

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA



PREPARACION DE UN PATRON PRIMARIO DE
PROTEINAS

T E S I S
Que Para Obtener el Título de:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P r e s e n t a

EDUARDO JESUS CHANES ADAME

México, D. F.

1978



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 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.

LAS TESIS 1974
NO. ~~11-10~~ 92
FECHA _____
PROG. _____
S. _____



JURADO ASIGNADO ORIGINALMENTE SEGUN EL TEMA:

PRESIDENTE : DEA CORONADO PERDOMO
VOCAL : MARIA ELENA BUSTAMENTE CALVILLO
SECRETARIO : SALVADOR MARTIN SOSA
1er. SUPLENTE : VICTORIA VALLES SANCHEZ
2do. SUPLENTE : ESTHER GUTIERREZ HIDALGO

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA
LABORATORIO DE BIOQUIMICA DEL HOSPITAL DEL NIÑO

D I F

S U S T E N T A N T E
EDUARDO JESUS CHANES ADAME
ASESOR DEL TEMA
Dr. SALVADOR MARTIN SOSA

Este trabajo lo dedico a mis padres,
Sebastian y Altagracia que han sabido
encausarme en la vida y me han he --
cho ver su valor. Para ellos con mu -
cho cariño.

A mis hermanos: Eli, Ofelia, Pablo
y Gerardo que me han ayudado a sa -
lir adelante gracias al apoyo y - -
unión entre nosotros.

A mis abuelas, Tios, Primos y de -
mas familiares.
A todos mis amigos que han compar -
tido el camino de la Vida conmigo.

A todos mis Maestros que han influido en mi formación profesional.
A mi querida escuela UNAM (F. de Q) por haberme proporcionado algo del conocimiento humano.

Con toda gratitud y respeto al Dr. Salvador Martín Sosa por guiarme, y por la ayuda prestada para la realización de este trabajo.

Gracias a mis compañeros de los laboratorios del Hosp. del niño DIF. Y en especial a: Manuel, Norma, Soledad, Francis, Gloria y Gustavo que me han ayudado con sus experiencias y amistad.

Gracias SYLVIA por haberme
proporcionado el impulso para
mi superación como hombre y
como profesionista.
Con todo mi amor para Ti de-
dico este trabajo.

I N D I C E

	Pág.
INTRODUCCION.....	1
I GENERALIDADES.....	5
A).- Materiales de referencia.....	5
B).- Recomendaciones para un patrón primario de albúmi na sérica.....	9
C).- Control de calidad.....	12
D).- Exactitud y precisión.....	14
II MATERIAL Y METODOS.....	17
A).- Material.....	17
B).- Indicaciones para preparar una solución estandariza da de protefna.....	19
C).- Especificaciones y pruebas de pureza.....	28
D).- Procedimiento para valorar la concentración de pép tido en la solución estandarizada.....	32
1).- Método de Kjeldahl.....	36
III RESULTADOS.....	41
IV DISCUSION.....	58
V CONCLUSIONES.....	60
VI RESUMEN.....	61
VII BIBLIOGRAFIA.....	62

INTRODUCCION

El concepto de control de calidad en química clínica se basa, en - que todo analista debe admitir que hay cierto grado de incertidumbre o - cierta desviación del valor real en cada resultado que se obtiene. El simple reconocimiento de lo anterior coloca al analista en situación de poder elevar la calidad de su trabajo, lo que a su vez redundará en beneficio - - del paciente.

Resulta esencial, por lo tanto, determinar de alguna manera la - variabilidad de los resultados y de los distintos factores que contribuyen - a ello, ya que un resultado tiene muy poco o nulo valor a menos que se conozca, aunque sea en cierta aproximación, el grado de incertidumbre asociado a dicho resultado. De las ideas anteriores derivan el concepto de - control de calidad y diversos aspectos estadísticos inherentes al mismo.

Al establecer un sistema para el control de calidad (cercanía a la - realidad) de los resultados, un laboratorio puede reducir de manera muy - significativa esa incertidumbre, de ahí que en el momento actual sea in - dispensable tanto, manejar los conceptos, como establecer sistemas ade - cuados a las características y requerimientos de cada laboratorio y en - - ocaciones, de cada analista.

La posibilidad de establecer un sistema de control de calidad en - el laboratorio clínico depende, a su vez, de la posibilidad de contar con - materiales de referencia satisfactorios, y este es un problema que apenas en años recientes ha sido atacado. Los expertos consideran que solamen - te a través de esfuerzos internacionales será posible acelerar en la medida en que se considere necesario, la estandarización de métodos y mate -

riales de diagnóstico indispensables para elevar la calidad del trabajo en el laboratorio clínico a los niveles científicamente deseables.

El problema es complejo y la solución no puede ser simple, pues - to que son numerosos los aspectos que deben ser tomados en considera - ción y que requieren de esfuerzos coordinados de individuos y de organi - zaciones; de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (1), los as pectos más importantes que requieren coordinación son:

1. - Terminología internacional.
2. - Requisitos en control de calidad y criterio de comportamien - to de materiales para diagnóstico.
3. - Evaluación y comparación de métodos.
4. - Reactivos de referencia y materiales para calibración.
5. - Estandarización biológica para mediciones cuantitativas (en - colaboración con el comite de expertos en estandarización - biológica).
6. - Exámenes de instrumentos y aparatos.
7. - Estudios internacionales en colaboración.
8. - Educación y adiestramiento de personal técnico.

Es quizá en el campo de la bioquímica clínica donde se ha podido - avanzar más en el desarrollo de materiales y métodos de referencia, so - bre todo en los Estados Unidos de Norteamérica; sin embargo, fué hasta - 1967 cuando la Oficina Nacional de Normas (National Bureau of Standard - o NBS) de ese país, produjo su primer material de referencia (Standard -

Reference Material o SRM) para uso específico en el laboratorio clínico: Colesterol. A la fecha NBS ofrece alrededor de 20 materiales de referencia para el laboratorio clínico, incluyendo filtros de vidrio, filtros líquidos para espectrofotometría y cubetas de cuarzo, materiales que son certificados por NBS. Se trata con materiales bien caracterizados de pureza bastante bien definida que se utilizan para calibrar un sistema de medición que permite la comparación de resultados sobre una base similar.

Sin embargo, el uso de materiales de referencia certificados no basta para garantizar la exactitud de los resultados, por lo cual ha sido necesario aceptar el concepto de métodos de referencia (métodos de exactitud demostrada) como un elemento esencial para alcanzar la mayor exactitud posible en condiciones prácticas. Hace apenas unos cuantos años fue aceptado el método de absorción atómica como método de referencia para la determinación de calcio en suero y se encuentran en estudio, ó en vía de aprobación métodos de referencia para glucosa, ácido úrico, plomo, electrolitos, colesterol, bilirrubina, hierro y nitrógeno de la urea, en sangre.

Como puede verse, entre éstos no se encuentran las proteínas séricas, que apenas en 1975 fueron incluidas en la lista de prioridades del NBS, por lo que toca a su producción como material de referencia. Cabe aclarar que desde 1972 y gracias a los esfuerzos combinados de esa dependencia y de la Federación Internacional de Química Clínica, se cuenta con un método aceptado en forma tentativa y preliminar para la preparación y estandarización de una solución de sero albúmina bovina

útil como patrón clínico primario, método en el cual se basa esta tesis.

Considero innecesario abundar en argumentos sobre la importancia biomédica de la cuantificación exacta de proteínas séricas, pero es conveniente hacer énfasis en que a través de este trabajo se ha realizado, por primera vez en nuestro país, la preparación de un patrón clínico primario de proteínas estandarizado conforme a las especificaciones internacionalmente aceptadas en el momento actual. Desde otros puntos de vista, el uso de este tipo de patrones resulta importante para reducir el costo de control de calidad en esta prueba y en otras también, ya que resulta relativamente fácil preparar patrones secundarios de suero humano, en cantidad suficiente para incorporar el número adecuado de controles en las pruebas cotidianas.

CAPÍTULO I
GENERALIDADES.

MATERIAL DE REFERENCIA

Existen diversas definiciones y aún conceptos sobre los materiales de referencia, patrones, controles, etc. utilizados en la actualidad para establecer sistemas de control de calidad. A continuación se indican algunas definiciones propuestas por Radin (2), las que han sido ampliamente aceptadas:

PATRON PRIMARIO (Primary standard): Sustancia química pura utilizada para valorar una solución volumétrica de concentración desconocida o para la preparación de una solución de concentración conocida. - - Aún cuando no es posible siempre seleccionar una sustancia como patrón primario, debe ser seleccionada de acuerdo a los siguientes criterios:

- 1.- Debe ser una sustancia estable y de composición definida.
- 2.- Una sustancia que se pueda desecar de preferencia a 105-110 °C, sin alterar su composición.
- 3.- Tener un peso equivalente elevado a fin de que los errores en las pesadas puedan tener un efecto relativamente pequeño.
- 4.- Ser una sustancia que pueda ser analizada con exactitud.
- 5.- Las reacciones deseadas deberan ocurrir de acuerdo a procesos sencillos, rápidos, bien definidos y esencialmente completos.
- 6.- Que se asegure la pureza de un patrón primario por pruebas cualitativas bien definidas, de sensibilidad conocida a través de su preparación por un método que permita obtener consis -

tentemente un producto puro y por su almacenamiento bajo -- condiciones en las que el producto es enteramente estable.

Estos son los criterios en los que se basa NBS y algunas compa -- ñas elaboradoras de productos químicos. En el caso de los materiales de referencia de NBS, estos obtienen una certificación de su pureza con el -- respaldo oficial correspondiente, por lo que en el momento actual deben -- ser considerados como los materiales de referencia que ofrecen mayor -- garantía de exactitud.

PATRON CLINICO PRIMARIO. - La definición clásica de patrón -- clínico primario no es aplicable con frecuencia en el caso del laboratorio -- clínico, ya que muchos de los constituyentes de los fluidos orgánicos no -- pueden purificarse con facilidad y muchos no son estables.

Un patrón clínico primario se define como una sustancia química -- que puede ser preparada dentro de ciertos límites de pureza aceptables -- para la medición cuantitativa de dicha sustancia en muestras clínicas. -- De la definición anterior se desprende que el concepto de pureza tiene un -- sentido relativo, ya que una sustancia "pura" puede purificarse aún más -- si se desarrollan nuevos métodos o si los aspectos económicos pasan a -- un segundo plano.

SOLUCION "PATRON CLINICO PRIMARIO". - Es la que se prepara -- pesando con la mayor exactitud posible un patrón clínico primario y dilu -- yendo hasta un volumen exactamente conocido, con un diluyente apropiado -- y definido.

SOLUCION "PATRON CLINICO SECUNDARIO". - Es la que se prepara disolviendo y diluyendo hasta un volumen conocido, con un solvente o solución definidos, una cantidad exactamente pesada de una substancia química de menor pureza. Esta solución "patrón clínico secundario debe ser valorada a partir de una solución patrón clínico primario".

MUESTRAS DE REFERENCIA. - También se les llama "materias de control", y se refiere a materiales en los que la composición química y las características físicas simulan las de los especímenes analizados. Puede tratarse de un suero o mezcla de sueros conservados en su condición original, congelados o liofilizados ó bien pueden usarse mezclas sintéticas. Para ciertas determinaciones se emplean controles de origen animal que tienen las ventajas de su bajo costo y se elimina el riesgo de la trasmisión de la hepatitis viral, aún cuando no pueden ser utilizados para la cuantificación de todo tipo de componentes.

