FIG. 62 Linearidad fotométrica empleando Glucosa a 510 nm, en diferentes aparatos. (Glucosa GCD-PAP)

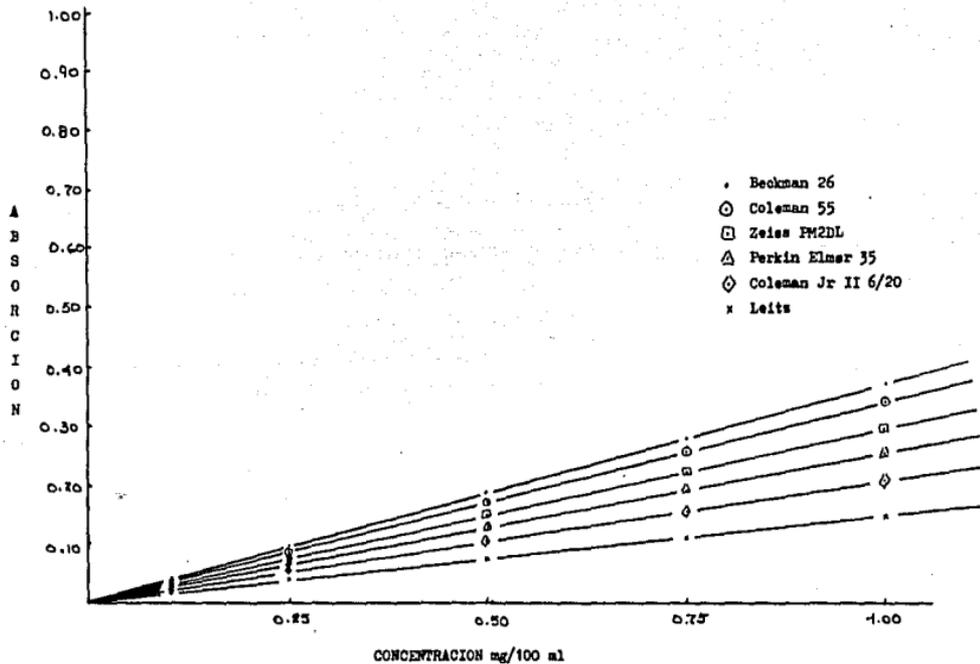


FIG. 63 Linealidad fotométrica empleando Creatinina (Jaffe) a 490 nm, en diferentes aparatos.

CUADRO 13

Solución p-Nitrofenilfosfato

Longitud de onda - 405 nm

Actividad							Leitz
U/L	ukat/L	Bockman 26	Coleman 55	Perkin Elmer 35	Zeiss PM ₂ DL	Coleman Jr 6/20	(415 nm)
10	166.7	0.05	0.05	0.045	0.043	0.044	0.035
20	333.4	0.09	0.09	0.09	0.09	0.08	0.07
30	500.0	0.14	0.14	0.140	0.13	0.12	0.10
60	1000.2	0.29	0.18	0.276	0.27	0.25	0.22
100	1667	0.48	0.47	0.451	0.48	0.41	0.37

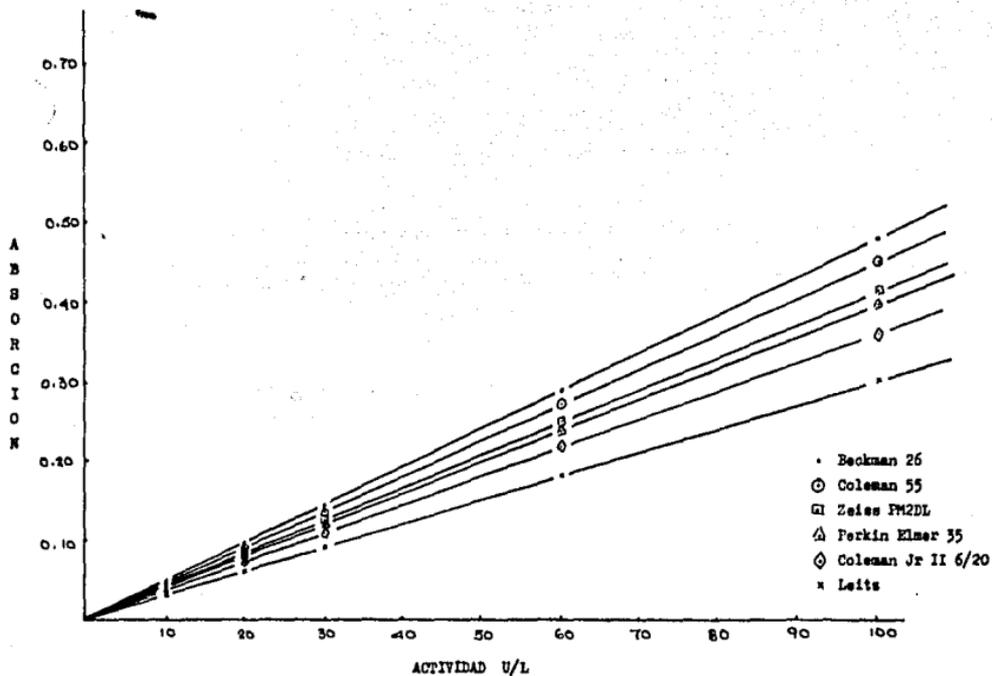


FIG. 64 Linealidad fotométrica empleando p-nitrofenil fosfato a 405 nm, en diferentes aparatos.

en cambio, en el Coleman 6/20 y Perkin Elmer 35 su conducta es diferente y se nota más en cercano U.V., donde su pendiente es inclinada, la respuesta del detector disminuye y por ende no pasa por el origen. Aunque dichas deficiencias no se manifiestan tanto en el Perkin Elmer 35, pues si se observa, a una longitud de onda de 365 nm presenta una recta que verdaderamente parte del origen. Este hecho se explica por ser un aparato de una mejor resolución que el Coleman 6/20, muy semejante al Zeiss PM2DL, sólo que tiene una limitante, que su rango espectral se inicia a partir de 335 nm, lo cual lo hace vulnerable a la luz extraña.

Por otro lado, en la región visible, los aparatos cursan con pendientes que parten del origen, incluyendo el fotómetro Leitz, con soluciones de Naranja de metilo a 465 nm y Rojo congo a 540 nm. Además se emplearon otros tipos de soluciones con el objeto de comprobar su utilidad y verificar la linealidad fotométrica.

La fosfatasa alcalina (405 nm), la creatinina (490 nm) y glucosa (510 nm), todas ellas sus pendientes para cada aparato parten del origen.

Para verificar que los aparatos estén calibrados de acuerdo a los resultados expuestos anteriormente, se desajustó uno de ellos, el Coleman 6/20, notándose una desviación de la pendiente y una disminución de la extinción, empleando las soluciones de Naranja de metilo y Rojo congo. (Fig. 47 y 51)

IV.3 Métodos empleados para la comprobación del ajuste de aparatos.

