

EVALUACIÓN DEL ANÁLISIS DE CALCIO SÉRICO CON O-CRESOLFTEÍNA COMPLEXONA

Karl Schosinsky*, Marianela Vargas*, Miguel Chavarría*

Key Words Index: Calcium, serum, o-cresolphthalein

RESUMEN

Se modificó y evaluó un método para la determinación de calcio sérico con o-cresolfteína complexona. Las lecturas de absorbancia del complejo calcio-o-cresolfteína disminuyen al aumentar la temperatura, el calentamiento del espectro fotómetro produce variaciones que se corrigen analizando un patrón entre cada seis muestras. El uso de un blanco interno obvia el problema de contaminación por calcio en la cristalería y el de un blanco de muestra corrige errores por turbiedad y pigmentos. El método presenta linealidad hasta 20 mg/dl de calcio. La recuperación promedio obtenida fue de 100,4 por ciento con un intervalo de 99,2 a 103,0 por ciento. El hierro, el magnesio, el fosfato, la bilirrubina y la hemoglobina no producen interferencia. Las precisiones para muestras con valores de calcio bajos, normales y altos mostraron coeficientes de variación de 1,7; 1,0 y 1,5 por ciento en un mismo día y de 1,6; 2,7 y 2,2 por ciento día a día respectivamente. Con una población de 101 adultos sin patología aparente se obtuvo un intervalo de referencia de 8,2-9,7 mg/dl. El método propuesto correlaciona adecuadamente con el de absorción atómica.

Descriptores: Calcio, suero, o-cresolfteína. [Rev. Cost. Cienc. Méd. 1986; 7(3):243-250.

INTRODUCCIÓN

El análisis del calcio sérico representa un problema en muchos laboratorios, en parte debido a que las concentraciones normales de esta sustancia fluctúan en un intervalo muy estrecho, por lo que una pequeña variación en la concentración tiene significado clínico; por lo tanto es necesario utilizar métodos de alta precisión, exactitud y sensibilidad para su análisis. Por otra parte, el calcio es un contaminante frecuente y abundante, lo cual constituye una fuente de error importante (1,11).

Los procedimientos basados en absorción atómica muestran precisión y exactitud satisfactorias, por lo que son considerados métodos de referencia (2). Sin embargo, estos no son accesibles para la mayoría de los laboratorios, ya que la adquisición y el mantenimiento del equipo son costosos. Anteriormente el método más utilizado fue el de Clark y Collip (3), basado en la precipitación del calcio como oxalato y titulación posterior del oxalato en medio ácido con permanganato de potasio. Este método consume mucho tiempo y no presenta el desempeño analítico deseado. Actualmente los métodos complexométricos que utilizan o-cresolfteína complexona (1), azul de metil-timol (6) y calceína (7) constituyen una mejor alternativa. Se ha reportado que varios métodos que emplean o-cresolfteína complexona presentan muy buena correlación con métodos de referencia basados en absorción atómica (1,5,8). Sin embargo, al tratar de introducir el método de la o-cresolfteína complexona en nuestro laboratorio, encontramos dificultades para obtener un desempeño analítico satisfactorio. Por lo tanto procedimos a evaluar y modificar los sistemas que utilizan o-cresolfteína complexona, para producir un método con precisión y exactitud adecuadas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Equipo:

Las lecturas espectrofotométricas se realizan en un espectrofotómetro Beckman modelo 34 (Beckman Instruments, Fullerton, CA 92634).

Lavado de la cristalería:

Parte de la cristalería utilizada fue lavada con una solución de ácido nítrico al 25 por ciento (V/V) y escrupulosamente enjuagada con agua destilada. También se usó cristalería sin lavado especial para demostrar que el uso de un blanco interno corrige errores por contaminación de la cristalería.

Muestras de suero:

Para evaluar el desempeño analítico del método se recogió muestras de suero sin ictericia, lipe-

* Departamento de Análisis Clínicos, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica.

mia o hemólisis visibles de pacientes hospitalizados. Para obtener el intervalo de referencia se analizó las muestras de suero de 101 adultos ambulatorios sin patología aparente.

Reactivos para el método de la o-cresolftaleína complexona:

1. Solución de o-cresolftaleína complexona (0,2887 mmol/l). En un frasco volumétrico de 100 ml se agrega 0,01 g de o-cresolftaleína complexona (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO 63178), 0,2 g de 8-hidroxiquinolina (Sigma Chemical Company) y aproximadamente 50 ml de HCl 0,025 mol/l (2,1 ml de HCl concentrado en un litro de agua desionizada). Se calienta en baño de agua a ebullición y se agita esporádicamente hasta la disolución completa de los reactivos. Se deja enfriar y se afora con HCl 0,025 mol/l. Este reactivo es estable en botella de polietileno o poliestireno a temperatura ambiente aún seis meses después de su preparación.
2. **Solución amortiguadora de 2-amino-2-metil-1 propanol:** (AMP), pH10,2 (0,5609 mol/l). Se disuelve 5g de hidrocloreto de 2-amino-2-metil-1 -propanol (Sigma Chemical Company) en 30 ml de KOH 1 mol/l (5,6 g de KOH en 100 ml de agua desionizada). Se ajusta el pH a 10,2 con KOH 1 mol/l. Se transfiere cuantitativamente a un frasco volumétrico de 100 ml y se afora con agua desionizada. Este reactivo es estable en botella de polietileno o poliestireno a temperatura ambiente aún seis meses después de su preparación.
3. **Reactivo de color:** Se mezcla volúmenes iguales de solución de o-cresolftaleína complexona y solución de AMP. Este reactivo es estable a temperatura ambiente por aproximadamente ocho horas.
4. **Solución de EDTA disódico** (13,4 mmol/l): Se disuelve 0,5 g de EDTA disódico en 100 ml de agua desionizada.
5. **Solución patrón de reserva de calcio** (100 mg/dl): Se disuelve 2,4970 g de Ca CO₃ (previamente desecado a 200°C por 4 horas) con 5 ml de HCl concentrado en un frasco volumétrico de 1 litro. Se agrega aproximadamente 750 ml de agua desionizada, se ajusta el pH a 7,0±0,5 con KOH 0,1 mol/l y se afora con agua desionizada. Este reactivo se mantiene estable a temperatura ambiente por varios años, siempre y cuando se evite su contaminación con el sello de la tapa de la botella, pipetas, etc.

6. **Solución patrón de trabajo de calcio** (10 mg/dl). En un frasco volumétrico de 100 ml se deposita 10 ml de solución patrón de reserva de calcio y se afora con agua desionizada. Al igual que la solución patrón de reserva, este reactivo es muy estable.

Procedimiento:

1. Se enjuaga una cubeta con reactivo de color se utiliza para todas las determinaciones.
2. Se deposita 2,5 ml de reactivo de color en la cubeta y se lee la absorbancia del blanco interno de reactivos de la muestra (A₁) contra agua a 575 nm.
3. Se agrega 50 ml de muestra, se mezcla por inversión utilizando papel "parafilm" y se lee la absorbancia a los 30 segundos a 575 nm contra blanco de agua (A₂).
4. Se vierte el contenido de la cubeta en un tubo de ensayo conteniendo 2 gotas (0,05 ml) de EDTA disódico (13,4 mmol/l), se mezcla.
5. Se repite los pasos (2), (3) y (4) utilizando solución patrón de trabajo de calcio. Es recomendable incluir un patrón cada seis determinaciones de acuerdo con el siguiente sistema: muestra, muestra, patrón, patrón, muestra, muestra, patrón, ... La absorbancia del primer patrón se utiliza para calcular la concentración de las primeras seis muestras, la del segundo para las seis siguientes y así sucesivamente.
6. Una vez concluido el análisis de las muestras y patrones se procede a leer las absorbancias de las soluciones del paso (4) contra agua. Estas lecturas corresponden a los blancos de las muestras (A₃) y patrones (A_{3p}).

Cálculos:

$$Ca \text{ (mg/dl)} = \frac{A_2 - (A_3 - A_{3p} + A_1) \times P}{A_{2p} - A_{1p}}$$

A₂ = Absorbancia de la muestra.

A₃ = Absorbancia del blanco de muestra.

A₁ = Absorbancia del blanco interno de reactivos de la muestra.

A_{2p} = Absorbancia del patrón.

A_{3p} = Absorbancia del blanco del patrón.

A_{1p} = Absorbancia del blanco interno de reactivos del patrón.

P = Concentración del patrón en mg/100 ml.

Si la cristalería está libre de calcio y los sueros no muestran lipemia o hemólisis, el procedimiento y los cálculos matemáticos pueden simplificarse efectuando solamente las lecturas A_2 y A_{2p} contra blanco de reactivos y empleando la fórmula:

$$\text{Ca (mg/dl)} = \frac{A_2}{A_{2p}} \times P$$

Efecto de componentes séricos:

Para evaluar el efecto interferente del hierro, magnesio, fósforo, hemoglobina y bilirrubina se prepararon soluciones acuosas de sulfato amónico férrico, acetato de magnesio tetrahidratado, fosfato monopotásico, hemoglobina y bilirrubina respectivamente. Se agregaron volúmenes constantes de estas soluciones a alícuotas de suero para obtener las concentraciones deseadas. En ningún caso los sueros fueron diluidos más de 1/1,111.

Estudio comparativo

Para efectuar estudios de correlación y regresión lineal se analizó el calcio sérico a 58 muestras por el método de la o-cresolftaleína complexona y por un método de absorción atómica utilizando un espectrofotómetro de absorción atómica Perkin Elmer modelo 2380 (Norwalk, Connecticut 06856, USA) con los reactivos y la metodología descritos previamente (9).

RESULTADOS

Espectro de absorción:

Al determinar el espectro de absorción entre 450 y 650 nm, las soluciones patrón acuosas y las muestras de suero presentan un pico único de absorción a 575 nm.

