

**PREPARACION DE LOS REACTIVOS
PARA LA DETERMINACION DE AMONIO PLASMATICO
USANDO UNA RESINA DE INTERCAMBIO IONICO***

*Julio G. Mora C.** Hannia Mora Z.**, Oscar Cordero A.**, Rodrigo Vargas A.***

Key Word Index: Plasmatic amonium, Berthelot reaction, preparation of chemical reagents.

Resumen

Se prepararon los reactivos para la determinación de amonio plasmático. La resina empleada es una resina catiónica fuertemente ácida (amberlita 252 de la casa Rohm and Haas) y como reacción de color se empleó la reacción de Berthelot.

Se correlacionaron los valores obtenidos con los reactivos preparados en nuestro laboratorio y los de una casa comercial obteniéndose una correlación de 0,93, con una recuperación de 97, 104, 76 por ciento para valores bajos, intermedios y altos respectivamente y cumpliéndose la ley de Beer y Lambert en nuestras condiciones de trabajo hasta 400 microgramas por cien mililitros. [Rev. Cost. Cienc. Méd. 1983; 4(Sup. 1): 9 -16].

Introducción

La mayoría de los métodos usados en la determinación de amonio plasmático se realizan mediante el siguiente procedimiento:

- a) Separación del amonio de otros constituyentes plasmáticos.
- b) Cuantificación del amonio separado previamente (7).

El procedimiento para la separación del amonio del plasma había sido controvertido, hasta la aparición de las resinas de intercambio iónico, ya que el uso de estas no requiere que el plasma sea alcalinizado, evitándose así, en parte, el incremento de amonio por desaminación de las proteínas (1, 5).

Para la cuantificación del amonio se han usado métodos tales como la reacción de Nessler (9), la reacción de la ninhidrina (8), microtitulación (4), y la reacción de Berthelot (3, 7).

Se escogió la reacción de Berthelot porque presenta las siguientes ventajas:

- a) buena reproducibilidad y sensibilidad; y
- b) la formación de un complejo coloreado final estable (3, 7).

Conscientes de la crisis económica por la que atraviesa Costa Rica actualmente, y contando a la vez con los medios adecuados para la fabricación de los reactivos necesarios para la determinación de amonio plasmático a un costo mucho menor y con la misma calidad técnica que los importados, nos dimos a la tarea de producirlos en nuestro laboratorio, mediante el procedimiento que describiremos.

* Presentado en el IV Congreso de Microbiología, Parasitología y Patología Clínica, San José, Costa Rica, 28 Nov.— 1^o Dic. 1982.

** Laboratorio Clínico Dr. Clodomiro Picado T., Hospital San Juan de Dios, CCSS.

Material y Métodos

En la preparación de todos los reactivos es indispensable el uso de agua libre de amonio.

- a) Preparación de la resina de intercambio iónico (7).
1. Tomar un volumen de la resina comercial Amberlita 252 (Rohm and Haas Comp. Philadelphia) y agregar dos volúmenes de cloruro de sodio al 9 por ciento. Agitar fuertemente durante cinco minutos. Dejar sedimentar la resina dos minutos.
 2. Decantar el sobrenadante.
 3. Agregar a la resina dos volúmenes de agua libre de amonio y agitar fuertemente durante dos minutos. Decantar el sobrenadante y repetir este paso tres veces.
 4. Luego de decantar el sobrenadante se agregan dos volúmenes de un amortiguador de fosfatos 0,2 M, pH 7,4, agitar fuertemente y decantar el sobrenadante. Repetir este paso hasta que el pH del sobrenadante sea 7,4. Guardar la resina en la solución amortiguadora a 4°C.
- Esta resina es reusable y para regenerarla debe aplicarse el procedimiento anteriormente descrito.
- b) El reactivo de álcali-hipoclorito usado en la reacción se prepara agregando 0,21 g de hipoclorito de sodio, 2,5 g de hidróxido de sodio y agua c.s.p. 100 ml. En caso de no contar con hipoclorito de sodio puro, se puede usar 5,0 ml de un blanqueador comercial que contenga hipoclorito de sodio al cinco por ciento (p/v). Esta solución es estable dos meses en botella ámbar a 4°C (6).
- c) El reactivo del fenol se prepara agregando 50 g de fenol grado analítico y 0,25 g de nitroprusiato sódico y agua c.s.p. un litro. Esta solución es estable dos meses en botella ámbar a 4°C (6).
- d) Patrón de amonio de 15 mg/100 ml (solución de reserva). Disolver 70,7 mg de sulfato de amonio en agua en c.s.p. 100 ml.
- e) Patrón de amonio de 150 microgramos/ 100 ml: tomar 0,1 ml del patrón de amonio de 15 mg/100 ml, agregar 0,3 ml de cloruro de sodio 4N y aforar con agua hasta 10 ml.
- f) Muestra: la sangre se obtiene usando heparina como anticoagulante. Debe ser transportada al laboratorio en un baño con hielo y analizada en los 30 minutos siguientes a la obtención de la muestra.
- g) Procedimiento para determinar amonio en plasma (2):
1. En tres tubos cónicos de 15 ml rotulados como:
 - i. Muestra: 1 ml de plasma y 2 ml de agua.
 - ii. Patrón: 1 ml de patrón de 150 mcg/100 ml de amonio y 2 ml de agua.
 - iii. Blanco: 3 ml de agua.
 2. Con una pipeta de 5 ml con la punta quebrada agregar a todos los tubos 0,2 ml de resina (4 gotas), taparlos con papel parafinado y ponerlos en un agitador horizontal durante cinco minutos.

