

INCORPORADA A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

• OBSERVACIONES EN ESPECTROFOTOMETRIA.

T E S I S

Que para obtener el título de.
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

p r e s e n t a :
GRACIELA CASILLAS DELGADO



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

75

BIBLIOTECA C. QUIMICAS



OBSERVACIONES EN ESPECTROFOTOMETRIA.

GRACIELA CASILLAS DELGADO

GUADALAJARA, JAL.

1963

11773

Con cariño a mis Padres, a quienes me dabo.

A mis hermanos, a quienes admiro.

A mis maestros, con respeto y agradecimiento.

A mi novio por su sincero y absoluto estímulo

Graciola.

11773

Hago patente mi agradecimiento a los Doctores:
Joaquín Ramos Santos y Angel Morales
Castro, por su atinada dirección a la pre-
sente Tesis.

Graciela.

TESIS.

"OBSERVACIONES EN ESPECTROFOTOMETRIA"

Estudio que presenta para su aprobación la Srta. Graciela Casillas Delgado.

CONTENIDO.

- Cap. I Propósito y fundamentación de la Tesis.
- Cap. II Fotometría y generalidades.
- Cap. III Tipos de aparatos fotométricos mas comunes.
- Cap. IV Espectrofotómetro Coleman Jr. Particularidades.
- Cap. V Calibración, generalidades.
- Cap. VI Curvas de calibración: Glucosa, Urea, Creatinina, Colesterol, Bilirrubina y Hemoglobina.
- Cap. VII Observaciones.
- Cap. VIII Comentarios.
- Cap. IX Conclusiones.
- Cap. X Bibliografía.

CAPITULO I

"PROPOSITO Y FUNDAMENTACION DE LA TESIS"

Con relativa frecuencia el Principiante piensa en que basta tener un aparato enfrente, apretar un botón y surgirá el resultado. Es otra la realidad, pues ahí se encuentran infinidad de problemas y situaciones difíciles que se deben conocer de antemano; es por ello que sugiero esta Tesis, la que tiene como finalidad obtener y presentar algunas observaciones y datos útiles relacionados con la calibración de un espectro fotómetro.

La química analítica se define como la ciencia y arte que determina la composición de materias en términos de elementos o componentes contenidos.

El desarrollo de la analítica ha seguido muy de cerca la introducción de aparatos de medida.

Ello se inició con la invención de la balanza analítica, que dió origen al análisis gravimétrico, el que posteriormente fué suplantado en parte por el análisis volumétrico que se inició con el material graduado; estos métodos se fueron haciendo cada vez más exactos.

En los últimos años del siglo XIX se dió origen a un nuevo tipo de aparato que vino a revolucionar los métodos anteriores, el fotómetro, el cual en un principio se utilizó cualitativamente y posteriormente su uso se extendió al campo cuantitativo.

Los métodos entonces usados fueron los colorimétricos y nefelométricos a los que siguieron los espectrofotométricos.

Las mediciones eléctricas introducidas entonces dieron con mayor exactitud los puntos finales de las suplidias reacciones volumétricas.

Desde 1930 el rápido desarrollo del tubo al vacío amplificador y la celdilla fotoeléctrica han resultado beneficiosos para los métodos analíticos.

Hoy, el analista debe conocer el funcionamiento de estos aparatos para utilizarlos adecuadamente.

Las propiedades físicas de cualquier elemento, pueden servir de base a un método. En el caso de la absorción de la luz efectuada por medio de un material colorado; de la capacidad de conducción de un cuerpo (potencial iso-eléctrico) o del poder de un gas para conducir calor.

En otros casos se depende de la variación de las propiedades eléctricas de los diferentes elementos, como por ejemplo en el potenciómetro.

Pocas cantidades físicas fundamentales pueden medirse directamente; la mayoría de las medidas que pueden hacerse en el laboratorio consisten esencialmente en desplazamiento lineal o angular, comparando con alguna escala. Tal es el caso de la balanza (lineal) y la bureta (desplazamiento lineal del menisco) y de las mediciones eléctricas, con desplazamiento angular de agujas o del dial de potenciómetros.

La intensidad de luz y de sonido sirven también de indicadores, pues la diferencia entre ella y el indicador, llevada a cero convierte la cantidad a un simple desplazamiento. Esta es en realidad la función del aparato; traducir la concentración a una manera directa y ópticamente observable.

La mayoría de los métodos analíticos están basados en teoría matemática sólida y muy ocasionalmente en experimentos empíricos, sin gran fundamento.

Como resumen enumero algunas de las propiedades físicas más utilizadas en análisis cuantitativo:

PROPIEDADES MECANICAS:

Densidad, tensión superficial y viscosidad.

PROPIEDADES TOMANDO EN CUENTA LA INTERACCION CON ENERGIA RADIANTE:

Absorción de energía radiante (rayos X, ultravioleta, infrarojos, microondas)

ROTACION EN EL PLAN DE LUZ POLARIZADA:

Índice de refracción, dispersión, fluorescencia o fosforescencia.

PROPIEDADES ELECTRICAS:

Conductividad eléctrica, constante dieléctrica, susceptibilidad magnética, características de corriente de voltaje.

PROPIEDADES TERMICAS:

Cambios de temperatura, conductividad térmica.

PROPIEDADES NUCLEARES:

Radionactividad.

La espectrofotometría se basa en la medición de la absorción de luz que una sustancia coloreada produce en un momento dado.

En la colorimetría, una porción de luz (luz filtrada) es la que pasa a través de la sustancia coloreada. En cambio si se efectúa la medición en cualquier área del espectro parte de un rayo de luz monocromática, tendremos el fenómeno de la espectrofotometría.

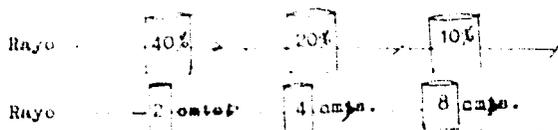
Por lo anterior, en la espectrofotometría nos valemos de un aparato que en síntesis separa la luz (radiación) en sus diferentes gamas espectrales para usar a nuestra conveniencia la emisión de la radiación con la gama que más nos convenga usar al medir la absorción de radiación de una sustancia dada. Es decir; artificialmente obtenemos una emisión de luz monocromática.

Por ejemplo: usando una radiación dentro de la gama 575 a 590 encontramos que una solución cúprica absorberá solo el componente amarillo de esa radiación, dejando pasar la luz complementaria o sea la azul, permitiendo efectuar una medición adecuada de dicha sustancia.

En resumen, en espectrofotometría obtenemos una serie de radiaciones de diferentes tipos (diferentes gamas), que nos permitirán con mayor precisión medir la absorción de radiación propia a determinadas soluciones.

Algunas soluciones pueden ser medidas cuantitativamente por sus características propias de absorción a determinado tipo de radiación. Sin embargo, valiéndonos de su propiedad de reaccionar con otras sustancias para formar compuestos de una coloración más intensa podremos obtener mediciones con mayor facilidad y sensibilidad.

La cantidad absorbida de radiación propia a determinada sustancia es directamente proporcional a la concentración de dichas sustancias en solución, o a la distancia que la radiación tiene que atravesar.



Sabemos que la cantidad de radiación absorbida por una sustancia dada varía de acuerdo con la gama de la radiación usada. La selectividad de una gama es importante, y se lleva a cabo conociendo

las lecturas espectrofotométricas de varias concentraciones conocidas y que se obtuvieron a diferentes gamas. Una vez determinados los puntos gráficamente (% de Transmisión vs. longitud de onda), se unen con líneas y de esta manera se notará la mejor zona de absorción, la que se elige como se describe en el Capítulo V de Calibración.

Después de determinada la mejor gama, el proceso de calibración nos lleva a determinar gráficamente la concentración y la densidad óptica (papel milimétrico) o la concentración con el porcentaje de transmisión (papel semi-logarítmico). Se unen los puntos dando una línea.

He aquí en pocas palabras el objeto de este trabajo, consistente en el deseo de que sirva para orientar sobre la calibración en espectrofotometría basándonos en los trabajos realizados para calibrar un espectrofotómetro Coleman Jr.

CAPITULO II

"FOTOMETRIA Y GENERALIDADES"

La fotometría se define como la medición de la luz. La luz a su vez como toda excitación del nervio óptico que nos produce la sensación de luz; pero aquí no solo nos referimos a esa sensación interior sino también a la causa externa que al actuar sobre nuestros ojos produce la expresada sensación. Las impresiones luminosas se distinguen por: la intensidad o claridad (luz deslumbradora, mate, pálida, vacilante, etc...) y por el color (luz roja, amarilla, verde, etc...).

La luz según Newton y Huyghens, es debida al movimiento ondulatorio (transversal) del éter. En cuanto dicho movimiento etéreo llega a un cuerpo cualquiera, le ilumina y se convierte en nuevos centros ondulatorios del éter.

Un rayo luminoso produce energía radiante y ésta es debida a las ondulaciones antes mencionadas. La radiación consiste en un discreto-desplazamiento de fotones.

En una serie de ondulaciones se distinguen crestas y valles.

La distancia entre dos crestas o dos valles consecutivos recibe el nombre de longitud de onda y se representa por la letra griega (λ)-gama.

El tiempo empleado en verificar una ida y vuelta completa a partir de una posición determinada se llama tiempo de oscilación o período.

Frecuencia, es el número de oscilaciones por segundo, descrito por la onda. Las unidades de frecuencia son los "Hertz" (un hz es igual a un ciclo por segundo) y el "Fresnel" (un f es igual a 10^{12} hz).

La velocidad de propagación de la luz es muy cerca a 3 por 10^{10} cmts. por segundo, por radiación en el vacío y disminuye cuando pasa a través de sustancias transparentes.

La longitud de onda es dada por la relación de la velocidad a la frecuencia. Las unidades son: Angstroms (A o A°); un $\text{A} = 10^{-8}$ cmts.

Micrones (M); un $\text{M} = 10^{-6}$, $\text{M} = 10^{-4}$ cmts.

Milimicrones (m/M) un $\text{m/M} = 10^{-3}$, $\text{M} = 10 \text{ A}$

Una cantidad que es de importancia en algunas circunstancias es

el "número de onda" que viene siendo el número de ondas por centímetro.

La emisión de rayos de una radiación consiste en la energía originada por la propagación desde un manantial a través de un vidrio o una serie de medios, a un receptor donde es absorbido (menos la cantidad absorbida por el medio a su paso). Como la energía por unidad de tiempos poder, se puede decir poder de radiación.

Plano de luz polarizada es luz cuyas vibraciones han sido reducidas a un solo plano de propagación perpendicular al cuerpo.

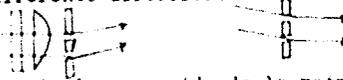
La luz polarizada se puede producir de varias maneras:

- 1) Por reflexión parcial: tal es el caso de una lámina de vidrio o una superficie pulida; también por reflexión de partículas coloidales
- 2) A través del prisma de Nicol y otros similares.
- 3) A través de cristales anisotrópicos, como el sulfato de yodoquinina.

Otro fenómeno físico que se considera básico en fotometría es la refracción de la luz. La experiencia nos enseña que cuando un rayo de luz llega a la superficie de separación de dos medios se divide en dos porciones: una que continúa propagándose por el antiguo medio (es reflejada) y otra que penetra en el nuevo sufriendo una desviación (es refractada).

Existe en espectrofotometría una rejilla de difracción que tuvo su origen en este principio, y que sirve para elegir un haz de luz determinado, eliminando los restantes.