Un inconveniente de este tipo de materiales obtenidos de fuente comercial es que los valores de referencia (valores normales) pueden haber sido determinados utilizando una metodología diferente a la del laboratorio usuario, en cuyo caso el material no es particularmente adecuado para definir la exactitud de los resultados, aunque sí la precisión. Por la misma razón no es recomendable calibrar aparatos y métodos con este tipo de materiales, a menos que éstos sean iguales a los del laboratorio por el cual es elaborado. Como regla se acepta que para la calibración de éstos se preferirán patrones clínicos primarios y secundarios siempre que éstos sean razonablemente estables y puros.

MATERIALES DE CONTROL CON VALORES ASIGNADOS. - Son aquellos donde ciertos componentes del suero, orina, LCR, han sido valorados por el laboratorio que los elabora, usando uno ó varios métodos. - Estos no son recomendables para control de exactitud ni para calibrar, puesto que aún en el caso de utilizar un método para el cual el producto tiene un valor asignado por quien lo proporciona, difícilmente las condi-ciones de la prueba van a ser similares respecto de aparatos de medición, estandarización de reactivos, error humano, etc. En rigor estos materiales deben ser utilizados solamente para control de precisión.

MATERIALES DE CONTROL SIN VALORES ASIGNADOS. - Son similares a los anteriores pero la casa que los elabora los suministra al usuario - - sin valores asignados para sus diversos componentes. Ello implica que el laboratorio que los utiliza como medio de control debe obtener experi-mentalmente dichos valores, lo que a su vez implica la necesidad de con-tar con patrones primarios o cuando menos secundarios de calidad com-probada, pues de ello dependerá la exactitud de los valores obtenidos. La valoración de los componentes de estos materiales exige también un mínimo de determinaciones para cada uno (30 determinaciones son el número ideal en la práctica), a fin de obtener un buen promedio y una desviación-estandard que nos garantice exactitud y precisión. En concreto pueden reconocerse 2 ventajas en este tipo de controles: menor costo y la posibili-dad de valorar sus componentes en las condiciones y con los métodos propios de cada laboratorio.

La selección de materiales de calibración o de control además de-

la frecuencia con que deben ser utilizados constituyen problemas que deberán resolverse de acuerdo a los recursos y las posibilidades metodológicas de cada laboratorio. Los expertos concuerdan en que no es posible establecer reglas fijas, pero en términos generales se acepta que la base de la exactitud es el patrón clínico primario y que la precisión puede controlarse satisfactoriamente mediante el uso de muestras de referencia o de materiales de control.

RECOMENDACIONES Y CONSIDERACIONES GENERALES DE LA FEDERACION INTERNACIONAL DE QUIMICA CLINICA (I F C C)

PROBLEMAS RELACIONADOS CON LA DETERMINACION DE ALBUMINA. - Diversas encuestas interlaboratorios han indicado una escasa correspondencia en las pruebas para cuantificar albúmina. La gran mayoría de ellas se realiza por métodos colorimétricos basados en la afinidad por ciertos colorantes, de los cuales los más utilizados son el verde de bromo cresol (BCG) y el ácido Benzoico 2-(4-hidroxy azobenceno) (HABA).

Se reconoce claramente la necesidad de investigar más a fondo la especificidad de tales pruebas, y de estudiar el comportamiento de las mismas cuando se practican en muestras procedentes de enfermos o que están recibiendo tratamiento con diversas drogas (medicamentos). En el momento actual, parece que la mejor manera de elevar la exactitud en las determinaciones de albúmina es buscar la estandarización de las pruebas entre los distintos laboratorios, para lo cual es indispensable contar

con un patrón primario de la más alta calidad.

ESPECIFICACIONES PARA UN PATRON PRIMARIO DE ALBUMINA SERICA HUMANA.

(human serum albumin standard).

a). - No es posible por ahora basar estas especificaciones en propiedades tales como afinidad por colorantes, contenido de tioles de ácidos grasos y de agentes cristalizables, estabilidad durante el almacenaje y aumento de formas poliméricas, ya que todas ellas parecen estar relacionadas entre sí. De ahí la conveniencia de preparar lotes piloto, que se ajusten a los criterios siguientes, para ser probados exhaustivamente:

1). - Investigar el efecto de eliminar los lípidos, para ver: Estabilidad durante el almacenaje, aparición de formas poliméricas y afinidad por BCG y HABA.

2). - Investigar el efecto de readicionar ácidos grasos, por ejemplo 2 moles de ácido oleico por mole de albúmina sérica humana libre de lípidos, sobre las propiedades indicadas anteriormente.

3). - Investigar el efecto de formas poliméricas en la afinidad por BCG y HABA.

4). - Investigar el efecto de bloquear el grupo thiol, en las mismas propiedades.

b). - En el momento actual parece posible definir especificaciones en los aspectos que siguen:

1). - Preparación. - La albúmina debe obtenerse por el método de

alcohol a bajas temperaturas (fracción V de COHN). Antes de ser liofilizada debe ser metida a deionización. Debe evitarse la adición de estabilizadores y/o agentes cristalizantes, tales como caprilato, acetiltriptofano y decanol. El contenido de globulinas (proteínas que no sean albúminas) no debe exceder del 1%.

2).- Pureza. - El polvo liofilizado no deberá contener más de - - 0.1% de cenizas, 0.05% de carbohidratos (como total de hexosas), 0.03% de compuestos amino no proteínicos (como nor-leucina), y 0.02% de hematina. El total de las impurezas indicadas equivale aproximadamente a las especificaciones de la División de patrones biológicos de los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos de Norteamérica. Podría utilizarse la metodología, para cuantificar las impurezas, descrita por NCCLS - (National Committee for Clinical Laboratory Standards).

Para la detección de contaminantes proteínicos podría utilizarse - electroforesis en acetato de celulosa y en agar, e inmunolectroforesis - con diversos antisueros contra suero humano completo en varias diluciones, seguido de cuantificación de las impurezas detectadas con antisueros específicos.

La concentración de albúmina en la solución debe ser determinada por comparación con la solución estandarizada de proteínas según el - - NCCLS, por medio del método de biuret, permitiéndose un CV de 0.3%.

Envasado. - Prepárese como una solución estéril que contenga - - 50g/lt., a pH de 6.5-6.8 en NaCl 0.02M. Envasar a razón de 2.2 ml. en ampollitas selladas a la flama.

3).- Sugestiones a laboratorios que han solicitado una alternativa de estandarización para pruebas de albúmina humana por métodos de fijación de colorantes.

a).- Preparar soluciones de albúmina humana fracción V para ser utilizadas como estándar. Estandarizar esta solución por medio de la reacción de biuret (por ejemplo, el método de Gornall y cols., según se describe en "solución estandarizada de proteínas NCCLS", (4), contra una solución de albúmina bovina adquirida de fuente comercial, cuyo contenido de proteínas ha sido definido como 6.25 veces su cantidad de nitrógeno. Como ejemplo, la Casa Armour prepara una solución estandarizada de proteína que contiene 10 g. de nitrógeno por litro.

b).- Un procedimiento alternativo, que requiere más trabajo en el laboratorio local, es preparar una solución que contenga aproximadamente 50 g. por litro de albúmina humana fracción V, y luego deionizar esta solución por pasos a través de una resina intercambiadora de iones. Luego, este contenido de proteínas es determinado como peso seco por unidad de volumen de solución, calentando alícuotas en una estufa hasta evaporación total del líquido y después en una estufa de secado al vacío. Esta solución deionizada debe ser utilizada pronto; de otra manera debe elevarse su pH a 7 y agregar NaCl hasta una concentración de 0.02M o mayor para prevenir la precipitación.

CONTROL DE CALIDAD.

Desde un punto de vista conceptual, el control de calidad se refiere

re a una serie de medidas que deben establecerse en forma sistemática a manera de constituir un programa que de por resultado obtener datos de la mayor exactitud y precisión posibles. De acuerdo con Whitby (6), los pasos fundamentales son los siguientes:

A). - El reconocimiento de las fuentes de error, inherentes a la obtención, transporte y recepción de muestras para análisis, y a cualquier otro proceso preliminar en la separación del suero o del plasma.

B). - La evaluación de procesos analíticos nuevos en el laboratorio respecto de exactitud, precisión y sensibilidad, mediante pruebas comparativas y de recuperación.

C). - Establecer la reproducibilidad de los métodos analíticos utilizados y definir los límites aceptables de variación para las muestras de referencia.

D). - Cálculo de promedios y desviaciones estandard, preparación de gráficas de control de calidad para hacer evidente la constancia o la variabilidad de los datos de control.

Una vez establecido el programa de control de calidad, su valor será prácticamente nulo si no se realizan las acciones indicadas por los resultados obtenidos.

También es conveniente hacer notar que aparte de los puntos indicados anteriormente, un programa completo de control de calidad debe tomar en cuenta otros aspectos, como los que se refieren al buen funcionamiento de equipo, aparatos y material de laboratorio, incluyendo el lavado correcto del material de vidrio.

EXACTITUD Y PRECISION.

Si se define EXACTITUD como la cercanía de una medición al VALOR REAL de la misma, y su determinación puede realizarse comparando resultados observados con el valor real. El programa consiste en conocer este valor real, y sería más conveniente reconocer que casi siempre eso es imposible. Los dos recursos de que se dispone en la actualidad para acercarse al máximo al valor real, es el uso de sustancias de elevada pureza y de contenido de impurezas bastante bien conocido, y de la aplicación de métodos de referencia cuyas características hacen posible una dispersión mínima de las mediciones en cuestión. El problema de la exactitud es complejo, no admite soluciones simplistas y está lejos de resolverse en forma satisfactoria para numerosos componentes químicos de la sangre o de otros fluidos biológicos.

La precisión, por otra parte, es el error aleatorio, es decir, la variación que se observa en los resultados cuando un mismo material o muestra es analizado repetidas veces en condiciones similares. En otras palabras, precisión es el grado de reproducibilidad observado en determinaciones repetidas de un mismo material; entre más pequeña sea la variación observada, mayor será la precisión. Exactitud y precisión no dependen la una de la otra; una prueba puede ser exacta pero imprecisa, precisa pero inexacta, inexacta e imprecisa, o idealmente, exacta y precisa.

La medida de la dispersión de valores en una serie de determina -

ciones repetidas, nos indica en forma numérica el grado de precisión. - -
Comúnmente esa dispersión se expresa en términos de desviación estandar (DE), y esta debe ser determinada para cada método y para cada material de referencia o de control. En la practica puede lograrse una precisión aceptable repitiendo 30 veces una determinación en el mismo material o muestra, calculando la media (\bar{X}) y la DE en la forma que sigue:

a).- Sumar todos los valores obtenidos experimentalmente - - -
($\sum X_n$, en donde X representa cada valor obtenido, y n el número de determinaciones en el mismo material).

B).- Calcular la \bar{X} dividiendo el valor de $\sum X_n$ entre n .

c).- En una segunda columna indicar los valores $\bar{X} - X_1$, - - -
 $\bar{X} - X_2 \dots \bar{X} - X_n$.

d).- Elevar al cuadrado cada uno de los valores asi calculados e -
indicarlos en una tercera columna.

e).- Sumar todos los valores de esta tercera columna, para obtener $(\bar{X} - X)^2$.

f).- La desviación estandar se calcula con la siguiente formula:

$$DE = \sqrt{\frac{(\bar{X} - X)^2}{n - 1}}$$

g).- El coeficiente de variación se calcula como sigue:

$$C V = \frac{DE \times 100}{\bar{X}}$$

Si se realiza una serie numerosa de determinaciones de un componente en un mismo material, la dispersión de resultados en relación a la

media, seguirá una curva normal o de Gauss al graficar las frecuencias - respecto de las desviaciones estandard.

