

53

2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

PREPARACION DE UN ESTANDAR SECUNDARIO
DE CIANOMETAHEMOGLOBINA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

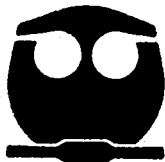
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

P R E S E N T A :

PILAR MARIA DE LOURDES GARCIA TAPIA



1990



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

Capítulo	Página
I. OBJETIVOS	1
II. INTRODUCCION	2
III. GENERALIDADES DE LA HEMOGLOBINA	11
Hemoglobina como sistema amortiguador	16
Valores de referencia	19
IV. ESTANDARES	
Normas	20
Terminología	23
Estandarización y validación de soluciones de cianometahemoglobina	24
V. DISEÑO EXPERIMENTAL	
Aislamiento y purificación de la Hemoglobina	28
Preparación y estandarización de la solución de cianometahemoglobina	30
Validación de la solución estándar de cianometahemoglobina	32

VI. RESULTADOS	37
VII. CONCLUSIONES	62
VIII. ANEXOS	
Anexo No. 1	
Calibración de espectrofotómetros	72
Anexo No. 2	
Curva de calibración de Hb	77
Anexo No. 3	
Reactivos	78
IX. BIBLIOGRAFIA	80

CAPITULO I

OBJETIVOS

Preparación de un estándar secundario de cianometahemoglobina en la Facultad de Química, con las características necesarias para ser reconocido como material de referencia en la cuantificación de Hemoglobina, en centros de educación superior y laboratorios de Patología Clínica.

Adecuar a nuestro trabajo las nuevas especificaciones emitidas por el Comité Internacional de Estandarización en Hematología (ICSH), en cuanto a: preparación, estandarización y validación de esta solución estándar de cianometahemoglobina.

Establecer un esquema para controlar y certificar que la solución estándar de cianometahemoglobina cumple con las especificaciones del ICSH.

CAPITULO II

INTRODUCCION

La determinación de la concentración de hemoglobina en sangre es un parámetro altamente expresivo en Medicina Clínica y Preventiva, fundamental en el diagnóstico de la anemia; por consiguiente la metodología a emplear debe ser lo más precisa y fidedigna posible, y basada en un método de análisis adecuadamente estandarizado.

Numerosos métodos para la determinación cuantitativa de hemoglobina (hemoglobinometria) han sido desarrollados, todos ellos basados en diferentes propiedades fisicoquímicas de la sangre, ver cuadro I (1), que difieren entre si significativamente con respecto a exactitud y precisión. Una investigación llevada a cabo por Donaldson, *et. al.* (2) muestra que una inexactitud del 3% puede obtenerse por la medición de: contenido de hierro, contenido de oxígeno, capacidad de fijación de O_2 y CO, hematina ácida, hematina alcalina, oxihemoglobina, carboxihemoglobina y cianometahemoglobina (HiCN).

En 1958 el Comité para el Establecimiento de un Patrón de Hemoglobina, después de analizar los diferentes métodos existentes, llegó a la conclusión de que el método de cianometahemoglobina (HiCN) era el mejor. Este método que había sido propuesto por Stadie (3) como un sencillo método

espectrofotométrico en 1920, fué modificado posteriormente para obtener así algunas ventajas, adoptándose como método de referencia por el Comité Internacional de Estandarización en Hematología (ICSH) en el año de 1964 y procediendo tanto a su estandarización, como a la elaboración de un patrón de referencia de cianometahemoglobina (4).

CUADRO I
MÉTODOS EMPLEADOS EN HEMOGLOBINOMETRIA

Propiedad en que se basa el método:	Característica analizada:
Física	Densidad específica Índice de refracción
Química	Hierro hemoglobínico
Capacidad para fijar gases	Fijación de CO Fijación de O ₂
Espectro de Absorción	Hemoglobina Oxihemoglobina Carboxihemoglobina Metahemoglobina Metahemoglobinazida Cianometahemoglobina Hematina alcalina Hematina ácida Hemocromógenos de piridina

Finalmente las recomendaciones para la determinación de Hb empleando el método de HiCN fueron definitivamente adoptadas en el XI Congreso Internacional de Hematología en 1966 (5) y el patrón

de HiCN fué considerado como "Patrón de Referencia Internacional" por la Organización Mundial de la Salud en 1968 (6), por tanto si algún otro método es empleado éste debe ser ajustado para obtener resultados comparables con los del método de HiCN.

El método de cianometahemoglobina fué elegido por las siguientes razones:

1. El procedimiento es sencillo, preciso y exacto.
2. La HiCN es la forma más estable de todos los derivados de la Hb y todas las especies derivadas de la Hb son convertidas cuantitativamente en HiCN: oxihemoglobina, carboxihemoglobina, hemoglobina fetal y sulfahemoglobina (ésta última al menos en parte, ocasionando un error no mayor de 0.27%).
3. El color es adecuado para la determinación, tanto en fotómetros de filtro como en espectrofotómetros de banda estrecha, ya que el espectro de absorción de la HiCN exhibe un máximo alrededor de la longitud de onda de 540 nm, se observa una banda ancha y relativamente plana, como una meseta, ver la figura 1.
4. Las soluciones estándar de HiCN obedecen estrictamente la Ley de Lambert-Beer en una longitud de onda de 540 nm, sobre una amplia escala de concentración y por lo tanto la curva de calibración puede ser obtenida por todos los fotómetros por medio de una solución estándar simple.
5. Las soluciones estándar de HiCN son de preparación sencilla (ya sea a partir de hemoglobina cristalina o de eritrocitos) y de gran estabilidad, 6 años a 4 °C (7).

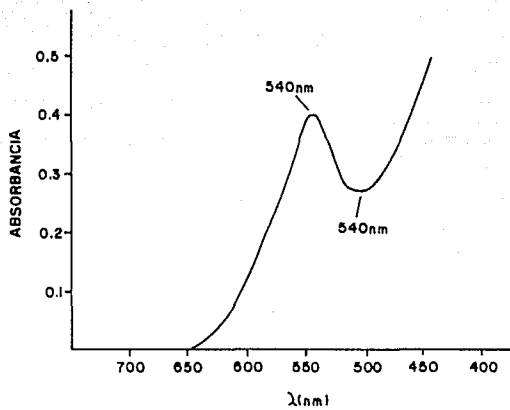


Fig.1 Espectro de absorción de la HICN.

6. Las soluciones de HiCN pueden ser estandarizadas en forma muy precisa.

7. El desarrollo de color es rápido (3 min) y permanece estable aún por algunos días.

Sin embargo, el método también presenta algunos inconvenientes:

1. El reactivo diluyente contiene cianuro que es tóxico, por lo que debe manejarse con cuidado, aunque la dosis letal es 200 mg/L y el reactivo contiene 50 mg/L.

2. Las concentraciones de los compuestos de reacción deben revisarse constantemente ya que puede haber pérdidas de cianuro, por el envase en frascos de polietileno, o de ferricianuro por congelación del reactivo, interfiriéndose así la transformación completa en HiCN .

3. La calidad de la estandarización del método está controlada de manera indirecta por espectrofotometría de una solución de HiCN purificada. El análisis directo de hierro no es posible debido a la presencia de ferricianuro en la solución estándar (8).

4. El tiempo de reacción para carboxihemoglobina es muy largo (90-120 min) con el reactivo modificado por Van Kampen y recomendado por el ICSH; se ha reportado que el tiempo puede disminuirse a 15 min por un incremento de 5 veces en la concentración de ferricianuro (9) o bien por calentamiento de la mezcla de reacción a 56°C de 3 a 5 min (10).

Para obtener resultados confiables en la determinación de Hb no basta el empleo del mejor método, ni el mejor de los estándares. Es indispensable disponer de un material de buena calidad y no descuidar aquellos aspectos personales de trabajo, ya que en la aplicación del método es posible cometer errores aleatorios y/o sistemáticos. Estos errores deben ser reconocidos y, siempre que sea posible, eliminados. Las causas de error en la aplicación del método de la HiCN son:

1. Errores en la muestra

- a. errores de extracción.
- b. empleo de anticoagulantes no recomendados.

2. Errores en la dilución

- a. empleo de pipetas no calibradas o sucias.
- b. eliminación deficiente del exceso de sangre que queda en las paredes exteriores del capilar antes de introducirlo en el reactivo.

3. Errores en la conversión

- a. empleo de reactivo mal preparado o caducado.
- b. reacción incompleta por una lectura antes del tiempo necesario.

4. Errores de medición

- a. empleo de instrumentos no calibrados.
- b. celdas sucias, deterioradas y no ajustadas.

En los laboratorios clínicos hematológicos cada vez son más empleados los contadores electrónicos y para obtener resultados

uniformes se recomienda la calibración para Hb utilizando una muestra de sangre fresca, previamente analizada por el método de HiCN usando una preparación de referencia de cianometahemoglobina (11). Sin embargo la disponibilidad de preparaciones de referencia debe ser de importancia primaria también para la calibración de contadores electrónicos.

Ultimamente se ha insistido en las ventajas de un nuevo método basado en el de hematina alcalina pero con propiedades características debido a la adición de un detergente no iónico. El producto fué designado como hematina alcalina D-575 (D entendido por detergente y 575 por el pico de absorbancia que presenta a esa longitud de onda). Las ventajas que presenta son:

- 1) gran estabilidad de reactivo y producto por un periodo de 2 años.
- 2) todas las especies de Hb con significado clínico son convertidas en hematina alcalina D-575.
- 3) puede ser estandarizado de manera directa a partir de clorohemina (compuesto con alto grado de pureza) ya que es convertido en el mismo producto final como todas las especies de Hb (8 , 12).

También se ha descrito un procedimiento simple y exacto para cuantificar espectrofotométricamente el Fe hemoglobínico usando 7-bromo-1,2-dihidro-1-(3-dimetilaminopropil)-5-(2-piridil)-2H-1,4-benzodiazepin-2-ona dihidrocloruro, el cual forma un quelato con

el Fe (II) dando un color azul violeta brillante, e involucra la previa separación del Fe de la Hb por una solución de hipoclorito, eliminando así una digestión de la muestra (13). Incluso se ha mencionado que éste método puede emplearse en la determinación de Hb como un método comparable con el método de HiCN, ya que elimina la preparación de un estándar de Hb. El método mide una propiedad fundamental de la molécula de Hb, su contenido de Fe, el cual es constante y no se afecta por la presencia de otros derivados de la Hb. Las soluciones estándar son preparadas a partir de Fe de 99.90 % de pureza.

A pesar de ello, la publicación más reciente emitida por el ICSH (7), respecto al método de referencia para hemoglobinometría en sangre, se refiere al método de HiCN. Con este estudio pretendemos revisar dichas recomendaciones y también las especificaciones para la preparación del estándar de HiCN, con el fin de que el conocimiento y aplicación referente a estos temas de gran importancia en la Clínica se mantengan a la vanguardia, dentro de las posibilidades de este centro educativo.

En la investigación desarrollada, la parte esencial la constituye la preparación, estandarización y validación del estándar de Hb, que se empleará en el método de HiCN; y aunque anteriormente ya se había emprendido una tesis similar en esta Facultad (14), ésta tal vez no fué suficientemente difundida puesto que el estándar continuaba adquiriéndose a través del Departamento de Compras. Posteriormente se establecieron las bases

para prepararlo, pero su estabilidad era muy corta (de 1 a 2 semanas). Por consiguiente nuestro propósito, es el de preparar un estándar secundario de HiCN, que garantice su función como tal de acuerdo a las especificaciones que han sido establecidas por el ICSH, y que pueda almacenarse para ser distribuido cuando se requiera.

Deseamos también que la calidad del estándar no se limite a las necesidades educativas de la Facultad, sino que favorezca también a otros centros de educación superior y a laboratorios de Patología Clínica, contando además con la ventaja de un costo inferior al que habitualmente se adquiere, y que la estabilidad de este estándar sea similar al estándar comercial (mayor a 12 meses).