En el cuadro siguiente se muestran los resultados obtenidos en los diferentes aparatos, utilizando sueros control de valores conocidos Seronorm Routine. Como se puede observar, en cada uno de los aparatos los resultados son muy reproducibles, excepto en el del Coleman 6/20 (desajustado), pues en las determinaciones cinéticas y en métodos que emplean un factor teórico, los valores son bajos. (caso 1, 2, 3, 5, 6 y 8). Sin embargo, si se emplea un patrón de concentración conocida no se nota una diferencia en sus resultados, comparados con aparatos bien calibrados. (COD-PAP/UREA). Es factible que su-

CUADRO 14

No. de Caso		BECKMAN 26	COLEMAN 55	PERKIN ELMER 35	ZEISS FM ₂ DL	COLEMAN 6/20	LEITZ	COLEMAN 6/20*
1	GPT (Cinético) (365 nm)	58 U/L	56 U/L	56 U/L	56 U/L	54 U/L	-----	32
2	GOT (Cinético) (365 nm)	27 U/L	26 U/L	26 U/L	26 U/L	24 U/L	-----	19 U/L
3	LDH (Cinético) (365 nm)	275 U/L	260 U/L	275 U/L	270 U/L	230 U/L	-----	190 U/L
4	GT (Cinético) (405 nm)	34 U/L	32 U/L	31 U/L	30 U/L	28 U/L	-----	18 U/L
5	Fosfatasa alcalina (Punto final)(405 nm)	252 U/L	249 U/L	240 U/L	247 U/L	229 U/L	-----	200 U/L
6	Glucosa (Gluc-DH) (365 nm)	210 mg/100 ml	208 mg/100 ml	206 mg/100 ml	208 mg/100 ml	205 mg/100 ml	205 mg/100 ml	174.5 mg/100 ml
7	Glucosa (GOD-PAP) (510 nm)	227 mg/100 ml	226 mg/100 ml	227 mg/100 ml	226 mg/100 ml	228 mg/100 ml	227 mg/100 ml	222 mg/100 ml
8	Colesterol Enzimático (365 nm)	200 mg/100 ml	201 mg/100 ml	201 mg/100 ml	199 mg/100 ml	200 mg/100 ml	-----	170 mg/100 ml
9	Urea (525 nm)	65 mg/100 ml	65 mg/100 ml	65 mg/100 ml	64 mg/100 ml	63 mg/100 ml	64 mg/100 ml	65 mg/100 ml

* Aparato desajustado.

ceda este efecto, por emplear un patrón que al mismo tiempo se procesa con un problema, por tanto, se trabajan a las mismas condiciones (de pipeteo, tiempo de medición, aparato, tiempo de reacción, etc.) reduciendo el error. Pero si se hubiera utilizado una curva de calibración desarrollada en un Coleman - 6/20 ajustado, encontraríamos resultados muy diferentes, como se aprecia en la determinación de Fosfatasa alcalina.

La selección de la longitud de onda establece el color de la luz que pasa a través de la solución problema y que especifica el valor medio del rango de longitudes de onda que incluyen el haz de luz. Siendo muy importante - que el espectrofotómetro mida exactamente a la longitud de onda deseada, no - sufriendo desviaciones. Para ésto se requiere la calibración constante de dichos aparatos.

Entre los métodos empleados para la calibración de la longitud de onda se cuenta con el filtro de Didimio, encontrando importantes ventajas, ya - que permite en corto tiempo (5 min. máximo) detectar desviaciones de la longitud de onda, por disminución de la fuente de poder o por presencia de polvo - que dañe el sistema óptico. El mínimo de transmisión permitido es hasta ± 2 nm a 585 nm, según lo indica el manual de operaciones Coleman. Efectivamente en contramos que durante un año permanece dentro del rango de aceptabilidad. Des - graciadamente sólo detecta desviaciones a una sola longitud de onda, lo cual es representativo para la región media del espectro visible y sólo es adaptable en algunos aparatos; por otro lado, tiene la desventaja de que sólo se - usan para localizar longitudes de onda de transmisión mínima, que es más difícil que localizar longitudes de onda de transmisión máxima.

Sabemos que para la calibración de la longitud de onda no basta con ajustar a una longitud de onda, se requiere de 2 o más puntos, dependiendo - del tipo de monocromador (prisma o rejilla).

Con el uso del juego de estandares que miden a 3 longitudes de onda: sulfato de níquel 670 nm, sulfato de amonio cobalto 520 nm y perclorato cróico 420 nm, se observa similar conducta al absorber la luz cuando el aparato - está ajustado. (57)

En el caso de un aparato desajustado, a parte de no obtener la misma absorción a diferentes longitudes de onda, se observa una desviación de la - Ley de Beer, al no pasar por el origen (Fig. 30) por inexactitud de la longitud de onda. Esta comprobación se puede apoyar mediante los resultados del - filtro de Didimio y de la solución de sulfato de níquel con una concentración

de 1.0 según recomienda Perkin-Elmer en su reporte de 1975.

Se utiliza la solución de sulfato de níquel, porque produce una banda de máxima transmisión a 510 nm (Fig. 66), permitiendo medir la transmisión - en todo ese rango de longitudes de onda.

La longitud de onda de 510 nm nos permite controlar el ancho de banda, en donde a esa longitud de onda es más alta la energía de la lámpara, y - deja pasar más luz (no absorbe) el estándar. Por lo tanto, la lectura será - del 90% o más. En el caso del aparato desajustado se observa que hay una dis-minución de la luz (lectura 84%) lo cual nos hace pensar que puede ser debido a una abertura de la hendidura, el filamento de la lámpara se haya desgastada o por falta de limpieza del sistema óptico. En este caso se observó que el - filamento de la lámpara, se había desgastado ocasionando una desviación en el haz de luz. Al cambiarse la lámpara la respuesta de ésta fué superior al 90%.

De acuerdo a los resultados obtenidos en un Coleman de 8 nm. (cuadro 2) presenta una banda de máxima transmisión mucho mayor que la de un aparato - de menor sensibilidad, como el Coleman 6/20 (Cuadro 1).

	Máximo de Transmisión 510 nm.
Perkin-Elmer 35	93 - 92.6
Coleman 6/20	90 - 90

Por lo tanto, la exactitud de la longitud de onda se puede comprobar por la máxima transmisión a 510 nm, sea cual fuere el aparato, ya que, una des-viación bajaría la transmisión.

Sin embargo, la calibración y estandarización con soluciones siempre están asociadas con numerosas complicaciones como: pureza química, estabilidad de los estándares y la limitación de sólo adaptarse a algunos aparatos -- que cuenten con portaceldas para celdas redondas (Spectronic 20, 21, Coleman 20, 35, 6/8, Gilfor II).

