

DETERMINACION DE Cu, Zn, Fe, Ca, Mg, y K EN SANGRE MEDIANTE ESPECTROSCOPIA ATOMICA CON LLAMA

O. Duque, M. Granda, R. Jiménez, M. Catasús y R. Rodríguez.

Dpto. Química Analítica, Instituto de Materiales y Reactivos para la Electrónica, Facultad de Química, Universidad de la Habana, Calzada de Zapata y Calle G, Vedado, Plaza de la Revolución, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 1ro de septiembre de 1996.

RESUMEN. Se estableció un procedimiento analítico para determinar directamente Cu, Zn, Fe, Ca, Mg y K mediante Espectroscopia Atómica con Llama en muestras de sangre total. Se comparó la digestión de la muestra cuando se emplea HNO₃ (c) y mezcla HNO₃-HClO₄ (3:1). Se estudió el efecto del EDTA y el La³⁺ como *buffers* espectrales en las curvas de calibración y se demostró que no es necesario su empleo. Los recobrados del proceso de adición de estándar efectuado fueron satisfactorios, así como la reproducibilidad obtenida. La metodología se aplicó a muestras de sangre total sin liofilizar de dos pacientes aquejados de insuficiencia renal crónica.

ABSTRACT. A simple procedure for the direct determination of Cu, Zn, Fe, Ca, Mg and K by Flame Atomic Spectrometry in whole lyophilized blood was developed. The digestion of the sample with nitric acid (c) and with a mixture of nitric and perchloric acids was studied as well as the effect of several spectral buffers (EDTA, La³⁺). The final technique employing nitric acid for the digestion and no need for buffers was applied to whole blood samples of several patients of chronic renal insufficiency. Recovery of a standard addition process proved to be satisfactory as well as the reproducibility obtained.

INTRODUCCION

Los minerales y oligoelementos tienen funciones biológicas importantes en el organismo humano. Al igual que los componentes principales del cuerpo, ellos son indispensables y deben estar en concentraciones definidas, para que los procesos vitales se lleven a cabo en condiciones óptimas.¹⁻⁴ Una carencia o un exceso de esos elementos se relaciona siempre con un defecto o una reducción de las funciones fundamentales y se observan tanto irregularidades metabólicas como cambios patológicos en el organismo.^{3,5-7}

Mediante el progreso de las técnicas en las áreas químico-analíticas se han ampliado los conocimientos sobre los mecanismos químicos de los oligoelementos y primordialmente durante los últimos años, se han completado informaciones sobre su participación en procesos biológicos del organismo humano.

Se hace evidente de todo lo anterior la necesidad de conocer las concentraciones de estos oligoelementos y minerales en determinados fluidos biológicos. Cuba también se ha incorporado a esta temática y es por ello que en la actualidad diferentes entidades cubanas realizan trabajos en colaboración con vistas a dar una respuesta a diferentes interrogantes.

En el análisis de muestras de sangre ha sido una preocupación de los investigadores dedicados a este campo aspectos tales como la toma de muestra,^{2,8} su almacenamiento^{9,10} y su posible contaminación,^{11,12} al igual que el procesamiento analítico correspondiente. Estos procedimientos de análisis tienen dos partes fundamentales: el tratamiento de la muestra y la posterior determinación instrumental. Tanto la vía seca^{7,8} como la húmeda¹³⁻¹⁶ han sido ampliamente utilizadas como técnicas de digestión; mientras que métodos tan diversos como los electroanalíticos, los cro-

matográficos y los de Espectroscopia Atómica se encuentran entre los más comúnmente empleados en el análisis de muestras de fluidos biológicos.^{1,3}

Por estas razones, el objetivo del presente trabajo fue desarrollar un procedimiento sencillo y directo para la determinación de Cu, Zn, Fe, Ca, Mg, K en sangre total empleando para ello la Espectroscopia Atómica con Llama.