CAPITULO III

GENERALIDADES DE LA HEMOGLOBINA

La Hb es un compuesto de porfirina-Fe(II)-proteína que se encuentra en los eritrocitos y le da el color rojo característico a la sangre. Es responsable del transporte de O_2 , de CO_2 y del equilibrio ácido-base de la sangre. La porción porfirínica de la Hb es la protoporfirina IX (tipo III), la cual combinada con el Fe constituye el grupo heme, por lo que también puede describirse a la Hb como una hemoproteína.

La estructura primaria de la molécula consta de 4 cadenas polipeptídicas de homología secuencial, cada una de ellas unida a un grupo heme, 2 denominadas cadenas α con 141 aminoácidos (aa) en su secuencia y las otras 2 cadenas β con 146 aminoácidos. Esas cadenas polipeptídicas adoptan la forma de hélices α constituyendo la estructura secundaria de la molécula. Esta agrupación tiende a situar los residuos aa polares en el interior de la hélice, con lo que la molécula es relativamente no polar. Cada una de las cadenas polipeptídicas se hallan plegadas en una forma globular compacta que constituye la estructura terciaria. Las 4 cadenas están unidas estrechamente entre sí mediante enlaces no covalentes, ocupando los 4 ángulos de una figura aproximadamente tetraédrica; esta orientación específica recibe el nombre de estructura cuaternaria. Las 4 cadenas forman la molécula de Hb con un peso molecular por gramo de 64,458 y un contenido en Fe de 0.34% en peso.

El sitio activo para el transporte de O_2 se encuentra situado entre los residuos 55 y 84 dentro de cada cadena, que son los aa a los que se encuentra unido el átomo de Fe del heme (residuos de histidina). Se produce así un sitio activo con un medio circundante absolutamente no polar para el heme, siendo las áreas polares externas suficientes para hacer a la Hb muy soluble.

Existen 5 distintos tipos de subunidades de globina que se designan con las letras griegas desde la α hasta la ϵ . Todas ellas constan de 146 aminoácidos, excepto la variedad α que tiene 141. Las diferentes subunidades ocurren habitualmente en combinaciones de las que resultan 5 tipos de hemoglobinas normales (ver el cuadro II) y cuya proporción varía según las etapas de nuestra vida, tal como se muestra en la figura 2 (15).

Las anomalías de la Hb pueden clasificarse en 3 grupos principales: talasemias, variantes de la Hb y Hbs anormales. El término talasemia abarca un grupo heterogéneo de alteraciones hereditarias, caracterizadas por una disminución de la velocidad de la síntesis de uno o más tipos de cadenas polipeptídicas de la Hb. Las variantes de la Hb son hemoglobinas con alguna alteración en la estructura primaria y las hemoglobinas anormales resultan por combinaciones anómalas de subunidades normales, a nivel de estructura cuaternaria.

Los derivados de la Hb son compuestos de importancia médica y química, que resultan de la reacción de la Hb con otras sustancias

CUADRO II

HEMOGLOBINAS HUMANAS NORMALES

Clase	Nombre	Fórmula de las subunidades	Edad en que se encuentra presente
Hbs embrionarias	Gower 1	ϵ_4	Predomina en los primeros 2 meses, desaparece después del 3er. mes de gestación
	Gower 2	$\alpha_2\epsilon_2$	
Hb fetal	Hb-F	$\alpha_2\gamma_2$	Predomina en la vida fetal; declina rápidamente después del nacimiento. Menos del 2% durante el resto de vida.
Hbs adultas	Hb-A ₁	$\alpha_2\beta_2$	La más importante en el adulto. Detectable ya en el comienzo de la gestación
	Hb-A ₂	$\alpha_2\delta_2$	

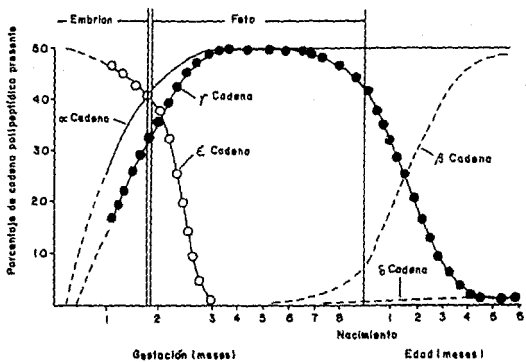
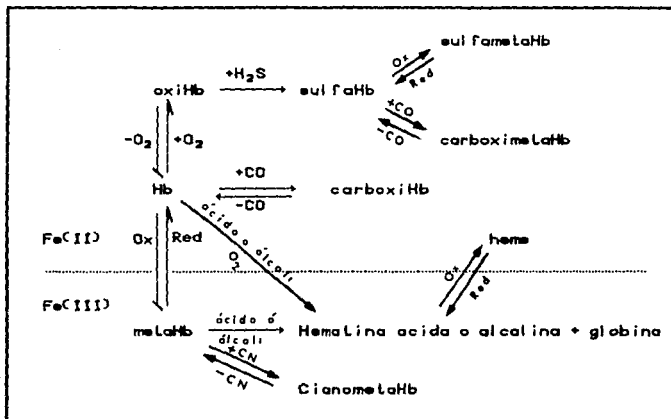


Fig. 2. Proporción de diversas cadenas polipeptídicas de la Hb humana normal en los primeros etapas de la vida.

distintas del O_2 , el cuadro III muestra las relaciones químicas entre la Hb y sus derivados (15).

CUADRO III

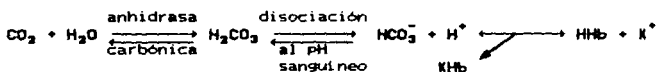
Hb Y SUS DERIVADOS



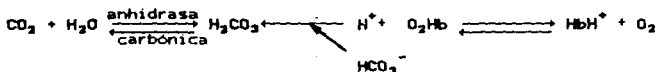
Hb como sistema amortiguador

La Hb es el mejor sistema amortiguador en la fisiología del pH de la sangre debido a la combinación tanto de un pKa apropiado, de 7.2 dado por los residuos de histidina y cercano al pH fisiológico (7.4), como a su alta concentración en la sangre (9.3 mM/L), lo que le otorga una capacidad relativa amortiguadora de 40 mEq/L.

La mayoría del CO_2 formado en los tejidos periféricos es transportado en el plasma de la sangre como HCO_3^- , con el H^+ ligado a la Hb dentro del eritrocito, ver fig.3 (16), llevándose a cabo la siguiente reacción hacia la derecha:



En los pulmones la siguiente ecuación procede a la izquierda con la liberación de H^+ , que reacciona con el HCO_3^- transportado para formar CO_2 que los pulmones pueden liberar (fig. 4).



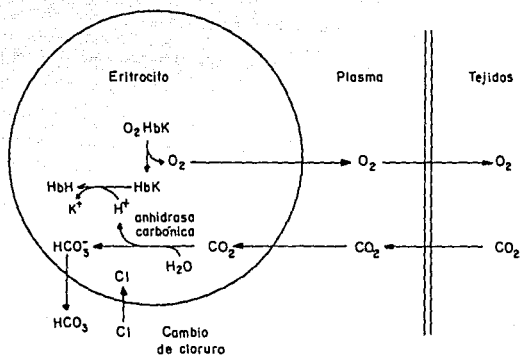


Fig. 3 Acción amortiguadora de la Hb en los tejidos.
 HbK representa la sal de potasio de la Hb.
 HbH representa la forma protonada de la Hb.

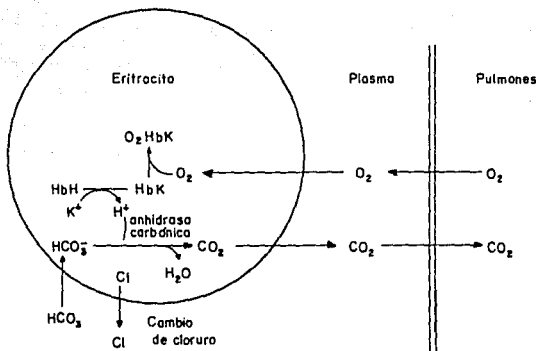


Fig.4 Acción amortiguadora de la Hb en los pulmones
HbK representa la sal de potasio de la Hb.
HbH representa la forma protonada de la Hb

Valores de referencia para la Hb

Los valores de referencia para Hb son de 15.5-17.5 g/dL (9.6-11 mM/L) para varones y de 13.5-16.0 g/dL (8.4-10 mM/L) para mujeres. Estos valores pueden ser afectados según las siguientes variables:

- Edad. En los primeros dos años de vida las variaciones en la concentración de Hb son significativas y a partir de los 2 años se observa un incremento gradual de los valores, que alcanzan los de referencia para el adulto alrededor de los 10 años. Las variaciones entre los 20 y 60 años son insignificantes. Después de los 60 años los cambios no están bien establecidos.
- Ejercicio. Produce un incremento de las cifras de un orden del 3-10% por disminución de la volemia, que es reversible. El entrenamiento atlético profundo da lugar a un incremento estable.
- Variaciones estacionales. Las variaciones son pequeñas pero se encuentran cifras máximas en el invierno o primavera.
- Altitud. Los valores de Hb se elevan con la altitud (policitemia) debido al fenómeno compensador por la menor tensión de O_2 .
- Temperatura. Se encuentra en relación recíproca debido a los cambios que produce en la volemia, la concentración disminuye al aumentar la temperatura ambiente y aumenta al disminuir la temperatura.

CAPITULO IV

ESTANDARES

Normas.

Un estándar se define como un material o solución con la cual la muestra es comparada en orden a determinar la concentración u otra cantidad. El término compuesto "estándar de calibración" debe ser usado siempre que se necesite evitar la confusión con otros términos técnicos o coloquiales de la palabra estándar (17).

Una solución estándar ideal debe ser pura, exacta, estable por un considerable periodo de tiempo, estéril y capaz de ser guardada libre de contaminación. bajo las más exigentes condiciones, fácil y económica de preparar y simple para usar. Las normas que se han señalado en relación a los estándares, por el Panel de Expertos en Nomenclatura y Control de Calidad en Química Clínica son las siguientes (16):

El valor fijado debe ser exacto en el más alto grado posible. El método de preparación del estándar y el de obtención del valor fijado debe ser descrito de tal manera que el estándar pueda ser reproducido exactamente.

La concentración u otro tipo de cantidad del estándar debe ser establecido en unidades aprobadas. Este valor debe ser un valor establecido, valor de referencia del método o valor certificado.

Es importante señalar que la composición de los estándares debe ser conocida en su totalidad dentro de lo posible, es decir que los materiales usados en la preparación deben ser sustancias puras, esencialmente libres de compuestos indefinidos. La fuente y naturaleza de los especímenes debe ser especificada, y alguna modificación física o química debe mencionarse.

La estabilidad determina la capacidad del estándar de detectar cambios con el tiempo y puede ser afectada por contaminación microbiológica. Debe ser establecida mediante pruebas adecuadas y debe expresarse como vida media de cada componente bajo condiciones de almacenamiento establecidas.

Las especificaciones para cada estándar dependen de su aplicación y compatibilidad con el proceso analítico y con la muestra.

Para propósitos de Control de Calidad es conveniente clasificar los estándares dentro de dos grupos fácilmente identificables (18):

a) Una solución de estándar primario es aquella solución en la cual la concentración es determinada solamente por disolución de una cantidad pesada del material estándar en un solvente apropiado y llevado a un volumen o masa determinado.

b) Una solución de estándar secundario es aquella solución en la cual la concentración u otra cantidad es determinado por un método analítico de confianza establecida.

En un sentido limitado, el término control de calidad en Química Clínica se refiere principalmente al monitoreo de precisión y exactitud en la ejecución de los métodos analíticos.

Esencialmente, precisión y exactitud, son evaluadas realizando ensayos replicativos en muestras del mismo espécimen de acuerdo a un plan diseñado, ya que se da por sentado que los valores son estables respecto a la cantidad investigada. La media (u otra medida de tendencia central) de la muestra reflejará la exactitud del método, una mayor exactitud repercutirá en una pequeña desviación de los resultados respecto al valor fijado. El coeficiente de variación (u otra medida de dispersión) de la muestra representará la precisión del método, los métodos más precisos son aquellos que tienen pequeños coeficientes de variación entre resultados replicativos.