CAPITULO II

MATERIAL Y METODOS

Con el afán de contar con patrones clínicos primarios de la mayor calidad posible, tanto para preparar patrones secundarios y muestras de referencia usándolos para estandarizar métodos en Química Clínica, - - siendo necesaria la preparación y valoración de la materia prima, que es albúmina bovina, de la cual se usaron tres lotes, obteniéndose ésta de - - fuente comercial #. Aproximadamente 10 g. de cada lote se mezclaron -- perfectamente y se llevaron a un desecador de vacío con gel de sílice y -- cloruro de calcio anhidro, durante 3 días.

Al empezar el análisis de las impurezas nos percatamos que una - parte del polvo de albúmina era insoluble en agua, siendo que una de las - características de esta fracción protéica es la de su solubilización inme- diata en agua o solución salina. Consideramos que este problema se de-- bía a una desnaturalización de la proteína provocada por el mal manejo - en el almacenaje o durante su transporte, ya que al llegar la muestra a - institución se procedió a conservarla en refrigeración y protegida de la - humedad.

Para resolver este problema y no desperdiciar este material, se - procedió a centrifugar en frío y separar a través de un filtro tipo SEITZ - EK - S, a fin de obtener una solución de albúmina totalmente libre de ma- terial insoluble. Después se liofilizó la solución de albúmina, para deter- minar su contenido de impurezas en base a substancia seca y de acuerdo - a la metodología que se indicará más adelante, junto con los resultados - que se encuentran en el cuadro # 1.

Laboratorios Behring

Debido a las dificultades que se encontraron para obtener al principio, una albúmina bovina satisfactoria, se consideró pertinente analizar el contenido de impurezas de un lote de albúmina bovina Fracción V, como una eventual alternativa para la preparación del patrón primario.

Sin embargo, como puede verse en el cuadro # 1, el lote estudiado contenía impurezas en cantidades superiores a las especificadas como máximas, por lo cual se descartó ésta posibilidad. En cambio, la albúmina filtrada y liofilizada sí resultó dentro de las especificaciones y cifras considerablemente menores de compuestos amino-no protéicos y de humedad, y también se redujo su contenido de carbohidratos.

Para la preparación de la solución patrón primaria se calculó el peso total de substancia - base necesaria para obtener una concentración final de 7.00 g/100 ml. de solución, haciendo las correcciones correspondientes al contenido de cada impureza.

Las impurezas que contenía éste material eran carbohidratos, lípidos, aminoácidos solubles, cenizas y humedad, las cuales resultaron estar en cantidad permitida por las normas de la Federación Internacional de Química Clínica.

La solución así preparada fue filtrada a través de un filtro esterilizador y dividida en alícuotas, y guardándose en frascos engargolados en el refrigerador.

Para valorar la concentración de este material se usaron básicamente dos procedimientos:

- 1) Determinación de nitrógeno protéico por método de Kjeldahl.
- 2) Método de biuret, modificación de Weichselbaum.

SOLUCION ESTANDARIZADA DE PROTEINA (Según recomendaciones del IFCC.) (3)

1. Producto

1.1 Descripción. - Deberá utilizarse sero albúmina bovina en polvo la cual debe llenar las especificaciones de pureza indicadas en la sección 3.1, con un contenido conocido de polipéptidos (ver sección 1.2). Se prepara como una solución que contiene aproximadamente 70 g/litro de polipéptidos. La solución también contiene cloruro de sodio y su pH debe ajustarse a manera de obtener la mayor estabilidad. No debe contener preservativos. La solución estandarizada de proteínas se suministra en ampollitas desechables con 2.2 ml. de la solución.

1.2 Definición. - La concentración de proteínas de la solución estandarizada, expresada en g/l, se basa en la masa de material polipeptídico disuelto por litro de solución, en donde el material peptídico está definido como albúmina en polvo menos su contenido de cenizas, carbohidratos, lípidos, compuestos amino no proteícos, y agua.

1.3 Usos. - La solución estandarizada de proteína deberá utilizarse principalmente como un patrón de referencia para pruebas de proteínas totales por métodos colorimétricos tales como el biuret y el de Folin-Lowry. Por medio del método de biuret podrán ser estandarizados sueros "normales" y soluciones de proteínas preparadas en el laboratorio, con--

tra la solución estandarizada de proteínas. Los sueros "normales" así estandarizados podrán ser utilizados para calibrar refractómetros para estimaciones de proteínas séricas.

Otros usos posibles de la solución estandarizada de proteínas - - con la verificación de procedimientos tales como análisis de aminoácidos electroforesis, cromatografía por difusión en gel de agar, y determinaciones de nitrógeno. La solución estandarizada de proteínas no debe ser utilizada en la estandarización de pruebas basadas en la fijación de colorantes, para verificar directamente refractómetros precalibrados, o como aditivo para la estandarización de bilirrubina. No se proporcionan diluyentes acuosos tales como solución 0.15 M de NaCl.

2. Preparación.

2.1 Materia prima. - La albúmina se obtiene a partir de plasma - de bovinos.

2.2 Purificación. - La sero albúmina bovina en polvo, de las características especificadas en la sección 3.1 puede ser preparada por fraccionamiento a bajas temperaturas (método de Cohn) seguida de recristalización 3 o más veces, deionización en resinas de intercambio iónico y - - liofilización, o por otros métodos que produzcan un material dentro de - - las especificaciones, el uso de un agente cristalizante, como el decanol, puede permitirse; la identidad del agente cristalizante y su fracción masa en el polvo de albúmina debe estar especificada (sección 3.1). El producto liofilizado no deberá calentarse por arriba de 25°C.

2.3 Disolución. - La solución estandarizada de proteína se prepara disolviendo la cantidad de polvo de sero albúmina bovina requerida para alcanzar una concentración de polipéptidos (como se define en la sección 1.2 y determinado por análisis según la sección 3.1) de aproximadamente 70 g/lit. de solución acuosa.

Antes de diluir la solución de proteínas a su volumen final debe agregarse NaCl a razón de 0.02 moles por litro de solución, y suficiente solución de NaOH 1 M para llevar el pH de la solución a 6.5-6.8.

2.4 Envasado. - La solución estandarizada de proteínas debe envasarse en ampollitas de vidrio selladas en atmósfera de gas inerte. El volumen por ampollita se especifica en la sección 3.2. Pueden utilizarse otros envases de material inerte.

2.5 Identificación.

2.51 En ampollitas individuales.

Nombre: Solución estandarizada de proteínas.

Volumen: 2.2 ml.

Concentración: ± 1 desviación estándar.

Nota: "Leer el instructivo de la caja antes de abrir la ampollita".

Condiciones de almacenamiento: 2°C a 8°C.

Fecha de envasado: 2.52 en el instructivo de la caja.

2.52 En el instructivo de la caja.

2.521 Precauciones.

Usos. - La solución estándar de proteína no debe utilizarse para estandarizar pruebas basadas en la fijación de colorantes para verificar

directamente refractómetros precalibrados o como aditivo para la estandarización de bilirrubina.

Almacenamiento y uso. - Las ampollitas almacenadas deben alcanzar la temperatura ambiente antes de ser abiertas, y utilizadas pronto - dentro del mismo día.

2.522 Usos apropiados. - La solución estandarizada de proteínas - debe ser utilizado principalmente como un patrón de referencia para pruebas de proteínas totales por métodos colorimétricos tales como el biuret y el de Folin-Lowry.

Por medio del método de biuret podrán ser estandarizados sueros "normales" y soluciones de proteínas preparadas en el laboratorio contra la solución estandarizada de proteínas. Los sueros "normales" así estandarizados podrán ser utilizados para calibrar refractómetros y así estimar la cantidad de proteínas séricas. Otros usos posibles de esta solución son la verificación de procedimientos tales como análisis de aminoácidos, electroforesis, cromatografía por difusión en gel de agar, y determinaciones de nitrógeno.

No se suministran diluyentes con la solución estandarizada. Pueden utilizarse diluyentes tales como solución acuosa de NaCl 0.15 M.

2.523 Método de biuret (4) recomendado. - Este método puede utilizarse para estandarizar otras soluciones de proteínas contra la solución estandarizada de proteínas.

Fundamento. - Todas las proteínas contienen el enlace peptídico el cual se combina con el ión cobre en las soluciones alcalinas fuertes, dan-

do un complejo de color púrpura, la intensidad del color producido es proporcional a la cantidad de enlaces peptídicos y por lo tanto a la cantidad de proteínas.

Reactivos:

a) Biuret. - Deben utilizarse reactivos grado analítico. Pesar 1.50 g. de sulfato cúprico ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, P. M. 249.7) y 6.0 g. de tartrato de sodio y potasio ($\text{K Na C}_4 \text{H}_4 \text{O}_6 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$, P. M. 282.2); transferir a un matraz volumétrico de un litro y disolver en aproximadamente 500 ml. de agua destilada. Agitando constantemente, agregar 300 ml. de NaOH 2.5 N (preparado a partir de una solución saturada de NaOH libre de carbonatos). Completar el volumen con agua destilada, mezclar y conservar en un frasco Pyrex, de polietileno o de vidrio común cubierto de parafina en su interior. Este reactivo deberá ser estable indefinidamente pero debe ser descartado si muestra un precipitado rojizo o negro, lo cual indicaría contaminación o preparación defectuosa.

b) Solución de cloruro de sodio 0.15 M (8.5 g/litro).

Procedimiento:

a) Preparar cuidadosamente una dilución 1:20 de la solución estandarizada de proteína con la solución de NaCl . Asimismo preparar dilución de la solución desconocida de proteínas, a manera de contener entre 3 y 4 mg/ml.

b) En tubos separados medir 2 ml. de cada una de las diluciones y 8 ml. del reactivo de biuret; mezclar bien. Preparar también un blanco-

de reactivo usando 2 ml. de la solución de NaCl y 8 ml. del reactivo de biuret.

Dejar en reposo durante 30 minutos a 20 - 25°C y leer la absorción a 540 nm., ajustando la absorción a cero con el blanco de reactivos.

Nota: En caso que la solución desconocida de protefna exhiba un tono rojo o amarillo, preparar también un blanco de muestra utilizando 2 ml. de la muestra diluída más 8 ml. de un reactivo preparado como se indica, pero omitiendo el sulfato cúprico. Restar la absorción de este blanco del de la mezcla biuret (solución de protefna).

Cálculos:

$$\frac{\text{Absor. del desc.}}{\text{Absor. del patrón}} \times \frac{\text{Conc. del patrón (g/lt.)}}{20} = \text{Conc. del desc. dil. (g/lt.)}$$

Este es el método recomendado para la valoración de la solución-protéica, al cual se le hicieron modificaciones, como las propuestas por Weichselbaum. Una de éstas fue la de reducir los volúmenes de muestra y reactivos, ya que estas cantidades son demasiado grandes.

Se llegó a la conclusión de que los volúmenes de muestra y de reactivos, eran óptimos en una proporción de 250 microlitros de muestra y 1 ml. de reactivo de biuret, ya que no se pierde sensibilidad y hay bastante precisión. Aún así, el volumen de muestra no es apropiado pues la técnica se pretende adaptarla para la valoración protefca de pacientes infantiles y la cantidad de muestra es todavía alta. Para resolver esta situación se empezaron a probar otras variantes del método para utilizar volú

menes de muestra lo más pequeños posibles sin perder las características propias del método, y sin previa dilución, lo cual eliminaría un factor de error y reduciría el tiempo necesario para la prueba. La técnica más apropiada fue una modificación del biuret hecha por Weichselbaum (5), la cual usa 20 microlitros de muestra.