PARTE EXPERIMENTAL

Reactivos

Se usaron patrones primarios de 1 000 mg/L calidad *Spectrosol* de Cu²⁺, Zn²⁺, Fe²⁺, Mg²⁺ y K⁺. El patrón de 1 000 mg/L de eC a²⁺ fue reparado pesando 2,4973 g de eC aCO₃ (BDH) y disolviendo con 25 mL de HCl (1 mol/L). Posteriormente, se enrasó en un matraz aforado de 1 000 mL con agua desionizada.

Las disoluciones empleadas como patrones secundarios de concentración adecuada de todos los elementos anteriores se obtuvieron a partir de sus respectivos patrones primarios.

Como *buffers* espectrales se utilizaron soluciones de LaCl₃ (al 1 0% e nL a³⁺) calidad *Spectrosol* (BDH) y de EDTA al 5 % (m/v) a partir de la sal disódica (Analar) de 99,5 % de pureza.

Los ácidos empleados durante el estudio de la digestión de la muestra fueron: HNO₃ 70% y densidad 1,41 g/mL (Analar) y HClO₄ 60% y densidad 1,53 g/mL (Merck).

Durante todo el trabajo se utilizó agua desionizada y todas las soluciones se envasaron en recipientes plásticos. Además, el material usado se lavó con detergente, se enjuagó con agua y posteriormente, se dejó en contacto con HNO₃ (1:1) durante la noche. Finalmente, se enjuagó con agua desionizada abundante.^{4,11}

Equipos

Para la determinación de los elementos se utilizó un Espectrómetro de Absorción Atómica marca PYE-UNICAM, modelo SP-9 (con lámparas de cátodo hueco) y llama aire-acetileno. En este mismo equipo se realizó el análisis de potasio mediante Fotometría de Llama.

Los parámetros flujo de acetileno, altura de quemador y ancho de rendija se optimizaron con vistas a lograr la mayor sensibilidad.

En la Tabla I se muestran las condiciones de trabajo empleadas.

TABLA I
Condiciones de trabajo

Elemento	λ (nm)	Flujo-aire (mm/eqv)	Flujo-C ₂ H ₂ (mm/eqv)	Altura del quemador (mm)	I lámpara (mA)	Rendija (nm)
Fe	248,3	35	24	1	10	0,2
Ca	422,7	35	24	1	4	0,2
Mg	285,2	35	24	1	3	0,2
Cu	324,8	35	24	1	4	0,2
K	766,5	35	24	2	—	0,2
Zn	213,9	35	24	1	7	0,2

Experimentos

El trabajo experimental se realizó con un *pool* de sangre procedente del Banco de Sangre del Centro de Investigaciones Médico-Quirúrgicas, La Habana, al cual se le añadió EDTA (concentración final en la muestra igual a 0,2 %) como anticoagulante y se liofilizó para su conservación en bulbos de 5 mL.

Estudio del proceso de digestión

El estudio del proceso de digestión se comenzó con el ensayo de la disolución de la muestra de sangre liofilizada en HNO₃ (c) y en una mezcla HNO₃ (c)-HClO₄ (c) (3:1) pues son estas algunas de las variantes de digestión por vía húmeda que se recomiendan para esta operación.^{9,17,18}

Para realizar el experimento, se tomaron dos porciones iguales de la muestra en estado sólido, se trasvasó a vasos de precipitado y en un caso, se añadieron 10 mL de HNO₃ (c) y en el otro 10 mL de la mezcla.

A continuación, se efectuó la digestión en la placa calefactora, se trasvasó a un matraz aforado de 25 mL y se enrasó con agua desionizada. El proceso de digestión transcurre aproximadamente en 30 min para ambas variantes, pero en el caso de la variante que emplea la mezcla ácida, al enfriar aparece una ligera turbidez en la disolución. Simultáneamente, se prepararon los blancos correspondientes para cada digestión.

En ambos casos, de los matraces aforados de 25 mL que contenían la disolución de la muestra, se efectuó un proceso de dilución apropiado para cada elemento y se realizó la medición.

Las curvas de calibración se obtuvieron a partir de cinco multipatrones. En la Tabla II se presentan los intervalos de concentración usados para cada elemento.