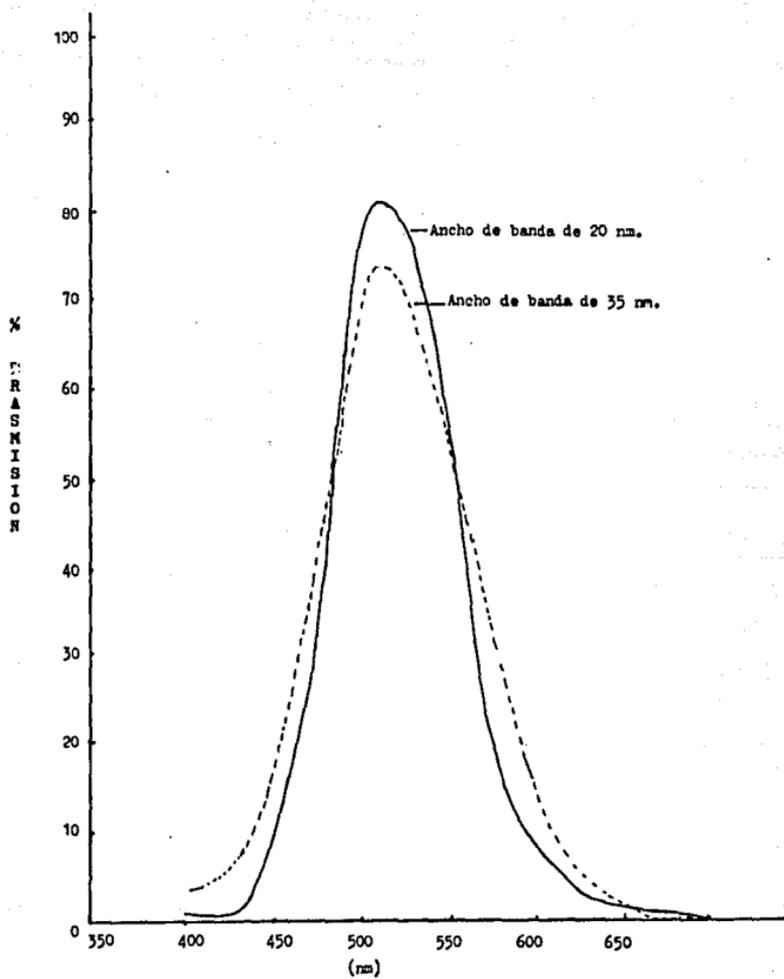


FIG. 66 Curva de transmisión del Sulfato de Niquel

azul de bromofenol a 496.2 nm y encontró que este valor era dependiente de la temperatura al correr el espectro a temperaturas altas y bajas. Desgraciadamente no pudo confirmar dichos resultados. Hoxter por su parte, encontró que los puntos isobstéticos no eran afectados por cambios de temperatura entre 4 y 45°C (5).

Por nuestra parte, sólo empleamos temperaturas de 25°C, 37°C y 40°C, no sufriendo cambios en los puntos. Esto se puede explicar de la siguiente manera:

Las moléculas al absorber el calor, modifican los niveles energéticos, vibracional y rotacional, sin afectar las transiciones electrónicas, las cuales son responsables del espectro de absorción. Por lo tanto, no se espera una desviación de un punto isobstético a causa de cambios de temperatura.

Es importante que las soluciones comparadas (ácido-base) tengan la misma concentración, mas no es preciso conocer la concentración absoluta, - - pues las variaciones en la concentración provocan únicamente un cambio de extinción o absorción sin alterar el punto isobstético. Tampoco es necesario conocer el valor exacto del pH, pues la solución indicadora cruzará por el mismo punto isobstético, independientemente del pH y a la misma concentración.

Para mayor precisión, Hoxter (3) recomienda escoger dos curvas cuyas tangentes tengan un mayor ángulo entre sí, generalmente se emplean valores extremos de pH.

Apoyamos este criterio de precisión, porque permite por una parte, - preparar las soluciones en forma rápida y segura sin necesidad de emplear instrumental adicional (potenciómetro), basta con una varilla indicadora universal (un rango de 1 a 14) y por otro lado, permite detectar claramente el punto de intersección, como se observan en las figuras de la 31 a la 55.

Es interesante advertir la conducta de un aparato desajustado, en - donde se aprecia la desviación que sufre la longitud de onda en base a los - puntos isobstéticos.

En el caso del Coleman 6/20 desajustado, encontramos que dicha desviación se manifiesta notoriamente en ciertas regiones más que en otras, por ejemplo: con el naranja de metilo en la región visible a 470 nm, se ve afectada con una desviación de 5 nm (inexactitud a 475). Sin embargo, con el rojo congo a 543 nm, se observa una desviación de 20 nm (inexactitud a 568 nm) lo cual nos hace suponer que la inexactitud se encuentra aproximadamente entre 540 y 580 nm. Esto puede ser factible cuando se trata de una lámpara que empieza a bajar su poder por desgaste de sus filamentos. Así también, la inexactitud de la longitud de onda sólo afecta en un cierto rango que puede ser visible o U.V.

En el caso de la región U.V., es muy importante controlar la exactitud de la longitud de onda ya que hoy en día muchos de los métodos que se emplean en el campo de los análisis clínicos se trabaja en esta región, como en la Enzimología Clínica, en donde se aplican los métodos de medición continua y que se basa para su determinación en la producción o consumo de la coenzima Nicotinamida adenina dinucleotido (NADH), que tiene la propiedad de formar color en la región de 334 a 365 nm. Cuando hay una desviación de 5 nm, alrededor de 340 nm, dará una diferencia de absorción del 10%, la misma desviación a 465 nm aumentará el error hasta el 50% en la lectura.

Para controlar dicha región se puede escoger el naranja de metilo — que tiene un punto isobéptico a 352 nm, o el dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) que tiene un punto isobéptico a 339 nm.

En el caso de la región de 400 a 450 nm que también se emplea en Enzimología Clínica, se pueden emplear los pares de derivados de la Hemoglobina, como es el caso del par de la metahemoglobina (Hi) y hemoglobina cianuro — (HiCN) que cuentan con un punto isobéptico a 416 nm.

Hoxter (5) y Parthasaraty e I. Sanghi (29), revisaron algunas soluciones indicadoras que se pueden emplear para la calibración de la longitud de onda y que poseen puntos isobépticos (Cuadro 15).