Los detalles de la técnica son:

REACTIVOS

1. - a) Hidróxido de sodio 0.2 N.

b) Yoduro de potasio al 0.5 % en solución 0.2 N de NaOH.

2. - Solución stock de biuret.

Disuelva 45 g. de tartrato de sodio y potasio en aproximadamente 400 ml. de una solución de hidróxido de sodio 0.2 N. Agregue, mientras agita, 15 g. de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en cristales finos, hasta completa disolución. Agregue 5 g. de KI y diluya a 1 litro con solución de NaOH 0.2 N.

3. - Solución de biuret diluida.

Diluya 200 ml. de la solución stock de biuret hasta 1000 ml. con la solución de NaOH 0.2 N conteniendo 5 g. de KI/l.

4. - Solución de tartrato - yodo.

Disuelva 9 g. de sal de Rochelle (tartrato de Na y K) en solución al 5 % de KI en NaOH 0.2 N y dilúyala hasta 1 lt.

PROCEDIMIENTO

Agregue 20 microlitros de suero (medido con pipeta o microbureta de alta precisión) a 1.0 ml. de reactivo de biuret, enjuagando la pipe-

ta varias veces. Prepare también un blanco con 20 microlitros de agua y 1.0 ml. de biuret. Además haga un blanco de suero con 20 microlitros de suero y 1.0 ml. de tartrato de Na y K. Este blanco de suero solamente es esencial cuando el suero está opalescente o muy pigmentado. Mida 20 microlitros de solución patrón de concentración conocida y agregue 1 ml. de reactivo de biuret; también incluya un blanco de la solución patrón.

Lleve los tubos a una temperatura de 30-32°C a baño maría por 10 min. y después lea la absorción a 555 nm. usando el blanco de biuret para ajustar a cero de absorción.

CALCULOS:

$$\frac{\text{Abs. de la prueba}}{\text{Abs. de la sol. patrón}} \times \text{conc. del patrón} = \text{g. de proteína/100 ml. de muestra.}$$

Notas. - La bromosulfaleína y la fenosulfoftaleína pueden interferir con la determinación de proteínas totales debido al color formado en solución alcalina.

Las dextranas pueden interferir a causa de la turbidez. Teóricamente estas interferencias deberán ser minimizadas por el uso de un blanco apropiado.

Con esta técnica y a partir de la solución patrón primario de hizo una curva de calibración a partir de las siguientes concentraciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 mg./100 ml. (curva # 1). De esta curva concluimos que esta variante del biuret es suficientemente sensible y preciso, lo mismo a concentraciones altas y bajas.

2. 524. - Valores analíticos encontrados en la sección 3.1 y 3.2.

2. 525. - Información complementaria que debe suministrarse:

a) Índice de refracción de la solución a 25°C.

b) Densidad; masa de la solución a 25 °C.

c) Espectro de absorción de la solución (400 - 500) nm. y espectro de absorción de la solución diluida con agua a una fracción volumen - de 0.01 (200 - 400 nm.)

Absorción de la solución diluida a 280 nm.

d) Contenido de nitrógeno de la solución, por método de Kjeldahl

2. 526. - Información suplementaria que debe proporcionarse, - si se dispone de ello:

a) Composición de amino-ácidos de las proteínas fracción molar.

b) Composición de ácidos grasos de los lípidos incluidos, fracción molar.

c) Composición de los metales incluidos, por análisis espectrográficos de emisión, cantidad de substancia por masa de polvo.

d) Análisis inmunolectroforético, usando antisuero contra suero completo de bovino.

3. - ESPECIFICACIONES Y PRUEBAS.

3.1 De pureza en el polvo liofilizado.

Constituyentes	Técnica	Especificación (fracc. masa de polvo liofilizado).	Precisión de la prueba. D. E.
a. Cenizas	Sulfato (add. 1)	0.001	± 0.0001
b. Carbohidratos			
1. Hexosa total	Orcinol (add. 2)	0.0005	± 0.0001
2. Suma de citrato piruvato y lactato.	Extracto ac. perclórico; Enzimático (add. 2)	0.0001	± 0.00002
c. Lípidos			
1. Total	Gravimétrico (add. 3) o Cromatografía gas-liq.	0.0050	$+ 0.0005$
2. Agentes cristalizantes.	Cromatografías gas-liq.	0.0010	± 0.0002
d. Compuestos amino-protéicos, como norleucina.	Extracto ac. fosfotúgstico; ninhidrina (add. 4).	0.0003	± 0.00005
e. Agua	Secado en estufa (add. 5) o titulación Karl Fisher.	0.05	± 0.005
f. Impurezas proteícas.			
1. Electroforesis	pH 5 y pH 8.6 acetato de celulosa.	no detectado	± 0.01
2. Electroforesis en gel.	Gel de acrilamida o de almidón, o agarosa, pH 9.	menor de < 0.05 dímero	± 0.01
g. Propiedades Espectrales			
1. Ultravioleta	a más o menos 1 g/litro	$A_{250}/A_{279} < 0.5$	± 0.02
2. Banda de Soret	a 70 g/litro	$A_{405} < 0.2$	± 0.02
3. Visual	a 70 g/litro	$A_{500}, A_{600} < 0.05$	± 0.0

3.2 En muestras de la solución envasada.

Medición de	Rango	Precisión de la prueba.
a. Concentración de la masa de péptidos (add. 6)	65 - 75 g/litro	± 0.2 g/litro
b. pH	6.5 - 6.8	± 0.02
e. Concentración de substancias con ión sodio.	0.02 - 0.04 mol/lit	± 0.001 mol/litro
d. Concentración de substancia con ión cloro	0.01 - 0.03 mol/lit.	± 0.001 mol/litro
e. Volumen	2.15- 2.25 ml.	
f. Esterilidad	Según la USP XVIII pp. 855 clase A.	

4. Métodos recomendados para las pruebas.

4.1 Procedimiento para la determinación de cenizas (basado en la USP XVIII, pág. 901). (7)

Pesar exactamente por triplicado de 0.8 a 1.5 g. (menor cantidad si se dispone de una microbalanza) del polvo de albúmina, en crisoles tarados de platino. Calentar hasta calcinación total, en un lugar protegido de corrientes de aire a la temperatura más baja posible para efectuar la combustión. Enfriar, humedecer cada residuo con 1 ml. de ácido sulfúrico y luego calentar cuidadosamente a $800 \pm 25^\circ\text{C}$ (que se puede alcanzar en un mechero bunsen) hasta que el carbón halla sido completamente consumido. Enfriar los crisoles en desecador con P_2O_5 y pesar.

Calcular las cenizas sulfatadas como la fracción masa del residuo en el polvo \pm D.E.

4.2 Procedimiento para la determinación de carbohidratos.

(a) Hexosa total (de "métodos de análisis químicos", Dept. of Phys. Chem., Harvard Medical School (8)).

REACTIVOS: (Preparar los reactivos de orcinol y de carbohidratos cada tres días).

Reactivo de orcinol. - Disolver 1.6 g. de orcinol, recristalizado de benceno, en 50 ml. de agua destilada y completar a 100 con ácido sulfúrico concentrado. Conservar en un lugar fresco.

Acido sulfúrico 10.8 molar. - Agregar cuidadosamente 60 ml. de ácido sulfúrico concentrado a 40 ml. de agua enfriada en hielo.

Reactivo de Galactosa-Manosa. - Pesar 250 mg. de D-galactosa y 250 mg. de D-manosa y disolverlos en agua destilada a un volumen total de 500 ml.

PROCEDIMIENTO: En tubos de ensaye preparar por triplicado las siguientes mezclas: 0.1 g. de polvo de albúmina en 1 ml. de agua. 2.5 ml. de reactivo de orcinol y 15 ml. del reactivo de ácido sulfúrico 10.8 M.

Preparar estándares que contengan, en vez de la solución de albúmina, 1 ml. de diluciones del reactivo de galactosa-manosa que contengan 0, 0.01, 0.03, 0.05 de hexosa total. Preparar también un blanco de muestra con 0.1 g. de polvo de albúmina en 3.5 ml. de agua más 15 ml. del --

reactivo de ácido sulfúrico, y un blanco de referencia con 3.5 ml. de - - agua más 15 ml. del reactivo de ácido sulfúrico.

Calentar los tubos a 80°C durante 20 min. , enfriar en agua helada y en la obscuridad durante otros 20 min. y luego a temperatura ambiente en la obscuridad por 30 min. Leer la absorción de todas las muestras a 450 nm. contra el blanco de referencia.

Restar la absorción del blanco del de la muestra, desconocida. Interpolar estos valores netos a partir de los valores de los estándares para obtener hexosa como fracción masa del polvo ± 1 D.S .

(b) Citrato, piruvato y lactato. (9)

Reportar los resultados como la suma de estos 3 constituyentes -- como fracción masa del polvo \pm D.S.

4.3 Procedimiento para la determinación de lípidos totales (gravimétrico).

Hágase por duplicado o por triplicado si alcanza el material. Di--solver alrededor de 5.0 g. de polvo de albúmina en 100 ml. de agua deionizada, ajustar el pH a 4.7 con ácido acético 5 M. y reducir todavía más-- el pH hasta 3.5 con una cantidad predeterminada del ácido acético.

Agregar la solución de albúmina gota a gota y agitando, a 500 ml. de metanol a temperatura ambiente. Agitar durante una hora y elevar el - pH agregando hidróxido de amonio 5 M. en cantidad equivalente al ácido acético que se requirió para bajar el pH de 4.7 a 3.5.

Agitar durante una hora más, a temperatura ambiente y centrifu-

gar a 2000 x g durante 15 min; lavar el precipitado con 200 ml. de metanol.

Evaporar el sobrenadante combinado con las soluciones de lavado, en un baño de vapor con agitación. Extraer el residuo 3 veces con 80 ml. de éter. Combinar los extractos etéreos, filtrar y evaporar en un recipiente tarado hasta sequedad en un baño de vapor. Pesar nuevamente el recipiente y el contenido, incluyendo 2 recipientes de control para corregir por cambios de masa. Las pesadas deben tener una exactitud de 0.0002 g.

Calcular la masa obtenida como lípidos totales, fracción masa del polvo \pm D.S.

4.4 Procedimientos para la determinación de compuestos amino-protéicos (10).

REACTIVOS: Acido fosfotúngstico al 10%, recientemente preparado, filtrado, conservado en frío.

Amortiguador de acetato 2.5 M., pH 5.5, conteniendo 10 mg. de cianuro de sodio/litro, agregado poco antes de su uso.

Ninhidrina 30 g./l en metil celosolve.

Diluyente. - Volúmenes iguales de 2 propanol y agua.

PROCEDIMIENTO: Pesar muestras por triplicado de aproximadamente 20 mg. de polvo liofilizado y disolver cada uno en 0.2 ml. de agua.

Incluir 3 blancos de 0.2 ml. de agua y 3 estándares de 0.2 ml. cada uno conteniendo 0.1 micromoles (13.1 microgramos) de norleucina.

Enfriar en baño de agua al agregar 1.8 ml. de ácido fosfotúngtico; mezclar bien.