En la Tabla III se muestran los resultados obtenidos en dos réplicas al comparar los procesos de digestión. Como se observa los valores son similares, por lo cual se decidió continuar trabajando con la digestión nítrica, pues es más simple y emplea menos reactivos.

Para comprobar la posible influencia del medio ácido en la determinación, las señales obtenidas para cada elemento también fueron procesadas a partir de patrones preparados

en el medio ácido correspondiente en lugar de agua desionizada. Los resultados fueron similares a los que se presentan en la Tabla III, razón por la cual se continuaron utilizando las curvas de calibración multielementales preparadas en agua.

TABLA II
Concentración de los elementos en los patrones

Elemento	Intervalo de concentración ($\mu\text{g/mL}$)
Fe	0,5 – 4
Mg	0,05 – 0,25
Ca	0,5 – 2,5
Zn	0,05 – 0,25
Cu	0,1 – 0,8
K	2–1 0

TABLA III
Concentración obtenida al comparar
los dos procesos de digestión

Elemento	Digestión (HNO ₃)	Digestión (HNO ₃ -HClO ₄)
	($\mu\text{g/mL}$)	
Fe	1,82	1,79
Mg	0,11	0,10
Ca	0,89	0,85
Zn	0,12	0,12
Cu	0,38	0,37

Estudio del uso de un *buffer* espectral

Debido a las características de la muestra estudiada y a la naturaleza de algunos de los elementos que se analizaron, se decidió hacer un estudio de la necesidad de la adición o no de un *buffer* espectral para realizar la determinación instrumental.

Para ello, se disolvió una porción apropiada de la muestra sólida en ácido nítrico y a partir de la disolución obtenida, se realizaron tres experimentos, cada uno con cuatro réplicas:

- En el primero se adicionó disolución al 10 % de La^{3+} de forma que su concentración final en la de medición fuese 0,1 % . La curva de calibración multielemental correspondiente fue tratada de igual forma.
- En el segundo, se añadió disolución al 5 % de EDTA de forma que su concentración final en la disolución fuese 0,5 % . La curva de calibración multielemental fue tratada de igual forma.
- En el último, no se adicionó *buffer* alguno, y por tanto, se empleó una curva de calibración multielemental en agua.

Estos tres experimentos se efectuaron con un proceso de adición/recobrado de cada elemento para comprobar tanto la necesidad de la incorporación del *buffer* espectral, así como la efectividad de los dos *buffers* ensayados.

Pudo apreciarse, que salvo en la determinación de Ca^{2+} en presencia de La^{3+} como *buffer*, existe una recuperación satisfactoria para todos los elementos (Tabla IV). De lo que se desprende la no necesidad de usar un *buffer* espectral.

TABLA IV
Resultados del proceso añadido-recobrado en el estudio de los buffers

Elemento	Buffer		
	La^{3+}	EDTA	H_2O
Recuperación (%)			
Fe	101	99	104
Ca	65	99	94
Mg	99	99	101
Zn	101	101	102
Cu	97	96	99
K	1069	81	02

El comportamiento de ese elemento puede explicarse sobre la base del estudio realizado por Kantor¹⁹ con respecto a las diferencias observadas en su volatilización en presencia de nitrato o cloruro de lantano al emplear cada uno como *buffer* espectral.

En este trabajo, se utilizó cloruro de lantano tanto en la muestra como en los patrones correspondientes, sin embargo, el alto contenido de ácido nítrico presente en ella (y no en los patrones) implica la presencia de lantano también en forma de nitrato. De esta manera, se producen diferencias en la volatilización del calcio en la muestra con respecto a la curva de calibración, lo que pudiera ser la causa del efecto antes descrito.

Procedimiento analítico

Una vez determinada la conveniencia de: usar la digestión nítrica, emplear curvas de calibración multielemental sin simular el medio ácido y de no utilizar *buffers* espectrales, se procedió a realizar un proceso de adición/recobrado para comprobar si durante la digestión se producían pérdidas de los elementos o contaminación. Para ello, se empleó la técnica operatoria siguiente:

- a) Pesar aproximadamente 1,000 0 g de sangre liofilizada y trasvasar a vaso de precipitados de 150 mL .