CUADRO 15

Indicador	Punto Isosbético
Naranja de metilo	352, 469
Verde de Bromocresol	265, 277, 329, 509
Rojo neutro	408
Azul de timol (Acido)	485
Azul de timol (Alcalino)	500
Azul de bromotimol	260, 279, 325, 498
Rojo de fenol	238, 273, 322, 365, 514
p-nitrofenol	350
Riboflavim	266, 275, 296, 369, 462
$K_2Cr_2O_7$	245, 297, 339, 445
Púrpura de bromocresol	322, 490

Derivados de Hemoglobina

Hb/HbO ₂	397, 506, 548
Hb/HI	461, 454, 528, 600
Hb/HICN	400, 448, 542
Hb/HbCO	457, 548
Hb ₂ /HbCO	497
HI/HICN	515, 486, 519, 595
HI/HIN ₃	474, 520, 603

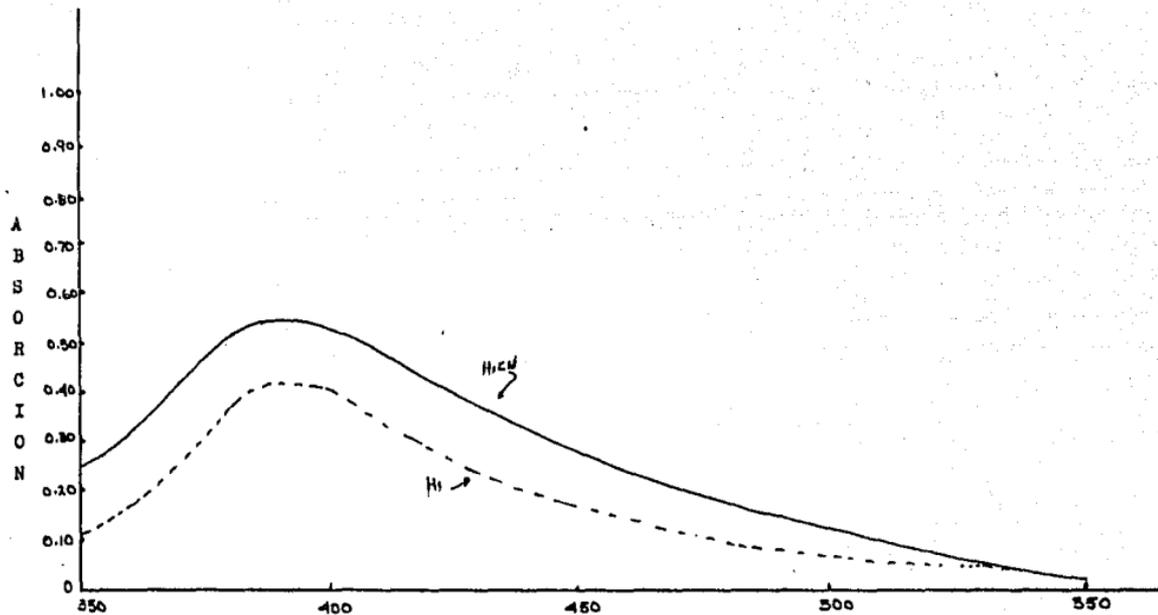
Hb - Desoxihemoglobina
 HI - Hemoglobina (metahemiglobina)
 HICN - Cianometahemoglobina
 HbO₂ - Oxihemoglobina
 HICO - Carboxihemoglobina
 HIN₃ - Azidahemoglobina

Para la práctica será suficiente trabajar únicamente con 4 soluciones -dicromato de potasio, rojo congo, naranja de metilo y azul de bromotimol- y con un par de derivados de hemoglobina-metahemoglobina (H₁)/Hemoglobina cianuro (H₂), las cuales proveen suficientes puntos isobéuticos que abarcan todo el espectro visible y parte del U.V. necesario para las determinaciones enzimáticas. Con estas soluciones se calibraron los espectrofotómetros y se midieron los puntos isobéuticos reproduciéndose de acuerdo a sus valores reportados en la literatura (5, 29, 30).

Las ventajas que ofrece este método es que comprende la determinación de un punto de intersección; esto implica una mayor precisión que la determinación de máximos y mínimos de absorción. En la práctica es fácil trabajar con igualdad de absorciones (puntos isobéuticos), que establecer la longitud de onda exacta a base de máximos o mínimos de absorción. Además, es un método sencillo, fácil de procesar y trabajar, económico y con soluciones muy estables, hasta 8 meses, se pueden utilizar con mayor precisión y exactitud de acuerdo a los resultados obtenidos en el cuadro 4. En el caso de los derivados de hemoglobina la estabilidad se reduce a 3 meses.

Por la oxidación que sufre la Ciano metahemoglobina, a través del tiempo se refleja un cambio de pH ligeramente neutro, de tal modo que presenta un espectro característico similar al de la metahemoglobina, con una banda máxima de absorción de 402 a 408 nm, como se observa en la Fig. 67. No presentando ningún punto de intersección.

A continuación se proporciona una tabla con la aplicación de los puntos isobéuticos en Química Clínica.



LONGITUD DE ONDA, nm.

FIG. 67

Conducta de HI y HICN después de 72 horas.

C U A D R O 16

Determinación	Longitud de onda	Punto isobéptico	
NAD ⁺ — NADH (GOT, GPT, LDH, CK)	340	339	K ₂ Cr ₂ O ₇
p-nitrofenilfosfato, colinesterasa	365	365	rojo de fenol
Glutamyltransferasa, Leucinarilamidasa, Colesterol enzimático.	405	339, 445	K ₂ Cr ₂ O ₇
Creatinina, Acido urico	490	498	azul de bromotimol
Bilirrubina total (Jendrassik-Grof)	578	595	Hi/HiCN
Bilirrubina conjugada	546	541	rojo congo
Magnesio, Glucosa (GOD-PAP)	500	498	azul de bromotimol
Urea (DAM), Proteínas T.	525	520	Hi/HiCN

El estar comprobando mensualmente la exactitud de la longitud de onda, nos permite trabajar con la mayor seguridad que cada aparato presente.

Otra función importante que deben exhibir los espectrómetros, es la relación lineal entre la energía radiante absorbida y la lectura del instrumento. La linealidad fotométrica es un prerrequisito para la exactitud espectrofotométrica, así como, la exactitud analítica.

El Subcomité de Espectrofotometría de la Asociación Americana de Química Clínica recomendó en 1969, el empleo de soluciones preparadas de compuestos apropiados (7). Los compuestos reportados para este propósito incluyen - oxihemoglobina a 415 nm, p-nitrofenol a 405 nm, cianometahemoglobina a 540 nm, sulfato de amonio cobalto a 512 nm y sulfato de cobre a 650 nm (13). Las soluciones que se emplearon en este trabajo son las mismas que se aplicaron para la obtención de puntos isobépticos: K₂Cr₂O₇ con absorciones a 350 y 365 nm, Naranja de metilo a 350, 365 y 465 nm y Rojo congo a 540 nm, además se emplearon estandares de glucosa a 510 nm (Método glucosa oxidasa (GOD-PAP) y de creatinina a 490 nm y la solución de p-nitrofenol a 405 nm. Todos ellos exhiben una linealidad que sigue la Ley de Beer.