Después de unos 15 min. centrifugar los tubos a 1000 x g, a 3-5°C durante 30 min,

Pasar 1.5 ml. del sobrenadante claro a un tubo y agregar 1.0 ml. de amortiguador de acetato y 1.0 ml. de reactivo de ninhidrina; llevar a un baño de agua hirviente durante 15 min. cubriendo la boca del tubo con una canica. Agregar 5.0 ml. del diluyente, mezclar y enfriar los tubos - rápidamente hasta que tengan la temperatura ambiente. Leer la absorción a 570 nm. contra agua.

Promediar las lecturas de los triplicados, tanto blancos como estándares y muestras. Restar el valor del blanco y calcular la concentración de compuestos amino no protéicos como nor leucina en términos de cantidad de substancia/masa de polvo + D. E.

4.5 Procedimiento para la determinación de agua.

Precauciones: Usar pasafiltros grandes para minimizar el espesor de la capa de polvo; usar papel o pinzas para manejar los pesafiltros. Evitar las corrientes de aire durante las pesadas, y de preferencia efectuar esto durante días no húmedos.

Secar 4 pesafiltros perfectamente limpios a 110°C; enfriar en un desecador con pentóxido de fósforo y pesar. Un pesafiltros se utiliza como tara secundaria, y debe pesarse antes y después que los otros tres. Si el promedio de sus pesadas cambia entre una serie y otra de pesadas,

la diferencia debe sumarse o sustraerse de todas las pesadas efectuadas en una serie.

Dejar que el frasco con polvo de albúmina alcance la temperatura ambiente y mezclar bien antes de abrirse; pesar luego 3 muestras de 1.0 g. o más en los pesafiltros (utilizar cantidades menores si se dispone de una microbalanza).

Cubrir los pesafiltros con papel filtro y colocarlos, con sus tapas a un lado, en un recipiente limpio que contenga pentóxido de fósforo y llevarlos a la estufa de vacío. Evacuar el desecador hasta 1 kPa (un kilopascal es aproximadamente 7.5 mmHg.) o menos, lentamente (20 - 30 min.), a manera que no perturbe el polvo.

Mantener el desecador a 109 - 111°C durante 2 días (NOTA: si no se puede alcanzar la presión de 1 kPa, es posible obtener resultados satisfactorios con "vacío ordinario" del orden de 20 pulgadas de vacío mercurio o 30 kPa, pero en tal caso las muestras deberán dejarse en la estufa por 4 días).

Permitir la entrada de aire a través de un tubo con pentóxido de fósforo, o introducir nitrógeno seco, lentamente a la estufa. Tapar los pesafiltros y pasarlos a un desecador con pentóxido de fósforo, y una vez a temperatura ambiente (30 - 45 min.), colocar los pesafiltros en el compartimiento de balanzas durante otros 20 min. y obtener otra serie de pesadas como se hizo anteriormente. Regresar las muestras a la estufa de vacío durante un día más y pesar otra vez para asegurarse de que la masa es constante a 1.0 miligramo. De no ser así, continúe las pesadas a intervalos de 1 o 2 días.

Calcular el contenido de agua en el polvo como fracción masa - -
 ± 1 D.S.

4.6 Procedimiento para determinar la concentración de péptido en la solución estandarizada.

Preparación de la solución de comparación: determinar la humedad por triplicado en el polvo liofilizado, como se indica en la sección 4.5; al mismo tiempo pesar por triplicado muestras de 1.4 g. en un recipiente de 100 ml.; registrar la masa con una exactitud de ± 0.0001 g. A cada muestra de 1.4 g. agregar 50 ml. de agua y dejar en reposo durante la noche. - Agitar suavemente para mezclar sin hacer espuma y cuidadosamente transferir cada muestra a un matraz volumétrico de un litro, completando hasta la marca con agua y cuidando de no hacer espuma; mezclar muy bien.

Dilución de la solución estandarizada: seleccionar 3 ampolletas de solución estandarizada, del principio, de la mitad y del final del proceso de envasado, dejar que alcancen la temperatura ambiente, abrirlas y preparar alicuotas como sigue:

Mediciones: incluir 3 o más alicuotas de cada muestra para poder evaluar la variación analítica:

a) Probar la solución de comparación y la dilución en una fracción volumen de 0.02 de la solución estandarizada por el método de biuret.

b) Leer la absorción contra agua tanto de la solución de comparación diluida a una fracción volumen de $\frac{1}{2}$ como de la diluida a una fracción - volumen de 0.01 de la solución estandarizada a la absorción más - -

cercana a 279 nm. Usar la misma cubeta para todas las muestras y corregir la lectura del blanco obtenido con agua en la misma cubeta.

Cálculos: Obtener la fracción masa de péptido en el polvo sustra--yendo de la unidad la suma de las fracciones masa de humedad, cenizas, -carbohidratos y lípidos. Calcular la concentración de péptidos en la solu--ción de comparación. Utilizar los datos analíticos para obtener la mejor--cifra de la relación de concentraciones de péptidos entre la solución de --comparación y la estandarizada. Convertir las cifras a concentración - --masa de péptido en la solución estandarizada, como $g/1 \pm 1$ D.S.

Determinación de nitrógeno total en fluídos biológicos. -
(Método de KJELDAHL).

REACTIVOS:

- 1) Acido sulfúrico concentrado.
- 2) Solución estándar de amonio. - Disuelva 2.3581 g. de sulfato -de amonio y complete el volumen hasta 1 litro con agua (1 ml. contiene --0.5 mg. de nitrógeno).
- 3) Acido clorhídrico 0.01436 N. - Este ácido debe ajustarse desti--lando el amonio de 2 ml. de la solución de amonio estándar, recibiendo--lo en ácido bórico y titulándolo. La concentración del ácido clorhídrico de--berá ajustarse hasta que la titulación requiera exactamente 5 ml. de ácido
1 ml. $HCl \pm 0.2$ mg. de N_2 .
- 4) Cloruro de selenio 0.9%.
- 5) Catalizador de Hengar - selenio. - Adicione 1 litro de ácido sul-

fúrico concentrado a 100 mg. de selenio metálico, y caliente hasta que la solución permanezca incolora. Estable indefinidamente.

6) Solución stock de indicador. - a) Disolver 100 mg. de fenoftaleína y completar el volúmen a 100 ml. con etanol de 95%. b) Disolver 33 mg de verde de bromo cresol y 66 mg de rojo de metilo, y complete el volumen a 100 ml con etanol de 95%.

7) Reactivo de ácido bórico. - Disolver 10 g de ácido bórico en 1400 ml de agua destilada y deionizada, agregar 400 ml. de etanol de 95%, 70 ml de solución: a) y 20 ml. de solución. b). Completar el volumen a dos litros y mezclar. Ajustar el color, si es necesario, a un color rojo-caffé con ácido o una base. No tome: el color límite ácido del indicador.

8) Fenoftaleína al 0.1% en etanol de 95%.

9) Hidróxido de sodio NaOH 60%. - Medir aproximadamente 400 ml de agua en un matraz de 2 litros, agitar con un agitador magnético y adicionar gradualmente 600 g de NaOH granulado. Continuar agitando hasta que permanezca frío. Completar el volumen a 1 litro y guardarlo en una botella de plástico.

PROCEDIMIENTO:

Digestión. - 1) Pipetear en matraces de digestión Kjeldahl una cantidad de muestra suficiente para que se obtenga una concentración de nitrógeno de 0.2 - 1.0 mg. Agregar 0.5 ml del reactivo de selenio. 2) Calentar los matraces en hornillas eléctricas para digestión. Calentar las soluciones poco a poco aumentando la temperatura gradualmente y dejarlo -

hasta que la solución permanezca incolora. Continuar así hasta que la temperatura sea constante; la digestión completa requiere una hora, al término de la cual se deja enfriar a temperatura ambiente.

3) Agregar 1 ml. de agua destilada y deionizada a cada tubo.

4) Correr un blanco de reactivo, especialmente cuando se está - usando un lote nuevo de reactivo.

DESTILACION Y TITULACION:

1) El aparato de destilación deberá destilar de 10 - 12 ml de destilado frío en sólo 2 min. Correr un blanco para asegurarse de que el aparato está limpio sin amonio libre, lo cual se verifica recibiendo, en un ma--traz limpio que contenga 10 ml de reactivo de ácido bórico, el destilado -- que se produzca en 2 min. en la titulación no deberá requerir más de 0.1 - ml de HCl 0.01436 N.

2) Si el aparato se encuentra totalmente limpio, empezar con las -- muestras, agregándole 4 gotas de fenoftaleína al 0.1% a cada matraz de digestión.

3) Poner un matraz de 50 ml tipo erlemeyer conteniendo 10 ml de reactivo de ácido bórico, bajo el condensador del aparato de destilación.

4) Sumergir el tercio inferior del matraz de digestión en agua fría, y enseguida agregar solución de NaOH al 60% agitando constantemente.

5) Cuando el contenido del matraz se torne color magenta, suspen--da la adición de NaOH y empiece de inmediato la destilación.

Cuando aparezca la primera gota de destilado en el condensador, -

empiece a contar el tiempo.

6) El tiempo de destilación deberá ser de 2 min., al cabo de los cuales se retirará el matraz de digestión.

7) Titular de inmediato el destilado con el ácido clorhídrico - - - 0.01436 N hasta un vire color rojo-café.

MUESTRA:

1) Medir en cada matraz de digestión 40 microlitros de suero o de solución problema y adicione 0.5 ml de reactivo de selenio.

2) Continúe la técnica para la determinación de nitrógeno total.

Cálculos:

$$(\text{ml de HCl } 0.01436 \text{ N gastados en la muestra - los del blanco}) \times 0.5 = \text{g de N}_2/100 \text{ ml de muestra}$$

Para convertir a proteína se usa el factor 6.25.

En la estandarización de éste método se hicieron algunos ajustes para acondicionarlo a los recursos del laboratorio de la institución.

Respecto a reactivos: Se usó, en lugar de la mezcla indicadora - - - (punto 6 de reactivos) de amonio, un indicador de tipo comercial. (#)

El reactivo de ácido bórico se preparó, agregando 7 ml de ese indicador a 2.5 g de ácido bórico disueltos en agua libre de amonio, y completar el volumen a 500 ml con agua deionizada libre de amonio.

Respecto al procedimiento:

Aparatos. - Las mediciones de los volúmenes de muestra fueron --

hechas con una microbureta de alta precisión. Los resultados de las determinaciones están en la tabla # 1.