- b) Añadir 10mL de HNO_3 (c)
- c) Calentar en placa calefactora (~150 °C) hasta disolución (~15 min).
- d) Enfriar y trasvasar a matraz aforado de 25 mL .
- e) Enrasar con agua desionizada.
- f) Efectuar las diluciones apropiadas para cada elemento.
- g) Medir la señal de absorbancia en el espectrómetro de absorción atómica contra un blanco apropiado.
- h) Procesamiento de los datos empleando una curva de calibración multielemental.

En el transcurso del trabajo y mediante ensayos de prueba y error, se determinó que de todas las variantes empleadas, la siguiente resultó la combinación "adición-dilución" más apropiada para cada elemento (Tabla V).

TABLA V
Adiciones y diluciones efectuadas para cada elemento

Elemento	Adición ($\mu\text{g/mL}$)	Dilución
Fe	80	1/100
Mg	10	1/100
K	200	1/100
Ca	10	2/25
Zn	1	2/25
Cu	0,4	2,5/5

Para efectuar el experimento de añadido/recobrado se homogeneizó el contenido de cuatro bulbos de sangre y se hicieron cuatro pesadas independientes:

- En la primera porción, se realizó el proceso de digestión descrito anteriormente y una vez disuelta la muestra se trasvasó a matraz aforado de 25 mL y enrasó posteriormente (porción A).
- A la segunda, se le realizó la adición múltiple de estándar anteriormente señalada (Tabla V), posteriormente, se procedió a su disolución, trasvase al matraz aforado y enrasado con agua (porción B).
- A la tercera porción, se le hizo la misma adición múltiple, pero después de disuelta la muestra y se llevó al matraz aforado y enrasó (porción C).

De todas las muestras con o sin adición múltiple (antes o después de la digestión), se tomaron posteriormente las alícuotas indicadas y se llevó a los correspondientes volúmenes finales con agua (Tabla V).

- La cuarta porción de la muestra, se disolvió, se llevó al matraz aforado de 25 mL y se enrasó. A continuación se efectuaron los procesos de dilución indicados, pero antes de enrasar los respectivos matraces aforados, se realizaron las adiciones apropiadas de estándar (porción D).

Las adiciones de estándar que se hicieron en este caso, estuvieron de acuerdo con las efectuadas en B y C y fueron diluidas según el factor de dilución para cada elemento.

Todo este proceso, se llevó a cabo en dos ocasiones y en cada caso, se trabajó con cuatro réplicas para A, B, C y D. En la Tabla VI se presentan los valores medios de concentración obtenidos en las diluciones.

TABLA VI
Concentración obtenida al aplicar proceso de añadido/recobrado

Elemento	A	B	C	D
	(µg/mL)			
Fe	0,96	1,79	1,77	1,71
Ca	0,62	1,35	1,35	1,45
Zn	0,070	0,153	0,150	0,147
Mg	0,053	0,151	0,154	0,158
K	3,6	5,7	5,8	5,8
Cu	0,090	0,29	0,28	0,28

Muestras: **A** sin adición. **B** con adición multielemental antes de la digestión. **C** con adición multielemental después de la digestión. **D** con adición multielemental en las respectivas diluciones.

Con estos datos, se realizó una comparación estadística de medias²⁰ entre las porciones B y C para determinar si existían pérdidas durante la digestión.

De esta forma, se comprobó la no existencia de diferencias significativas para ningún elemento ($\alpha = 0,05$),

lo que permitió inferir que durante ese proceso no hay pérdidas.

Los resultados de los procesos de recuperación correspondientes resultaron satisfactorios (Tabla VII), lo que da una medida de la exactitud del procedimiento propuesto.

TABLA VII
Recuperación en la muestra

Elemento	B	C	D
	(%)		
Fe	102	100	97
Mg	99	101	103
Zn	102	100	98
Ca	95	95	102
K	102	103	103
Cu	100	97	97

Los resultados correspondientes a las determinaciones de la concentración de los elementos estudiados en la muestra resultaron satisfactorios desde el punto de vista de la precisión (Tabla VIII).