3. Decantar el plasma sobrenadante con el cuidado de no eliminar la resina. Lavar la resina tres veces con 10 ml de agua libre de amonio.
 4. Agregar a cada tubo 1,0 ml de cloruro de sodio 4N y 1,0 ml de reactivo de fenol. Agitar y dejar en reposo durante tres minutos.
 5. Agregar 1,0 ml del reactivo álcali-hipoclorito.
 6. Poner en baño a 37°C durante 15 minutos.
 7. Sacar del baño y agregar 3,0 ml de agua.
 8. Decantar el sobrenadante en una cubeta de 18 x 150 mm y leer contra blanco a 630 nm.
- La absorbancia del blanco de reactivos leído contra agua no debe exceder de 0,14 de absorbancia. En caso de que exceda esta absorbancia deben revisarse todos los reactivos.

h) Curva de calibración:

Para establecer la curva de calibración recomendamos determinar los siguientes puntos 75, 150, 300 y 400 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$.

La concentración de amonio de la muestra se calcula a partir de la siguiente expresión siempre y cuando cumpla con la ley de Beer y Lambert.

$$\text{Amonio } (\mu\text{g}/100\text{ ml}) = \frac{\text{Absorbancia de la muestra}}{\text{Absorbancia del patrón}} \times \text{Concentración del patrón.}$$

Puede también obtenerse a partir de la curva de calibración.

Resultados y Discusión

El espectro de absorción del producto de reacción final leído contra agua muestra una zona de mayor absorbancia entre 620 y 640 nanómetros con un pico de máxima absorbancia en 630 nanómetros (Fig. 1).

El color de la reacción final se estabilizó a partir de los diez minutos de incubación a 37°C y este color final mantiene una estabilidad durante 18 horas (Fig. 2).

La ley de Beer y Lambert se cumple en las condiciones de trabajo de nuestro laboratorio hasta un máximo de 400 $\mu\text{g}/\text{dl}$, y a partir de esta concentración debe diluirse la muestra (Fig. 3).