El haber aplicado las mismas soluciones para la obtención de los puntos isobélicos y poder calibrar la linealidad fotométrica, se basó en las características que tienen los puntos isobélicos de ser independientes del pH, de la concentración y de la temperatura. Por lo tanto, para que la Ley de Beer no sufra desviaciones, es importante que no exista interacción del material absorbente entre sí (forman complejos), interacción del absorbente con el solvente o interacción del absorbente con sustancias extrañas. De ahí que los resultados que se obtuvieron, empleando el punto de intersección, formen una línea recta que parte del origen. Permitiendo de esta forma detectar errores de precisión o por mal funcionamiento del detector. Así como, reconocer limitaciones de la respuesta del detector, como es el caso del Coleman 6/20 y Perkin Elmer 35, con la solución de naranja de metilo a 350 nm (Fig. 58), en donde es especialmente problemático, debido a la baja producción de energía de la lámpara excitadora ocasionando que se desvíe del origen, facilitando la intervención de luz extraña, sin embargo, a 365 nm (Fig. 59) sólo en el Coleman 6/20 se observa una baja respuesta del detector.

Las ventajas que ofrecen las soluciones coloridas para certificar la respuesta lineal del detector son: su estabilidad (se pueden emplear hasta por 8 meses), su confiabilidad, su fácil uso y aplicación en cualquier tipo de espectrómetro, economías y por último, se pueden emplear para calibrar en cualquier región del espectro visible y cercano U.V.

Y como último parámetro, bajo estudio que definitivamente es importante por su complejidad y que a simple vista no se puede detectar es la presencia de la desviación de la luz (luz extraña).

Normalmente se manifiesta la presencia de luz extraña en los extremos del espectro visible, es decir, a longitudes de onda corta (360 - 400 nm) y larga (670 - 700 nm).

Existen varios métodos para la detección de la luz extraña (34) de los cuales se emplearon dos que son sencillos y rápidos. (58)

El primero de ellos es a base de un estándar de concentración conocida de NiSO_4 calibrado, que por su propiedad anteriormente citada, puede leerse en los de la región visible (Fig. 66) a 400 y 700 nm.

Los incrementos que se observen en las lecturas a estas longitudes de onda indicarán incrementos en la luz extraña. Un incremento mayor de $3\%T$ demanda la solucitud del servicio técnico especializado (38).

En el caso del aparato desajustado, se observa que así como la respuesta del aparato disminuye ($34\%T$) hay un notable aumento de la transmisión en los extremos del aparato de $5\%T$ a 400 nm y $8\%T$ a 700 nm, lo cual indica la presencia de luz extraña.

Este tipo de método a base de un estándar de NiSO_4 que controla la luz extraña es poco asequible, poco económico y con una estabilidad de aproximadamente 2 años, lo cual no en todos los laboratorios, tanto de instituciones como privados, los pueden adquirir.

Es necesario buscar un método que nos permita detectar la presencia de la luz extraña en forma práctica y económica. Slavin (34) propone el uso de la Ley de Beer, para la detección de la luz extraña instrumental, donde sufre desviación la Ley de Beer, en absorciones altas (altas concentraciones) a cualquier longitud de onda.

En las figuras 58 y 59, se demuestra la desviación de la Ley de Beer, empleando una solución de Naranja de metilo a 2 longitudes de onda 350 y 365 nm. En el caso de la figura a 350 nm, se observa que el Coleman 6/20 sufre desviación a absorciones altas (a partir de 0.55 A - línea punteada), lo cual no se observa en los demás aparatos. Únicamente no parte del origen el Coleman 6/20 y Perkin Elmer 35, y esto es factible ya que se está midiendo un rango inicial de longitudes de onda, donde es la interferencia por luz extraña.

En el caso de la Fig. 59, se observa que en el Coleman 6/20 sufre desviación de la Ley de Beer, a absorciones superiores de 0.675, lo cual es muy importante tomar en cuenta al momento que se valoren métodos cinéticos o

enzimáticos a 365 en dicho aparato, ya que se tendrá un error apreciable (de 10 - 20%) en valores altos de absorción o extinción, como se puede observar - en el cuadro 14. Solamente en un aparato de menor sensibilidad existe una variación mayor comparando con aparatos más sensibles.

En el cuadro 14, se comparan los valores obtenidos de una misma de-terminación en diferentes aparatos, observándose que en aparatos menos sensi- bles tendran resultados más bajos que si se realizan en aparatos de mayor sen- sibilidad. Y ésto en parte se debe a que en los extremos del espectro del -- aparato existe la interferencia por luz extraña.

Por otro lado, empleando la curva de $K_2Cr_2O_7$ a 365 nm (Fig. 57), en- contramos que todos los aparatos cumplen con la Ley de Beer y parten del ori- gen sin sufrir desviación.

Contrariamente a lo que sucede con naranja de metilo que sufre des- viaciones a altas concentraciones, se trabajó con una curva de $K_2Cr_2O_7$ de ma- yor concentración, es decir, de 10 mg/dL como máxima concentración, encuan- do los siguientes resultados Fig. 65. Comienza a haber una pequeña desvia- ción a partir del Perkin Elmer 35 y Zeiss PM₂DL, sin embargo, en el caso del Coleman 6/20 la desviación que sufre es a partir de la concentración de 8 mg/ dL, lo cual nos hace pensar que se deba dicha desviación por la presencia de luz extraña. Por lo tanto los límites de confiabilidad y exactitud para los aparatos en los rangos cercanos al U.V., variarán de acuerdo a su sensibili- dad, de esta manera existirá mayor error cuando se mida a una extinción mayor de 0.5 en el Coleman 6/20 y de 0.65 en el caso del Perkin Elmer 35 y Zeiss -- PM₂DL, o dicho en otra forma el límite de mayor riesgo en donde se presente - la luz extraña sería a partir de 0.5 en el Perkin Elmer 35 y Zeiss PM₂DL. En el caso de los otros aparatos no hay presencia de luz extraña.

Este tipo de control de la luz extraña se hace normalmente cada mes o 2 meses de acuerdo al uso que se le dé al aparato.

Para comprobar que los diferentes tipos de métodos que sugerimos pa- ra el control de los espectrómetros y fotómetros son confiables y seguros se

realizaron varias determinaciones tratando de abarcar todo el rango visible y cercano al U.V., empleando métodos enzimáticos para la valoración de sustrato, métodos de medición continua y de punto final, algunos utilizan factor teórico y otros un estandar de concentración conocida. De acuerdo al cuadro 14, - los resultados que se obtuvieron presentan buena correlación entre un aparato y otro. Esto nos permite confiar en los resultados al comprobar que los aparatos se encuentran en buenas condiciones y su respuesta es excelente.