El proceso de calibración de estándares puede conducir a importantes fuentes de inexactitud, en el caso de un estándar primario la exactitud depende solamente de la pureza del material estándar y el solvente, y de la fidelidad con la cual es preparada la solución. La exactitud de un estándar secundario depende de la exactitud del análisis, el cual debe involucrar un estándar que sea primario; además el nivel de incertidumbre para el valor fijado es usualmente mayor en este caso, ya que también dependerá de la precisión del método empleado para establecer ese valor.

Terminología

Con el fin de evitar confusiones respecto a los términos anteriormente empleados, presentamos a continuación la definición que con respecto a ellos emite el Panel de Expertos en Nomenclatura y Principios de Control de Calidad en Química Clínica (17).

Exactitud. Aproximación entre la media estimada de una cantidad y su valor verdadero. Esta puede expresarse en las unidades en las cuales la cantidad es medida, o como un porcentaje del valor verdadero.

Imprecisión. Coeficiente de variación o desviación estándar de los resultados, en una serie de mediciones. El valor medio y el número de pruebas deben establecerse y el plan usado debe ser descrito, de manera que otra persona pueda repetir el experimento.

Inexactitud. Diferencia numérica entre la media de una serie de mediciones y el valor verdadero.

Método analítico. Serie de instrucciones escritas, las cuales describen el procedimiento, materiales y equipo, que son necesarios para obtener resultados por el analista.

Método definitivo. Método, el cual después de investigaciones exhaustivas se basa en no tener fuentes conocidas de inexactitud o ambigüedad.

Método de referencia. Método, el cual después de investigaciones exhaustivas ha demostrado tener insignificante

inexactitud en comparación con su imprecisión.

Precisión. Aproximación entre mediciones duplicadas o representativas.

Valor certificado. Valor certificado por algún cuerpo oficial, sujeto a las condiciones establecidas por ese cuerpo.

Valor establecido. Valor sin certificación oficial.

Valor de referencia del método. Valor más probable derivado de una serie de resultados obtenidos por el más confiable método de referencia disponible.

Estandarización y validación de soluciones de HiCN

Las soluciones de HiCN son estandarizadas de manera indirecta por espectrofotometría, ya que se trata de un estándar secundario; se basa en el coeficiente de extinción milimolar de la Hb, cuando es medido a 540 nm, en celdas de 1 cm de diámetro interior y en un espectrofotómetro calibrado, tiene un valor de 44.0. Además de que la masa molecular relativa de la Hb es de 64,458.

Para mediciones de la preparación de referencia los expertos del ICSH recomiendan relacionar el coeficiente de extinción milimolar y la masa molecular relativa a un grupo hemo y, por tanto a un cuarto de la molécula total de la Hb, teniéndose así los siguientes valores $\epsilon_{\text{HiCN}}^{540}$ de 11.00 y M de 16,114.5.

De esta manera puede establecerse la concentración de la solución estándar para HiCN (equivalente a Hb), a partir de la siguiente fórmula, expresándola en mg/L:

$$C \text{ (mg/L)} = \frac{A_{\text{HiCN}}^{540} \times M}{\epsilon_{\text{HiCN}}^{540} \times 1.00} = 1465 \times A_{\text{HiCN}}^{540} \dots\dots (1)$$

C = Concentración de Hb en mg/L

A_{HiCN}^{540} = Absorbancia de la solución a 540 nm

M = Masa molecular relativa de la Hb

$\epsilon_{\text{HiCN}}^{540}$ = Coeficiente de extinción milimolar de la HiCN

1.000 = Paso de luz en la celda (en cm)

La solución estándar debe disponerse en una concentración simple entre 550 y 850 mg/L.

En el proceso de estandarización lo que pretendemos conocer es la A que debe presentar la solución estándar, de acuerdo a la concentración requerida, y esta puede calcularse reordenando los términos en la fórmula de esta manera:

$$A_{\text{HiCN}}^{540} = \frac{C \times \epsilon_{\text{HiCN}}^{540} \times 1.000}{M} = 6.8 \times 10^{-4} \times C \dots\dots (2)$$

A pesar de que la preparación y estandarización de las soluciones de HiCN es bastante simple, la validación requiere un ajuste de criterios concernientes a: 1) pureza, 2) estabilidad y 3) esterilidad.

1. Pureza.

La solución estándar debe exhibir un espectro de A conforme se muestra en la figura 1, observándolo entre λ de 450 - 750 nm.

En orden a facilitar el criterio del espectro, un cociente de valores de A en apropiadas λ puede calcularse. Para este propósito la relación A^{540} / A^{504} se ha probado que es adecuada, y su valor debe encontrarse entre 1.59-1.63. Divergencias significativas de este valor indica errores en hemoglobimetría debido a otros derivados hemo (si la conversión a HiCN es incompleta) o a compuestos no-hemo.

Medir en el IR cercano (λ de 725-800 nm), p. e. a 750 nm para checar turbidez; la A debe ser menor que 0.002 por cm de paso de luz, usando un blanco apropiado (ya sea reactivo diluyente o agua bidestilada).

2. Estabilidad.

Los valores de A^{540} / A^{504} de la solución estándar deben permanecer estables, dentro del 1 % en un año. Aunque se ha comprobado que si la preparación es guardada a 4 °C es estable por más de 6 años.

Además se ha probado que la solución de HiCN es extremadamente estable a diferentes temperaturas, si es guardada a temperatura ambiente el decremento en la A es aproximadamente 1 % en un año.

3. Esterilidad.

Se esteriliza la solución por filtración y se reparte asépticamente en porciones de 10 ml, que se guardan en viales de vidrio color ámbar y se cierran con tapones de goma esterilizados.

La esterilidad del producto debe probarse inoculando en medios de cultivo aeróbicos y anaeróbicos, que deberán incubarse a 22 °C y 37 °C, ya que varios microorganismos, especialmente Gram negativos son capaces de desarrollar en el reactivo de Drabkin modificado p.e. *Alcaligenes faecalis*, *Paracolonobacterium aerogenoides*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*.

Esta prueba es opcional para los laboratorios, pero siempre debe ser controlada por los productores.

Se ha recomendado el uso de soluciones de H₂CN que contienen 50 % de glicerol con el fin de prevenir la contaminación bacteriana y micótica, sin embargo estas no son ideales ya que es más difícil su preparación y uso, por su naturaleza viscosa. Además deben leerse frente a blancos que contengan 50 % de glicerol.

CAPITULO V

DISEÑO EXPERIMENTAL

El diseño experimental de nuestro trabajo consta de las siguientes 3 etapas:

- 1.-Aislamiento y purificación de la Hb.
- 2.-Preparación y estandarización de la solución de HiCN.
- 3.-Validación de la solución estándar de HiCN.

1.-Aislamiento y purificación de la Hb.

1.1 Principio.

La Hb es liberada de eritrocitos lavados, mediante la utilización de un solvente orgánico como es el cloroformo, para obtener un concentrado de Hb que deberá centrifugarse para eliminar restos celulares.

1.2 Material Biológico.

Obtener sangre venosa humana, de 4 a 6 ml por cada paciente sano, y mezclar con 0.1 ml de EDTA al 10%. Puede usarse como anticoagulante citrato sódico, heparina o la mezcla de oxalatos en la proporción adecuada.

Recoger de 15 a 20 ml de sangre fresca de esta manera.

1.3 Reactivos (cf. Anexo No. 3).

Solución EDTA 10 %

Solución salina 0.85 % (SSI)

Cloroformo R.A.

1.4 Material.

tubos 13 X 100 mm

pipetas Pasteur con bulbo

pipetas de 5ml graduadas 1/100

tubos para centrifuga de 10 ml

vaso de precipitado de 50 ml

gradilla

embudo

1.5 Equipo.

Centrifuga

1.6 Método.

Se centrifuga la sangre a una velocidad de 3,500 rpm por 5 min y se decanta el plasma descartándolo. Se lavan los eritrocitos 2 veces con SSI. Agregar a un volumen de los eritrocitos lavados otro volumen igual de agua y luego un volumen igual de cloroformo u otro solvente orgánico. Se mezcla, se deja en reposo durante 12 h a 4 °C y luego se centrifuga a alta velocidad (3,500 rpm) durante 30 min.

Después de la centrifugación se desarrollan tres capas distintas: la solución de Hb es removida por succión con pipeta Pasteur, dejando la capa sólida (paquete de estroma) y la capa de cloroformo. Para remover restos celulares la solución de Hb es centrifugada por segunda vez.

2.-Preparación y estandarización de la solución de HiCN.

2.1 Principio.

Toda la Hb es transformada en HiCN, cuya A es leída mediante un espectrofotómetro a una λ de 540 nm. La transformación de la Hb en HiCN se realiza en dos etapas, en las que intervienen como reactivos fundamentales el $K_3Fe(CN)_6$ y el KCN:

Primera $Hb + K_3Fe(CN)_6 \longrightarrow$ metahemoglobina (Hi).

Segunda $Hi + K^+CN^- \longrightarrow$ cianometahemoglobina (HiCN)

El pH de este reactivo es más bajo que el de los utilizados inicialmente, para aumentar la velocidad de reacción y se adiciona un detergente para evitar el enturbiamiento que, de otra forma, podría ocurrir a este pH relativamente bajo por la presencia de proteínas plasmáticas.

Para obtener la concentración deseada de Hb (800 mg/L) la A, determinada en base a la ecuación 2, deberá ser de 0.546.

2.2 Material biológico.

Concentrado de Hb obtenido como anteriormente se indicó (etapa 1).

2.3 Reactivos.

Reactivo de Drabkin modificado por Van Kampen-Zijlstra.

2.4 Material.

tubos de 13 X 100 mm

pipetas de 5 ml graduadas 1/100
pipetas Sahli con boquilla
celdas Coleman 10 mm de diámetro
viales de 10 ml blancos, boca 20 mm de diámetro 21-22 X 35
tapones de hule 20 mm de diámetro
retapas de aluminio 20 mm de diámetro
filtro Millipore
Kitasato 1 L
probeta 100 ml
vaso PP 2 L
gradilla

2.5 Equipo.

Espectrofotómetro calibrado Coleman Jr II 6/20 A
(cf. anexo No. 1).

2.6 Método.

El contenido de la solución de Hb es determinado por el método de HiCN, en base a la ecuación 1. Entonces se adiciona reactivo de Drabkin modificado por Van Kampen-Zijlstra en una proporción tal que permita obtener la concentración deseada de Hb, 800 mg/L. La A a 540 nm para esta solución, determinada en base a la ecuación 2 deberá ser de 0.546.

Se esteriliza la solución filtrándola a través de un filtro Millipore (con membrana de 0.22 μ) y se reparte asépticamente en porciones de 10 ml, envasándose posteriormente en viales de vidrio blanco. Se cierran los viales con tapones de goma esterilizados y,

son sellados con retapas de aluminio.

El estándar, ya envasado, es guardado bajo las siguientes condiciones :

- a.- 4 °C y expuestos a la luz.
- b.- 4 °C y al abrigo de la luz.
- c.- temperatura ambiente y al abrigo de la luz.

3.- Validación de la solución estándar de HiCN.

3.1 Principio.

Una solución de referencia de HiCN deberá cumplir con las especificaciones que han sido dadas a conocer por el ICSH y que se refieren a pureza, estabilidad y esterilidad.

3.2 Material biológico.

Soluciones de HiCN almacenadas bajo las siguientes condiciones:

- a. 4 °C expuesta a la luz.
- b. 4 °C al abrigo de la luz.
- c. temperatura ambiente, al abrigo de la luz.

3.3 Reactivo.

Reactivo de Drabkin modificado por Van Kampen-Zijlstra.

3.4 Material.

celdas Coleman de 10 mm de diámetro

tubos de 13 X 100 mm

gradilla

3.5 Equipo.

Espectrofotómetro calibrado Coleman Jr II 6/20 A.

3.6 Método.

A continuación se especifican las pruebas que se aplicaron a los lotes de solución estándar después de preparados y envasados.

3.6.1 Control de Pureza.

Examinar el espectro de A de 400-650 nm contra un blanco, que puede ser el reactivo de Drabkin modificado o agua bidestilada. Redujimos los límites de determinación del espectro ya que los puntos de inflexión que nos interesan se encuentran en esa zona.