TABLA VIII
Resultados del análisis de la muestra de sangre (n = 8, $\alpha = 0,05$)

Elemento	\bar{x}	$\pm \frac{ts}{\sqrt{n}}$	Sr	Experimental	Literatura	RB
				x(µg/mL)		
		(%)				
Fe	0,24	$4,3 \cdot 10^{-3}$	2,2	480	400-500 / 425-50	1; 6
Ca	$1,9 \cdot 10^{-2}$	$4,5 \cdot 10^{-4}$	2,7	39	—	—
K	0,92	$5,4 \cdot 10^{-3}$	0,7	1 800	—	—
Mg	$1,2 \cdot 10^{-2}$	$6,7 \cdot 10^{-4}$	5,9	27	40-70	1
Zn	$2,2 \cdot 10^{-3}$	$1,3 \cdot 10^{-5}$	0,7	4,4	2,1-6,5	9
Cu	$4,5 \cdot 10^{-4}$	$3,1 \cdot 10^{-5}$	8,2	0,9	0,7-1,8 / 0,8-1,4	6; 9

RB Referencias bibliográficas.

Estos valores se calcularon en por ciento (m/m) y en microgramos por mililitro, teniendo en cuenta que originalmente cada bulbo contenía 5 mL de sangre.

Para el Cu, Zn, Fe y Mg se encontró una coincidencia apropiada entre las concentraciones estimadas (µg/mL) y las que han sido reportadas para sangre total. Para los otros dos elementos no se halló esta información.

Aplicación

Con el objetivo de aplicar el procedimiento analítico desarrollado se realizó la determinación de Cu, Zn, Fe, Ca, Mg y K en pacientes con insuficiencia renal crónica de etiología primaria (sin tratamiento dialítico).

Se tomaron muestras de dos pacientes (hombres con edades comprendidas entre 35 y 55 años) con dicha patología, en los cuales el contenido de los elementos a determinar podía variar en dependencia del avance de la enfermedad y de las características del propio enfermo.

La toma de muestra de cada paciente, se realizó de la forma siguiente:^{2,7}

Con una jeringuilla plástica de 10mL con aguja de acero inoxidable, se extrajo entre 1y2m L de sangre. Esta se endulzó y después de desechar dicha porción, se tomó otra de 10mL .

En dos frascos previamente sometidos a un proceso adecuado de lavado con ácido nítrico (1:1) y que contenían dos gotas de EDTA al 10% cada uno, se vaciaron 5 mL respectivamente de la muestra.

El análisis de cada una se efectuó con cuatro réplicas. En este caso, no se pesó la muestra sino que se utilizaron los 5 mL de sangre para efectuar la digestión.

Dado que las muestras fueron congeladas después de su toma, fue necesario descongelarlas antes del análisis y homogeneizarlas. Para trasvasarlas del frasco plástico al beaker se utilizaron entre 5-10m L de agua desionizada.

Los resultados (Tabla IX) son considerados satisfactorios desde el punto de vista clínico, pues el comportamiento de los elementos corresponde con el esperado.

Así, por ejemplo, es típico que pacientes con esta patología presenten hipocalcemia severa, ya que hay trastornos en el equilibrio calcio-fósforo, que se manifiestan especialmente en la etapa predialítica.²¹

TABLA IX
Resultados obtenidos en las muestras de pacientes (n = 4, $\alpha = 0,05$)

Elemento	Muestra (1)			Muestra (2)		
	\bar{x}	$\pm \frac{ts}{\sqrt{n}}$	Sr	\bar{x}	$\pm \frac{ts}{\sqrt{n}}$	Sr
	(μg/mL)		(%)	(μg/mL)		(%)
Fe	309	2,9	1,1	312	5,9	7,0
Mg	29,9	0,32	1,1	39,2	0,25	0,7
K	1 381	21	1,9	1 288	41	3,8
Zn	2,7	0,58	23	2,6	0,25	12
Ca	4,9	0,15	3,7	5,3	0,25	5,3
Cu	1,05	0,030	3,4	1,00	0,021	2,6