Sin embargo, cuando se trabaja con un aparato desajustado se observa que los resultados son más bajos llegando hasta un 25% de variación, cuando - se emplean factores de cálculo teóricos como es el caso de la medición continua o métodos enzimáticos para determinar sustratos (Colesterol y Glucosa - - GLUC-DH) Cuadro 17, pero, cuando se utiliza un método que incluye un estandar de concentración no se aprecia dicha variación, siendo comprensible ya que el estandar es valorado al mismo tiempo que los problemas, logrando de esta forma minimizar el error propio humano, como de aparato. Cuadro 18.

CUADRO 17

Determinación	Factor Teórico mg/100 ml		% Variación
	Ajustado	Desajustado	
Glucosa (GLUC-DH)	205	174.5	25
Colesterol enzimático	200	170	25

CUADRO 18

Determinación	Estandar mg/100 ml		% Variación
	Ajustado	Desajustado	
Glucosa (GOD-PAP)	228	222	2.5
Urea (DAM)	63	63	0

Ahora bien, si se tratara con una curva de calibración definitivamente se observaría una variación similar a la del empleo de factor teórico, entre un aparato desajustado y un ajustado.

En el siguiente ejemplo se valoró la Glucosa (GCD-PAP) en un aparato ajustado y otro desajustado, con una curva de calibración hecha en el espectrofotómetro ajustado y empleando como problema un estandar de concentración conocida de 100mg/dl. Cuadro 19.

CUADRO 19

	Coleman Jr II 6/20 Extinción 510 nm		Interpolando en la Curva de Calibración Concentración mg/100ml		
	Ajustado	Desajustado	Ajustado	Desajustado	% Variación
Estandar	0.340	0.280	103	85	17
Estandar	0.330	0.270	100	82	18

De esta forma se concluye la importancia de tener un espectrofotómetro o fotómetro calibrado, ya que del buen mantenimiento que se le dé se obtendrán los resultados más exactos y confiables.

El proceso de la calibración espectrofotométrica es fundamental en los procedimientos químico clínicos. Los resultados que se obtengan dependen del control que se tenga del instrumento.

Aunque se emplee el mejor método para la determinación de un analito o enzima, lógicamente, un espectrofotómetro o fotómetro mal calibrado dará una respuesta inexacta.

Normalmente para la calibración de la exactitud de la longitud de onda y linealidad fotométrica, se emplean, ya sea filtros comerciales, lámpara o soluciones estandares calibradas a longitudes de onda específicas. Lamentablemente, dichos utensilios son poco asequibles, de alto costo y específicas a cierto tipo de aparatos. (Coleman Jr II y III).

De acuerdo a los resultados obtenidos, el empleo de los puntos isosbéticos a base de soluciones indicadoras para la calibración de la exactitud de la longitud de onda, es un método exacto, de fácil manejo, práctico y de bajo costo, que al mismo tiempo se puede utilizar para la calibración de la linealidad fotométrica.

Por otro lado, se ha comprobado que dicho método se adapta a cualquier tipo de espectrofotómetro, desde el aparato más sencillo, hasta el más sofisticado que podamos encontrar.

Resulta ventajoso el emplear las soluciones indicadoras, considerando que cada día surgen nuevos aparatos y que definitivamente es necesario controlarlos y mantenerlos en óptimas condiciones.

La estabilidad de las soluciones indicadoras es de aproximadamente 9 meses a temperatura ambiente.

Podemos concluir, que el empleo de los puntos isosbéticos se puede considerar como un método alternativo para la calibración de la longitud de onda y la verificación de la linealidad fotométrica.

Causas de desajuste del espectrofotómetro.

Medio Ambiente

En un laboratorio sucio donde el instrumento está expuesto a solventes volátiles como: HCl, HNO₃, NH₄Cl, entre otros, o humo de cigarro, son causas de un desajuste del aparato; ya que éstos cubren las paredes del compartimento de las celdas, el sistema óptico y las fuentes de poder. A menudo los solventes volátiles absorben en la región UV ocasionando aumento del ruido y esto reduce la sensibilidad.

Mayor humedad y temperatura causan condensación del agua en la superficie óptica, lo cual resulta un desajuste del instrumento. Así también afectan algunos de los componentes electrónicos.

Fuente de Poder

Excesivas fluctuaciones en la fuente de poder podrían causar inestabilidad en el instrumento y un desajuste en el funcionamiento. Las causas de estas fluctuaciones podrían ser una inadecuada línea de poder AC o una sobrecarga de éste mismo.

Envejecimiento de la Lámpara

El envejecimiento de la lámpara causará reducción en la energía, lo cual disminuirá el funcionamiento e incrementará el nivel de ruido y la luz extraña.

Ajuste

Un desajuste de la lámpara después de su instalación causa pérdida de energía y presencia de ruido. Así también un mal ajuste de la celda en el haz de luz causa pérdida de energía. Cuando se emplean microceldas o celdas

de flujo es muy importante este ajuste.

Tiempo de Calentamiento

Es necesario que a cada instrumento se le de un tiempo de calentamiento, de no ser así puede falsear los resultados.

Manejo de Muestra

Causan mal funcionamiento del instrumento la inestabilidad química, un método inadecuado y celdas sucias o rayadas.

Envejecimiento del Instrumento

- 1.- La pérdida de energía es ocasionada por desgaste óptico, un medio sucio y una mayor humedad.
- 2.- El envejecimiento de los componentes electrónicos desajustan el el aparato.
- 3.- Existen fallas en su funcionamiento con el envejecimiento del - fotodetector o exposición a la luz ambiental. También la presencia de humedad causa error fotométrico.

Cuidado del Instrumento.

Para obtener el máximo rendimiento de los instrumentos el laboratorio debe seguir las recomendaciones de las compañías de éstos y verificarlos diariamente. En caso de tener alguna falla debe ser atendida por personal de ser vicio altamente calificado.

Definición de términos empleados en espectrofotometría.

Absorción.- absorción (A) es igual a \log_{10} del recíproco de la transmisión (T)

$$A = \log_{10} (1/T)$$

Ej. T = 10%

$$A = \log_{10} \frac{1}{10\%}, \quad A = \log_{10} \frac{1}{0.1} = \log_{10} \frac{10}{1}$$

por tanto: A = 1 absorción

Si T = 40%

$$A = \log_{10} \frac{1}{40\%}, \quad A = \log_{10} \frac{1}{0.4} = \log_{10} 2.5$$

por tanto: A = 0.398

Si T = 4%

$$A = \log_{10} \frac{1}{4\%}, \quad A = \log_{10} \frac{1}{0.04} = \log 25$$

por tanto: A = 1.398

Si T = 0.4%

entonces A = 2.398

Absortividad (a).- la absorción (A) dividida por el producto de la concentración (c) de la sustancia y el paso de luz de la muestra -
(b) o $a = \frac{A}{bc}$.