El enrejado de difracción se considera como una serie de hendiduras separadas por pequeñas barritas opacas. Consideremos una luz que llega a la rejilla de difracción; la luz pasará a través de cada hendidura las que dispersarán la luz en diferente dirección.



El ángulo que corresponde a la luz emergida de la rejilla difractora depende de la dirección de la luz incidente que llega a la rejilla.

Cuando la onda luminosa incidente y la emergente están en el mismo plano al fenómeno se le llama de reflexión. El ángulo de incidencia es igual al ángulo de reflexión.



En espectrofotometría se utilizan con frecuencia las lentes, que son cuerpos transparentes, limitados por dos superficies esféricas. Atendiendo a la posición relativa de las dos superficies se distinguen dos clases de lentes: positivas o convexas y negativas o cóncavas.

POSITIVAS:

- Biconvexa ()
- Plano-convexa ()
- Cóncavo-convexa)

NEGATIVAS:

- Bicóncava ()
- Plano-cóncava ()
- Convexo-cóncava ()

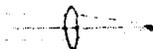
Los rayos emitidos por un punto son refractados por la lente de manera que, después de haberla atravesado, concurren todos a un punto.

Los rayos que pasan por el centro de la lente (centro óptico) no sufren desviación y se denominan rayos principales.

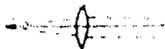
Toda lente tiene dos focos, uno a cada lado correspondientes a los dos sentidos a que pueden llegar los rayos paralelos al eje principal; los dos focos están a distancias iguales al plano principal.

Marcha de los tres rayos más notables:

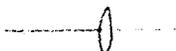
1) El rayo paralelo al eje principal, una vez refractado pasa por el foco



2) El rayo que pasa por el foco una vez refractado es paralelo al eje principal



3) El rayo principal (eje secundario) no es desviado por la refracción



DENSIDAD OPTICA.-

Algunas veces es conveniente en espectrofotometría expresar los valores en términos de Densidad Optica (D). La ventaja de esta manera de expresarlos es que de esta suerte los valores expresados por D. son directamente proporcionales a los valores correspondientes a C (concentración); por ejemplo: una solución (1) mostrando el triple de la lectura (D) también habrá triplicado el valor (C) de otra solución similar (2).

$$C_2 = \frac{C_1}{D_1} \quad \text{y} \quad D_2 = K \cdot D_1$$

$$K = \frac{C_1}{D_1}$$

Densidad Óptica es igual a $D = -\log_{10} T$.

La K de la ecuación se determina midiendo primeramente la densidad de una muestra de concentración conocida. La concentración de una muestra desconocida similar puede encontrarse entonces midiendo su densidad y multiplicando su valor por la constante K . Obviamente es posible preparar gráficas de calibración $C-D$ en manera exactamente similar a las gráficas $C-T$, tan solo usando papel milimétrico. La ventaja de la expresión D consiste en que es directamente proporcional a la concentración (C), si sigue la ley de Lambert-Beer.

Las desventajas consisten en que la lectura de la escala de la densidad óptica en el aparato no es uniforme, varía mucho por la asimetría y por leerse de derecha a izquierda.

En análisis la diferencia en concentración de un constituyente (C) considerado entre una muestra y una solución de referencia se determina midiendo el porcentaje de transmisión (T) de la muestra con respecto al de la referencia. El valor de (C) es computado entonces (o determinado por curvas o tablas) de este valor (T) que se ha medido.

Si es necesario la concentración absoluta de la muestra puede lograrse añadiendo al valor computado (C) la concentración conocida del constituyente considerado en la referencia. Generalmente sin embargo, el método analítico es tal que este último paso es innecesario, ya que la referencia seleccionada es el blanco, hecho con los mismos reactivos usados al preparar la muestra, de tal manera que la cantidad de luz absorbida por el material introducido en los reactivos será lo mismo en la referencia que en la muestra, de ahí que automáticamente se cancela uno a otro.

Una ventaja definida en el método espectroquímico es esta manera de nulificar las impurezas de los reactivos.

La relación entre (C) y (T) es exactamente expresada por la ley de Lambert-Beer en todo caso en que los requisitos de esta Ley son encontrados. Estos requisitos son:

- 1) La medida de (T) debe hacerse con luz monocromática.
- 2) La medición deberá hacerse a una longitud de onda que corresponda a la región de los constituyentes de la curva ($S-T$) en donde (T) substancialmente es constante o sea en la mitad de la región de máxima absorción o sea la porción plana de la curva.
- 3) La referencia debe ser seleccionada de tal manera que (C) es igual a cero, cuando (T) es igual a 100.

4) La naturaleza de la solución problema debe ser tal que su porcentaje de transmisión responda tan solo a los cambios en concentración.

La importancia de la ley de Lambert-Beer se enfatiza aquí porque es la más simple y segura porque es el único medio racional de trasladar lecturas fotométricas a expresiones correspondientes a la concentración de la muestra.

La ley también permite frecuentemente la determinación simultánea de dos y aún de tres constituyentes diferentes en la misma muestra, sin interferencia mutua y también se encontrará conveniente en otros aspectos que no detallaré.

La ley de Lambert-Beer señala que la concentración (C) es proporcional al logaritmo del recíproco de la (T) por el factor K.

$$C = K \log. \frac{1}{T}$$

Aunque la ley es expresada en la forma anterior ésta no es una forma conveniente para usos prácticos porque requiere dos operaciones - de matemáticas, considerables de tiempo, o sea la determinación del recíproco y de su logaritmo.

Una forma más simple es: $C = -K \log. T$ Esta ecuación significativamente señala que cualquier concentración (C) de una solución dada es proporcional al logaritmo de su correspondiente (T) transmisión.

Esto significa que la gráfica de (C-T) de esta relación, será una línea recta si se grafica en papel de coordenadas semi-logarítmicas y - tal gráfica constituye una calibración por medio de la cual una concentración corresponde a un valor particular de (T) transmisión.

La ecuación señala además que esta línea recta especificada siempre interceptará el punto C= a cero y T= a 100%. Concordantemente es posible preparar la gráfica de calibración (C-T) de un método analítico sin cálculos. Simplemente determinese la (T) en solución de concentración conocida, grafíquese este punto desconocido, tírese una línea que interseque este punto y el cero, esta línea es la línea gráfica de calibración.

La precisión de este método de graficar dependerá de lo preciso que el método analítico siga la ley de Lambert-Beer y es siempre aconsejable preparar y medir la transmisión de varias soluciones de concentración conocida, dentro del margen contemplado del método.

EL MÉTODO DE LA GALVANOMETRÍA

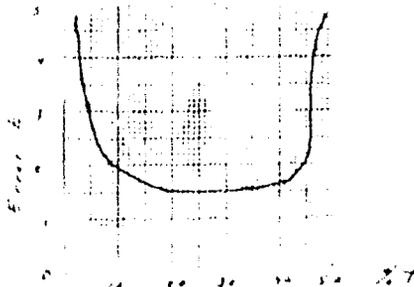
Errores en la posición de índice galvanométrico debido a fluctuaciones instrumentales y en los del operador en la lectura de la escala galvanométrica en sí misma constituyen el error instrumental absoluto.

Un error enteramente independiente del método analítico y de la habilidad de manipulación del operador, el efecto de este error absoluto en la precisión de un análisis es llamado error efectivo de instrumento. Si una muestra de sangre contiene 15 gr. % de hemoglobina, pero las limitaciones combinadas del instrumento y del error de lectura causan que el análisis indique 15.15 gr. %, entonces el error efectivo del instrumento será de 1%. Obviamente al analista le preocupa más el error efectivo que el absoluto instrumental.

La magnitud de un error efectivo correspondiente a un valor absoluto dado es dependiente de la transmisión en la muestra que se está usando y como consecuencia la eficacia de un procedimiento analítico puede depender tanto del grado de dilución seleccionada como de la precisión de las reacciones químicas utilizadas. Este es un hecho que el analista seguido olvida en el desarrollo de nuevos procedimientos, a pesar que su observación, siempre se traduce en datos más exactos y consistentes.

La figura (2) ilustra el error efectivo correspondiente a un error absoluto de 0.5%, e indica lo pobre de conducir análisis espectroquímicos tanto a valores muy altos como bajos de transmisión. Las razones para limitar medidas de transmisión a una gama que dé lecturas de: (5-90) son ahora evidentes.

No se debe confundir el colorímetro con el espectrofotómetro; en ambos se pueden hacer lineamientos gráficos de calibración, la importancia de distinción consiste en que el verdadero espectrofotómetro, la inmensa mayoría de las determinaciones siguen la Ley de Lambert-Beer debido a que se utiliza la luz monocromática, no así en el colorímetro que requiere la determinación de concentraciones conocidas múltiples.



CAPITULO III

"TIPOS DE APARATOS FOTOMETRICOS MAS COMUNES"

Existen varios aparatos de medición que utilizan básicamente el color y la intensidad de luz, se usaron y algunos aún se usan para determinaciones cualitativas y aún cuantitativas.

Cinco son los más directamente relacionados con este trabajo y -- ellos son: Colorímetro, Turbidímetro, Nefelómetro, Fluorofotómetro y por último el Espectrofotómetro.

Todos dependen de la medición de intensidad de la luz, ya sea -- transmitida, reflejada o producida a través de fluorescencia por partículas suspendidas en un líquido.

Estas partículas pueden ser moléculas, agregados coloidales de moléculas, o partículas más grandes, pero en todos casos su concentración gobierna la magnitud del efecto observado.

El colorímetro es un aparato para medir la transmisión de una solución coloreada, clara, en relación de un standard de referencia. Es muy útil y su uso en análisis cuantitativo es grande, la sensibilidad y utilidad son las mejores después del espectrofotómetro.

El turbidímetro es un instrumento análogo, empleando específicamente para medir suspensiones turbias que pueden ser clasificadas o no como coloides. Sirve para análisis químico-industriales por ejemplo azufre, sulfatos, etc..

El Nefelómetro por otra parte es un instrumento que mide la cantidad de luz dispersada por partículas suspendidas e iluminadas lateralmente por un intenso rayo de luz blanca o monocromática. Entre sus usos -- sirve para chequear la claridad de filtrados comerciales y bebidas.

El Fluorímetro o Fluorofotómetro es un diseño similar pero la luz observada es producida por fluorescencia en vez de por refracción. El rayo lateral de iluminación es ultravioleta y el método solo se aplica a sustancias que fluorescen. Es muy útil en la determinación de vitaminas y en otros campos especializados.

El Espectrofotómetro también utiliza la medición de intensidad de luz transmitida; tan solo que aquí esta luz es monocromática y puede escogerse cualquiera de aquellas encontradas en la gama del espectro.

Su utilidad es amplia y utiliza al igual que el colorímetro una solución standard de referencia.

Mediante el uso de la espectrofotometría es más fácil que las sustancias sigan la ley de Lambert-Beer.

Los Espectrofotómetros son variados en su tamaño y calidad encontrándose algunos un tanto complejos como el Beckman D. U. - y otros menos complicados y de mayor o menor precisión.

El Espectrofotómetro Coleman Standard, es de gran sensibilidad y se puede depender de él para trabajos de precisión.

Su modelo compacto, Coleman Junior es relativamente simple en su estructura, de muy fácil manejo y bastante sensible, por lo cual su uso en laboratorio clínico es grandemente favorecido.

