

ANALISIS ESPECTROFOTOMETRICO DE CARBOXIHEMOGLOBINA EN SANGRE

Spectrophotometric analysis of blood carboxyhemoglobin

F. Valcarce
Inst. Nac. de Toxicología. Madrid, España.

RESUMEN

Se presenta en este trabajo un análisis de las incertidumbres que se producen en la medida de la concentración de carboxihemoglobina en muestras de sangre y las causas que las originan. Se describen un método y las precauciones necesarias para poder medir con precisión incluso los valores pequeños, del orden del 1% .

ABSTRACT

An analysis of uncertainties affecting the measurement of carboxyhemoglobin levels in blood samples, which arise from instrumental and methodological factors, is presented. A reliable method to precisely determine even low levels in the 1 % range is also described.

PALABRAS CLAVE : Carboxihemoglobina, espectrofotométrico, sangre.
KEY WORDS : Carboxyhemoglobin, spectrophotometric, blood.

INTRODUCCION

La medida de la concentración de carboxihemoglobina (COHb) en sangre es muy importante a la hora de valorar una posible intoxicación por monóxido de carbono. Esto ha sido apreciado así y se pone de manifiesto por la existencia de una amplia gama de métodos para la medida de dicho nivel, algunos de los cuales se revisan en la bibliografía (1,2).

Es mayoritariamente aceptado que los métodos espectrofotométricos son sencillos y tienen buena reproducibilidad por lo que han sido muy utilizados en la práctica de análisis de muestras de origen clínico y forense. Resumiendo algunos de los procedimientos más utilizados, podemos citar la utilización de solución tampón alcalina de NH₄OH al 0.4 % ó si

milar para diluir la muestra, desplazando así la curva de disociación de la hemoglobina (Hb), la utilización de hidrosulfito sódico para convertir la oxihemoglobina (O₂Hb) y la metahemoglobina (MetaHb) a Hb reducida (3) eliminando así la posible interferencia en presencia de MetaHb, la medida de la absorbancia a dos ó más longitudes de onda y obtención de las expresiones que relacionan dichas medidas con el nivel de COHb presente en la muestra, ó más recientemente la aparición de instrumentos dedicados exclusivamente a la medida de éste parámetro, junto con otros relacionados tales como nivel de O₂Hb, MetaHb y Hb total conocidos como CO-oxímetros (4,5) y que basan su funcionamiento en ajustes multipunto de medidas espectrofotométricas.

Se ha tomado conciencia, por parte de los médicos y analistas de que no sólo los niveles altos de carboxihemoglobina podrían afectar a la salud de las personas, sino que también niveles relativamente bajos que se pueden alcanzar con facilidad en algunas situaciones y circunstancias de la vida actual, como el hábito de fumar, residir en núcleos urbanos ó industriales altamente contaminados, etc., podrían comportar riesgos para la salud (6), más aún si se mantenían de forma continuada en el tiempo.

Como consecuencia de ello, se centró el esfuerzo en asegurar la exactitud y reproducibilidad de las medidas en este rango de valores bajos de COHb, utilizando métodos (7) que aseguraban ser precisos incluso para valores de COHb, respecto de la Hb total, menores del 1%, revisiones y mejoras de estos métodos (8,9) y desarrollándose otros nuevos como los ajustes multipunto y otros (10,11,12). En los valores pequeños de COHb menores del 5%, la reproducibilidad de las medidas es difícil y se hace necesario un análisis riguroso de los factores instrumentales y operativos que introducen incertidumbres en la medida. Este análisis, hasta donde el autor conoce, no se ha hecho y es el propósito de este trabajo hacer una aportación en este sentido.

ANALISIS DE INCERTIDUMBRES

Tomamos como punto de partida uno de los métodos que se consideran más perfeccionados (13) y que fué desarrollado con el propósito de ser capaz de medir con precisión pequeños valores de COHb en sangre. Este método utiliza una solución tampón alcalinizante para diluir la muestra, de la que sólo necesita - 3 µl, posterior adición de hidrosulfito sódico para convertir los niveles de O₂Hb y MetaHb presentes a Hb reducida y deriva una expresión para el nivel de COHb en función de las absorptividades molares de los dos pigmentos presentes en la muestra, COHb y Hb reducida, las cuales habrían de ser previamente determinadas para las dos longitudes de onda a las que se mide el valor de la absorbancia y que son 432 nm y 420 nm. (Fig.-1)