Medir la A en una λ de 750 nm para verificar turbidez.

Determinar el valor de la relación A^{540} / A^{504} .

3.6.2 Control de estabilidad.

Determinar el coeficiente de variación para los valores de A^{540} y para A^{540} / A^{504} .

3.6.3 Control de esterilidad.

Incubar 4 frascos viales, dos a una temperatura de 28 °C y los otros dos a 37 °C. Observar si se desarrolla turbidez en un periodo de 48 y 24 h respectivamente.

Posteriormente sembrar en dos cajas Petri con agar Sabouraud y en dos cajas con agar nutritivo, e incubar a 28 °C por 72 h y a 37 °C por 48 h respectivamente. Observar si hay desarrollo de hongos, levaduras o bacterias.

Las pruebas a cada solución estándar se llevaron a cabo cada 7 días, por un lapso de 6 meses, considerándose suficientes en base a los fines que perseguimos. Las pruebas fueron las citadas bajo los puntos 3.6.2.

Ya que el valor de la relación A^{540} / A^{504} nos proporciona un

criterio confiable sobre la pureza de la solución, no es necesario examinar en todas las ocasiones el espectro de A, basta con llevarlo a cabo cada mes.

En cuanto a la prueba de esterilidad consideramos que debía aplicarse únicamente una vez al lote, después del envasado, y observando que no hubiera enturbiamiento de la solución durante el periodo de trabajo.

La información obtenida estará influenciada, tanto por las variaciones relativas a la propia medición, como a las variaciones de la cualidad medida. Dando por hecho que se atendió a todas las causas de variación que pueden controlarse mediante una técnica depurada y una buena instrumentación la variable a evaluar será la respuesta de cada uno de los lotes del estándar a las diferentes condiciones de almacenamiento, respecto a las pruebas de validación.

CUADRO IV
PRUEBAS DE VALIDACION

Requerimiento	Prueba	Periodo
Control de pureza	Espectro de A (400-650 nm)	6 meses, una vez por mes.
	A ⁷⁵⁰	6 meses, cada semana.
	A ⁵⁴⁰ / A ⁵⁰⁴	6 meses, cada semana.
Control de estabilidad	A ⁵⁴⁰	6 meses, cada semana.
	A ⁵⁴⁰ / A ⁵⁰⁴	6 meses, cada semana.
Control de esterilidad	Incubar 2 frascos a 28 °C por 48 h. Observar si hay enturbiamiento y sembrar en 2 cajas Petri con agar Sabouraud, incubar a 28 °C por 72 h.	Una vez, después del envasado.
	Incubar 2 frascos a 37 °C por 24 h. Observar si hay enturbiamiento y sembrar en 2 cajas Petri con agar nutritivo, incubar a 37 °C por 48 h.	Una vez, después del envasado.

CAPITULO VI

RESULTADOS

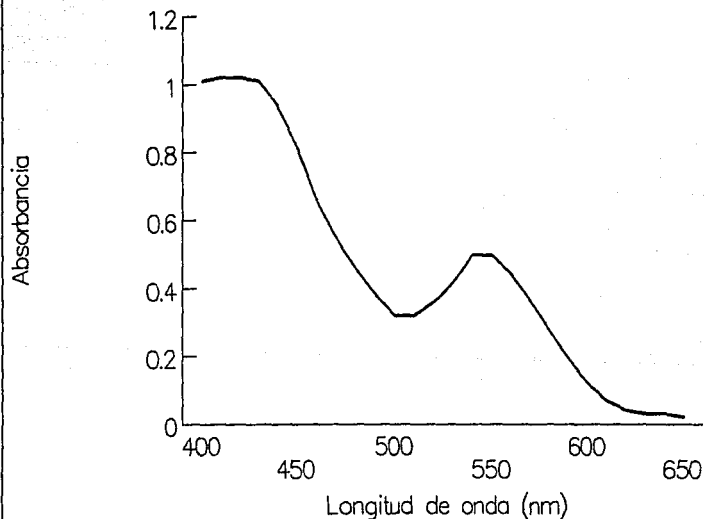
Se llevó a cabo la preparación y estandarización de la solución de HiCN , a una concentración de 800 mg/L , estéril y con las siguientes características espectrofotométricas:

1. $A^{540} = 0.50$ (en lugar del 0.546 calculado en base a la ecuación 2, por la corrección en la escala de absorción).
2. $A^{540} / A^{504} = 1.613$
3. $A^{750} = 0.00$
4. Registro de datos para la gráfica de espectro de absorción (el espectro se muestra en la gráfica 1):

λ (nm)	A	λ (nm)	A
400	1.01	530	0.42
410	1.02	540	0.50
420	1.02	550	0.50
430	1.01	560	0.44
440	0.94	570	0.36
450	0.82	580	0.27
460	0.67	590	0.19
470	0.56	600	0.12
480	0.46	610	0.07
490	0.38	620	0.04
500	0.32	630	0.03
510	0.32	640	0.03
520	0.36	650	0.02

Posteriormente se procedió a realizar las pruebas de validación para cada uno de los lotes de estándar, comparándose los datos obtenidos con los valores asignados en la etapa de estandarización, y siguiendo los criterios del ICSH con el fin de corroborar su utilidad como estándar.

Espectro de absorcion
Estandar de HiCN



a. Estándar de HICN almacenado a 4 °C, expuestos a la luz.

a.1 Determinación de A^{540} .

Para el control de la precisión, los datos obtenidos fueron sometidos al siguiente tratamiento estadístico:

No. de determinación	Valores individuales	Desviaciones del valor medio	Cuadrado de las desviaciones
	X_i	$X_i - \bar{X}$	$(X_i - \bar{X})^2$
			10^{-4}
1	0.50	0.013	1.69
2	0.50	0.013	1.69
3	0.50	0.013	1.69
4	0.51	0.023	5.29
5	0.49	0.003	0.09
6	0.49	0.003	0.09
7	0.48	-0.007	0.49
8	0.49	0.003	0.09
9	0.49	0.003	0.09
10	0.49	0.003	0.09
11	0.48	-0.007	0.49
12	0.48	-0.007	0.49
13	0.48	-0.007	0.49
14	0.48	-0.007	0.49
15	0.49	0.003	0.09
16	0.49	0.003	0.09
17	0.48	-0.007	0.49
18	0.49	0.003	0.09
19	0.48	-0.007	0.49
20	0.48	-0.007	0.49
21	0.48	-0.007	0.49
22	0.48	-0.007	0.49
23	0.48	-0.007	0.49
24	0.48	-0.007	0.49
25	0.48	-0.007	0.49
n= 25	Suma de los valores individuales		Suma de los cuadrados de desviación
	$\Sigma X_i = 12.17$		$\Sigma (X_i - \bar{X})^2 =$ 17.45

$$\begin{aligned} \text{Valor medio } \bar{X} &= \frac{12.17}{25} \\ &= 0.487 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Desviación estándar } S &= \sqrt{\frac{17.45 \times 10^{-4}}{24}} = \sqrt{0.072 \times 10^{-4}} \\ &= \pm 0.008 \end{aligned}$$

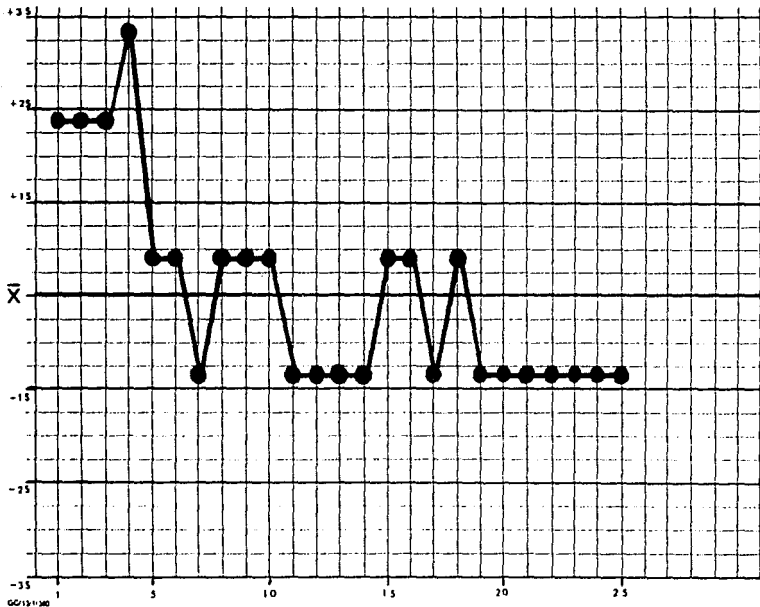
$$\begin{aligned} \text{Coeficiente de variación } CV &= \frac{0.800}{0.487} \\ &= \pm 1.64 \% \end{aligned}$$

$$\text{Límite de alerta superior } \bar{X} + 2S = 0.50$$

$$\text{Límite de alerta inferior } \bar{X} - 2S = 0.47$$

$$\text{Límite de control superior } \bar{X} + 3S = 0.51$$

$$\text{Límite de control inferior } \bar{X} - 3S = 0.46$$



Tarjeta de control No. 1
A⁴⁶

MICN
Componente

MICN
Método

4°C. EXPUESTO A LA LUZ
Condiciones del lote

0.487
Valor medio

± 0.008
Desviación estándar

± 1.64 %
Coeficiente de variación

a.2 Determinación de A^{540} / A^{504} .

Para el control de la precisión, los datos obtenidos fueron sometidos al siguiente tratamiento estadístico:

No. de determinación	Valores individuales	Desviaciones del valor medio	Cuadrado de las desviaciones
	X_i	$X_i - \bar{X}$	$(X_i - \bar{X})^2$ 10^{-3}
1	1.613	0.032	1.024
2	1.613	0.032	1.024
3	1.613	0.032	1.024
4	1.594	0.013	0.169
5	1.581	0.000	0.000
6	1.581	0.000	0.000
7	1.600	0.019	0.361
8	1.581	0.000	0.000
9	1.531	-0.050	2.500
10	1.531	-0.050	2.500
11	1.600	0.019	0.361
12	1.600	0.019	0.361
13	1.600	0.019	0.361
14	1.600	0.019	0.361
15	1.581	0.000	0.000
16	1.581	0.000	0.000
17	1.600	0.019	0.361
18	1.581	0.000	0.000
19	1.600	0.019	0.361
20	1.548	-0.033	1.089
21	1.600	0.019	0.361
22	1.548	-0.033	1.089
23	1.548	-0.033	1.089
24	1.548	-0.033	1.089
25	1.548	-0.033	1.089
$n = 25$	Suma de los valores individuales		Suma de los cuadrados de desviación
	$\Sigma X_i = 39.52$		$\Sigma (X_i - \bar{X})^2 = 16.57$

$$\text{Valor medio } \bar{X} \quad \bar{X} = \frac{39.52}{25}$$

$$= 1.581$$

$$\text{Desviación estándar } S \quad S = \sqrt{\frac{16.57 \times 10^{-3}}{24}} = \sqrt{0.69 \times 10^{-3}}$$

$$= \pm 0.026$$

$$\text{Coeficiente de variación } CV \quad CV = \pm \frac{2.6}{1.581}$$

$$= \pm 1.64 \%$$

$$\text{Limite de alerta superior} \quad \bar{X} + 2S = 1.63$$

$$\text{Limite de alerta inferior} \quad \bar{X} - 2S = 1.53$$

$$\text{Limite de control superior} \quad \bar{X} + 3S = 1.66$$

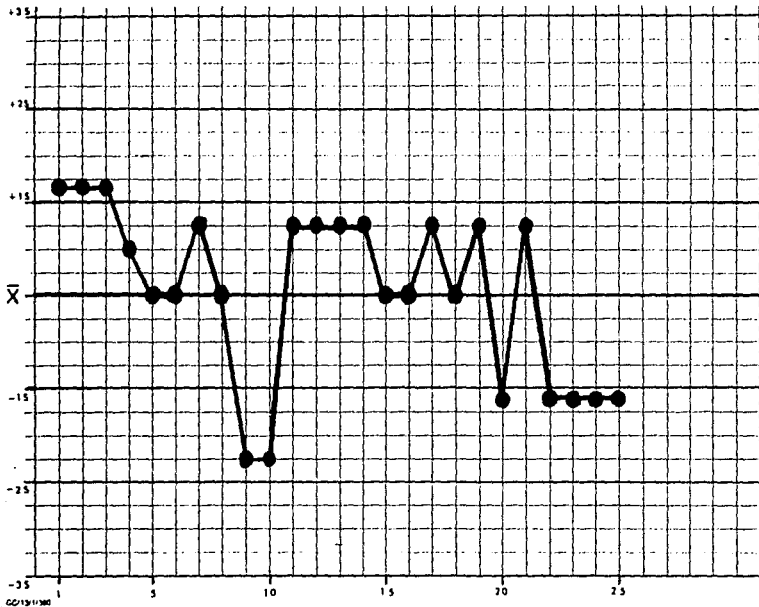
$$\text{Limite de control inferior} \quad \bar{X} - 3S = 1.50$$

a.3 Espectro de A

Para este lote observamos que hubo alteraciones poco significativas en el espectro de absorción, pero con una disminución en los valores a medida que se transcurre el tiempo, a partir de la preparación (datos no mostrados).

a.4 Determinación de A^{750} .