CAPITULO IV

"ESPECTROFOTOMETRO COLEMAN JUNIOR, PARTICULARIDADES"

CONSTRUCCION DEL APARATO Y TEORIA DE OPERACION:

Un resumen de la teoría y construcción del espectrofotómetro Coleman Junior, es sencillo y comprensible y el estudiante encontrará estos conocimientos útiles para el uso de la espectrofotometría en general.

Primero hablaré del monocromador, (véase diagrama), que en el aparato es iluminado por la lámpara excitadora. Esta lámpara tiene una potencia de seis voltios y se puede prender y apagar por medio de un switch colocado en la parte posterior.

El filamento de esta lámpara es muy delgado, mide 0.3 pulgadas de longitud y está colocado en la base de la lámpara. El lugar de este filamento es escrupulosamente escogido para que quede exactamente dentro de la posición, en el sistema óptico monocromático, ya que de ello depende la gama o longitud de onda de la calibración.

La luz de la lámpara producida por el filamento penetra en el doble sistema de lentes del monocromador, en donde la rejilla de difracción se interpone entre las dos lentes condensadoras produciendo, un espectro verdadero que se proyecta en la lámina de salida del monocromador, dejando esta última pasar tan solo el rayo monocromático que cae en su hendidura de salida.

La posición del filamento de la lámpara puede ser alterada al moverse el brazo de la misma. De esta manera, al rotar el dial correspondiente a la gama, el filamento del foco se mueve a través del eje óptico del monocromador resultando en el correspondiente cambio de la imagen espectral. El diseño del instrumento es tal que la percepción de la luz espectral que de hecho pasa a través de la rendija, ocurre, onde siempre exactamente a la longitud de onda indicada en el dial.

El rayo monocromático atraviesa la cubeta y finalmente su intensidad es medida por el fotómetro. El fotómetro de este instrumento consiste en una fotoceldilla conectada por un circuito central a un galvanóme-

tro iluminado por la proyección de una lámpara galvanométrica.

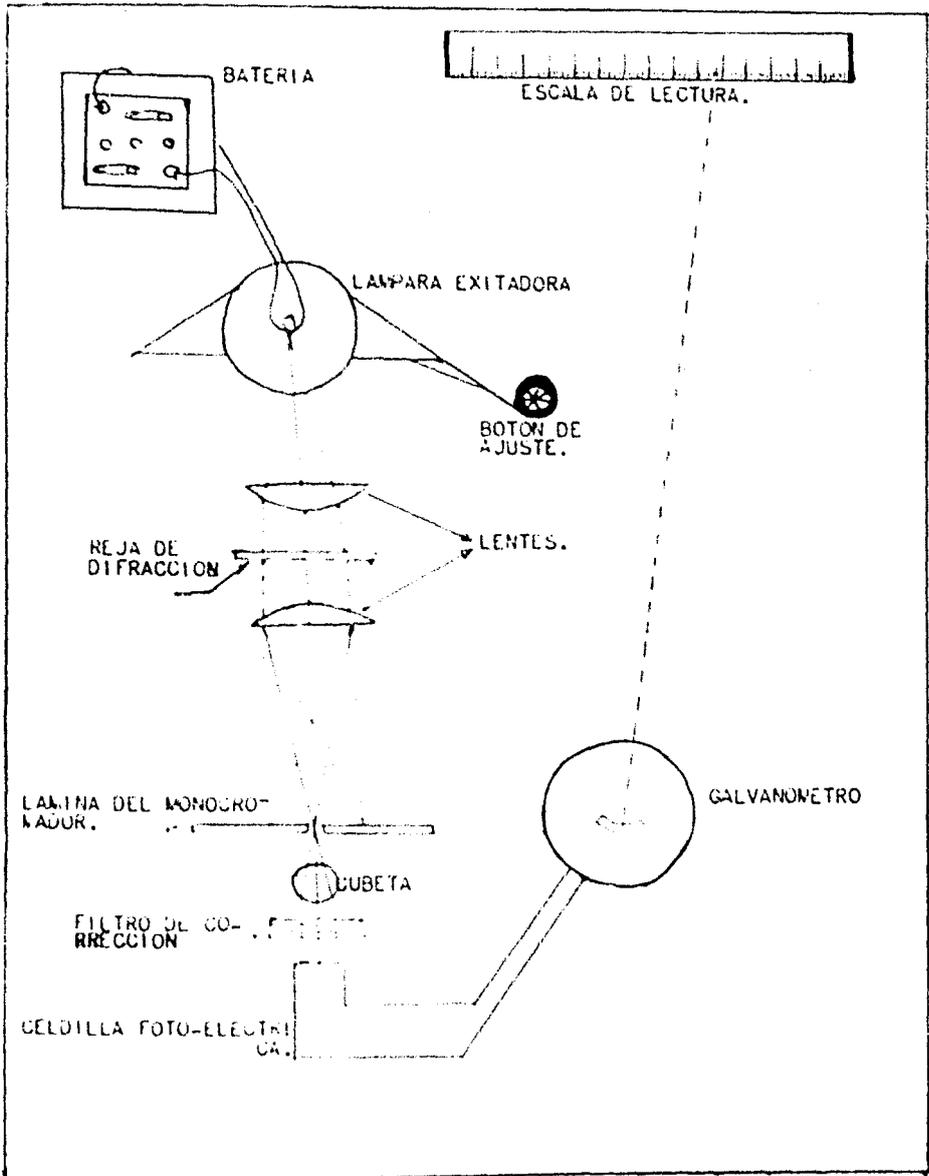
La lectura se hace en un tablero graduado, montado en la parte superior del aparato.

Junto con la fotoceldilla se encuentra un filtro de corrección para compensar la gran diferencia de respuesta de la fotoceldilla a las diferentes longitudes de onda. También debe entenderse que esta corrección no es del todo completa y que cuando el dial de la gama es cambiado de posición, el de ésta indicará también variación marcada.

En resumen, el espectrofotómetro Coleman Junior se usa escogiendo la gama deseada por medio del control de la misma (botón al centro del aparato). Luego, con el control del galvanómetro representado por dos botones de ajuste, grueso y fino, se logra que el indicador lea 100% de transmisión con la cubeta vacía. La cubeta de la muestra se interpone luego en el rayo de la luz que alcanza la fotocélula y por lo tanto una disminución proporcional en la posición de la aguja indicadora, en donde se efectúa la lectura final.

Un tablero para usos generales se suministra con cada instrumento-standar, están calibrados en porcentaje de transmisión y en densidad óptica y son muy convenientes para el desarrollo de nuevos métodos y para la ejecución de los ya existentes.

Una parte importante del equipo correspondiente a un espectrofotómetro es la celdilla o cubeta. Ellas pueden ser redondas o cuadradas, no importando mayormente cual de estas formas se utilicen, con tal de que el diámetro o espesor que tiene que atravesar el haz de luz sea el mismo en todas las cubetas. El espectrofotómetro Coleman Junior las tiene redondas y con diferentes diámetros. Se encuentran en el mercado cubetas de precisión suficiente para trabajo clínico regular y otras de alta precisión para pruebas más delicadas por su sensibilidad.



CAPITULO V

"CALIBRACION, GENERALIDADES"

La calibración de una curva standard se prepara teniendo como punto de partida una solución con una concentración conocida. Esta nos permite hacer diluciones conocidas por medio de los cálculos correspondientes.

Una vez conocidas estas concentraciones, se determina eléctricamente su valor (con espectrofotómetro o aparatos similares), siguiendo el procedimiento químico correspondiente.

Esto nos dará varias lecturas que corresponderán al valor de las diluciones conocidas de antemano, las que se graficarán en papel milimétrico si se utiliza la densidad óptica o en papel semi-logarítmico si se usa el porcentaje de transmisión.

El procedimiento se repite varias veces y cuando se sucede la coincidencia de puntos se grafica la curva final, con la que se prepara la tabla de valores tomando en cuenta la lectura y la concentración.

A la solución primaria, con una concentración conocida, se le llama "solución madre" y es preparada pesando exactamente la substancia problema (por ejemplo la glucosa) debidamente desecada.

El solvente puede ser de varios tipos, según corresponda a la substancia problema; por ejemplo: la glucosa se disuelve en una solución de ácido benzoico al 0.25%, para evitar el desdoblamiento de la misma por la fermentación que a su vez es provocada por bacterias. El ácido benzoico inhibe su desarrollo.

La dilución del colesterol puede hacerse con ácido acético, ya que es insoluble en el agua y por ser el mejor solvente. Para hacer más rápida su solución se calienta a baño maría.

Existen "soluciones madre" en que su preparación solo es factible diluyendo la substancia en una "mezcla de sueros", tal es el caso de la bilirrubina. También se requiere de un ligero calentamiento.

Existen casos en que la preparación de la "solución madre" debe llevarse a cabo a una temperatura determinada, con cierta exactitud de

biendo efectuarse con rapidez su preparación y determinación. Tal es el caso del timol, en que se utiliza una sustancia que a determinada temperatura y una vez iniciada la reacción química da origen a una precipitación de partículas similares a las producidas por un suero sanguíneo.

Hay soluciones "standard" que contienen sustancias de valor conocido y se venden en el comercio simplificando y estandarizando su exacto uso y valores, tal es el caso del Acuglobín para la calibración de la Hemoglobina.

Las condiciones para cada sustancia son específicas y por ello se rían muy largo de enumerar; solamente quiero explicar que para iniciar una calibración se deben conocer todos estos factores, que provocarían errores y fracasos sin su anterior conocimiento.

La técnica de casi toda determinación puede ser hecha en tal forma que sus datos sigan la ley de Lambert-Beer con precisión excelente previsto que las unidades sean hechas con un espectrofotómetro verdadero.

Cuando estas condiciones se encuentran, la construcción correspondiente de una gráfica de calibración (concentración/ transmisión) es tan simple como señalaré. Por ejemplo: en la determinación de hemoglobina, véase la gráfica (1) se notará que hay cuatro regiones espectrales donde la medición de transmisión puede ser hecha en una parte plana de la porción de la curva (M-T) muestra transmisión como lo demanda la ley de Lambert-Beer.

- 1) Entre la gama 575 a 625
- 2) Gama 550
- 3) Gama 500
- 4) Entre la gama 400 y 450.

La región (1) será desechada porque la hemoglobina muestra su menor absorción y la técnica sería altamente sensible a otros factores.

La región (2) aparece enteramente satisfactoria, la dilución con la cual la curva (B) fué hecha (1-300) es una conveniente relación clínica y la medición del valor T de la sangre normal cae dentro de la porción recomendada de transmisión (5 a 90%).

La región (3) no desecha por ser menos específica que (2) aunque puede ser satisfactoria para el procedimiento usarla.

La región (4) tiene las ventajas de (2) solo que la Hemoglobina es tan densa que es necesario una dilución (1-500) y ésto es un inconveniente.

Recomendación para trabajar (4) usando cubetas 10 x 75 mm y la dilución (1-300) con una solución de carbonato de sodio al 0.1%, usando este

mismo disolvente como blanco.

DETERMINACION DE LA MEJOR LONGITUD DE ONDA.

Para la elección de la mejor gama o longitud de onda se procede de la manera siguiente: Una vez elegida la técnica a seguir en cuanto se refiere a la parte química se procede a verificarla a diferentes concentraciones conocidas, se leen en el espectrofotómetro a diferentes gamas. Por ejem.: se preparan diluciones de glucosa, que correspondan a estas concentraciones; las que darán las correspondientes lecturas a las diferentes longitudes de onda.