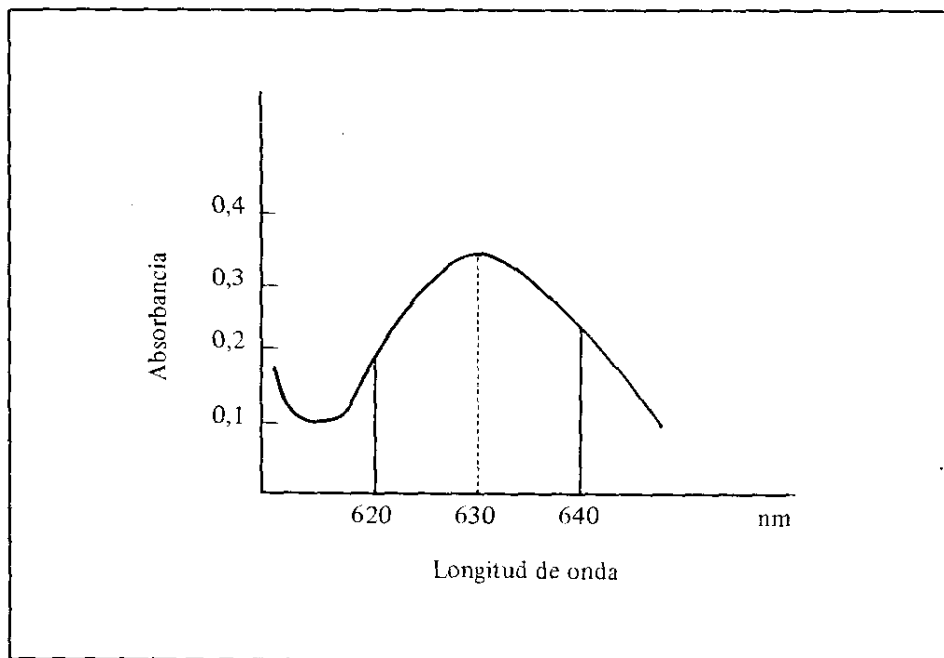
Los resultados de la prueba de recuperación indican que el método tiene una exactitud de 97, 104 y 76 por ciento para los valores bajos, medios y altos respectivamente (Cuadro 1).

La prueba de correlación realizada comprendió el análisis de 32 muestras de plasma obtenidos de pacientes internados en el Hospital San Juan de Dios, comparación realizada con reactivos de la casa Hyland (2) y los preparados por nosotros obteniéndose una correlación de 0.93 (Fig. 4).

Este estudio realizado en la preparación de los reactivos usados en la determinación de amonio plasmático nos indica que es un procedimiento adaptable a cualquier laboratorio del país por lo sencillo de su procedimiento, además de su bajo costo. La resina de intercambio iónico es regenerable y reusable por lo menos 15 veces, poniéndose en juego con este procedimiento los mecanismos de ahorro y reutilización de reactivos emprendidos en la institución.

La correlación obtenida entre los reactivos comerciales y los preparados en nuestro laboratorio demuestran su exactitud y sensibilidad, razones que nos permiten recomendar su preparación.