CAPITULO III
RESULTADOS

CURVA DE CALIBRACION
BIURET

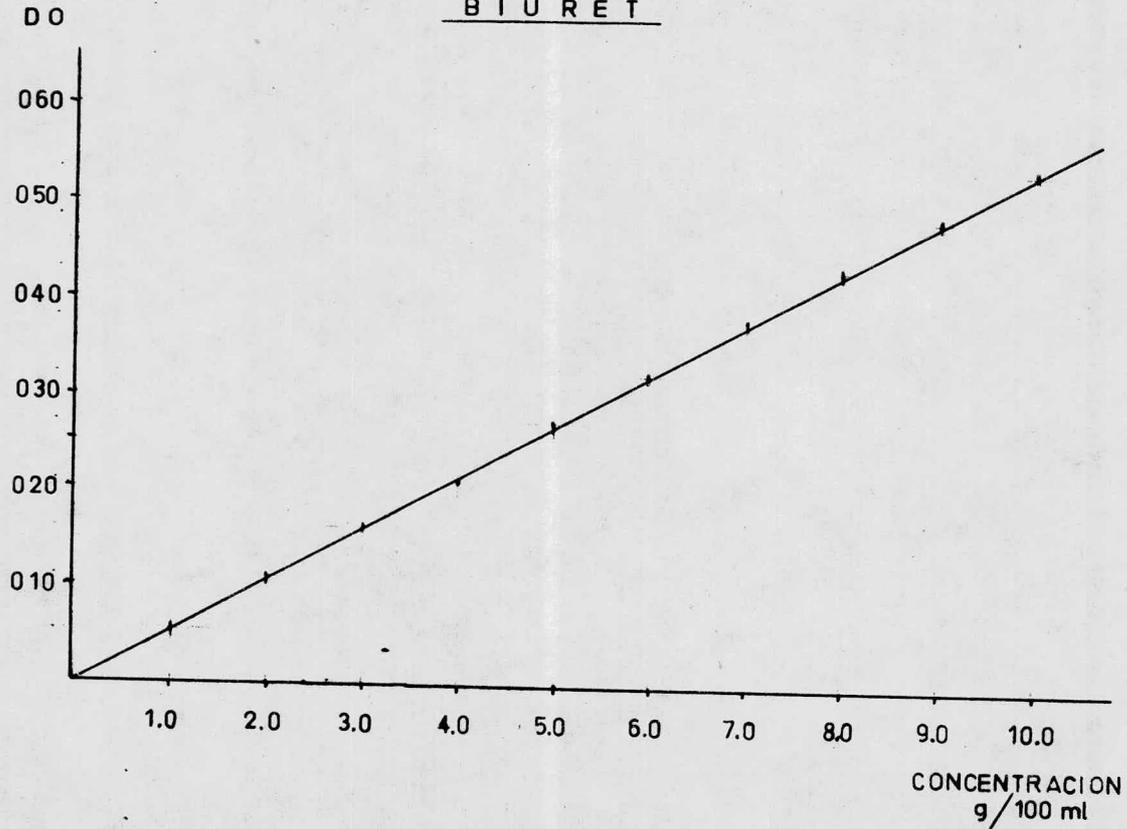


TABLA No. 1

TABLA DE VALORES OBTENIDOS DURANTE LA EVALUACION DEL PATRON PRIMARIO POR EL METODO DE KJELDAHL

Nº de prueba	X	\bar{X}	$\bar{X} - X$	$(\bar{X} - X)^2$
1	6.97	6.99	0.02	0.0004
2	7.00	6.99	0.01	0.0001
3	7.00	6.99	0.01	0.0001
4	7.00	6.99	0.01	0.0001
5	7.00	6.99	0.01	0.0001
6	6.94	6.99	0.05	0.0025
7	6.97	6.99	0.02	0.0004
8	7.00	6.99	0.01	0.0001
9	7.00	6.99	0.01	0.0001
10	7.00	6.99	0.01	0.0001
11	7.00	6.99	0.01	0.0001
12	6.97	6.99	0.02	0.0004
13	6.97	6.99	0.02	0.0004
14	7.00	6.99	0.01	0.0001
15	7.00	6.99	0.01	0.0001
16	7.00	6.99	0.01	0.0001
17	7.00	6.99	0.01	0.0001
18	7.00	6.99	0.01	0.0001
19	7.00	6.99	0.01	0.0001
20	6.97	6.99	0.02	0.0004
21	6.97	6.99	0.02	0.0004
22	7.00	6.99	0.01	0.0001
23	7.00	6.99	0.01	0.0001
24	7.00	6.99	0.01	0.0001
25	7.00	6.99	0.01	0.0001
26	6.97	6.99	0.02	0.0004
27	7.00	6.99	0.01	0.0001
28	7.00	6.99	0.01	0.0001
29	7.00	6.99	0.01	0.0001
30	7.00	6.99	0.01	0.0001

$$\Sigma (\bar{X} - X)^2 = 0.0075$$

$$D.E. = \sqrt{\frac{0.0075}{29}} = \sqrt{0.000259} = 0.01608 = 0.016$$

$$C.V. = \frac{100 \times 0.01608}{6.99} = \frac{1.608}{6.99} = 0.23\%$$

1 D E =	0.01608					
2 D E =	0.03216					
3 D E =	0.04820					valor aprox.
1 D E =	6.99	+	0.01608	=	7.00608	= 7.01
2 D E =	6.99	+	0.03216	=	7.02216	= 7.02
3 D E =	6.99	+	0.04820	=	7.03820	= 7.04
-1 D E =	6.99	-	0.01608	=	6.97392	= 6.97
-2 D E =	6.99	-	0.03216	=	6.95784	= 6.96
-3 D E =	6.99	-	0.04820	=	6.94176	= 6.94
22 valores	de	7.00	representan		73.33%	
7 valores	de	6.97	representan		23.33%	
2 valor	de	6.94	representan		<u>3.33%</u>	
					<u>99.99%</u>	

DISTRIBUCION DE FRECUENCIAS
PATRON PRIMARIO POR KJELDAHL

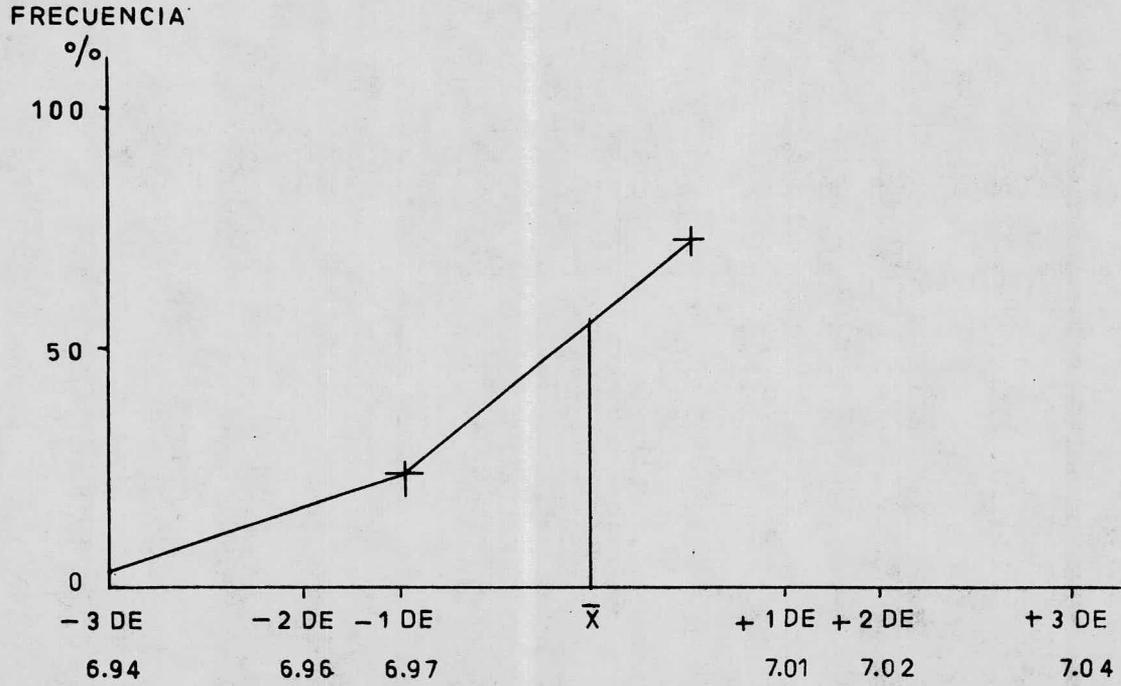


TABLA No. 2

TABLA DE VALORES OBTENIDO DURANTE LA EVALUACION DEL PATRON PRIMARIO POR LA TECNICA DE BIURET

Prueba Nº.	X	\bar{X}	$\bar{X} - X$	$(\bar{X} - X)^2$
1	7.00	7.005	0.005	0.000025
2	7.00	7.005	0.005	0.000025
3	7.00	7.005	0.005	0.000025
4	7.00	7.005	0.005	0.000025
5	7.05	7.005	0.045	0.002025
6	7.00	7.005	0.005	0.000025
7	7.00	7.005	0.005	0.000025
8	7.00	7.005	0.005	0.000025
9	7.05	7.005	0.045	0.002025
10	7.00	7.005	0.005	0.000025
11	7.00	7.005	0.005	0.000025
12	6.95	7.005	0.055	0.003025
13	7.00	7.005	0.005	0.000025
14	7.05	7.005	0.045	0.002025
15	7.00	7.005	0.005	0.000025
16	7.00	7.005	0.005	0.000025
17	7.00	7.005	0.005	0.000025
18	7.00	7.005	0.005	0.000025
19	7.00	7.005	0.005	0.000025
20	6.95	7.005	0.055	0.003025
21	7.00	7.005	0.005	0.000025
22	7.00	7.005	0.005	0.000025
23	7.00	7.005	0.005	0.000025
24	7.00	7.005	0.005	0.000025
25	7.05	7.005	0.045	0.002025
26	7.05	7.005	0.045	0.002025
27	7.00	7.005	0.005	0.000025
28	7.00	7.005	0.005	0.000025
29	7.00	7.005	0.005	0.000025
30	7.00	7.005	0.005	0.000025

$$\sum (\bar{X} - X)^2 = 0.01675$$

$$D. E. = \sqrt{\frac{0.01675}{29}} = \sqrt{0.0005775} = 0.02403 = 0.024$$

$$C. V. = \frac{100 \times 0.02403}{7.005} = \frac{2.403}{7.005} = 0.34\%$$

1 D E =	0.02403					
2 D E =	0.04806					
3 D E =	0.07209					valor aprox.
1 D E =	7.005	+	0.02403	=	7.02903	= 7.03
2 D E =	7.005	+	0.04806	=	7.05306	= 7.05
3 D E =	7.005	+	0.07209	=	7.07709	= 7.08
-1 D E =	7.005	-	0.02403	=	6.98097	= 6.98
-2 D E =	7.005	-	0.04806	=	6.95694	= 6.96
-3 D E =	7.005	-	0.07209	=	6.93291	= 6.93

23 valores de 7.00 representan 76.6%
 5 valores de 7.05 representan 16.6%
 2 valores de 6.95 representan 6.6%

99.8%

(Los valores de 7.00 y 7.05 pueden considerarse dentro de los límites de confianza al nivel de ± 2 D.E.)