L e c t u r a s	40 mg	60 mg	150 mg	300 mg	Gama o Long. de onda.
	55	45	41	18.5	500
	62	65	41	15.5	520
	81	65	40	15.0	550

Una vez conocidas estos datos se grafican en papel milimétrico uniendo los puntos. Tal como la continuación lo adjunto en los diferentes casos y tomando en cuenta lecturas contra gamas.

Urea:-

L e c t u r a s	8Mg	16Mg	32 Mg	Gama
	74	76	65.5	400
	75	73	60.0	415
	74	70	54.0	425
	66	50	27.0	450
	63	42.5	19.5	475
	75.5	66	47.5	500

COLESTEROL.

L e c t u r a s	50Mg	100Mg	200Mg	300Mg	400Mg	Gama
	75	56	36.5	23	14	400
	79	63	44	30	21	425
	85	72	56	43	33	450
	88	77	65	53	44	475
	89	80	68.5	57	48	500
	90	82.5	70	59	50	525
	90	80	69	59	50	550
	89	78.5	67	56	47	575
	87	76	64.5	53	42	600

COLESTEROL.

	50Mg ^m	100Mg ^m	200Mg ^m	300Mg ^m	400Mg ^m	Osma
Lecturas	80	76	64	51	41	625
	89	77	66	53.5	43.5	650

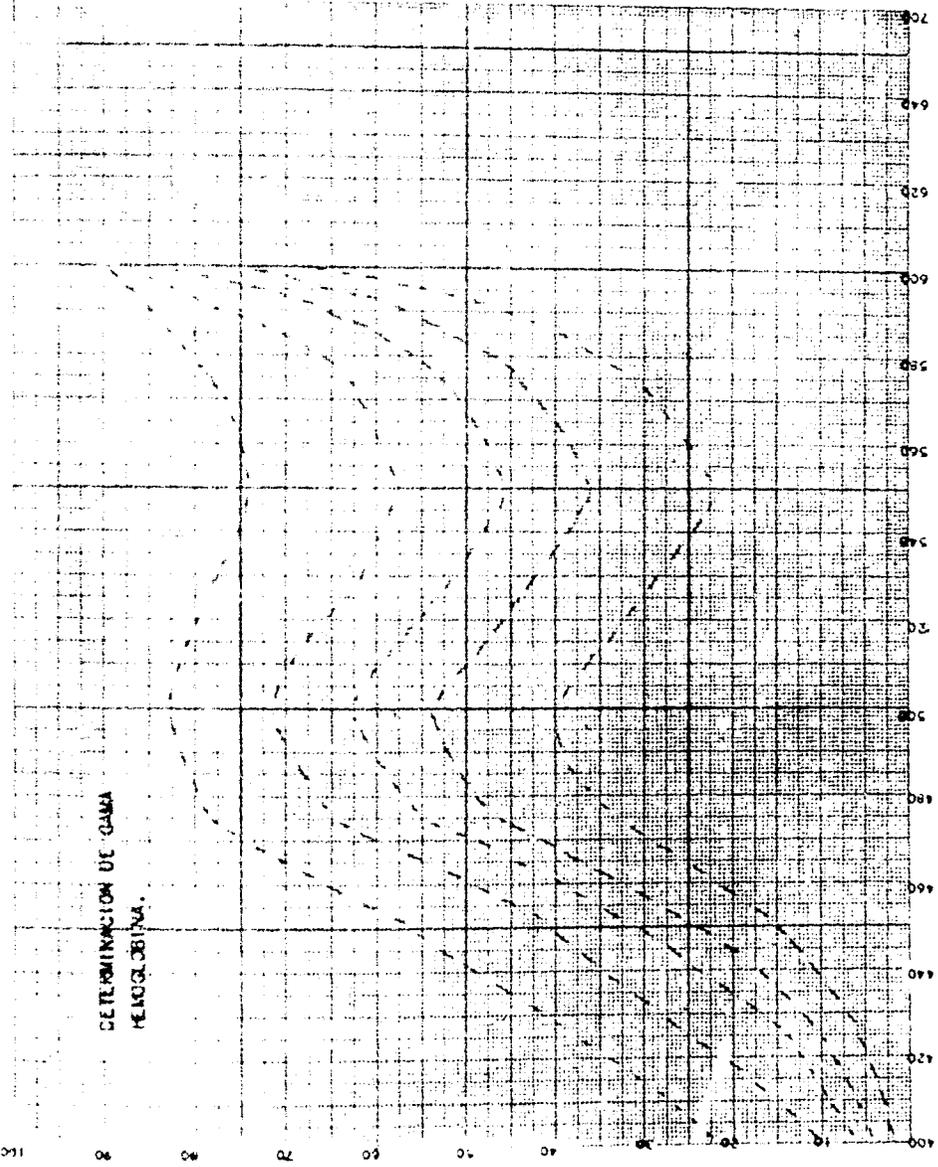
CREATININA

L e c t u r a s	2Mg ^m	4Mg ^m	5Mg ^m	6Mg ^m	10Mg ^m	Osma
	80	64	57	42	35	500
	86.5	75.5	70	58	51	525
	95	90	88	82	75.5	550
	99	98	97	95.5	94.0	575

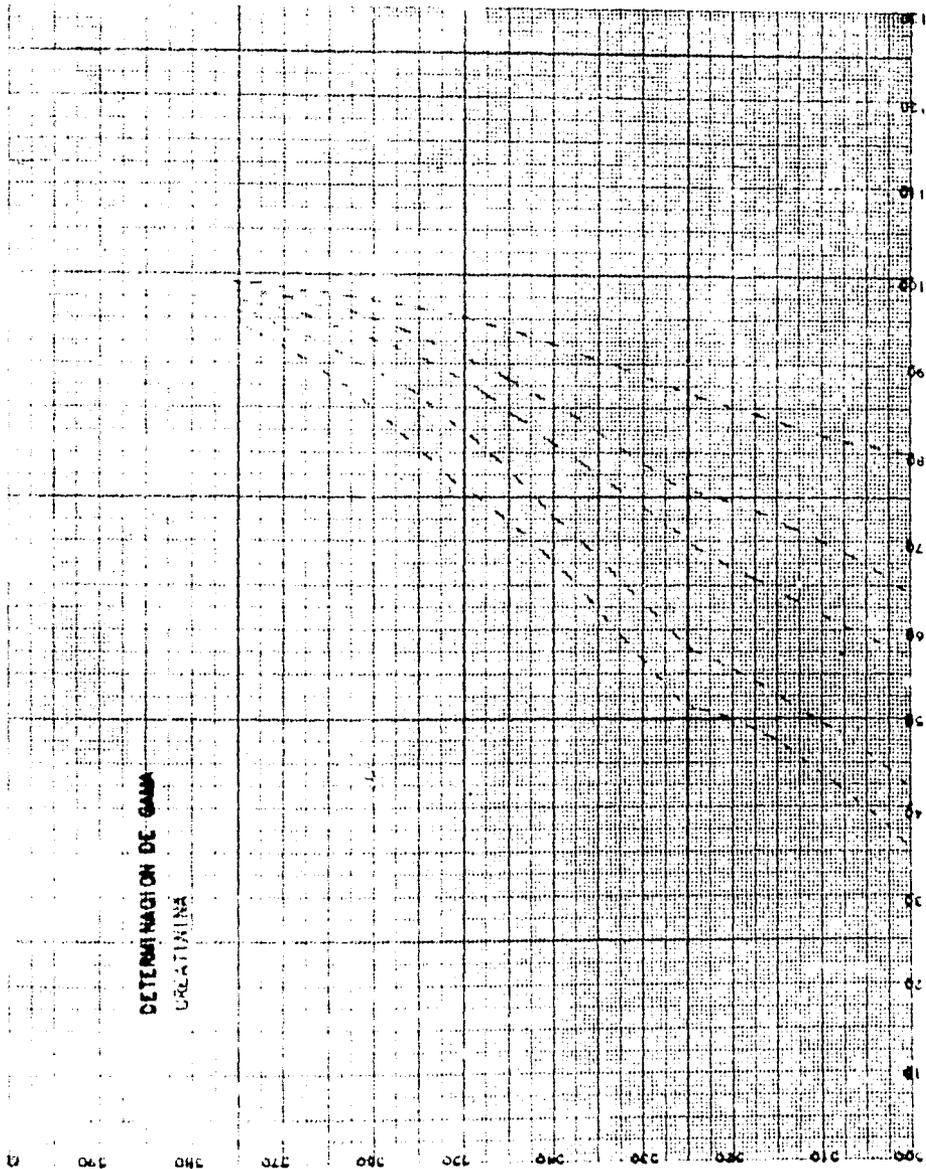
HEMOCLOBINA

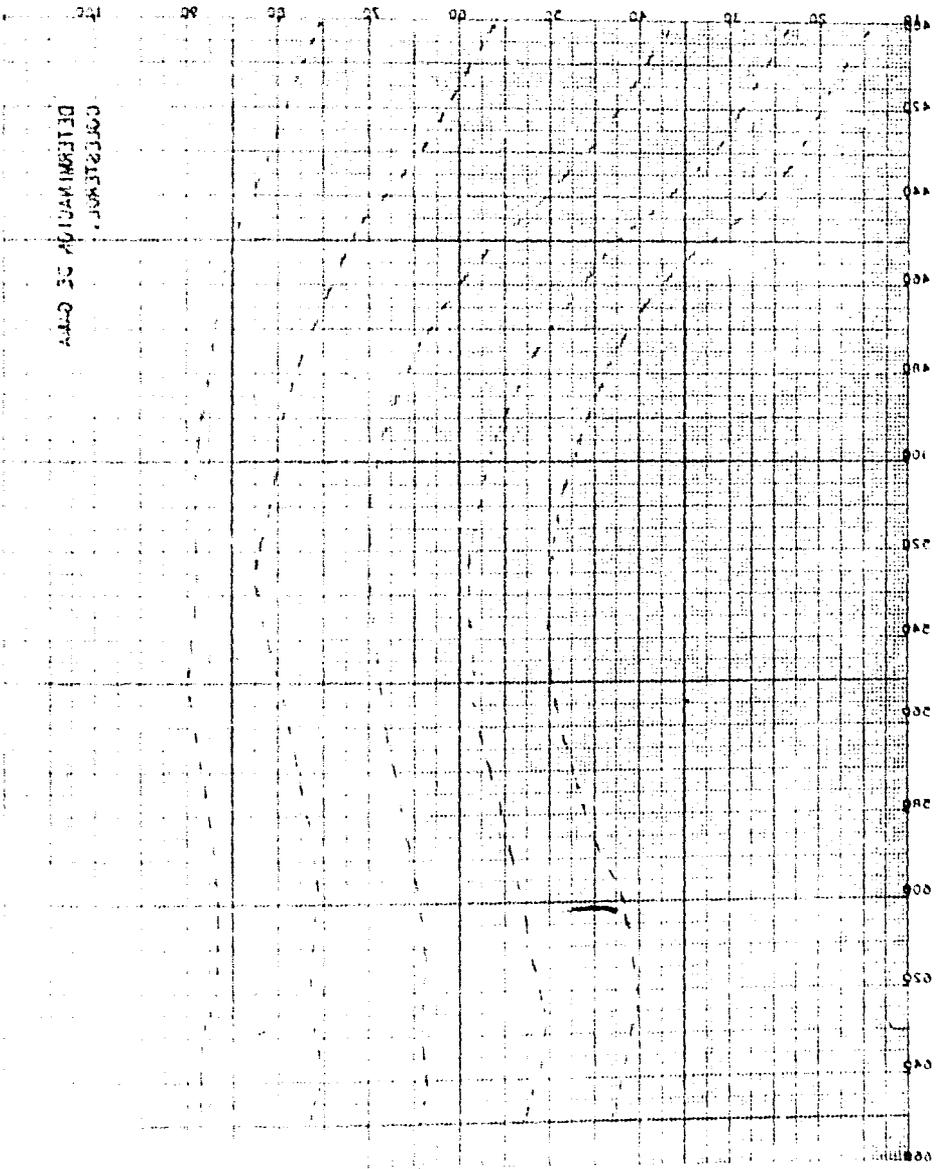
	19.950grs	13.600grs	10.100grs	7.03grs	3.550grs	Osma
L	2	4	6	10	22	400
e	5	6	10	14	25	425
c	15.50	25.0	31.5	40.5	56.0	450
t	33.0	47	55	65	78.5	475
u	40	54	62.5	71.5	83.0	500
r	30.5	44	53	63	78.5	525
a	22	36	45.5	57.5	74	550
s	32	45	53.5	63.5	79	575
	67	74	76	82.5	89.5	600

DETERMINACION DE GAMA
HEMOGLOBINA.