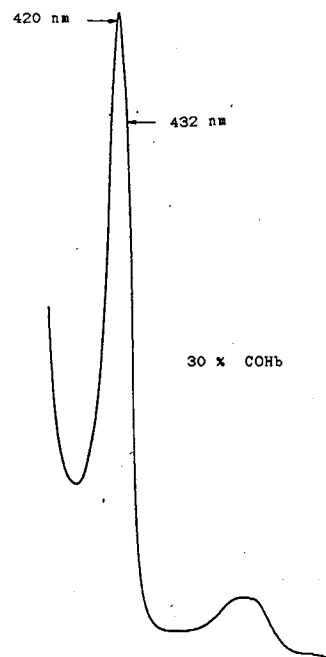


Fig.- 1

Las expresiones que se proponen en el citado método son:

$$A(420) = \left[x \cdot E_{420}^{\text{COHb}} + (1-x) \cdot E_{420}^{\text{Hb}} \right] \cdot l \cdot d$$

=>

$$A(432) = \left[x \cdot E_{432}^{\text{COHb}} + (1-x) \cdot E_{432}^{\text{Hb}} \right] \cdot l \cdot d$$

$$x = \frac{A(432) \cdot E_{420}^{\text{Hb}} - A(420) \cdot E_{432}^{\text{Hb}}}{A(420) \cdot \left[E_{432}^{\text{COHb}} - E_{432}^{\text{Hb}} \right] + A(432) \cdot \left[E_{420}^{\text{Hb}} - E_{420}^{\text{COHb}} \right]} \quad [1]$$

donde A es el valor de la absorbancia a la longitud de onda indicada, E la absorptividad molar del pigmento indicado a la longitud de onda correspondiente, l la trayectoria del haz en la cubeta, x la fracción molar de COHb y d la concentración de Hb en la muestra analizada.

En lugar de medir independientemente las absorptividades de la Hb y la COHb, se puede simplificar considerando que :

$$A(420)_0 = E_{420}^{Hb} \cdot l \cdot d \Rightarrow E_{420}^{Hb} = \frac{A(420)_0}{l \cdot d}$$

si $x = 0 \Rightarrow$

$$A(432)_0 = E_{432}^{Hb} \cdot l \cdot d \Rightarrow E_{432}^{Hb} = \frac{A(432)_0}{l \cdot d}$$

$$A(420)_1 = E_{420}^{COHb} \cdot l \cdot d \Rightarrow E_{420}^{COHb} = \frac{A(420)_1}{l \cdot d}$$

si $x = 1 \Rightarrow$

$$A(432)_1 = E_{432}^{COHb} \cdot l \cdot d \Rightarrow E_{432}^{COHb} = \frac{A(432)_1}{l \cdot d}$$

Donde $A(420)_0$ y $A(432)_0$ son los valores de la absorptividad a las longitudes de onda indicadas cuando la concentración de COHb es cero y se pueden obtener saturando de oxígeno la disolución de la muestra, y donde $A(420)_1$ y $A(432)_1$ son los valores de la absorptividad a las longitudes de onda indicadas cuando la concentración de COHb es uno (100%), que se pueden obtener saturando de monóxido de carbono la disolución de la muestra.

Sustituyendo en [1] y operando, dado que $l \cdot d \neq 0$, tenemos :

$$x = \frac{A(432)_0 \cdot A(420)_1 - A(420)_0 \cdot A(432)_1}{A(420)_0 \cdot [A(432)_1 - A(432)_0] + A(432)_1 \cdot [A(420)_1 - A(420)_0]}$$

ó bien, simplificando la notación, podemos poner : $x = \frac{a \cdot A_0 - b \cdot A_2}{A_0 + c \cdot A_2}$ [2] con

$$[3] \quad a = \frac{A(432)_0}{A(432)_1 - A(432)_0}, \quad b = \frac{A(420)_0}{A(432)_1 - A(432)_0}, \quad c = \frac{A(420)_1 - A(420)_0}{A(432)_1 - A(432)_0}$$

Donde A_0 y A_2 son ahora las absorbancias de la muestra a 420 nm y 432 nm respectivamente. Esta simplificación tiene la ventaja de que nos permite prescindir de la medida de absortividades propuesta en el método de referencia. Los valores de a , b y c que figuran en la expresión [2] pueden ser obtenidos para diferentes muestras y promediados por lo que pueden considerarse como constantes.