No hubo variaciones respecto al valor original de 0.00.



Tarjeta de control No.2
A³⁴⁰/A⁵⁰⁴

MICN

Componente

MICN

Método

4°C, EXPUESTO A LA LUZ

Condiciones del lote

1.581

Valor medio

10.026

Desviación estándar

11.64 %

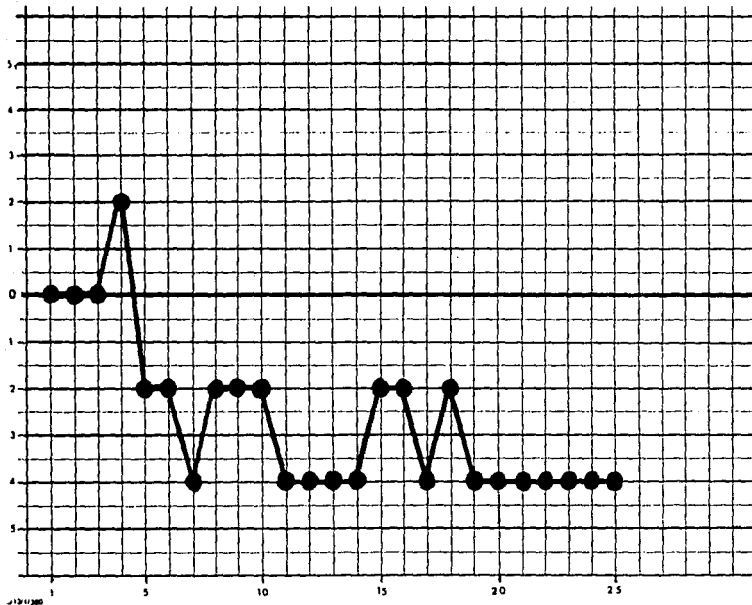
Coefficiente de
variación

a.5 Determinación de A^{540} .

Para el control de la exactitud, los datos obtenidos fueron sometidos al siguiente tratamiento estadístico:

No. de determinación	Valores individuales X_i	Desviaciones del valor asignado $X_i - X_o$	% de variabilidad $\frac{X_i - X_o}{X_o} \cdot 100$
1	0.50	0.00	0.00
2	0.50	0.00	0.00
3	0.50	0.00	0.00
4	0.51	0.01	2.00
5	0.49	-0.01	-2.00
6	0.49	-0.01	-2.00
7	0.48	-0.02	-4.00
8	0.49	-0.01	-2.00
9	0.49	-0.01	-2.00
10	0.49	-0.01	-2.00
11	0.48	-0.02	-4.00
12	0.48	-0.02	-4.00
13	0.48	-0.02	-4.00
14	0.48	-0.02	-4.00
15	0.49	-0.01	-2.00
16	0.49	-0.01	-2.00
17	0.48	-0.02	-4.00
18	0.49	-0.01	-2.00
19	0.48	-0.02	-4.00
20	0.48	-0.02	-4.00
21	0.48	-0.02	-4.00
22	0.48	-0.02	-4.00
23	0.48	-0.02	-4.00
24	0.48	-0.02	-4.00
25	0.48	-0.02	-4.00

% de
variabilidad



Tarjeta de control No. 3
A³⁴⁰

HICN
Componente

HICN
Método

4°C, EXPUESTO A LA LUZ
Condiciones del lote

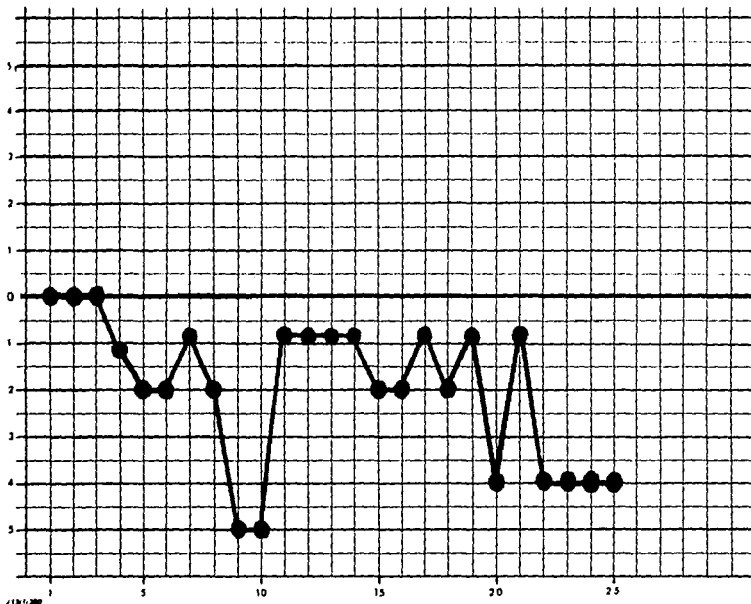
0.50
Valor asignado

a.6 Determinación de A^{540} / A^{504}

Para el control de la exactitud, los datos obtenidos fueron sometidos al siguiente tratamiento estadístico:

No. de determinación	Valores individuales X_i	Desviaciones del valor asignado $X_i - X_o$	% de variabilidad $\frac{X_i - X_o}{X_o} \cdot 100$
1	1.613	0.000	0.00
2	1.613	0.000	0.00
3	1.613	0.000	0.00
4	1.594	-0.019	-1.20
5	1.581	-0.032	-2.00
6	1.581	-0.032	-2.00
7	1.600	-0.013	-0.80
8	1.581	-0.032	-2.00
9	1.531	-0.082	-5.10
10	1.531	-0.082	-5.10
11	1.600	-0.013	-0.80
12	1.600	-0.013	-0.80
13	1.600	-0.013	-0.80
14	1.600	-0.013	-0.80
15	1.581	-0.032	-2.00
16	1.581	-0.032	-2.00
17	1.600	-0.013	-0.80
18	1.581	-0.032	-2.00
19	1.600	-0.013	-0.80
20	1.548	-0.065	-4.00
21	1.600	-0.013	-0.80
22	1.548	-0.065	-4.00
23	1.548	-0.065	-4.00
24	1.548	-0.065	-4.00
25	1.548	-0.065	-4.00

% de
variabilidad



Tarjeta de control No. 4
A¹⁴⁰/A³⁰⁴

MICN

Componente

MICN

Método

4°C, EXPUESTO A LA LUZ

Condiciones del lote

1.013

Valor asignado

b. Estándar de HCN a 4 °C y al abrigo de la luz.

b.1 Determinación de A^{540} .

Para el control de la precisión, los datos obtenidos fueron sometidos al siguiente tratamiento estadístico:

No. de determinación	Valores individuales	Desviaciones del valor medio	Cuadrado de las desviaciones
	X_i	$X_i - \bar{X}$	$(X_i - \bar{X})^2$
			10^{-4}
1	0.50	-0.002	0.04
2	0.50	-0.002	0.04
3	0.50	-0.002	0.04
4	0.49	-0.012	1.44
5	0.49	-0.012	1.44
6	0.50	-0.002	0.04
7	0.50	-0.002	0.04
8	0.50	-0.002	0.04
9	0.50	-0.002	0.04
10	0.50	-0.002	0.04
11	0.50	-0.002	0.04
12	0.50	-0.002	0.04
13	0.51	0.080	0.64
14	0.50	-0.002	0.04
15	0.52	0.018	3.24
16	0.50	-0.002	0.04
17	0.51	0.080	0.64
18	0.50	-0.002	0.04
19	0.51	0.080	0.64
20	0.49	-0.012	1.44
21	0.50	-0.002	0.04
22	0.50	-0.002	0.04
23	0.51	0.080	0.64
24	0.51	0.080	0.64
25	0.50	-0.002	0.04
n= 25	Suma de los valores individuales		Suma de los cuadrados de desviación
	$\Sigma X_i = 12.54$		$\Sigma (X_i - \bar{X})^2 = 11.4$

Valor medio \bar{X}

$$\bar{X} = \frac{12.54}{25}$$

$$= 0.502$$

Desviación estándar S

$$S = \sqrt{\frac{11.4 \times 10^{-4}}{24}} = \sqrt{0.475 \times 10^{-4}}$$

$$= \pm 0.007$$

Coefficiente de variación CV

$$CV = \frac{0.700}{0.502}$$

$$= \pm 1.39 \%$$

Límite de alerta superior

$$\bar{X} + 2S = 0.52$$

Límite de alerta inferior

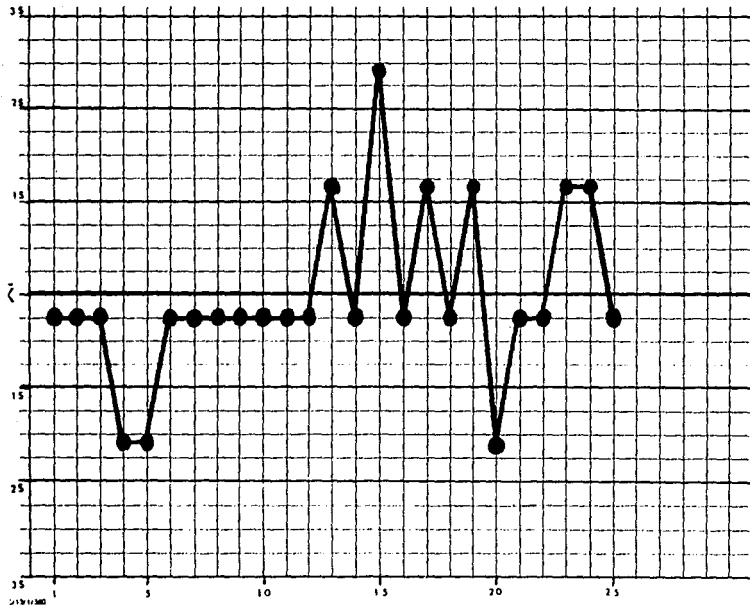
$$\bar{X} - 2S = 0.49$$

Límite de control superior

$$\bar{X} + 3S = 0.52$$

Límite de control inferior

$$\bar{X} - 3S = 0.48$$



Tarjeta de control No. 5
A⁵⁴⁰

HICN
Componente

HICN
Método

4°C. AL ABRIGO DE LA LUZ
Condiciones del lote

0.502
Valor medio

± 0.007
Desviación estándar

± 1.39 %
Coeficiente de
variación

b.2 Determinación de A^{540} / A^{504} .