Ancho de banda espectral.- el intervalo de longitud de onda en donde la radiación sale de la abertura de salida de un monocromador a la mitad de camino entre la base lineal y el pico de paso de banda.

Ancho de banda natural.- es la anchura a la mitad de la altura de la banda de absorción de la muestra. Es independiente de las anchuras de banda del instrumento.

Anchura de abertura espectral.- la anchura mecánica de la abertura de salida, dividida por la dispersión lineal en el plano de abertura.

Banda de absorción.- es una región del espectro de absorción en el cual la absorción pasa a través de un máximo.

- Concentración (c).- cantidad de sustancia contenida en una cantidad de muestra.
- Corrección de fondo.- absorción aparente causada por cualquier otra cosa que no sea la sustancia medida.
- Curva analítica.- es la representación gráfica de la relación entre la energía radiante y la concentración de la sustancia absorbente.
- Dispersión.- es la separación de la luz en sus componentes, longitudes de onda. La dispersión se logra por medio de un prisma o rejilla de difracción.
- Energía radiante.- energía transmitida como una onda electromagnética.
- Energía radiante extraña.- toda energía radiante que sale del detector a longitudes de onda que no corresponden a la banda de longitud de onda seleccionada.
- Espectro de absorción.- una gráfica entre absorción contra longitud de onda.
- Exactitud.- La concordancia del valor hallado del valor esperado o teórico.
- Exactitud fotométrica.- es la habilidad para indicar la lectura correcta de la energía que emerge del detector.
- Filtro.- es una sustancia que permite atenuar o reducir la energía radiante en una manera definitiva en algunas porciones del espectro más que en otros.
- Hertz (Hz).- la unidad de frecuencia es igual a un ciclo por segundo.
- Ley de Beer.- la absorción de una muestra homogénea es directamente proporcional a la concentración de la sustancia absorbente.
- Ley de Bouguer.- la absorción de una muestra homogénea es directamente proporcional al espesor o densidad de la muestra y al tamaño de la celda.
- Ley de Lambert-Beer.- la absorción de una muestra homogénea que contiene sustancia absorbente es igual a la absorptividad molar (a), al paso de luz (b) y a la concentración de la sustancia absorbente (c) o $A=abc$.
- Linealidad fotométrica.- la habilidad de un sistema fotométrico para producir una relación lineal entre la energía radiante que incide sobre su detector y algunas cantidades medibles provistas por el sistema.
- Longitud de onda (λ).- la distancia medida a lo largo de la línea de propagación de la onda entre dos puntos que están en la fase de ondas adyacentes.
- Longitud de onda analítica.- cualquier longitud de onda a la cual la medida

de la absorción o transmisión se realiza con el fin de determinar culitativamente o cuantitativamente una muestra.

Monocromador.- un dispositivo que permite seleccionar una porción del espectro generado desde una apropiada fuente de energía.

Nanometros (nm).- unidad de distancia que es igual a 10^{-9} metros. Empleado - en espectrofotometría U.V-visible a longitud de onda designada.

Paso de luz.- es la dimensión del diametro interno de la celda o densidad o espesor que recorre el paso de luz.

Posición espectral.- la longitud de onda efectiva de una haz monocromático - de energía radiante.

Repetibilidad.- la medida de la desviación de cualquiera de los valores de - su valor medio, todas las determinaciones son medidas sucesivamente y sin cambio de aparatos o material.

Reproducibilidad.- la medida de la desviación de los resultados obtenidos de su valor medio, las determinaciones siendo llevadas a cabo por diferentes operadores empleando aparatos localizados en diferentes laboratorios.

Resolución espectral.- la habilidad de medir la separación de dos bandas de absorción adyacentes o líneas de emisión expresadas como la relación entre $\frac{\lambda}{\Delta\lambda}$, donde λ es la longitud de onda examinada, y $\Delta\lambda$ es la separación de dos bandas de absorción o emisión que pueden ser distinguidas.

Transmisión.- la relación entre la energía radiante transmitida por la muestra a la energía radiante que incide sobre la muestra.

- 1) Rand, R.H.: Practical spectrophotometric standards, Clin. Chem. 15, 839-863 (1969).
- 2) Mann K. Charles, Vickers J. Thomas, Gulick M. Wilson: Instrumental Analysis, Harper, Row Publishers, N.Y. (1974) Pag. 315-316.
- 3) Frings C.S.: Use of Deuterium and Hidrogen Lamps in checking wavelength accuracy, Clin. Chem. 17, 568 (1971).
- 4) West, N.A. and Kemp. D.R. Practical standards for U.V. absorption and - fluorescence spectrophotometry Am. lab. 9, 37-49 (1977).
- 5) Hoxter, G.: Suggested Isosbestic Wavelength calibration in clinical analysis, Clin. Chem. 25, 143-146 (1979).
- 6) Model 35 Spectrophotometer, Coleman Instruments Division 2000 York Road, - Oak Brook, Illinois 60521, September 1978. Perkin Elmer, Part 5.
- 7) Frings C.S. and Broussard A.L.: Calibration and Monitoring of Spectrometers and Spectrophotometers, Clin. Chem. 25, 1013-1017 (1979).
- 8) H.A. Strobel.: Instrumentación Química Editorial Limusa, México 1979.
- 9) N.W. Química Clínica Moderna Interamericana, S. A. de C. V., México 1a. Edición (1972).
- 10) Cannon, D.C., Henry J.R. y Wilkeman W.J.: Clinical Chemistry, 2a. Ed. - Harper & Row Publishers N.Y. (1972).
- 11) Control de Calidad en Lab. Clínico. J.B.P. Martha Gurria Rafels (1979)
- 12) Leaveil S.B. Y Thorur A.O. Hematología Clínica, 4a. Edición, Interamericana México (1978)
- 13) Frings, C.S. Muscat, V. and Waldrop, N.T., Convenient method for checking detector response of spectrophotometers at three wavelengths, Clin. Chem. 22, 101-102 (1976).
- 14) Keith J. Ellis and John F. Morrison., Some sources of errors and artifacts in Spectrophotometric Measurements. Clin. Chem. 21, 776 (1975).
- 15) E. Merck Darmstadt, Clinical Laboratory, 11a Edición, Medico-Chemical Investigation Methods, F.R.G. (1974)
- 16) Servicios informativos de Merck-México, S. A.
- 17) D. Stamm, Reference Materials and Reference Methods in Clinical Chemistry J. Clin. Chem. Biochem, 17, 283-297 (1969).
- 18) E. Merck Darmstadt, Diagnostica Merck, Garantía de Calidad, R.F. de Alemania (1980)