La incertidumbre en la medida de x a partir de la expresión [2], resultará fundamentalmente como consecuencia de las incertidumbres en los valores medidos de A_0 y A_2 y tendremos:

$$\Delta x = \left| \frac{\partial x}{\partial A_0} \right| \cdot \Delta A_0 + \left| \frac{\partial x}{\partial A_2} \right| \cdot \Delta A_2$$

operando en [2] y sustituyendo, llegamos a:

$$\Delta x = \left| \frac{a - x}{A_0 + c \cdot A_2} \right| \cdot \Delta A_0 + \left| \frac{b + c \cdot x}{A_0 + c \cdot A_2} \right| \cdot \Delta A_2$$

donde ΔA_0 y ΔA_2 son las incertidumbres en el valor de la absorbancia a cada una de las dos longitudes de onda en que se mide.

Si hacemos una breve consideración sobre dichas incertidumbres, llámándolas genéricamente ΔA , veremos que ΔA proviene principalmente de dos causas independien-

tes: $\Delta A = \left[(\Delta A_F)^2 + (\Delta A_\lambda)^2 \right]^{1/2}$

donde ΔA_F es la incertidumbre fotométrica que viene especificada por el fabricante del instru-

mento de medida y que depende, entre otros factores, del valor de la absorbancia, aumentando

casi linealmente con ella y ΔA_λ es la incertidumbre en el valor medido de la absorbancia de-

vida a la incertidumbre $\Delta \lambda$ en la medida ó selección de una longitud de onda concreta que es

otro parámetro facilitado por los fabricantes de espectrofotómetros y-

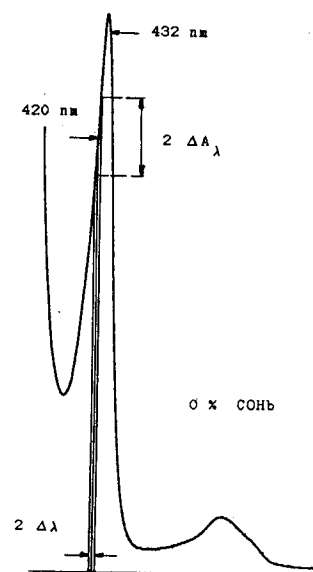


Fig.- 2

será de la forma ; $\Delta A_\lambda = |m \cdot \Delta \lambda|$, siendo m la pendiente de la curva en la que se mide A a la longitud de onda especificada (Fig.- 2).

Si consideramos en un primer momento que $\Delta A \approx \Delta A_0 \approx \Delta A_2$, lo cual es válido en la mayoría de las situaciones, tendremos para la expresión de la incertidumbre en el valor de x :

$$(a, b, c, x \geq 0) , \quad \Delta x = \frac{a + b + (c - 1) \cdot x}{A_0 + c \cdot A_2} \cdot \Delta A \quad [4]$$

Aquí vemos que la incertidumbre en el valor hallado crece con la incertidumbre en la medida de A , y decrece con los valores de absorbancia medidos. El valor de c es, como veremos, próximo a 1 por lo que la incertidumbre de x debida a factores instrumentales es esencialmente independiente del valor de x para valores de ΔA similares. Para minimizar la incertidumbre, deberíamos por tanto hacer que A_0 y A_2 fueran máximas pero manteniendo ΔA mínima lo cual es contradictorio puesto que, como sabemos, ΔA crece con los valores de A , por lo que habrá que buscar un compromiso. Este compromiso hay que buscarlo a la vista de las especificaciones del espectrofotómetro concreto que vayamos a utilizar en las medidas, pero de una forma general se puede decir que conviene elegir concentraciones de la muestra que lleven a lecturas de absorbancia altas pero que permitan mantener una reproducibilidad fotométrica buena junto con la linealidad en los valores de A .

Típicamente, para valores de A ligeramente mayores que 1 y para un espectrofotómetro de altas prestaciones con reproducibilidades en longitud de onda $\Delta \lambda = \pm 0.05$ nm y en absorbancia $\Delta A = \pm 0.0005$ @ $A = 1$ tendremos $\Delta x \approx 0.0014$ ó un 0.14 % , lo que nos garantiza poder medir valores del orden del 1 % con suficiente precisión. Si el espectrofotómetro es de bajas prestaciones y entre sus especificaciones incluye p.ej. $\Delta \lambda = \pm 0.5$ nm y $\Delta A = \pm 0.002$ @ $A = 1$, la incertidumbre que obtendremos ahora es $\Delta x \approx 0.014$ ó bien un 1.4 % lo que no nos permitiría medir con precisión valores de COHb en el rango considerado.