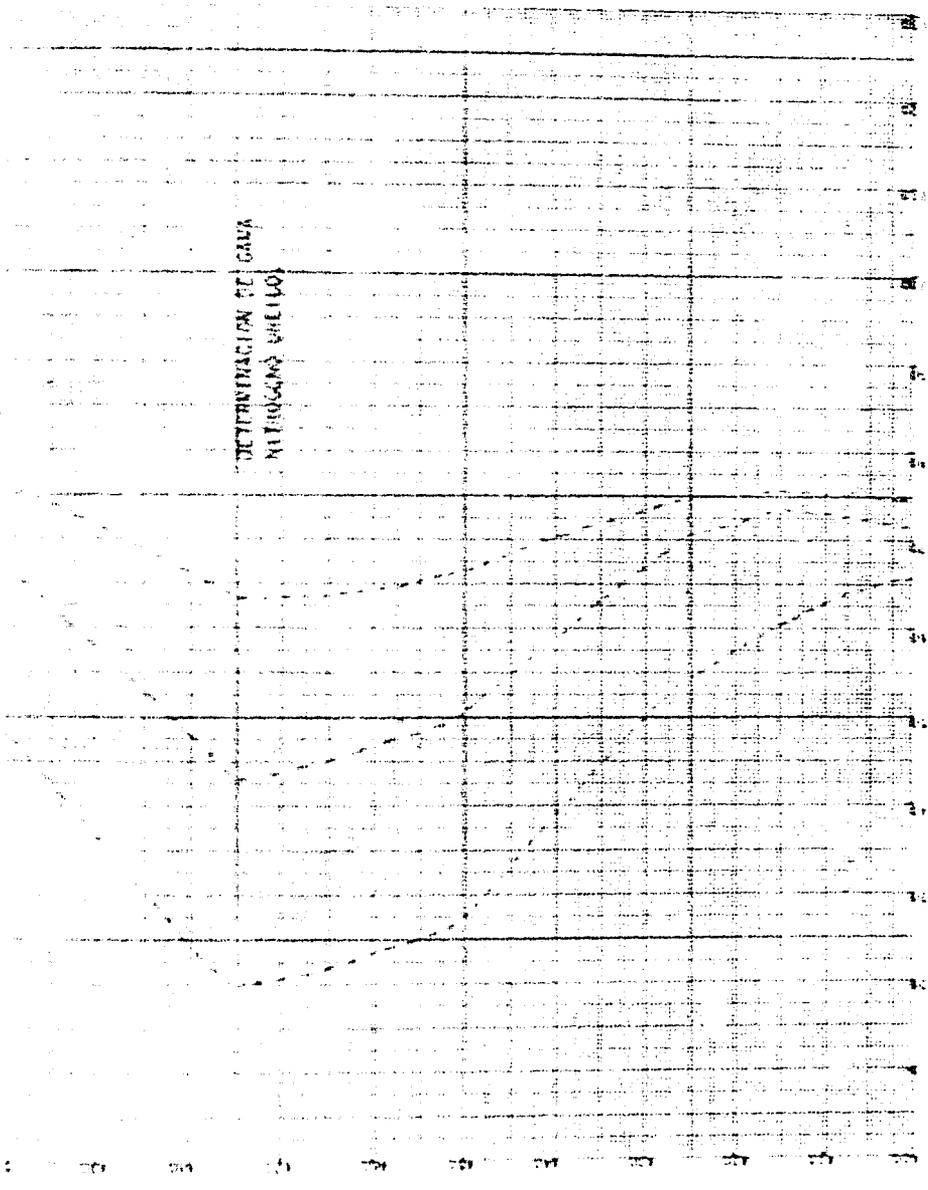
DETERMINACION DE GAUSA
ARGENTINA





CONFECCION
DETERMINACION DE COTA

DETERMINACION DE CALA
NITROGENO VIELLO



CAPITULO VI

CURVAS DE CALIBRACION

Glucosa.

Para la preparaci3n de la curva de glucosa, primeramente se deseca una cantidad de glucosa por tres d1as en una estufa, a temperatura adecuada. Esto se hace con el objeto de sustraer el agua de cristalizaci3n hasta el m1ximo, evitando variantes en el peso.

Enseguida se pesan, por ejemplo 0.500 Grs con mucha precisi3n, los que se colocan en un matr3z volum3trico de 100 c.c. afor1ndose con una soluci3n a 0.25% de 1cido Benz3ico A.P., una vez disuelta la glucosa se inicia la preparaci3n de diluciones a partir de esta soluci3n madre de la siguiente manera:

c.c. de "Sol. Madre"	Vol. final con Ac. Benz3ico al 0.25%	Mgs. por ciento de glucosa.
2	500	20
2	250	40
3	250	60
4	250	80
5	250	100
3	100	150
10	250	200
6	100	300

Utilizando 2.c.c. de cada una de estas diluciones y siguiendo la t3cnica de Polin-Wu (m3todo usado en este trabajo) se practica la determinaci3n espectrofotom3trica (espectrof3tometro Coleman Junior en el presente trabajo), en el que se ha determinado previamente la gama, se preparan nuevas soluciones standard, repiti3ndose la prueba. Las lecturas son comparadas una vez que se grafican.

Para hacer la curva gr1ficamente en papel milim3trico, se toman en cuenta concentraci3n y densidad 3ptica. Una vez conocidas la D. 3ptica y la Concentraci3n se colocan los puntos, consider1ndose correcta la prueba cuando estos puntos coinciden.

Una vez tirada la línea, se prepara la tabla de valores que facilitará el manejo y lectura.

<u>Datos de Calibración de Glucosa</u>		
Método de Polin-Wu	Coleman Jr. (500 Gammas)	
Concentración	Porcentaje de Transmisión	Densidad Optica
40	82	1.0862
80	68	1.1675
150	54	1.2676
300	35	1.4559
40	83	1.0809
80	65	1.1871
150	41	1.3872
50	80.5	1.0942
100	62.0	1.2076
150	47.0	1.3279
200	35.5	1.4498
80	70.5	1.1518
150	46.5	1.3325
300	21.0	1.6778
40	85.5	1.0680
60	70	1.1549
150	47	1.3279
300	21	1.6778
80	85.5	1.0680
150	70.5	1.1518
300	20.5	1.6882

NITROGENO UREICO Y UREA.

Prepárese una "solución Standard" de urea, disolviendo 171 Mgs de Urea g.p. en 100 c.c. de agua destilada (solución madre)

C.C. de Sol. Madre	Vol. final con agua	Mgs. por 100 de N. Uréico
0	50	0
5	50	8
10	50	16
20	50	32
30	50	48

Practíquese la técnica ordinaria (en nuestro estudio usamos la - técnica de Caureau, Diacetil-Monoxima). Que consiste en colocar de las diluciones anteriormente mencionadas 20.c.c a los que se le agregan 2.5 - décimas de Diacetil Monoxima preparada de antemano y cuatro c.c. de Ac. Sulfúrico al 50%, se calienta por 10 minutos, se deja enfriar por tres - y enseguida se añade 2.5 décimas de Persulfato. Se deja en reposo por - 5 min. y se lee.

DATOS DE CALIBRACION. N. UREICO.

Método de Caureau	Coleman Jr. (450 gamas)	
CONCENTRACION	% de Transmisión	D. Optica
0	80	1.0969
10	42.0	1.3768
32	21.5	1.6676
8	75.0	1.1249
16	56.0	1.2518
32	28.0	1.5528
8	63.0	1.2007
16	44.0	1.2557
32	25.0	1.6021
48	12.0	1.9208
8	61.0	1.2147
16	45.0	1.3468
32	24.0	1.6198
48	16.0	1.7959
8	77.0	1.1135
16	51.5	1.2882
32	22.0	1.6576

CREATININA.

Se prepara solución madre pesando 100Mgs de creatinina, disolviéndola en 80 c.c. de Ac. Clorhídrico 0.1 Normal. En un balón de 100c. c. - se afora con agua. Obtenemos una solución en la que un centímetro cúbico es igual a un miligramo.

Fóngase 10 c.c. de esta solución Standard en un matraz volumétrico de 1000 y añárese con ácido clorhídrico 0.1 Normal, tendremos una concentración de un c.c. igual a 0.01 Mgs., de esta última solución (solución de trabajo). Se diluye en la siguiente forma.

SOLUCION DE TRABAJO (0.01 Mgs = 1 c.c.)	Agua	Mgs. de Creatinina en 10 c.c.	Mgs. % de Crea - tinina en sangre
	8	0.02	2
2	6	0.04	4
4	5	0.05	5
5	2	0.08	8
8	0	0.10	10
10	10	Blanco	Blanco
0			

Sígase la técnica correspondiente (en este trabajo se usó la de Polin - du)

Se colocan 5 cc. de Acido Pírico más un cc. de Sosa al 10%.
 Se toman 2.5 del reactivo anterior, se le añaden 5 cc. de la di-
 lución; se deja reposar 5 min. y se lee contra un blanco prepa-
 rado en igual manera, sólo llevando agua y no suero.

DATOS DE CALIBRACION DE CREATININA

Método de Polin-Wu	Coleman Jr. (500 Gama)	
Concentración	Porcentaje de Transmisión	Densidad Óptica
2	80	1.0996
4	66	1.1805
4	60.5	1.2182
8	46.5	1.3325
10	38	1.4202
2	77	1.1135
4	65.5	1.1838
5	57.5	1.2403
8	44	1.3557
10	37.5	1.4260
2	74.5	1.1278
4	63.5	1.1972
5	57	1.2441
8	42	1.3768
10	35	1.4559
2	76	1.1192
4	65.5	1.1871
5	58	1.2366
8	44	1.3557
10	37.5	1.4260
2	76	1.1192
4	65.5	1.1838
5	57	1.2441
8	43	1.3665
10	37.5	1.4260

COLESTEROL.-

Prepárese solución de colesterol pesándose 200 mgrs. (previa-
 mente desecados) para diluir con 100 cc. de ácido acético concen-
 trado.