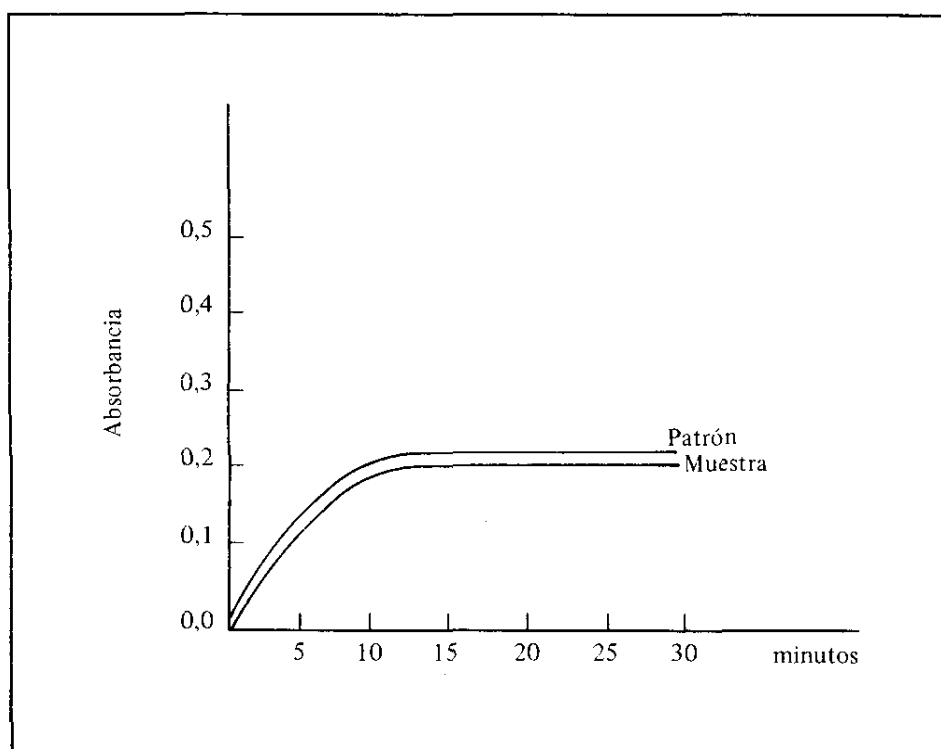
FIGURA 1
ESPECTRO DE ABSORCION EN LA DETERMINACION DE
AMONIO PLASMATICO



Agradecimiento

Al Lic. Carlos Monge M., por su colaboración y su asesoría técnica.

FIGURA 2
CURVA DE DESARROLLO DE COLOR CONTRA TIEMPO EN LA DETERMINACION DE AMONIO PLASMATICO



ABSTRACT

We describe the methodology employed to prepare the necessary chemical reagents for the laboratory determination of plasmatic ammonium. We used a strongly acid cationic resin (Amberlite 252, Rohm and Haas), and the Berthelot reaction for color development.

A comparisson was established between results obtained with commercial reagents and those prepared in this laboratory. A correlation of 0,93 was established with recuperation values of 97, 104 and 76 percent for low, middle and high concentrations. Beer Lambert's Law was constant up to 400 micrograms per hundred milliliters.

CUADRO 1
PRUEBA DE RECUPERACION EN LA DETERMINACION DE
AMONIO PLASMATICO ($\mu\text{g/dl}$)

Muestra	Valor esperado	Valor observado	Recuperación
Suero		72	
Suero + 75 $\mu\text{g/dl}$	147	143	97%
Suero + 150 $\mu\text{g/dl}$	222	232	104%
Suero + 300 $\mu\text{g/dl}$	372	282	76%

Promedio de valores obtenidos por triplicado.