Desde el punto de vista del método existen otros factores que introducen incertidumbre en la medida, tales como el disolvente utilizado, la homogeneización de la muestra y de la disolución, la estabilidad en el proceso de reducción con el hidrosulfito, etc. En el método que hemos elegido como punto de partida se describen una serie de precauciones y tiempos de espera que hay que respetar para obtener estabilidad en las lecturas de absorbancia, ya que se producen ciertos problemas en la reducción con hidrosulfito sódico. Hemos observado que dicha inestabilidad en las medidas está relacionada con la dificultad con que se produce la liberación del oxígeno por la O₂Hb en una disolución en la que el PH alcalino del disolvente produce que a bajas presiones de O₂ la hemoglobina esté saturada de oxígeno y se ha comprobado que utilizando agua destilada como disolvente éste fenómeno no se produce y la reducción es casi instantánea al añadir el hidrosulfito a la disolución.

Hacer esto tiene la ventaja de una mayor estabilidad en las lecturas de absorbancia, utilizar un disolvente más sencillo y poder usar sólo la cantidad de hidrosulfito necesaria sin tener que preparar previamente disoluciones tampón con éste compuesto, pero tiene como contrapartida el inconveniente de que también el monóxido de carbono se libera más fácilmente lo que obliga a realizar las medidas en un periodo de tiempo - lo más corto posible desde la puesta en disolución de la muestra ya que a partir de ese momento el nivel comienza a descender, lo cual resulta evidente en el caso de niveles iniciales altos (Fig.-3).

Cuando el nivel inicial de COHb es bajo, éste podrá bajar ó subir lentamente - hasta alcanzar el equilibrio con la atmósfera circundante, ó aumentar al deteriorarse la hemoglobina.

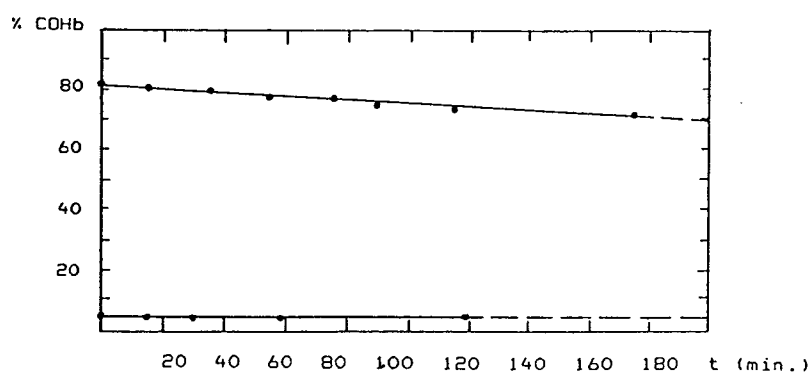


Fig.- 3

Otra fuente potencial de incertidumbre en la medida es el efecto de la radiación dispersada en la cubeta por partículas ó inhomogeneidades en la disolución , cuya dependencia cuadrática con la longitud de onda podría producir resultados erróneos afectados por dicha dispersión. Sin embargo, la consideramos despreciable en la mayoría de las situaciones dada la proximidad de las longitudes de onda a las que se mide A y que las disoluciones, después de añadir el hidrosulfito, resultan bastante claras y con poca dispersión de la radiación.

También hemos explorado la influencia de una mayor ó menor dilución de la muestra sobre el valor de COHb obtenido y en este aspecto no hemos encontrado diferencias significativas entre los valores obtenidos con diluciones del 1 % y del 0.1 % utilizando cubetas de 1 mm. y 1 cm. de paso de luz respectivamente.

Por último hemos introducido otra pequeña variación en el método de partida, en particular en lo que se refiere a una de las longitudes de onda a las que se efectúa la lectura ya que los 420 nm. están muy próximos a los 419.3 nm en que se produce el máximo de absorbancia en las muestras con valores altos de COHb (Fig.-4) y esto podría producir una dependencia excesiva, en la curva de calibrado, del ancho de banda espectral del instrumento concreto utilizado en la medida. En su lugar tomamos la lectura de absorbancia A_0 a una longitud de onda de 416 nm. que está suficientemente alejada de 419.3 nm. como para asegurar que para los anchos de banda espectral usuales la lectura de absorbancia no se verá afectada por la proximidad al máximo.