- 19) Wernimont, G. Evaluating laboratory performance of spectrophotometers, *Anal. Chem.* 39, 554-562 (1967).
- 20) Sooler, M.F.: Laboratory performance of spectrophotometers, *Am. J. Clin. Pathol.*, 61, 789-798 (1974)
- 21) Henry J.R., M.D.: *Clinical chemistry principles and technics*, Hoeber Medical Division, Harper & Row Publishers (1964)
- 22) Todd Sanford: *Diagnóstico clínico por el laboratorio*, 6a Ed. Salvat Editores, S. A. (1978)
- 23) J.W. Eichinger, Jr.: *Introducción y fundamentos enlaces químicos*, 2a Ed. Publicaciones cultural, S.A. (1972)
- 24) Barrow, *Química Física*, 2a. Edición, Editorial Reverté, S. A., Tomo I, -- (1972)
- 25) Dra. Horcasitas Pozas R., Dr. Moguez J.A., *Espectroscopia*, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas I.P.N. México (1979)
- 26) *Manual de Espectrofotometría I*, Merck México, S. A., Departamento de información y capacitación, (1981).
- 27) Fortune and Mellon, A Spectrophotometric Study of Certain Neutralization Indicators, *J. Am. Chem. Soc.* 60, 2607 (1938)
- 28) N.V. Parthasarathy e J. Sanghi, A simple technique for the calibration of the wavelength scale of spectrophotometers, *Nature* 182, 44 (1958).
- 29) Hoxter G., Calibracao da escala de ondas de espectrofotómetros para uso clínico.
- 30) Wallace R.B., A spectrophotometric study with neutralization indicators, *J. Am. Chem. Soc.* 46, 589 (1924)
- 31) Fog J., Calibration of the wavelength scale on spectrophotometers by the indicator method, *Scand J. Clin. Lab. Invest.* 320, 14 (1962).
- 32) Slavin Walter, Stray Light in Ultraviolet, Visible and near Infrared -- Spectrophotometry, *Anal. Chem.* 35, 561 (1963)
- 33) Pauta provisional (1979) de lista de especificaciones de espectrómetros en Química Clínica por el Panel de Expertos de Instrumentación de la Federación Internacional de Química Clínica, *Bioquímica* 22, 748 (1980).
- 34) Guidelines for Photometric Instruments for Measuring Enzyme Reaction Rates - Instrumentation Guidelines Study Group, Subcommittee on Enzymes, Committee on Standards, American Association for Clinical Chemistry, -- *Clin. Chem.* 23, 2160 (1977).
- 35) H.D. Herrera E. Milo, Control de calidad en el laboratorio clínico, *Comi*

- 18 Panamericano de la Sociedad Americana de Patología Clínica (ASCP) 1980 American Society of Clinical Pathologists, Inc., Bogota, Colombia.
- 36) Perkin Elmer, A procedure for monitoring the performance parameters of - Coleman 20 and 35 nm bandpass spectrophotometers, Coleman technical Report T-198B, April 1975.
 - 37) Chaaran, M.S., Keiser Ralph, Maintaining optimum spectrophotometer performance reprint from American Society of Clinical Pathologists, Technical Improvement service, No. 27.
 - 38) Proposed recommended practice for describing and measuring performance of spectrophotometers, Philadelphia, PA: American Society of Testing Materials Committee, E-13, 1-25, 1963.
 - 39) Standard recommended practice for describing and measuring performance of spectrophotometers in Analytical Methods of Spectroscopy, Philadelphia, PA: American Society of Testing Materials Committee, E-13, Annual Book of ASTM Standards, 193-212, (1974)
 - 40) Meinke WW.: Standard reference material for clinical measurements. Anal. Chem. 43, 28A - 47A (1971).
 - 41) Beeler MF: Laboratory performance of spectrophotometers, Results of a -- national survey. Am. J. Clin. Pathol. 61, 789-798 (1974)
 - 42) Denny RC.: A dictionary of spectroscopy, London, Mac Millan Press, Ltd, pag. 1 - 161 (1973)
 - 43) Standar method of estimating stray radiant energy (E397-73), in Analytical Methods of spectroscopy, Philadelphia, PA, American Society of Testing Material Committee, E-13, Annual book of ASTM Standards, pag. 291-302 (1974)
 - 44) Mac Donald RP., Uses for holmio oxide filter in spectrophotometry, Clin. Chem. 10, 1117-1120 (1964)
 - 45) Directions for Didymium calibrating standard, Oak Brook, Il., Coleman Instruments Division, No. 6-409, D-241R (1972)
 - 46) Hennis O. Schultz JL.: Spectrophotometry in analytical coordination chemistry section: Summary of Activities, July 1969 to June 1970, technical note 544, Washington, D.C., National Bureau of Standards, pag. 3-41 (1970)
 - 47) Standars definitions of terms and symbols relating to molecular spectroscopy (E-131-71), in Manual on Recommended Practices in Spectroscopy, Philadelphia, PA., American Society of Testing Materials Committee E-13, pag. 10-34 (1969)
 - 48) Use W. Drews, Mort Ch. Limitations in using Photometric Accuracy Standards Coleman Instruments Division, Oak Brook Il, (1977)

- 49) G.W. Ewing, Instrumental methods of Chemical Analysis, Mc Graw-Hill Book Co. 1969.
- 50) Ed. J.D. Winetordner, Spectrochemical Methods of Analysis, Vol. 3 Wiley Interscience 1971.
- 51) H.H. Willard, L.L. Merrit Jr., Instrumental Methods of Analysis, J.A. Dean-Van Nostrand Co. 1974.
- 52) C.H. Rao - Applications of Ultraviolet and visible spectroscopy - Butterworths (1975) London.
- 53) J.M. Brewer, A.L. Pesce, R.B. Ashorth., Experimental Techniques in Biochemistry, F.W.B. Prentice Hall, Foundation of Modern Biochemistry Series (1974).
- 54) Williams y Fleming, Métodos espectroscópicos en Química Orgánica, Ediciones Urno (1968).
- 55) J. McLoirney and W. Blavin, A wavelength standard for Ultraviolet-Visible-near infrared spectrophotometry.. Applied Optics Vol. 1, 3, 365-367 (1962)
- 56) Frings, G.S., Use of deuterium and hydrogen lamps in checking wavelength accuracy. Clinical Chemistry, 17, 568 (1971)
- 57) Eldridge, P.H., Beetham, R. recommended procedures for checking wavelength, absorption and linearity calibration and stray light of visible and ultraviolet spectrophotometers. Assoc. of Clinical biochem, pag.15-21 (1986)
- 58) Standard method of estimating stray radiant energy of spectrophotometers American Society of testing material, E 387-72 (reapproved 1977), 300-317.
- 59) Vandenberg, J.H. and Sparlock, C.H. Collaborative study of the performance of Cary spectrophotometers. J. of the Optical Society of America, Vol. 45, 11, 967-970 (1955)
- 60) M.W. Burke, M.V. Smith, L.J. Powell, and K. Lavrodineanu. Performance characteristics of NBS glass and metal-on-quartz transmittance standards. Am. Laboratory, 67-76 (July 1986).