FIGURA 3
GRAFICO DE LINEALIDAD EN LA DETERMINACION DE
AMONIO PLASMATICO

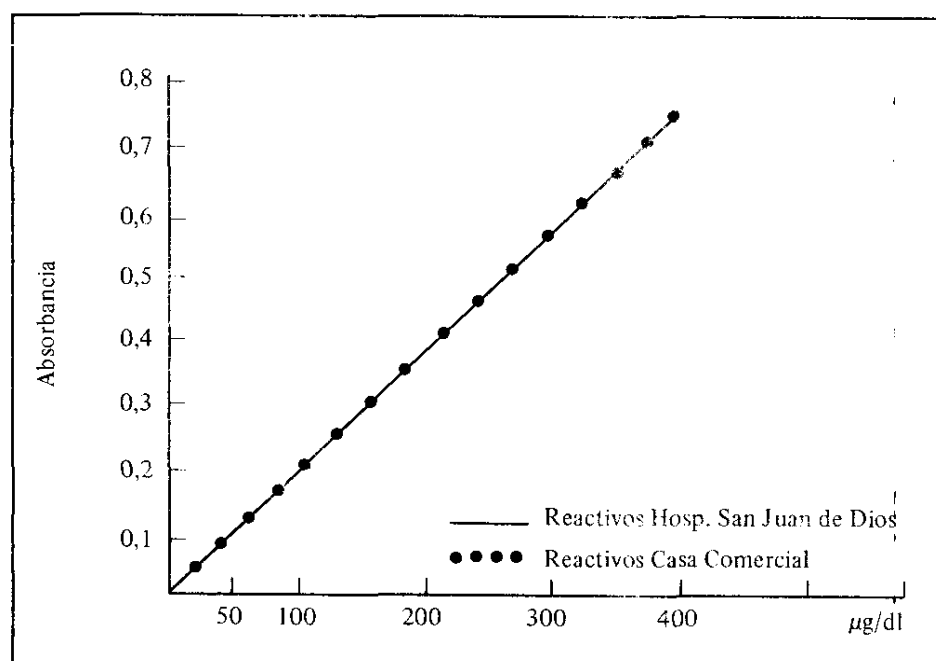
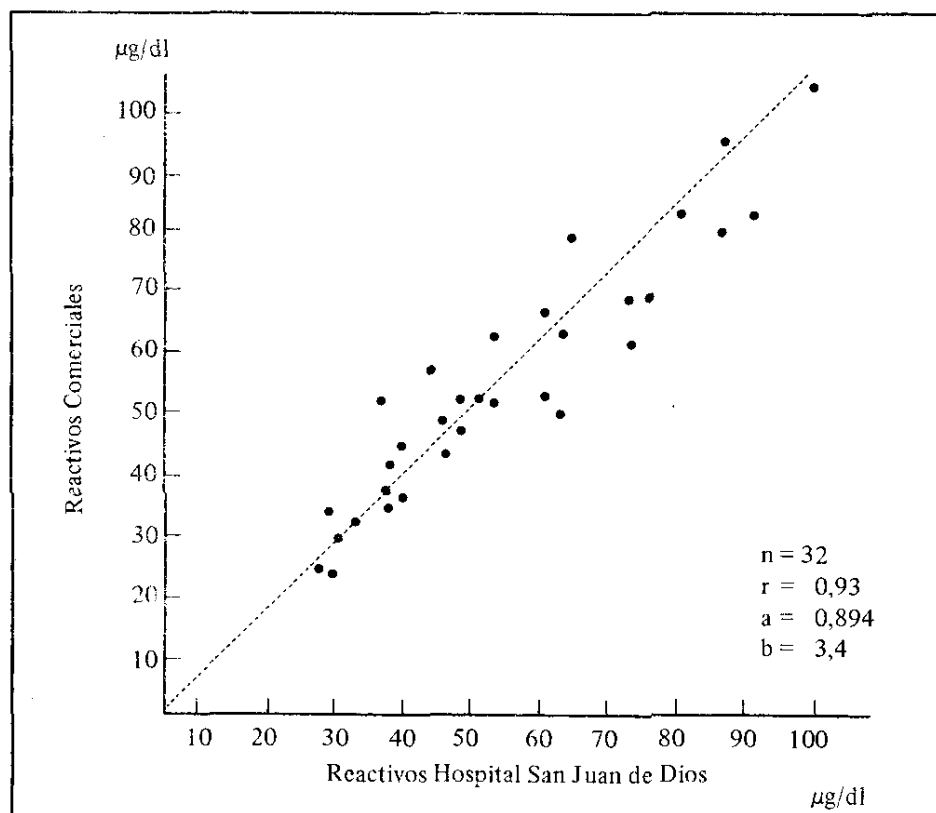


FIGURA 4
DIAGRAMA DE CORRELACION DE DETERMINACIONES DE AMONIO USANDO REACTIVO COMERCIAL Y EL PREPARADO EN EL HOSPITAL SAN JUAN DE DIOS



Bibliografía

1. Acland, J. D., Strong, R. Comparison between a microdifusion and an ion exchange method for the determination of plasma ammonium. *J. Clin. Pathol.* 1968; 21:12—15.
2. Blood ammonia test. A colorimetric method for the quantitative determination of ammonia nitrogen plasma. Monografía técnico-científica. Hyland. Div. Travenol Laboratories Inc. Costa Mesa, Calif. U.S.A. 1977: 3.
3. Chaney, A. L., Marbach, E. P. Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clin. Chem.* 1962; 8:130 -138.
4. Conway, E. J., Cooke, R. Blood ammonia, *Biochem. J.* 1939; 33: 457—478.
5. Dienst, S. G. An ion exchange method for plasma ammonia concentration. *J. Lab. Clin. Med.* 1961; 58:149-- 154.

6. Henry, R. J., Cannon, J., Winkelman, A. M., eds. *Química Clínica. Bases y Principios*. Harper and Row, publishers Inc. Maryland, U.S.A. Primera edición en español, 1974: 322—323.
7. Miller, G. E., Rice, J. D. Determination of the concentration of ammonia nitrogen in plasma by means of a simple ion exchange method. *Amer. J. Clin. Pathol.* 1963; 39:97—103.
8. Nathan, D. G., Rodkey, F. L. A colorimetric procedure for the determination of blood ammonia. *J. Lab. Clin. Med.* 1957; 49:779-785.
9. Seligson, D., Seligson, H. A microdiffusion method for the determination of blood nitrogen liberated as ammonia. *J. Lab. Clin. Med.* 1951; 38:324—330.