Con estas nuevas condiciones , obtenemos para los parámetros de la expresión [2], los valores:
 $a = 1.63$, $b = 1.11$, $c = 0.9$ para el caso de sangre humana.

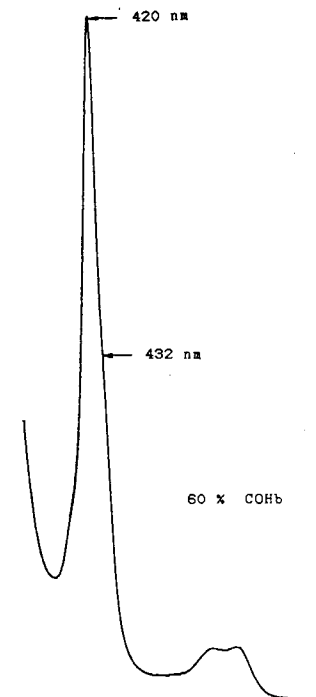


Fig.- 4

METODO EXPERIMENTAL

Reactivos : Agua destilada, Hidrosulfito sódico (87 % Merck), gases Oxígeno y Monóxido de carbono (S.E.O.).

Instrumento de medida : Espectrofotómetro UV - VIS modelo 550 SE de Perkin-Elmer, con $\Delta A = \pm 0.002 @ A=1$ y $\Delta \lambda = \pm 0.2$ nm. lineal en A hasta al menos $A = 2$ y ancho de banda espectral de 2 nm.

Método : Se homogeiniza perfectamente la muestra sin airearla ni producir burbujas y se prepara en matraz Erlenmeyer una disolución aproximadamente del 0.1 % de la muestra de sangre en agua destilada, se homogeiniza y se transfieren 3 ml. de esta disolución a una cubeta para UV-VIS de 1 cm. de paso de luz a la que se adicionan 15 mg. del hidrosulfito sódico, se homogeiniza agitando sin producir burbujas y se miden los valores de absorbancia en el espectrofotómetro a las dos longitudes de onda especificadas de 432 nm. y 416 nm., manteniendo el haz de referencia libre y anotando las lecturas como A_2 y A_0 respectivamente. Estos valores se llevan a la expresión [2] y nos proporciona el valor de la concentración de COHb en la muestra analizada.

Los valores de las constantes a, b y c que figuran en [2], se han obtenido de la siguiente forma ; una muestra con pequeña concentración de COHb se insufla, una vez puesta en disolución, con gas oxígeno puro durante periodos de 3 minutos tomando alícuotas de 3 ml., adicionando hidrosulfito y leyendo los valores de absorbancia entre periodos, hasta que no se producen variaciones significativas en los valores leídos, momento en que los últimos valores obtenidos se asignan a $A(432)_0$ y a $A(416)_0$. Después sobre la misma disolución anterior, se insufla gas monóxido de carbono puro durante periodos de 3 min. tomando alícuotas de 3 ml., adicionando hidrosulfito sódico y leyendo los valores de absorbancia entre periodos hasta que no se produzcan nuevas variaciones en -

los valores leídos , momento en que éstos últimos valores se asignan a $A(432)$ y $A(416)$ (Fig.-5). Estos valores, se llevan a las expresiones [3] que relacionan estas lecturas con las constantes, teniendo en cuenta que donde allí pone $A(420)$ es ahora $A(416)$ y obtenemos los valores : $a = 1.63$, $b = 1.11$, $c = 0.9$ ya mencionados. Esto se hizo para diferentes muestras y se promediaron los valores que se reproducen de una a otra presentando sólo pequeñas variaciones. El número de veces que es necesario insuflar con gases depende de la muestra, la efectividad con que se insufla, etc.- pero suele ser suficiente con 3 ó 4 veces, procurando no producir burbujas, para que el resultado sea seguro.