Solución de Colesterol al 200%	Ac. Acético Concentrado	Concentración de Colesterol en -- Mgros. %.
0.4	0.0	400
0.3	0.1	300
0.2	0.2	200
0.1	0.3	100
0.05	0.35	50
0.0	4.0	00

Se determina mediante la técnica correspondiente (en nuestro-

trabajo usamos la técnica del Acido Paratoluen-Sulfónico.

Se colocan las anteriores diluciones, tomando en cuenta que la solución de colesterol y el ácido acético suma 4 décimas. Se le agrega un cc. de Acido paratoluen -sulfónico (12%) y 3 cc. de Anhídrido acético, se deja reposar por 15 minutos sin mezclar y en un lugar obscuro. Transcurrido ese tiempo se le añaden .4 cc. de Acido Sulfúrico concentrado y se mezcla hasta desbaratar el precipitado, se deja en reposo por 20 minutos y se lee a 625 m μ s.

Calibración de Colesterol

Método Paratoluen sulfónico		Coleman Jr. 625 m μ s	
Concentración	Porcentaje de transmisión		Densidad Optica
100	66		1.1805
200	46		1.3372
300	33		1.4815
400	21		1.6778
50	81.5		1.0888
100	65		1.1371
200	44		1.3557
400	21		1.6778
150	54		1.2676
200	44.5		1.3516
250	37		1.4318
300	30.5		1.5157
400	21		1.6778
150	53.5		1.2716
200	44.5		1.3516
300	30		1.5229
400	21.5		1.6676
150	54		1.2676
200	44.5		1.3516
300	30.5		1.5157
400	21.5		1.6676
100	69		1.1612
200	52		1.2840
300	38		1.4202
400	28		1.5528

BILIRRUBINA.- Técnica de Powell modificada.

Se pesan 10 Mgs. de Bilirrubina pura, se disuelve por ligero calentamiento en 10 cc. de Na₂CO₃ al 1%. Añadir enseguida 80 cc. de una mezcla de sueros no hemolizados. Se le ajusta el pH a 7.4 añadiendo aproximadamente 0.6 cc. de Fosfato Acido de sodio al 20%, se

se completa a 100 con la mezcla de sueros.

En la calibración se emplea esta solución a diferentes concentraciones juntamente con una muestra de la mezcla de sueros sin bilirrubina, restando la Densidad Óptica de esta última de los factores encontrados en las diferentes diluciones de la solución tipo.

O sea que se toma una muestra concentrada de bilirrubina correspondiente a 10 Mgts. y como blanco una porción concentrada de sueros sin bilirrubina; enseguida se toma una porción que corresponda a 5 Mgts. y como blanco mitad de mezcla de sueros y mitad de solución salina fisiológica. Y así sucesivamente. Se tira una línea con los puntos obtenidos, y ya para trabajo rutinario con suero — problema se sigue este cuadro de dosificación con dilución final — del suero al 1X10.

BILIRRUBINA TOTAL		TESTIGO		BILIRRUBINA DIRECTA		TESTIGO	
Suero	0.3 cc.	Suero	0.3 cc.	Suero	0.3	Suero	0.3
Diaz reactivo	0.15	Diaz Testigo	0.15	Diaz Reactivo	0.15	Diaz Testigo	0.15
Benzoato de Na.	2.55	Benzoato Na.	2.55	Agua destilada	2.55	Agua Dest.	2.55

Se leen 5 min. después de mezclar en el caso de bilirrubina total y 10 en el caso de la directa, a una gama de 525, y con tubos de 12 mm.

DATOS DE CALIBRACION DE BILIRRUBINA

Concentración	Porcentaje de transmisión	D. Óptica
10	32	1.4949
5	53.5	1.2716
1.1	90	1.0458
10	32	1.4949
5	57	1.2441
1.1	89.5	1.0402
5	54	1.2676
2.5	72.5	1.1397
1.25	90	1.0458
10	32	1.4949
5	55	1.2596
1.1	95.5	1.0200

HEMOGLOBINA.-

Para la calibración de Hemoglobina se utiliza una solución que

se vende en el comercio bajo el nombre de Acuglobin o también otro que se pide como Haycel. Ambos tienen una concentración conocida de la hemoglobina, bastará entonces medir la concentración original y de ahí hacer las diluciones correspondientes sacando por medio de sencillos cálculos la concentración correspondiente.

Se utiliza como blanco una porción de solución de hemoglobina, o el diluyente correspondiente según el producto.

Calibración de Hemoglobina (Acuglobin.)

Coleman Jr. 540 Gamas.

Concentración	% de Transmisión	Densidad Óptica
15.9	42.0	1.3768
12.0	52.0	1.2840
6.0	72.0	1.1427
15.0	47.5	1.3233
12.0	55.0	1.2596
6.0	73.5	1.1337
12.15	51	1.2924
8.0	64	1.1938
6.10	71	1.1487
4.2	79	1.1024
12.0	51.5	1.2882
6.0	71.0	1.1487
3.0	84.5	1.0731

Para hacer la adaptación a las siguientes determinaciones se debe de tomar en cuenta la pipeta en que se medirá la sangre y la cantidad de solución en que se diluirá, por ejemplo.-

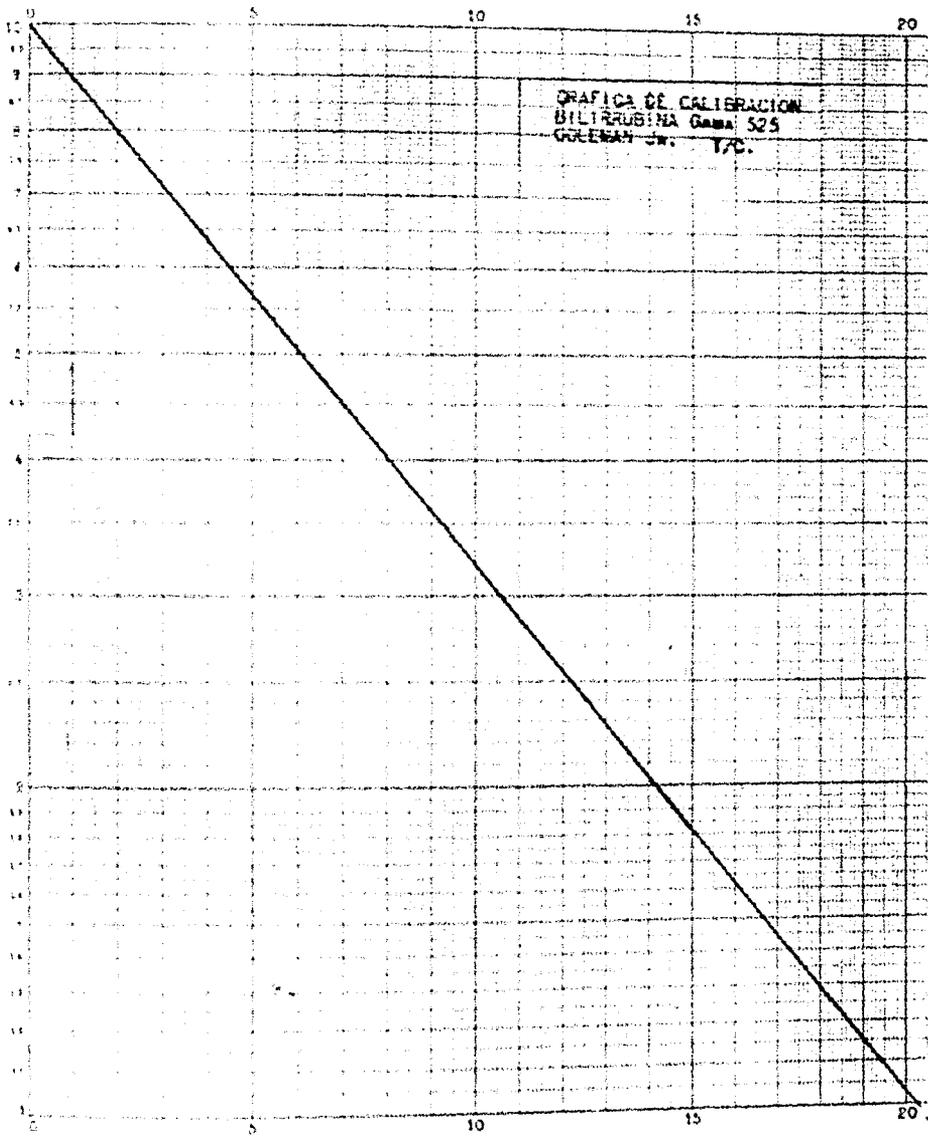
CONTENIDO DE LA AMPULA DE ACUGLOBIN = 0.0599 GR. %

F = .025 (PIPETA)