Igualmente, se presenta la posibilidad de que los pacientes tengan anemia debido a la propia patología y que por tanto, el contenido de hierro en su sangre, disminuya.²¹

En el caso del cobre, la concentración en los enfermos se mantiene normal siempre y cuando no hayan sido sometidos aún a proceso de diálisis.²²

Por otra parte, se sabe que pacientes con síntomas nefróticos presentan bajos valores de zinc debido a su eliminación en la orina y a la disminución en las proteínas enlazadas a este.²³

El experimento realizado con sangre de dos pacientes no permite arribar a conclusiones definitivas desde el punto de vista clínico sobre el comportamiento de estos elementos en enfermos de insuficiencia renal, lo cual será objeto de un trabajo posterior.

CONCLUSIONES

Se recomienda el empleo del ácido nítrico concentrado para la disolución de la muestra de sangre liofilizada, por su sencillez, rapidez y menor posibilidad de contaminación.

Al estudiar el uso o no de un *buffer* espectral en la determinación instrumental se encontró que no es necesario su empleo para el análisis de Cu, Zn, Fe, Ca, Mg y K en la muestra de sangre en las condiciones de trabajo utilizadas.

Es posible emplear el método de la curva de calibración multielemental en agua para la determinación de los elementos estudiados al utilizar el procedimiento descrito para descomponer la muestra.

La reproducibilidad obtenida fue satisfactoria para todos los elementos, encontrándose valores de Sr < 10% .

BIBLIOGRAFIA

1. Negretti de Bratter V., Bratter P., Mohn L., Sitzer G., *Minerales y Oligoelementos*, Ed. Fundación Bertelsmann, Alemania, 1995.
2. Burguera. J.L., Burguera M. y Alarcon O. **Trace Elements in Medicine**, **3**, 117, 1986.
3. Sabory J. and Wills M.R. **Clinical Chemistry**, **38**, 1565, 1992.
4. Mertz. M.D. **Nutrition Reviews**, **51**, 287, 1993.
5. **Revista Zoom** (Janssen Pharmaceutica), **19**, 2, 1988.
6. Subramanian K.S. **The Science of the Total Environment**, **30**, 231, 1983.
7. Tulley R.T. and Lehmann H. P. **Clin. Chim. Acta**, **122**, 189, 1982.
8. Boumann P.W. *Inductively Coupled Plasma Emission Spec.*, Ed. Wiley, N.Y. 1987.
9. Winnefeld K., Dawczynski H., Bosseckert H. and Kauf E. **Trace Elements in Medicine**, **10**, 90, 1993.
10. Subramanian K.S. **Anal. Atomic Spectroscopy**, **3**, 11, 1988.
11. De Benzo Z., Fraile R. e Carrion N. **Analytica Chimica Acta**, **231**, 283, 1990.
12. Subramanian K. S. **Atomic Spectroscopy**, **8**, 1, 1987.
13. Nygren O. and Nilsson C. **Analyst**, **113**, 591, 1988.
14. Sunderman F.W. **Anan. Clin. Lab. Sci.**, **14**, 41, 1984.
15. Sperling. K. R. **Analytical Chemistry in Medicine and Biology**, **2**, 969, 1983.
16. Gorsuch T.T. **Analyst**, **84**, 135, 1959.
17. Albarado. J. **Analytical Letters**, **22**, 2975, 1989.
18. Subramanian K. S. **Anal. Chem.**, **327**, 544, 1987.
19. Kantor T. **Spectrochimica Acta**, **42B**, 543, 1987.
20. Ostle B. *Estadística Aplicada*, Ed. Científico Técnica, La Habana, 1977.
21. Comunicación personal de la Dra. Eva Barranco, especialista en Nefrología del Hospital "Hermanos Ameijeiras", La Habana.
22. Alfrey A.C. and Smythe W. R. *Trace metals and Regular Dialysis*, Cap. 37, 647-9, 1985.
23. Alfrey A.C. *The Kidney: Physiology and Pathophysiology*, Cap. 75., Ed. Seldin y Gúbish, N. Y. 1985.