Para el control de la precisión, los datos obtenidos fueron sometidos al siguiente tratamiento estadístico:

No. de determinación	Valores individuales	Desviaciones del valor medio	Cuadrado de las desviaciones
	X_i	$X_i - \bar{X}$	$(X_i - \bar{X})^2$
			10^{-4}
1	1.613	-0.009	0.81
2	1.613	-0.009	0.81
3	1.613	-0.009	0.81
4	1.581	-0.023	5.29
5	1.581	-0.023	5.29
6	1.613	-0.009	0.81
7	1.613	-0.009	0.81
8	1.613	-0.009	0.81
9	1.613	-0.009	0.81
10	1.613	-0.009	0.81
11	1.613	-0.009	0.81
12	1.613	-0.009	0.81
13	1.594	-0.010	1.00
14	1.613	-0.009	0.81
15	1.576	-0.028	7.84
16	1.613	-0.009	0.81
17	1.594	-0.010	1.00
18	1.613	-0.009	0.81
19	1.594	-0.010	1.00
20	1.581	-0.023	5.29
21	1.613	-0.009	0.81
22	1.613	-0.009	0.81
23	1.594	-0.010	1.00
24	1.594	-0.010	1.00
25	1.613	-0.009	0.81
$n = 25$	Suma de los valores individuales		Suma de los cuadrados de desviación
	$\Sigma X_i = 40.09$		$\Sigma (X_i - \bar{X})^2 =$ 41.67

Valor medio \bar{X}

$$\bar{X} = \frac{40.097}{25}$$
$$= 1.604$$

Desviación estándar S

$$S = \sqrt{\frac{41.67 \times 10^{-4}}{24}} = \sqrt{1.73 \times 10^{-4}}$$
$$= \pm 0.013$$

Coefficiente de variación CV

$$CV = \frac{1.300}{1.604}$$
$$= \pm 0.81 \%$$

Límite de alerta superior $\bar{X} + 2S = 1.63$

Límite de alerta inferior $\bar{X} - 2S = 1.58$

Límite de control superior $\bar{X} + 3S = 1.64$

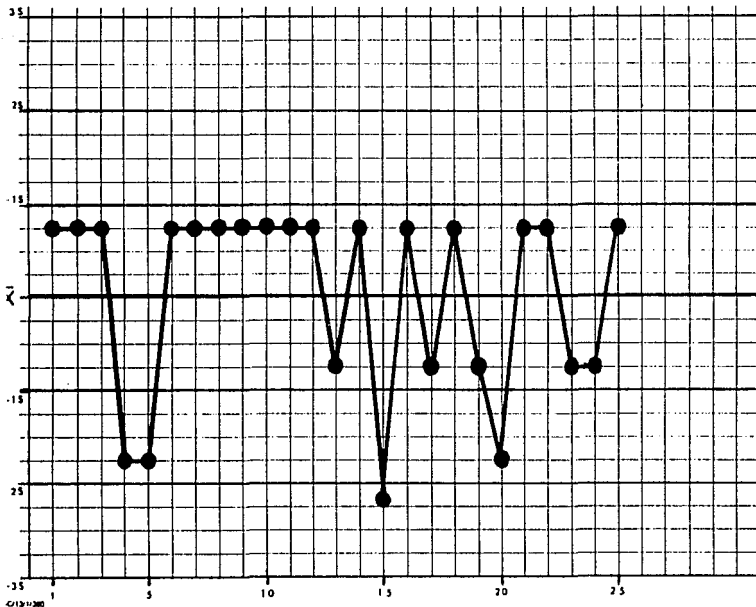
Límite de control inferior $\bar{X} - 3S = 1.56$

b.3 Espectro de A.

El espectro de A que se realizó cada mes se presentó sin variaciones significativas respecto al espectro que ya presentamos, por lo que no incluimos los datos.

b.4 Determinación de A⁷⁵⁰.

No hubo alteraciones respecto al valor original de 0.00.



Tarjeta de control No. 6
 A^{540}/A^{504}

H:CN
 Componente

H:CN
 Método

4°C, AL ABRIGO DE LA LUZ
 Condiciones del lote

1.604
 Valor medio

± 0.013
 Desviación estándar

± 0.81 %
 Coeficiente de
 variación

c. Estándar de HICN, a temperatura ambiente y al abrigo de la luz.

c.1 Determinación de A^{540} .

Para el control de la precisión, los datos obtenidos fueron sometidos al siguiente tratamiento estadístico:

No. de determinación	Valores individuales	Desviaciones del valor medio	Cuadrado de las desviaciones
	X_i	$X_i - \bar{X}$	$(X_i - \bar{X})^2$ 10^{-4}
1	0.50	-0.001	0.01
2	0.50	-0.001	0.01
3	0.50	-0.001	0.01
4	0.49	-0.011	1.21
5	0.49	-0.011	1.21
6	0.50	-0.001	0.01
7	0.50	-0.001	0.01
8	0.50	-0.001	0.01
9	0.50	-0.001	0.01
10	0.50	-0.001	0.01
11	0.50	-0.001	0.01
12	0.49	-0.011	1.21
13	0.51	0.009	0.81
14	0.50	-0.001	0.01
15	0.51	0.009	0.81
16	0.51	0.009	0.81
17	0.49	-0.011	1.21
18	0.50	-0.001	0.01
19	0.51	0.009	0.81
20	0.51	0.009	0.81
21	0.50	-0.001	0.01
22	0.50	-0.001	0.01
23	0.51	0.009	0.81
24	0.50	-0.001	0.01
25	0.50	-0.001	0.01
n = 25	Suma de los valores individuales		Suma de los cuadrados de desviación
	$\Sigma X_i = 12.52$		$\Sigma (X_i - \bar{X})^2 = 9.85$

Valor medio \bar{X}

$$\bar{X} = \frac{12.52}{25}$$

$$= 0.501$$

Desviación estándar S

$$S = \sqrt{\frac{9.85 \times 10^{-4}}{24}} = \sqrt{0.41 \times 10^{-4}}$$

$$= \pm 0.006$$

Coefficiente de variación CV

$$CV = \frac{0.600}{0.501}$$

$$= \pm 1.20 \%$$

Límite de alerta superior

$$\bar{X} + 2S = 0.51$$

Límite de alerta inferior

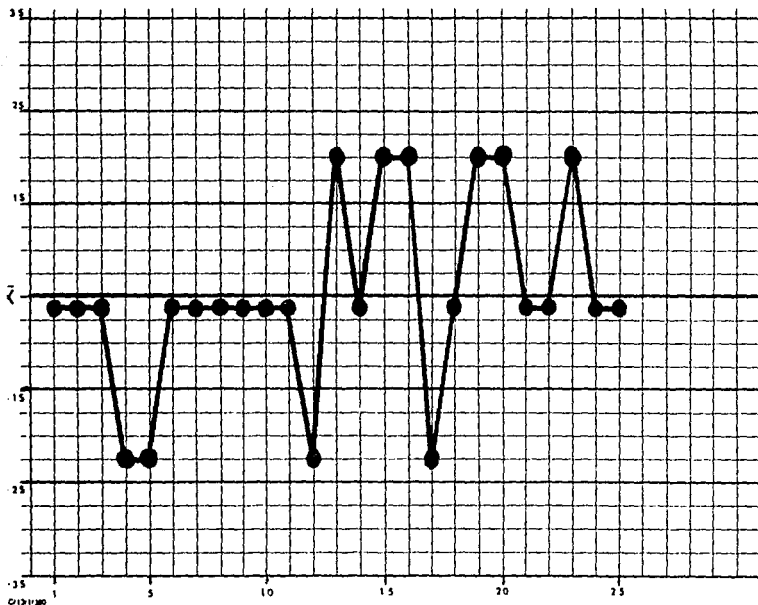
$$\bar{X} - 2S = 0.49$$

Límite de control superior

$$\bar{X} + 3S = 0.52$$

Límite de control inferior

$$\bar{X} - 3S = 0.48$$



Tarjeta de control No. 7
A⁵⁴⁰

MICN
Componente

MICN
Método

TEMPERATURA AMBIENTE,
AL ABRIGO DE LA LUZ
Condiciones del lote

0,501
Valor medio

±0,006
Desviación estándar

±1,20 %
Coeficiente de
variación

c.2 Determinación de A^{540} / A^{504} .

Para el control de la precisión, los datos obtenidos fueron sometidos al siguiente tratamiento estadístico:

No. de determinación	Valores individuales	Desviaciones del valor medio	Cuadrado de las desviaciones
	X_i	$X_i - \bar{X}$	$(X_i - \bar{X})^2$
			10^{-4}
1	1.613	0.010	1.00
2	1.613	0.010	1.00
3	1.613	0.010	1.00
4	1.581	-0.022	4.84
5	1.581	-0.022	4.84
6	1.613	0.010	1.00
7	1.613	0.010	1.00
8	1.613	0.010	1.00
9	1.613	0.010	1.00
10	1.613	0.010	1.00
11	1.613	0.010	1.00
12	1.581	-0.022	4.84
13	1.594	-0.009	0.81
14	1.613	0.010	1.00
15	1.594	-0.009	0.81
16	1.594	-0.009	0.81
17	1.581	-0.022	4.84
18	1.613	0.010	1.00
19	1.594	-0.009	0.81
20	1.594	-0.009	0.81
21	1.613	0.010	1.00
22	1.613	0.010	1.00
23	1.594	-0.009	0.81
24	1.613	0.010	1.00
25	1.613	0.010	1.00
n= 25	Suma de los valores individuales		Suma de los cuadrados de desviación
	$\Sigma X_i = 40.08$		$\Sigma (X_i - \bar{X})^2 = 39.22$

Valor medio \bar{X} $\bar{X} = \frac{40.083}{25}$

$$= 1.603$$

Desviación estándar S $S = \sqrt{\frac{39.22 \times 10^{-4}}{24}} = \sqrt{1.63 \times 10^{-4}}$

$$= \pm 0.013$$

Coefficiente de variación CV $CV = \frac{1.300}{1.603}$

$$= \pm 0.81 \%$$

Límite de alerta superior $\bar{X} + 2S = 1.63$

Límite de alerta inferior $\bar{X} - 2S = 1.58$

Límite de control superior $\bar{X} + 3S = 1.64$

Límite de control inferior $\bar{X} - 3S = 1.56$

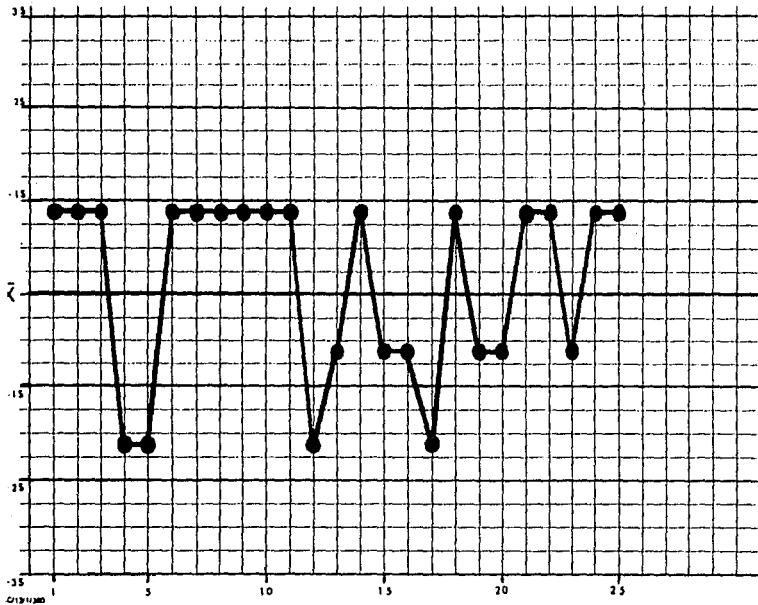
c.3 Espectro de A.

Igual que para el lote anterior, el espectro de A examinado cada mes no presentó variaciones significativas, por lo que omitimos los datos.

c.4 Determinación de A⁷⁵⁰.

No presentó alteraciones respecto al valor asignado.

En cuanto al control de esterilidad ninguno de los lotes presentó señales de contaminación durante el periodo de prueba.



Tarjeta de control No. 4
A⁵⁴⁰/A³⁰⁴

M.C.N.
Componente

M.C.N.
Método

TEMPERATURA AMBIENTE,
AL ABRIGO DE LA LUZ
Condiciones del lote

1.603
Valor medio

±0.013
Desviación estándar

±0.81%
Coeficiente de
variación

CAPITULO VII

CONCLUSIONES

Se reconoce que la concentración de Hemoglobina en sangre es un parámetro importante en Medicina Clínica y Preventiva, que requiere ser evaluado mediante una metodología confiable, exacta, precisa, sensible y específica. El método de HiCN responde a esas demandas y a una serie de ventajas adicionales, como sencillez y bajo costo, razones por las que el ICSH lo adoptó como "Método de Referencia Internacional" para hemoglobinometría en sangre humana desde el año de 1964, procediendo a su estandarización y difusión entre los laboratorios hematológicos. Su estándar fue considerado como "Patrón de referencia Internacional" por la OMS en 1968.