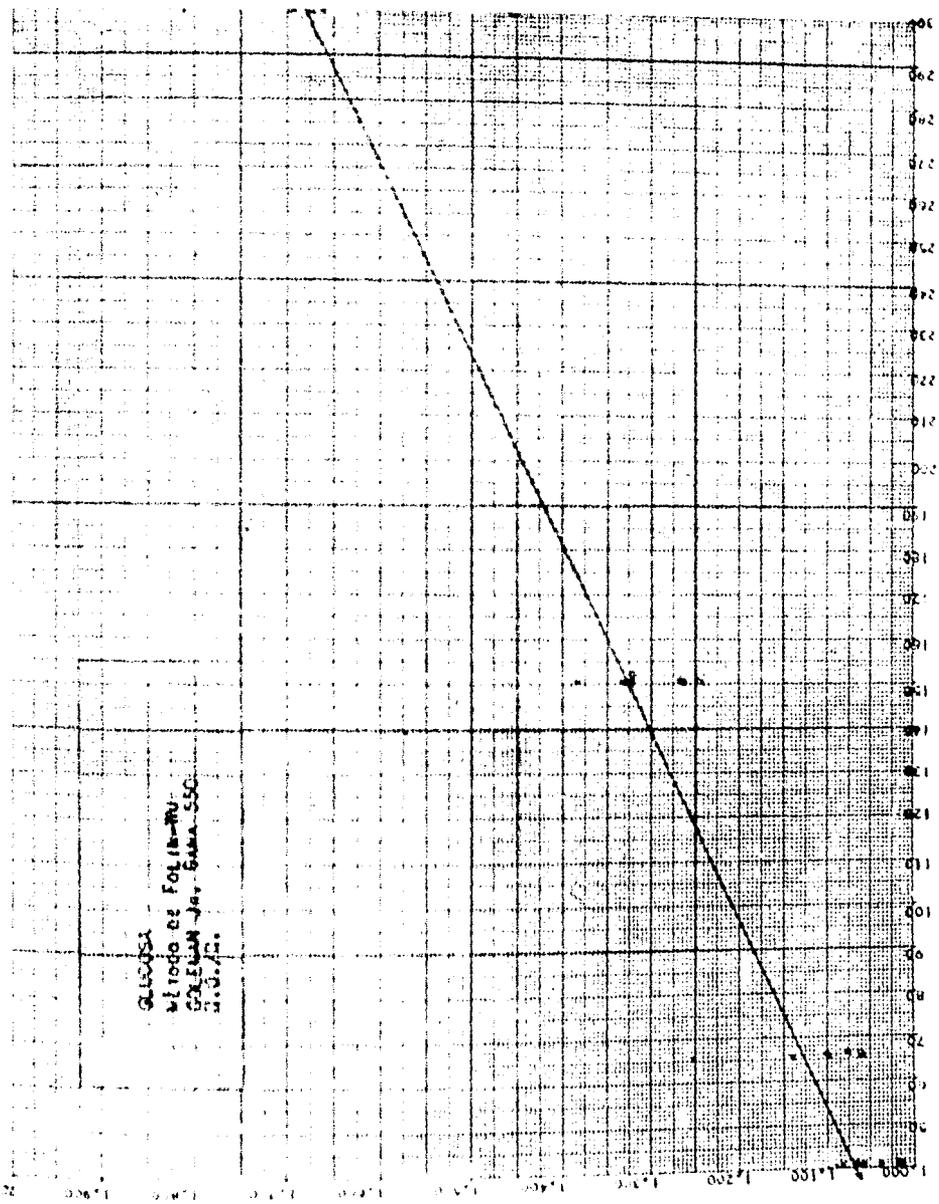
5.025

$$\frac{0.0599 \times 5.025}{.025} = 1204$$

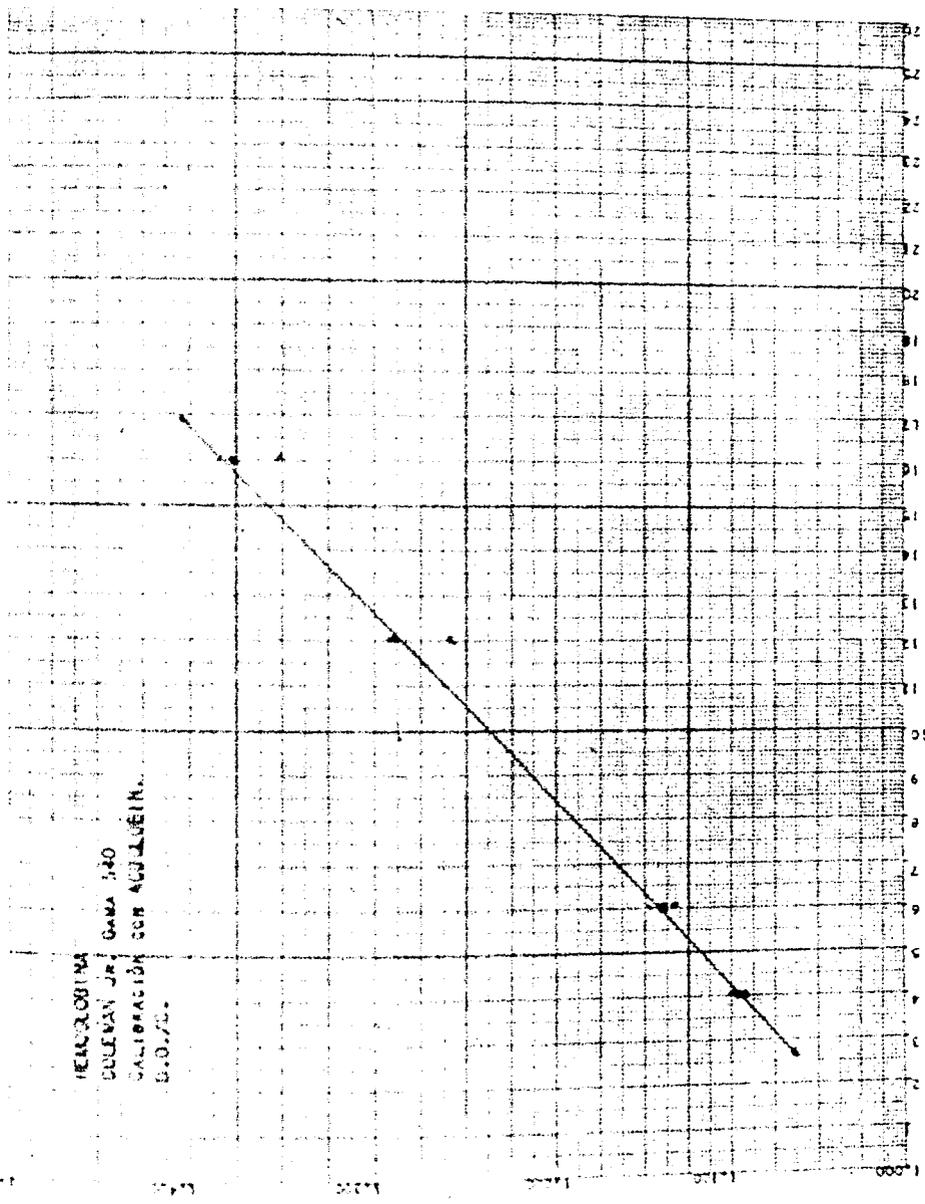
12.04 GRS % - LECTURA 1
 8.026GRS % - LECTURA 2
 7.224GRS % - LECTURA 3
 6.02 GRS % - LECTURA 4



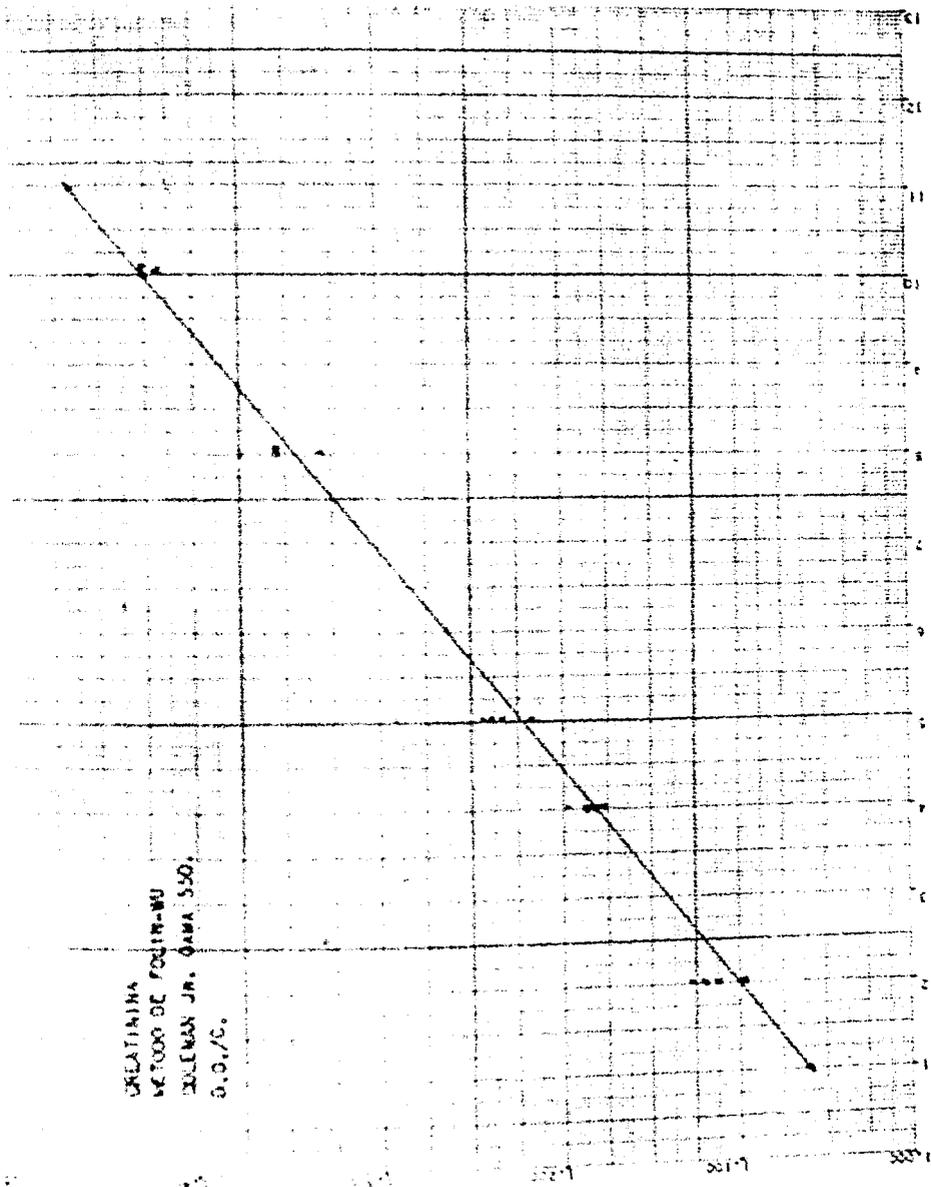
GLUCOSE
Method of Foglia-Ro
SPECTRAL JAY, SAMA-550
U.S.A.



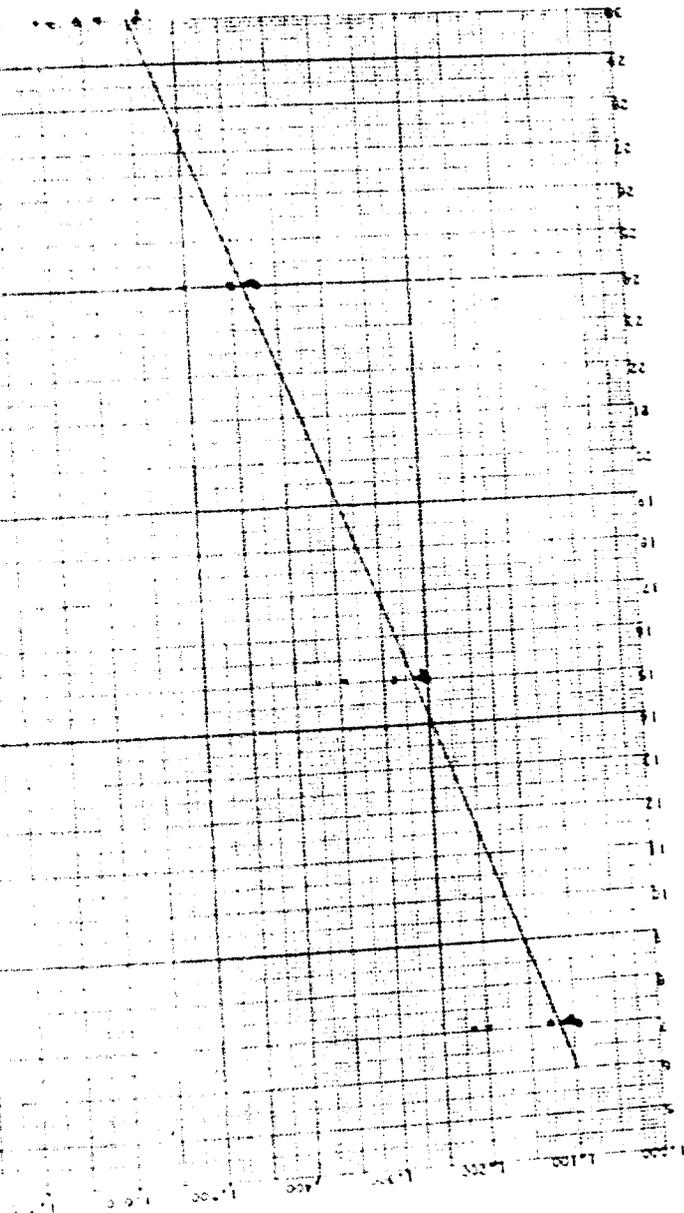
HECROBINA
DULEYAN JR. DATA 140
CALIBRACION CON AGUJUEIRO.
D.0.75.