DISTRIBUCION DE FRECUENCIAS
PATRON PRIMARIO POR BIURET

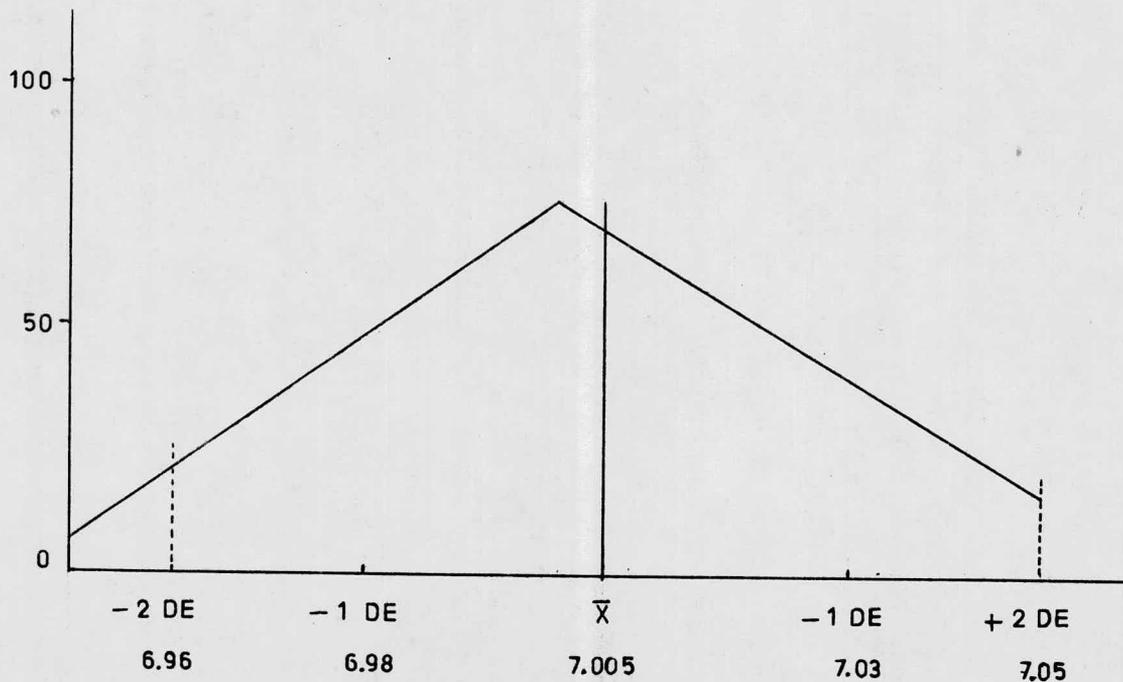


TABLA No. 3

TABLA DE VALORES OBTENIDOS DURANTE LA EVALUACION DEL PATRON SECUNDARIO "A" POR LA TECNICA DE BIURET

Prueba Nº.	X	\bar{X}	$\bar{X} - X$	$(\bar{X} - X)^2$
1	6.60	6.62	0.02	0.0004
2	6.60	6.62	0.02	0.0004
3	6.60	6.62	0.02	0.0004
4	6.60	6.62	0.02	0.0004
5	6.67	6.62	0.05	0.0025
6	6.60	6.62	0.02	0.0004
7	6.60	6.62	0.02	0.0004
8	6.60	6.62	0.02	0.0004
9	6.67	6.62	0.05	0.0025
10	6.60	6.62	0.02	0.0004
11	6.60	6.62	0.02	0.0004
12	6.60	6.62	0.02	0.0004
13	6.67	6.62	0.05	0.0025
14	6.60	6.62	0.02	0.0004
15	6.60	6.62	0.02	0.0004
16	6.67	6.62	0.05	0.0025
17	6.60	6.62	0.02	0.0004
18	6.60	6.62	0.02	0.0004
19	6.60	6.62	0.02	0.0004
20	6.67	6.62	0.05	0.0025
21	6.60	6.62	0.02	0.0004
22	6.67	6.62	0.05	0.0025
23	6.60	6.62	0.02	0.0004
24	6.67	6.62	0.05	0.0025
25	6.80	6.62	0.18	0.0324
26	6.60	6.62	0.02	0.0004
27	6.60	6.62	0.02	0.0004
28	6.60	6.62	0.02	0.0004
29	6.60	6.62	0.02	0.0004
30	6.60	6.62	0.02	0.0004

$$\Sigma (\bar{X} - X)^2 = 0.0587$$

$$D. E. = \sqrt{\frac{0.0587}{29}} = \sqrt{0.002024} = 0.0448$$

$$C. V. = \frac{100 \times 0.0448}{6.62} = \frac{4.4887}{6.62} = 0.6780\%$$

1 D E =	0.04488
2 D E =	0.08976
3 D E =	0.13464

					valor aprox.
1 D E =	6.62	+	0.04488	=	6.66488 = 6.665
2 D E =	6.62	+	0.08976	=	6.70976 = <u>6.71</u>
3 D E =	6.62	+	0.13464	=	6.75464 = 6.75
-1 D E =	6.62	-	0.04488	=	6.57512 = 6.57
-2 D E =	6.62	-	0.08976	=	6.53024 = 6.53
-3 D E =	6.62	-	0.13464	=	6.48536 = 6.48

22 valores de 6.60 representan 73.3%

7 valores de 6.67 representan 23.3%

1 valor de 6.80 representa $\frac{3.3\%}{99.9\%}$

En esta serie de 30 determinaciones se obtuvo un resultado "fuera de control" (prueba No. 25); si eliminamos ese dato y recalculamos en base a los otros 29 valores, se obtienen los siguientes resultados.

$$\sum (\bar{X} - X)^2 = 0.0263$$

valor
aprox.

$$D. E. = \sqrt{\frac{0.0263}{28}} = \sqrt{0.000939} = 0.03064 = 0.031$$

$$C. V. = \frac{100 \times 0.03064}{6.62} = \frac{3.064}{6.62} = 0.46\%$$

$$1 \text{ D E} = 0.03064$$

$$2 \text{ D E} = 0.06129$$

$$3 \text{ D E} = 0.09194$$

$$1 \text{ D E} = 6.62 + 0.03064 = 6.6506 \quad \text{valor aprox.} \\ = 6.65$$

$$2 \text{ D E} = 6.62 + 0.06129 = 6.6812 \quad = 6.68$$

$$3 \text{ D E} = 6.62 + 0.09194 = 6.7119 \quad = 6.71$$

$$- 1 \text{ D E} = 6.62 - 0.03064 = 6.5893 \quad \text{valor aprox.} \\ = 6.59$$

$$- 2 \text{ D E} = 6.62 - 0.06129 = 6.5587 \quad = 6.56$$

$$- 3 \text{ D E} = 6.62 - 0.09194 = \underline{6.5280} \quad = 6.53$$

22 valores de 6.60 representan 75.86 %

7 valores de 6.67 representan 24.14 %

100.00 %

Haciendo notar que una sola prueba "fuera de control" puede afectar el C. V. tan significativamente dándonos un criterio falso acerca de la bondad de una técnica, siendo además legítimo invalidar este valor.

DISTRIBUCION DE FRECUENCIAS
PATRON SECUNDARIO POR BIURET "A"

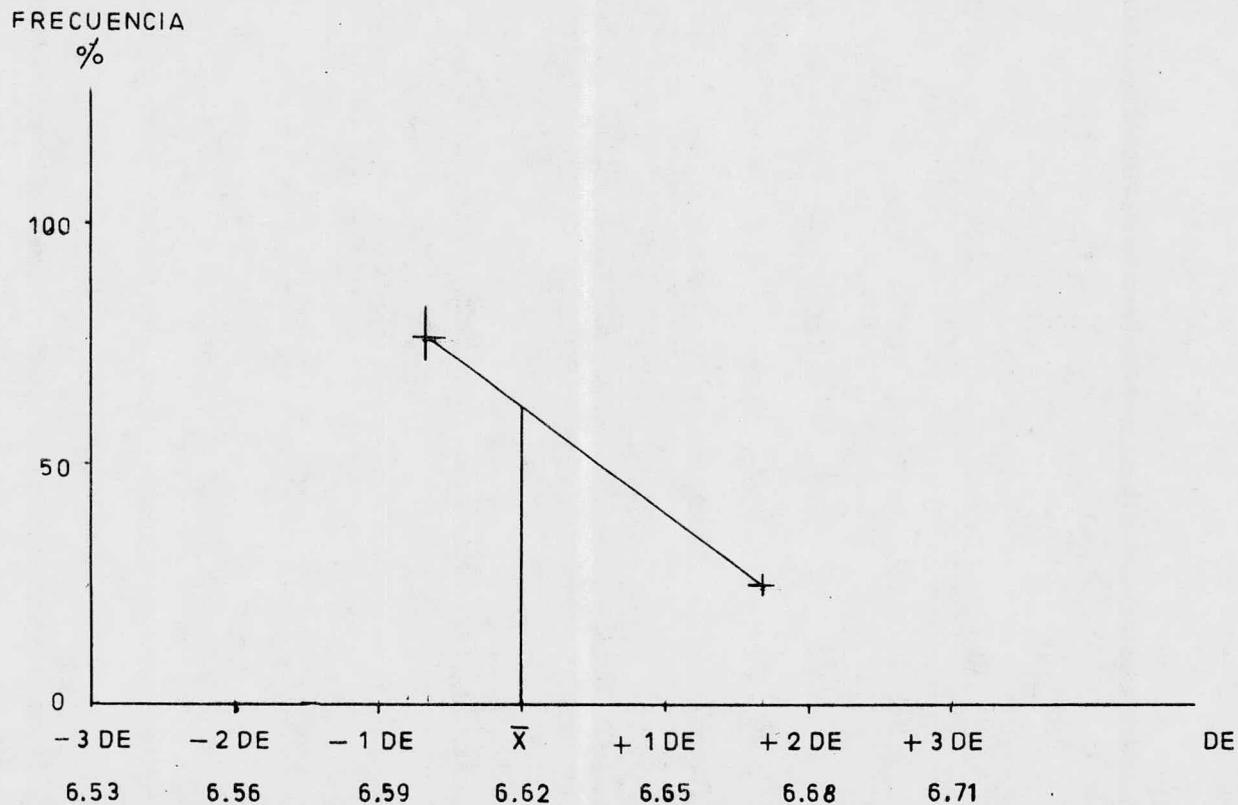


TABLA No. 4

TABLA DE VALORES OBTENIDOS DURANTE LA EVALUACION DEL
PATRON SECUNDARIO "B" POR LA TECNICA DE BIURET

Prueba No.	X	\bar{X}	$\bar{X} - X$	$(\bar{X} - X)^2$
1	4.40	4.43	0.03	0.0009
2	4.40	4.43	0.03	0.0009
3	4.50	4.43	0.07	0.0049
4	4.40	4.43	0.03	0.0009
5	4.40	4.43	0.03	0.0009
6	4.40	4.43	0.03	0.0009
7	4.50	4.43	0.07	0.0049
8	4.40	4.43	0.03	0.0009
9	4.40	4.43	0.03	0.0009
10	4.50	4.43	0.07	0.0049
11	4.40	4.43	0.03	0.0009
12	4.40	4.43	0.03	0.0009
13	4.50	4.43	0.07	0.0049
14	4.40	4.43	0.03	0.0009
15	4.50	4.43	0.07	0.0049
16	4.40	4.43	0.03	0.0009
17	4.40	4.43	0.03	0.0009
18	4.40	4.43	0.03	0.0009
19	4.50	4.43	0.07	0.0049
20	4.40	4.43	0.03	0.0009
21	4.40	4.43	0.03	0.0009
22	4.40	4.43	0.03	0.0009
23	4.50	4.43	0.07	0.0049
24	4.50	4.43	0.07	0.0049
25	4.40	4.43	0.03	0.0009
26	4.57	4.43	0.14	0.0210
27	4.50	4.43	0.07	0.0049
28	4.40	4.43	0.03	0.0009
29	4.40	4.43	0.03	0.0009
30	4.40	4.43	0.03	0.0009

$$\sum (\bar{X} - X)^2 = 0.0831 \text{ valor aproxim.}$$

$$D. E. = \sqrt{\frac{0.0831}{29}} = \sqrt{0.0028} = 0.05320 = 0.053$$

$$C. V. = \frac{100 \times 0.05320}{4.43} = 1.20 \%$$

$$1 D E = 0.053209$$

$$2 D E = 0.106418$$

$$3 D E = 0.159627$$

Valor Aprox.