Con base en lo expuesto se advierte la necesidad de que los Laboratorios Clínicos y centros de educación superior cuenten con un estándar de HiCN que garantice la confiabilidad y precisión de los resultados obtenidos, a un costo mínimo. Es así que se emprendió este trabajo, con la finalidad de proporcionar ese estándar de HiCN, debidamente preparado, calibrado y valorado, en conformidad con las especificaciones del ICSH y aunando a ello la información pertinente en cuanto a las condiciones de almacenamiento que aseguren su conservación.

Se preparó un estándar de 800 mg/L de Hb y con las siguientes características espectrofotométricas:

1. A^{540} de 0.50
2. A^{540} / A^{504} de 1.613
3. A^{750} de 0.00

Se dividió en tres lotes, sometiéndose a diferentes condiciones de almacenamiento por 6 meses, durante los cuales se aplicaron las pruebas de validación establecidas por el ICSH.

a. Estándar de HICN almacenado a 4°C , expuesto a la luz.

El lote de estándar analizado deberá descartarse ya que no acata las especificaciones señaladas.

1. Control de pureza.

Este lote presenta alteraciones en el espectro de A, a medida que transcurre el tiempo de prueba, la curva de A va decreciendo, sin embargo esto no logra apreciarse en la gráfica (datos no mostrados).

Además puede observarse en la tabla a.2 que el comportamiento general para el valor de la relación A^{540} / A^{504} es también decreciente y se aprecia en un valor medio de 1.581, que no cumple con el criterio del ICSH (1.59-1.63).

En cuanto al valor de A^{750} , éste no presenta cambios respecto al valor original de 0.00.

2. Control de estabilidad.

Se observa que el coeficiente de variación (CV) obtenido para los parámetros A^{540} y A^{540} / A^{504} (\pm 1.64 %, para ambos)

muestra una ligera desviación con respecto al $\pm 1\%$ que señala el ICSH, aunque se mantiene dentro de los límites de control estadísticos.

El análisis de las gráficas de control (No.1 y 2) para ambos parámetros revelan notablemente una tendencia decreciente, que indica se está fuera de control. Por ello decidimos evaluar la inexactitud, determinando el % de variabilidad para cada uno de los valores individuales obtenidos y tomando como valor asignado 0.50 para la A a 540 nm y 1.613 para la relación de absorbancias.

Se observaron valores decrecientes hasta de - 4% para A^{540} y de - 5.1% para A^{540} / A^{504} (más de dos veces el CV), que muestran una inexactitud significativa en ambos casos, revelando inestabilidad del lote. El análisis de las gráficas No.3 y 4 muestra de manera clara como el estándar se encuentra fuera de control, ya que se observan hasta 21 de 25 valores por debajo del valor asignado.

b. Estándar de HICN almacenado a 4°C, al abrigo de la luz.

Este lote puede considerarse como estándar de referencia, ya que cumple con las especificaciones señaladas por el ICSH.

1. Control de pureza.

Los valores para espectro de A y A^{750} se mantuvieron sin variaciones significativas respecto a los valores asignados.

Para la relación A^{540} / A^{504} se presentó un valor medio de

1.604 que se encuentra dentro de los límites de confianza señalados como correctos por el ICSH (1.59-1.63).

2. Control de estabilidad.

Las determinaciones para A^{540} presentaron un valor medio de 0.502, con un CV de $\pm 1.39\%$ que podemos considerar como una imprecisión poco significativa, respecto al $\pm 1\%$ que señala el ICSH.

Los valores de la relación A^{540} / A^{504} exhiben un CV de $\pm 0.81\%$ lo que se considera como una imprecisión no significativa, siguiendo el criterio del ICSH, y dentro de los límites de control estadísticos.

El análisis de las gráficas de control No.5 y 6 revela en lo general una distribución normal de los valores, pero en el periodo comprendido entre el sexto y el doceavo valor se pensaría que se encuentra fuera de control, ya que son siete valores por debajo de la media para A^{540} y siete valores por encima de la media para la relación de absorbancias; sin embargo después los valores vuelven a caer bajo control. Podría pensarse en una mala calibración del espectrofotómetro, aunque tratamos que esto no ocurriera, pero utilizamos los mismos aparatos que se emplean en las prácticas por los alumnos y estos se encuentran sometidos a una carga excesiva de trabajo. La conclusión es que el estandar se encuentra bajo control.

En base a que para ambos parámetros la imprecisión es pequeña y muestran valores medios con ligera dispersión respecto al valor

asignado, consideramos no necesario evaluar la inexactitud para este lote. Concluimos así que este lote de estándar es estable.

c. Estándar de HICN almacenado a temperatura ambiente y al abrigo de la luz.

Este lote de estándar también puede considerarse como de referencia, ya que obedece a las especificaciones del ICSH.

1. Control de pureza.

Los valores obtenidos para el espectro de A y para A^{750} se mantuvieron dentro de lo especificado, sin cambios importantes respecto a los valores establecidos.

En cuanto a la relación A^{540} / A^{504} se observó un valor medio de 1.603, que se encuentra dentro de los límites de confiabilidad establecidos (tabla c.2).

2. Control de estabilidad.

En la determinación de A^{540} encontramos un valor medio de 0.501 y un CV de ± 1.20 que señala una imprecisión pequeña, según el criterio del ICSH y que se encuentra dentro de los límites de control.

Para la determinación de A^{540} / A^{504} se presenta un CV de ± 0.81 , que representa una imprecisión pequeña, siguiendo el mismo criterio. El análisis de las gráficas de control No.7 y 8 muestra resultados similares a los del estándar almacenado a 4°C y al

abrigo de la luz, concluyéndose que el estándar se encuentra bajo control.

Al igual que para el lote anterior se decidió que no era necesario evaluar la inexactitud de los valores, ya que la imprecisión para los dos parámetros es poco significativa y los valores medios presentan insignificante dispersión respecto al valor asignado. Se concluye que este estándar es estable.

Todos los lotes del estándar se mantuvieron libres de contaminación en el tiempo señalado para la prueba, cumpliendo así el requerimiento 3 referente a control de esterilidad.

A continuación se presenta una tabla que engloba los resultados obtenidos:

TABLA DE RESULTADOS

	Estándar de HICN. 4 °C expuesto a la luz	Estándar de HICN. 4 °C al abrigo de la luz	Estándar de HICN temperatura ambiente al abrigo de la luz
Control de			
Pureza			
Espectro de			
absorción	aceptable	aceptable	aceptable
A ⁵⁴⁰	no aceptable	aceptable	aceptable
A ⁷⁵⁰	no aceptable	aceptable	aceptable
Control de			
estabilidad			
CV de A ⁵⁴⁰	aceptable	aceptable	aceptable
CV de A ⁵⁴⁰ /A ⁵⁰⁴	aceptable	aceptable	aceptable
% de variabilidad de A ⁵⁴⁰	no aceptable	_____	_____
% de variabilidad de A ⁵⁴⁰ /A ⁵⁰⁴	no aceptable	_____	_____
Control de			
esterilidad			
turbidez	aceptable	aceptable	aceptable
Conclusión	lote rechazado	lote aceptado	lote aceptado

El estándar deberá almacenarse siempre al abrigo de la luz y a 4 °C, o bien a temperatura ambiente.

El estándar debe ser distribuido en porciones de 10 ml, de preferencia en viales color ámbar, si no fuera posible podrá repartirse en frascos de vidrio blanco y guardarlos de la exposición a la luz en cajas. Los viales, los tapones de hule y las retapas de aluminio es posible conseguirlos en las siguientes direcciones:

Retapas y accesorios
Av. San Fernando No. 482
573-16-90.

Distribuidora de envases
de México.
División del Norte No. 1020
575-75-48

A pesar de no estar señalado el uso de un conservador en la preparación del estándar nosotros lo aconsejamos, de otra manera se tienen problemas de esterilidad, ya que varios microorganismos pueden desarrollarse en la solución si no se cuidan numerosos detalles en el proceso de esterilización, con la consiguiente contaminación y pérdida de tiempo. La cantidad de azida de sodio es mínima (0.1%) y no llega a afectar la pureza del estándar, en cuanto a especies constituyentes.

El estándar fué puesto a prueba en las prácticas de los dos grupos de Hematología para probar su fidelidad en condiciones no óptimas, sino de rutina y los resultados fueron satisfactorios.

Este trabajo apenas constituye el primer paso en la preparación de un estándar de referencia de HiCN, ya que es necesario afinar algunos detalles en el esquema propuesto: contar

en un solo laboratorio con el material, reactivos y equipo a utilizar evitando desplazamientos innecesarios y lograr un mejor control de todo el proceso, el equipo a utilizar deberá estar al cuidado exclusivo de la persona encargada del proceso previniendo desajustes, llevar a cabo un control más amplio del estándar contando con una mayor preparación de lotes.

Era nuestro deseo lograr la certificación del estándar por la Comisión Nacional de la Industria de Laboratorios Químicos y Farmacéuticos, sin embargo no fué posible contar con la información necesaria ya que no se había nombrado al titular en la Dirección Farmacéutica, ni existía persona que pudiera proporcionarnos los datos acerca del procedimiento a seguir para la certificación de un estándar de naturaleza biológica. No obstante creemos que el estándar, al cumplir con todas las especificaciones señaladas por el ICSH puede distribuirse y emplearse como estándar de referencia a nivel de centros educativos y de Laboratorios Clínicos.

Por lo anterior, considero que la solución estándar obtenida puede ser empleada como estándar de referencia en laboratorios de Patología Clínica y en centros de educación superior que así lo deseen, y más aún podrá ser preparada por ellos mismos con calidad satisfactoria siguiendo el esquema aquí planteado en cuanto a su preparación, estandarización y validación, y corrigiendo las causas de error que pudieran derivarse en estas etapas de trabajo, en la calidad del material empleado o en la aplicación del método.

Con fundamento en los resultados obtenidos considero que se logró la preparación de un estándar secundario de cianometahemoglobina, calibrado y valorado de conformidad con las especificaciones del ICSH, que lo avalan como estándar de referencia y por consiguiente con calidad equivalente a los estándares comerciales, cumpliéndose el objetivo de este trabajo.

CAPITULO VIII

ANEXOS

ANEXO No. 1

CALIBRACION DE ESPECTROFOTOMETROS

Debido a que la estandarización y validación del estándar de HICN dependen de la conformidad con las especificaciones en cuanto a características espectrofotométricas, dentro de las recomendaciones para la preparación de la solución de HICN el ICSH ha propuesto:

- a) La calibración de la longitud de onda.
- b) La verificación de la escala de absorbancia.

Calibración de la longitud de onda.

La λ es calibrada por medio de líneas de emisión del Hg para λ de 546.1 y 491.6 nm, de las líneas de emisión del H para λ de 656.3 y 486.1 nm, que son las técnicas más exactas, o bien a base de filtros de tierras raras como el didimio, para λ de 585 nm.

Nosotros empleamos la técnica de filtro de didimio, que describimos a continuación.