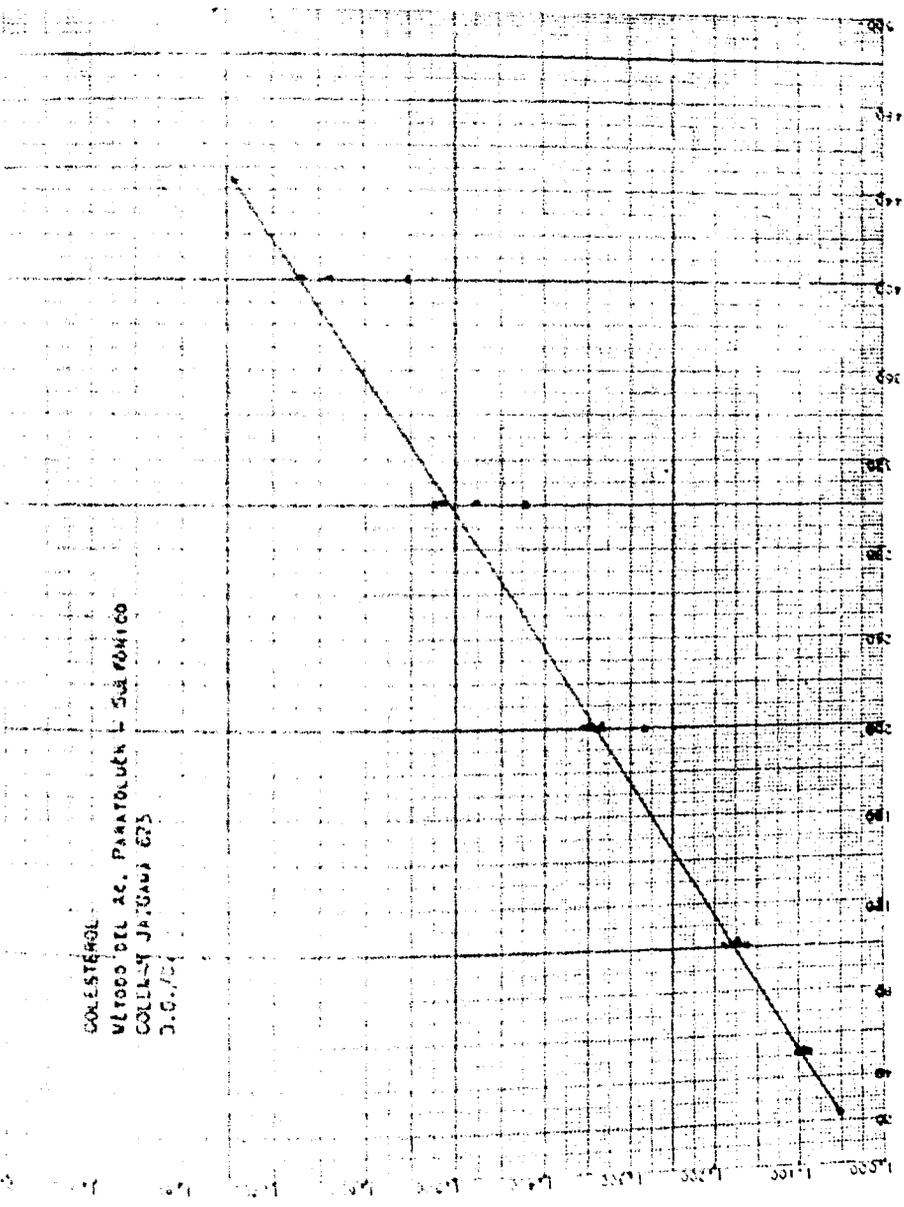
UREATININA
MÉTODO DE FOSTER-WU
BOLEMAN JR. OAMA 550.
0.01/C.

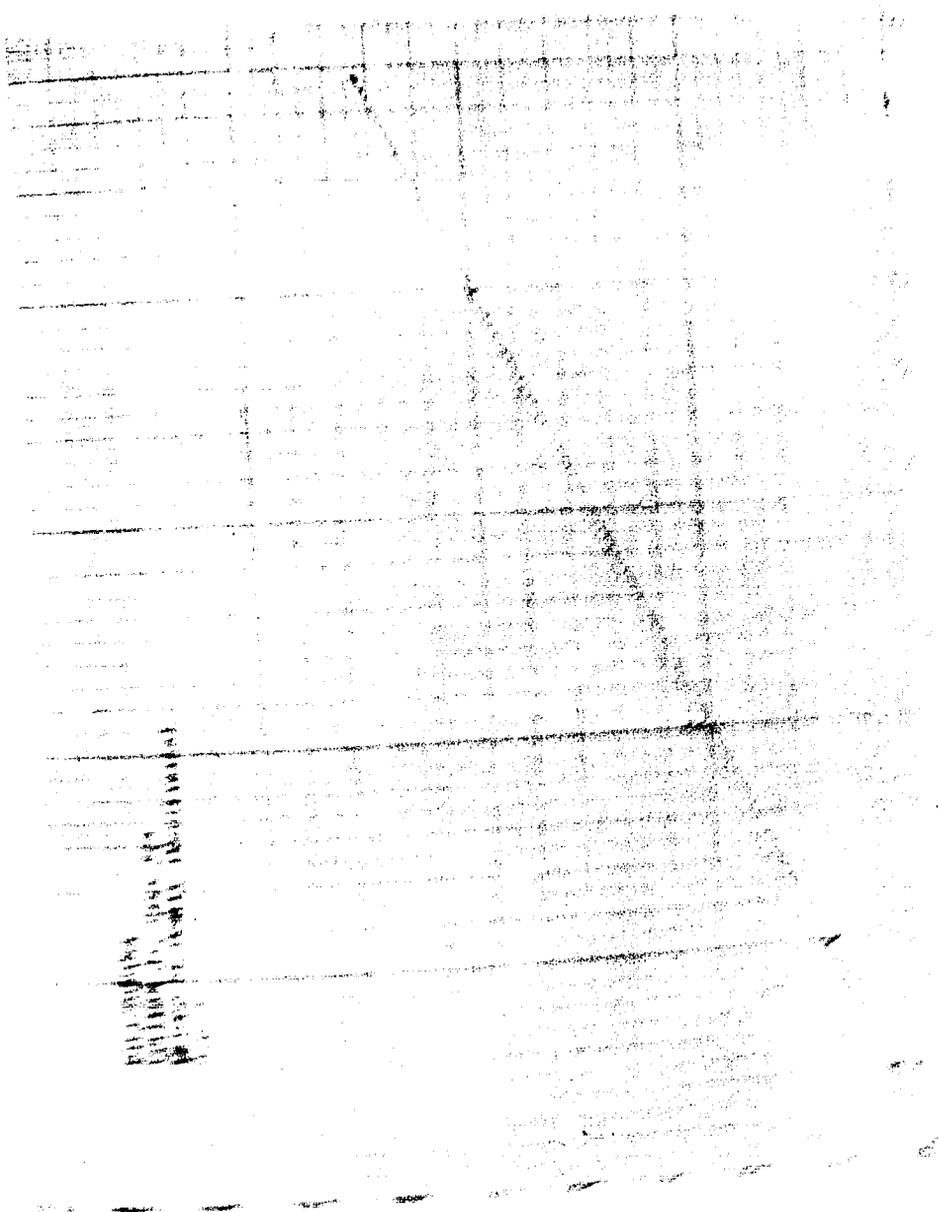


METODO DO CARTICO
 METODO DE SAUERBACH (DIACETIL-RESISTENCIA)
 COLLEMAN JR., JAMA 140
 1923 / 6.



COLESTÉROL
MÉTODOS DEL AC. PARATOLUÉN - SULFÓNICO
COLLETTI J. J. (1964) 673
D. G. (70)





CAPITULO VII

ORSEVACIONES

1. Se encuentran diferencias en las diferentes curvas logradas para cada una de las substancias examinadas. Se nota que estas diferencias en su mayor parte son de más o de menos, siendo las unas paralelas a las otras.
2. En otras ocasiones, las menos, las líneas de las curvas son muy diferentes entre sí, mostrando una divergencia en uno u otros sentidos.
3. En otras ocasiones, alguno de los puntos trazados discrepan por completo del resto de los puntos logrados en la misma determinación.

CAPITULO VIII

COMENTARIOS

1. La diferencia de las curvas en un sentido paralelo puede deberse y en su mayor parte lo es, a variaciones en el peso de la substancia "Standard", o a diferencias en la preparación de la solución madre.
2. La divergencia de las líneas tiene una explicación más complicada, pudiéndose deber a errores en el momento de hacer las soluciones estándares.
3. Los puntos discrepantes en una línea, indudablemente que señalan un error en el proceso de su determinación respectiva, desde el punto de vista técnico.
4. Para evitar algunos de los inconvenientes señalados en Observaciones, es del todo necesario extremar las precauciones en algunos detalles del proceso, como son los siguientes:
 - a) La substancia a determinar debe ser cuidadosamente deshidratada, antes de pesarla. (Cuando éste sea el caso).
 - b) La pesada debe efectuarse cuidadosamente, usando una balanza de precisión adecuada.
 - c) El equipo de vidriería debe de estar adecuadamente limpio.
 - d) El material graduado, sobre todo pipetas debe de ser de buena calidad para evitar errores debidos a su pobre calibración.
 - e) Se debe ser cuidadoso en la técnica de pipeteo y aferamiento.
 - f) La temperatura de los líquidos al medirse debe conservarse dentro de ciertos límites.
 - g) Los reactivos a usarse deben ser de buena calidad, evitando al máximo las impurezas.
 - h) Las técnicas señaladas, deben ser cuidadosamente seguidas.
 - i) El espectrofotómetro debe ser suficientemente sensible y sobre todo su fuente de energía debe ser constante, evitando variaciones.
 - j) La gama debe ser cuidadosamente seleccionada para cada prueba.
 - k) Debe tenerse presente la ley de Lambert-Beer, la que es seguida por la mayor parte de las substancias en un espectrofotómetro.

- 1) Aunque es posible efectuar una calibración conociendo la lectura de un solo punto, mediante el uso del disco logarítmico o el empleo del factor determinado, es siempre preferible verificar las curvas mediante la determinación de varias concentra - ciones diferentes.

CAPITULO IX

CONCLUSIONES

1. Independientemente de que un espectrofotómetro sea comprado - con calibración previa de la casa vendedora, su verificación es indispensable.
2. Los productos usados para la calibración del aparato deben - ser de buena calidad, ya sea que sean adquiridos en el mercado como "standard" o que se preparen en el laboratorio mismo.
3. El aparato debe ser suficientemente sensible y su fuente de - energía estable.
4. La determinación de la gama apropiada para la prueba específica es imprescindible.
5. La misma curva debe repetirse con diferentes "Standards" hasta lograr un resultado satisfactorio.
6. La determinación de una sustancia debe correrse siempre junto con una solución de valor conocido, permitiéndose así - una nueva verificación de exactitud de la curva.
7. Las técnicas empleadas deben ser rigurosamente seguidas.

CAPITULO X

BIBLIOGRAFIA

Tratado Popular de Física.

Autor: Juan Kleiber y Dr. E. Karsten

Traducción al Castellano: Dr. José Estolella

9a. Edición

Editorial Gustavo Gili, S. A.

Optical Methods of Chemical Analysis

Autor: Thomas H. P. Gibb, Jr. Ph D.

Primera Edición

Mc Graw Hill Book Company, Inc.

Instrumental Methods of Chemical Analysis

Autor: Galen W. Kwing

Segunda Edición

Mc Graw Hill Book Company, Inc.

Operating Directions for de Coleman Junior Spectrophotometer

PH Coleman Instruments Inc.

Printed in Feb. 1959