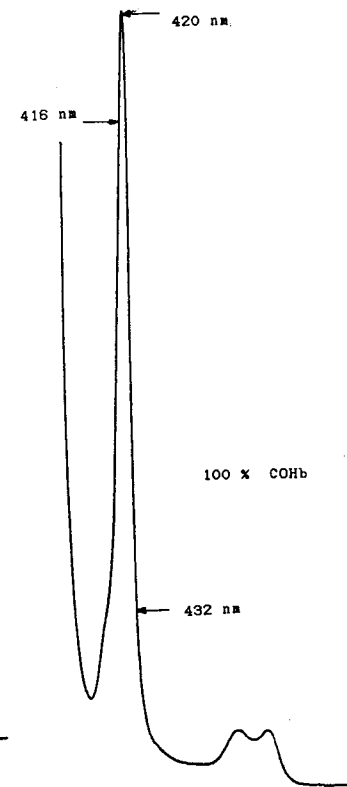


Fig.- 5

ANALISIS DE RESULTADOS

Para evaluar el funcionamiento del método , se efectuaron análisis múltiples de muestras con diferentes niveles de COHb obteniendo los valores medios y desviaciones típicas de los resultados obtenidos. Se tomaron las muestras de forma independiente y en días distintos para tener en cuenta los diferentes factores que pueden introducir error. En la tabla se presentan los resultados obtenidos y en ella vemos como pa

% COHb (v.medio)	N	σ (d.típica)	K% (c.variación)
0.4	10	0.2	50
3.2	9	0.2	6
48.5	10	0.6	1.2
80.1	8	1.5	1.8

ra niveles pequeños de COHb se mantienen también pequeñas las desviaciones típicas, como corresponde a valores pequeños de ΔA y Δx , ob

teniéndose coeficientes de variación iguales ó menores que el 10 % para concentraciones de COHb de 3 % y coeficientes de variación de menos del 50 % para valores de COHb de 1 % , como era nuestro objetivo.

Vemos además que a medida que aumentan los valores de concentración de COHb también lo hacen las desviaciones típicas, poniéndose de manifiesto que aumenta ΔA al hacerlo la pendiente de la curva, y también que las incertidumbres introducidas por los factores debidos al método anteriormente mencionados, cobran mayor importancia para las mayores concentraciones, a pesar de lo cual y precisamente por ser éstas altas vemos que los coeficientes de variación se mantienen pequeños y no superan el 2 % .

CONCLUSIONES

A la vista de estos resultados, podemos sacar varias consecuencias:

- 1.- Los factores instrumentales son los que limitan la precisión en la medida de pequeños valores de la concentración de COHb.
- 2.- En los niveles de COHb altos los factores que limitan la precisión de la medida son, además de los instrumentales, los debidos al método, tales como homogeneización de la muestra y la disolución.
- 3.- Es posible medir niveles de COHb del 1 % con buena precisión, pero los valores menores de 1% se verán afectados de un alto grado de incertidumbre cuando se determinen en una sola medida, incluso en las condiciones experimentales más favorables.

AGRADECIMIENTOS

El autor agradece a los profesores del Inst. Nal. de Toxicología : Manuel Sancho, M. Angeles Rams y Josefina Gómez las sugerencias y el interés demostrado en el curso de este trabajo, sin los cuales éste no habría sido completado.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- D.C. Wigfield et al. J. An. Toxicology, vol.5 , 1981.
- 2.- T.J. Siek en "Advances in analytical toxicology" vol. II, Ed. R.C.Baselt, 1989.
- 3.- N.C. Klendshoj et al. J.Biol.Chem.,vol.183,pp 297-303, 1950
- 4.- H. Maeda et al. For.Sci.Internat.,vol.87,pp 201-210, 1997
- 5.- P.G. Langston et al. J.Anal.Toxicology,vol.17,pp 278-283, 1993
- 6.- H.S. Stoker,S.L. Seager en "Química ambiental", pp 35, Ed. Blume, 1981.
- 7.- B.T. Commins,P.J. Lawther, Brit.J.Industr.Med.,vol.22, pp 139-143, 1965
- 8.- R.E.C. Lily et al., Brit.J.Industr.Med.,vol.29,pp 454-457, 1972
- 9.- H. Muroya,T. Kubota, Bull.Tokyo Med.Dent.Univ.,vol.21, pp 67-77, 1974.
- 10.- J.H. Sanderson et al. Brit.J.Industr.Med,vol.35,pp 67-72, 1978
- 11.- T.J. Siek,F. Rieders, J.of Foren.Sci.,vol.29,nº1 pp 39-54, 1984
- 12.- L.K. Pannell et al., J.of An.Toxicology,vol.5, 1981.
- 13.- F.L. Rodkey et al., Clin.Chem.,vol.25,nº8, 1979.