1. Encender el aparato para precalentar (10-15 min).
2. Seleccionar el filtro (VIS).

3. Seleccionar con el monocromador la λ de 585 nm.
4. Controlar los botones de ajuste grueso (COARSE) en el extremo inferior y fino (FINE) en la parte media.
5. Ajuste a 585 nm con el filtro de didimio.
 - a. Teniendo obstruido el paso de luz, ajustar a 0% de T. Puede hacerse con la reglilla de la escala si no es muy grande el desajuste o con el cero mecánico.
 - b. Sacar el filtro y poner la cubierta para celdas (NEGRA) para ajustar a 100% de T con los botones grueso y fino.
 - c. Repetir los pasos a y b para controlar los ajustes a 0 y 100% de T.
 - d. Colocar el filtro de didimio y anotar el valor de % de T mínimo. Cuando el aparato es nuevo y la lámpara es aún viable este valor corresponde aproximadamente a 4% de T.
6. Llevar con el botón de ajuste grueso a 50% de T, estando la λ a 585 nm.
7. Girar el monocromador a 580 y 590 nm, para controlar que el valor mínimo corresponde a 585 nm.
8. Si el mínimo no corresponde a 585 nm, compensar la desviación regresando con los botones de ajuste grueso y fino a 50% de T.
9. Llevar el monocromador a 585 nm.
10. Quitar la tapa trasera del espectrofotómetro habiéndose quitado cualquier prenda de metal.
11. Sin mover el espectrofotómetro ajustar con el tornillo grande amarillo (cremallera en la parte de atrás), moviendo a 5-6 topes/nm.

a. hacia la derecha si el mínimo está desplazado a la izquierda.

b. hacia la izquierda si el desplazamiento del mínimo es a la derecha.

12. Colocar la tapa posterior del espectrofotómetro y controlar nuevamente el 0 y 100% de T, así como la λ que debe ser de 585 nm y corresponder al mínimo (50 % previamente fijado).

Notas:

Observar el espectro de didimio antes de efectuar la calibración de λ .

Si en el punto 5.c se obtiene inicialmente un valor inferior a 4% es indicativo de que la energía de la lámpara se está reduciendo y debe pensarse en cambiarla.

A pesar de no estar considerada dentro de las técnicas que recomienda el ICSH para comprobar la exactitud de la λ , nosotros empleamos también la de los puntos isobásticos pI. Hoxter ha propuesto (18) el empleo de soluciones indicadoras para encontrar puntos isobásticos o de intersección, esto es, la λ a la cual la A de una sustancia a diferentes pH es la misma.

Después de haber calibrado la λ con alguno de los otros procedimientos se puede emplear el de los pI como alternativo, con excelentes resultados en los espectrofotómetros con que contamos en nuestros laboratorios, y al mismo tiempo con las ventajas de abarcar las regiones UV y VIS mediante el uso de soluciones baratas y estables (19).

Estudiando el trabajo que realizó Morales Arias sobre este punto, decidimos escoger dos sustancias indicadoras cuyos pI estuvieran cercanos a la λ que debemos trabajar y que es de 540 nm.

Indicador	Punto isosbético
Azul de bromotimol ABT	498 nm
Rojo congo RC	541 nm

El procedimiento es el siguiente:

1. Se examina el espectro de A entre 400-600 nm para cada par de soluciones de ABT y RC, pH 4.0 y pH 8.0, contra agua bidestilada (para su preparación cf anexo No. 2).
2. Graficar los resultados sobre papel milimétrico, disponiendo las lecturas de A en las abscisas y los valores de λ en las ordenadas.
3. El punto de intersección de ambas curvas para un par de soluciones será el pI.
4. El valor obtenido deberá compararse con los valores reportados por Hoxter, y ya mencionados.

La desviación máxima permitida es de 15 nm, considerando que los valores fueron obtenidos por él contando con un espectrofotómetro de mayor resolución, mayor sensibilidad, paso de banda estrecho y contando con un graficador.

Verificación de la escala de Absorción

La escala de absorción es corroborada por medio de un filtro de A conocida a una λ de 540 nm, p.e. con un Corning HT filtro amarillo, con soluciones de referencia de HiCN u otro medio que haya sido certificado por alguna autoridad.

Nosotros verificamos la escala de A utilizando una solución de referencia de HiCN.

ANEXO No. 2

CURVA DE CALIBRACION DE HEMOGLOBINA

Para la cuantificación de Hb en una muestra de sangre total, deberá elaborarse una gráfica de calibración a partir de cinco soluciones de concentración de HiCN decreciente, con el estándar de referencia, que se diluye en el reactivo de Drabkin modificado.

La gráfica puede prepararse de acuerdo al siguiente cuadro, la solución valorada de cianometahemoglobina es equivalente a 20 g/dL de hemoglobina, dilución 1:251.

CUADRO V

PREPARACION DE LAS SOLUCIONES ESTANDAR DE HiCN PARA
ELABORAR LA CURVA DE CALIBRACION

tubo	estándar de referencia HiCN	reactivo diluyente	Hb g/L
blanco	0.0	5.0	0.0
1	1.0	4.0	4.0
2	2.0	3.0	8.0
3	3.0	2.0	12.0
4	4.0	1.0	16.0
5	5.0	0.0	20.0

ANEXO No. 3

REACTIVOS

1. EDTA al 10%

EDTA		2.5 g
H ₂ O destilada	cbp	25 ml

2. NaCl al 0.85% (SSI)

NaCl		0.85 g
H ₂ O destilada	cbp	100 ml

3. Reactivo de Drabkin modificado por Van Kampen-Zijlstra

K ₃ Fe(CN) ₆		200 mg
KCN		50 mg
KH ₂ PO ₄		140 mg
saponina		250 mg
NaN ₃		100 mg

Disolver suavemente hasta disolución total.

Ajustar el pH con H₃PO₄ 0.1N y/o con

NaOH 0.1 N a pH 7.2 ± 0.1

H ₂ O destilada	cbp	1000 ml
----------------------------	-----	---------

Deberá guardarse en un frasco de borosilicato oscuro a una temperatura entre 4 y 25° C. No deberá congelarse.

4. H₃PO₄ 0.1N

H ₃ PO ₄ R.A.		0.225 ml
H ₂ O destilada	cbp	100 ml

5. NaOH 0.1N

NaOH		0.4 g
H ₂ O destilada	cbp	100 ml

6. HCl 0.1N

HCl R.A.		8.4 ml
H ₂ O destilada	cbp	100 ml

ANEXO No. 3

REACTIVOS

1. EDTA al 10%

EDTA		2.5 g
H ₂ O destilada	cbp	25 ml

2. NaCl al 0.85% (SSI)

NaCl		0.85 g
H ₂ O destilada	cbp	100 ml

3. Reactivo de Drabkin modificado por Van Kampen-Zijlstra

K ₃ Fe(CN) ₆		200 mg
KCN		50 mg
KH ₂ PO ₄		140 mg
saponina		250 mg
NaN ₃		100 mg

Disolver suavemente hasta disolución total.

Ajustar el pH con H₃PO₄ 0.1N y/o con

NaOH 0.1 N a pH 7.2 ± 0.1

H ₂ O destilada	cbp	1000 ml
----------------------------	-----	---------

Deberá guardarse en un frasco de borosilicato oscuro a una temperatura entre 4 y 25° C. No deberá congelarse.

4. H₃PO₄ 0.1N

H ₃ PO ₄ R.A.		0.225 ml
H ₂ O destilada	cbp	100 ml

5. NaOH 0.1N

NaOH		0.4 g
H ₂ O destilada	cbp	100 ml

6. HCl 0.1N

HCl R.A.		8.4 ml
H ₂ O destilada	cbp	100 ml

7. Rojo Congo 20 μ M/L (RC)

Rojo congo	14.0 mg
H ₂ O destilada cbp	100 ml

Tomar 5 ml de la solución y aforar a 50 ml, para obtener la concentración deseada.

Dividir la solución en dos partes, ajustar una de ellas a pH 4.0 con HCL 0.1N y la otra a pH 8.0 con NaOH 0.1N. Guardárlas en frasco ámbar a temperatura ambiente.

8. Azul de bromotimol 40 μ M/L (ABT)

Azul de bromotimol	25.0 mg
H ₂ O destilada cbp	100 ml

Tomar una alícuota de 5 ml y aforar a 50 ml.

Dividir la solución en dos partes y una de ellas llevarla a pH 4.0 con HCl 0.1N y la otra a un pH de 8.0 con NaOH 0.1 N. Guardar en frasco ámbar a temperatura ambiente.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

CAPITULO IX

BIBLIOGRAFIA

1. Vives, C.J.L., Jou, J.M., Aguilar, J.L. "Método recomendado por el I.C.S.H. para la determinación de la concentración de Hemoglobina en sangre". Sangre (Barc) 26 (6): 172-178 (1981).
2. Donaldson, R. et al. Lancet 1 (1): 874 (1951).cit. por Tentori, L., Salvatori, M.M. en: METHODS IN ENZYMOLOGY. Vol. 76. Ed. Antonini, E. Academic Press Inc. N.Y. (1981).
3. Stadie, W.C.A. "A method for the determination of methemoglobin in blood". J. Biol. Chem. 4 (1): 237 (1920).
4. Holtz, A.H. "Some experience with a cyanhaemoglobin solution". en: STANDARDIZATION, DOCUMENTATION AND NORMAL VALUES IN HAEMATOLOGY. Vol. 21 (1):75. Ed. De Boroviczény CH.G. Bibl. Haemat. (Basel). N.Y. (1965).
5. "Recommendations for haemoglobinometry in human blood". Brit. J. Haemat. 13 suppl.71 (1): 71-75 (1967): International Committee for Standardization in Haematology.
6. "International biological standards and international biological reference preparations". WHO Tech. Rep. Ser. (384): 85 (1968): World-Health Organization.
7. "Recommendations for reference method for haemoglobinometry in human blood (ICSH standard 1986) and specifications for international haemoglobinocyanide reference preparation (3rd. edition)". Clin. Lab. Haemat. 9 (1):73-79 (1987): International Committee for Standardization in Haematology; Expert Panel on Haemoglobinometry.
8. Zander, R., Lang, W., Wolf, H.U. "Alkaline haematin D-575, a new tool for the determination of haemoglobin as an alternative to the cyanhaemoglobin method. I. Description of the method". Clin. Chim. Acta 136 (1): 83-93 (1984).
9. Taylor, J.D., Miller, D.D.M. "A source of error in the cyanmethemoglobin method of determination of haemoglobin concentration in blood containing carbon monoxide". Am. J. Clin. Pathol. 43 (1): 265-271 (1965).
10. Rice, E.W. "Rapid determination of total hemoglobin as hemoglobin cyanide in blood containing carboxyhemoglobin". Clin. Chim. Acta 18 (1): 89-91 (1967).

11. Koepke, J.A., Am. J. Clin. Pathol. 68 (suppl.): 180 (1977).
cit. por Tentori, L., Salvatori, A.M. en METHODS IN ENZYMOLOGY.
Vol. 76. Ed. Antonini, E. Academic Press Inc. N.Y. (1981).
12. Wolf, H.U., Lang, W., Zander, R. "alkaline haematin D-575, a
new tool for the determination of haemoglobin as an alternative to
the cyanhaemoglobin method. II. Standardization of the method
using pure chlorohaemin". Clin. Chim. Acta 136 (1): 95-104 (1984).
13. Klein, B.; *et al.* "A new procedure for the determination of
hemoglobin". Clin. Chim. Acta 26 (1): 77-84 (1969).
14. Trigueros, G.M. Preparación de un patrón primario de
Hemoglobina. Tesis Lic. UNAM, Facultad de Química, México, 1977.
15. Henry, R.J., Cannon, D.C. (eds.) CLINICAL CHEMISTRY:
PRINCIPLES AND TECHNIQS. 2nd. edition. Harper & Row Ed. N.Y.
(1971).
16. Kaplan, A., Pesce, A.J. (eds.) CLINICAL CHEMISTRY. C. V. Mosby
Company Ed. U.S.A. (1984).
17. "Approved recommendations on Quality Control in Clinical
Chemistry. Part. 3. Calibration and control materials".
Recommendations and related documents (1): 65-70 (1984):
International Federation of Clinical Chemistry.
18. "Approved recommendations on Quality Control in Clinical
Chemistry. Part. 1. General principles and Terminology".
Recommendations and related documents (1): 48-55 (1984):
International Federation of Clinical Chemistry.
19. Hoxter, G. "Suggested isosbestic wavelength calibration in
clinical analysis". Clin. Chem. 25 (1): 143-149 (1979).
20. Morales, A.O.S. Técnicas alternativas para verificar la
calibración de espectrofotómetros en Química Clínica. Tesis Lic.
UNAM, Facultad de Química, México, 1988.