$$1 D E = 4.43 + 0.053209 = 4.489009 = 4.49$$

$$2 D E = 4.43 + 0.106418 = 4.542218 = 4.54$$

$$3 D E = 4.43 + 0.159627 = 4.595427 = 4.59$$

$$- 1 D E = 4.43 - 0.053209 = 4.382591 = 4.38$$

$$- 2 D E = 4.43 - 0.106418 = 4.329382 = 4.33$$

$$- 3 D E = 4.43 - 0.159627 = 4.276173 = 4.27$$

20 valores de 4.40 representan 66.6 %

9 valores de 4.50 representan 30.0 %

1 valor de 4.575 representan 3.3 %

99.9 %

En esta serie de 30 determinaciones se obtuvo un resultado "fuera de -- control" (prueba No. 26); si eliminamos ese dato y recalculamos en base a los otros 29 valores. Se obtienen los siguientes resultados:

$$\sum (\bar{X} - X)^2 = 0.0621$$

Valor aprox.

$$D. E. = \sqrt{\frac{0.0621}{28}} = \sqrt{0.00221} = 0.04709 = 0.047$$

$$C. V. = \frac{100 \times 0.04709}{4.43} = 1.0 \%$$

$$1 \text{ D E} = 0.047094$$

$$2 \text{ D E} = 0.094188$$

$$3 \text{ D E} = 0.141282$$

Valor aprox.

$$1 \text{ D E} = 4.43 + 0.047094 = 4.4770 = 4.48$$

$$\text{D E} = 4.43 + 0.094188 = 4.5241 = 4.52$$

$$3 \text{ D E} = 4.43 + 0.141282 = 4.5712 = 4.57$$

Valor aprox.

$$- 1 \text{ D E} = 4.43 - 0.047094 = 4.3829 = 4.38$$

$$- 2 \text{ D E} = 4.43 - 0.094188 = 4.3358 = 4.33$$

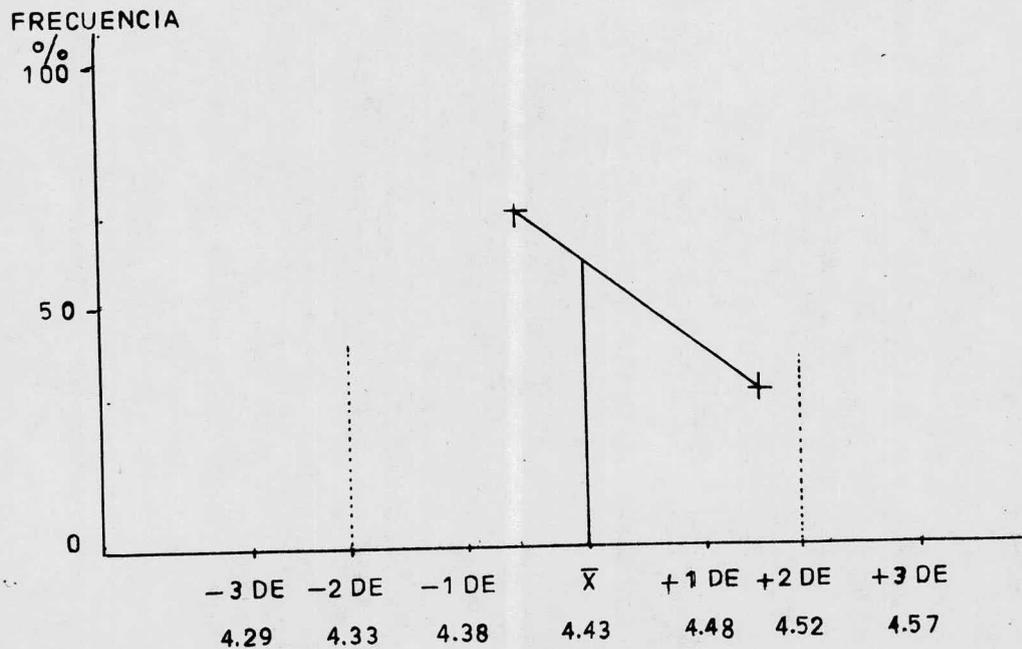
$$- 3 \text{ D E} = 4.43 - 0.141282 = 4.2887 = 4.29$$

20 valores de 4.40 representan 68.96 %

9 valores de 4.50 representan 31.03 %

99.99 %

DISTRIBUCION DE FRECUENCIAS
PATRON SECUNDARIO POR BIURET "B"



CUADRO No. 1

	ESPECIFICACIONES mg./ g. album.	PRIMER ANALISIS DE ALBUMINA PURA ORIGINAL	SEGUNDO ANALISIS DE ALBUMINA PURA LIOFILIZADA	PRIMER ANALISIS DE ALBUMINA REACTIVO FRACC.V
CARBOHIDRATOS HEXOSAS TOTALES	0.500 g./g. alb.	0.445 mg./g. alb	0.335 mg./g. alb	1.6 mg./g. alb
HUMEDAD	50 mg./g. alb.	82.8 mg./g. alb	42 mg./g. alb	66.8 mg/g. alb
CENZAS	5 mg./g. alb	1.99 mg./g. alb	2 mg./g. alb	48 mg./g. alb
LIPIDOS TOTALES	5 mg./g. alb	0.56 mg./g. alb	0.56 mg./g. alb	2.24 mg./g. alb
COMPUESTOS AMI- NO NO PROTEICOS COMO NOR LEUCINA	0.3 mg./g. alb	12 mg./g. alb	0.48 mg./g. alb	3.625 mg./g. alb

CUADRO No. 2

MATERIAL	METODO	No. DE VALORES	MEDIA \bar{X}	DESVIACION ESTANDARD	LIMITES DE CONFIANZA 95 %	VALOR ESPERADO	C. V. %
PATRON	KJELDAHL	30	6.99	0.01608	7.0221 6.9578	7.00	0.23
PRIMARIO	BIURET MODIFICADO	30	7.005	0.0240	7.053 6.957	7.00	0.34
PATRON	BIURET MODIFICADO	30 [#]	6.62	0.0448	6.709 6.530 6.681	-	0.678
SECUNDARIO "A"		29	6.62	0.0306	6.558	-	0.46
PATRON	BIURET MODIFICADO	30 ^{##}	4.43	0.0532	4.5364 4.3236 4.524	-	1.20
SECUNDARIO "B"		29	4.43	0.0470	4.335	-	1.0

UN RESULTADO " FUERA DE CONTROL " ## UN RESULTADO "FUERA DE CONTROL "

CAPITULO IV

DISCUSSION

DISCUSION DE LOS RESULTADOS.

Como puede verse en las tablas 1 a 4 y en el cuadro # 2 los resultados obtenidos en este trabajo se basan en 30 determinaciones de cada material de referencia, por el método de biuret modificado, y el patrón primario por el método de Kjeldahl. El C.V. para este último fué de 0.23% en nuestras condiciones de trabajo, el valor que confirma la excelente reproducibilidad de ese método una vez que han sido controladas adecuadamente sus variables. Con el método modificado de biuret también se obtuvo un C.V. muy bajo (0.34%) y una media de 7.005 muy cercano al valor esperado de 7.00.

En base a tales resultados para el patrón primario cabe concluir que las pruebas analíticas de pureza de la albúmina bovina arrojaron resultados muy exactos, pues de otra manera la media por Kjeldahl se hubiera alejado del valor esperado.

De lo anterior, puede también inferirse que la metodología seleccionada por la Federación Internacional de Química Clínica para la cuantificación de impurezas en la albúmina bovina, es muy satisfactoria y relativamente sencilla, si bien exige bastante adiestramiento para obtener buena reproducibilidad.

Los resultados obtenidos por el método de biuret modificado para los dos patrones secundarios son un poco más altos (C.V. de 0.46% y - - 1.0% respectivamente), lo cual podría explicarse cuando menos en el caso, del patrón secundario "B", por tratarse de una solución heterogénea -

de proteínas séricas. Sin embargo, tanto el C.V. como los límites de - -
confianza para este material de referencia que puede ser preparado en - -
cualquier laboratorio, son definitivamente aceptables. El uso sistemático
de un patrón secundario como el preparado y valorado en este trabajo, -
contribuiría sin duda a elevar la exactitud y la precisión en la cuantifica -
ción de proteínas en muestras clínicas, y redundaría en una reducción - -
del costo de control de calidad basado en sueros control de fuentes comer -
ciales. Para mantener control sobre un patrón secundario de las caracte -
rísticas indicadas, bastaría con realizar periódicamente pruebas simulta -
neas con el patrón primario, ya que por razones económicas principal - -
mente no es conveniente recomendar el uso sistemático del patrón prima -
rio como base de un programa de control de calidad para proteínas.

C A P I T U L O V

C O N C L U C I O N E S

De acuerdo a las recomendaciones de la Federación Internacional de Química Clínica, la preparación de un patrón primario de proteínas, -
constituido por una solución de albúmina bovina de pureza conocida, no -
presenta grandes problemas técnicos o metodológicos. La evaluación de -
este material de referencia debe realizarse por el método de Kjeldahl, -
que ofrece las mejores características en cuanto exactitud y precisión; -
sin embargo, la utilización sistemática de este material de referencia y -
el método de Kjeldahl no resultan aconsejables en la práctica diaria del -
laboratorio clínico, por lo cual se recomienda la preparación adicional -
de un patrón secundario que, valorado cuidadosamente contra el patrón -
primario permitirá establecer un sistema de control de calidad para pro-
teínas, que sea satisfactorio desde el punto de vista técnico y económi- -
co.

CAPITULO VI

RESUMEN

Se estudia la preparación de un patrón clínico primario que requiere de un esfuerzo considerable tanto técnico como económico para conseguir un material de referencia; viéndose que el contenido de impurezas, debe ser perfectamente conocido y satisfacer las especificaciones propuestas por la Federación Internacional de Química Clínica (IFCC) .

Revisando la metodología para el análisis y valoración, se observa que deben ser métodos de referencia cuya precisión y exactitud se han demostrado.

Este patrón debe usarse para valorar soluciones patrón secundarias, cuyo empleo en el laboratorio clínico, es benéfico para reducir los costos de los programas de control de calidad.

CAPITULO VII

BIBLIOGRAFIA

- 1).- Citado por: "Standards a World problem" Special Lab World, report on papers from the international Conference on Standardization of Diagnostics Materials called by WHO and CDC. Lab. World June 1974.
- 2).- Radin, N. :What is a standard? . Clin. Chem. 43 : 55, 1967.
- 3).- Citado por: International Federation of Clinical Chemistry. Recomendations and general considerations of the IFCC.
- 4).- Gornall, A. G.; Bardawill, C.J. y David, M.M.: Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. J. Biol. Chem. 177: 751, 1949.
- 5).- Weichselbaum, T.E.: An accurate and rapid method for the determination of proteins in small of blood serum and plasma. Amer. J. Clin. Pathol. 16:40 1946.
- 6).- Whitby, L.G., Mitchell F.L. y Moss, D.W.: Qualit and control in routine clinical chemistry. Advan. Clin. Chem. 10: 65. 1967.
- 7).- The United States Pharmacopeia USP XVIII Procedure of the determination of ash. pag. 901.
- 8).- Sørensen, M. y Haugaard, G. : The use of the orcinol reaction for for determinig the nature and quantity of carbohidrate groups in proteins. Biochim. Zeitsch. 260 : 247, 1933.
- 9).- Hanson, M; Richard, W. y Ballard, F.: Citrate, pyruvate, and lactate contaminants of comercial serum albumin. J. Lipid. Res. 9 : 667, 1968.
- 10).- Rosen, H. : A modified ninhydrin colorimetric analysis for amino acidos. Arch. Biochem. Biophys. 67 : 10, 1957.