Efecto de la temperatura:

Al aumentar la temperatura disminuye la intensidad de color del complejo del calcio con o-cresolftaleína (Fig. 1). Si las absorbancias de las muestras y del patrón no son leídas a la misma temperatura se produce un error importante en el resultado. Por ejemplo, cuando las absorbancias de una muestra de suero y un patrón fueron leídas a 30°C la concentración calculada de calcio en la muestra fue de 8,7 mg/dl. Cuando la absorbancia de esa misma muestra fue leída a 37°C y la del patrón a 30°C, la concentración de calcio obtenida fue de 7,5 mg/dl. Este comportamiento es independiente de la concentración de calcio en la muestra.

Linealidad:

El método presenta linealidad hasta 20 mg/dl de calcio al emplear soluciones patrón acuosas.

Pruebas de recuperación:

A alícuotas de suero conteniendo 5,0 mg/dl de calcio, se agregaron cantidades de 1,0 a 10,0 mg/dl de calcio, obteniéndose porcentajes de recuperación entre 98,7 y 103,3 con un promedio de 100,4 (Cuadro 1).

CUADRO 1

RECUPERACIÓN DEL CALCIO AGREGADO A SUERO

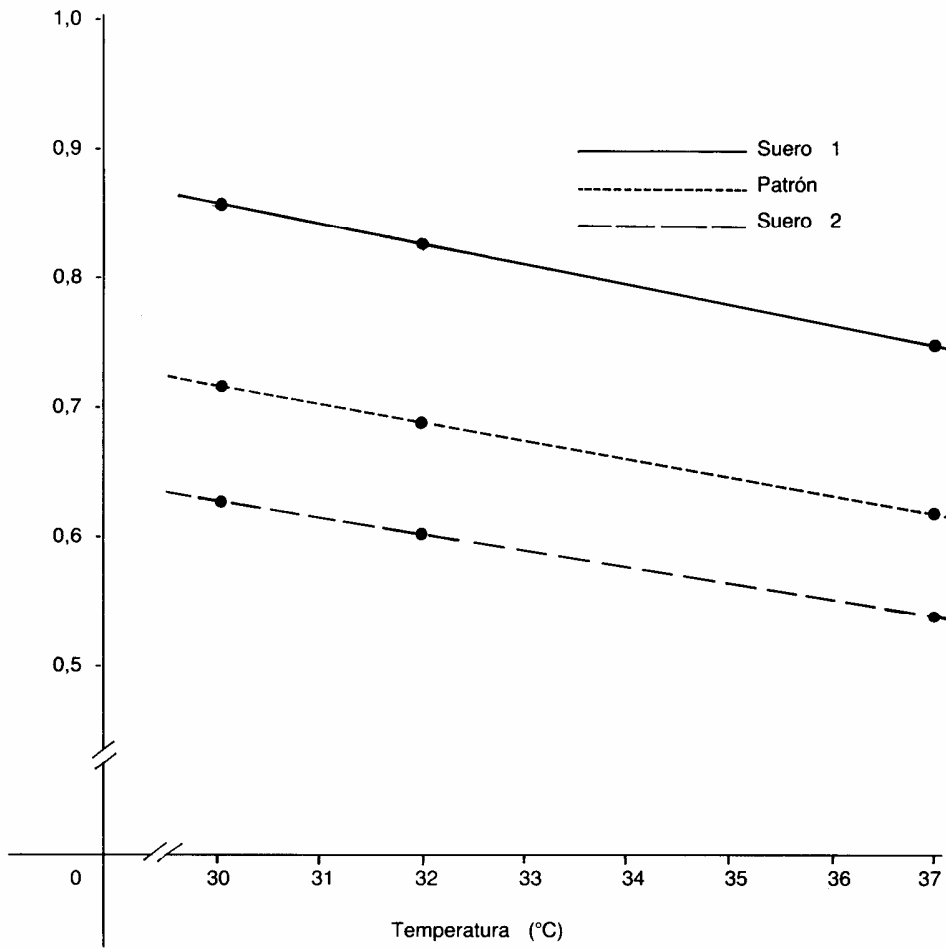
Calcio agregado (mg/dl)	Concentración de calcio (mg/dl)		Recuperación* (%)
	Valor experimental**	Valor calculado	
0	5,0	—	—
1,0	6,0	6,0	100,0
2,0	7,1	7,0	101,4
4,0	9,3	9,0	103,3
6,0	11,0	11,0	100,0
8,0	12,9	13,0	99,2
10,0	14,8	15,0	98,7
			$\bar{X} = 100,4$

* Recuperación (%) = $\frac{\text{Valor experimental}}{\text{Valor calculado}} \times 100$

** Promedio de análisis por duplicado.

FIGURA 1

EFFECTO DE LA TEMPERATURA EN LAS LECTURAS DE ABSORBANCIA DEL COMPLEJO CALCIO-O-CRESOLFTALEINA



CUADRO 2
EFFECTO DE ALGUNOS COMPONENTES SÉRICOS EN LA CUANTIFICACIÓN
DE CALCIO CON O-CRESOLFTALEINA COMPLEXONA

Componentes	Concentración (mg/dl)							
Hierro agregado	0	0,02	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
Calcio	8,2	8,1	8,1	8,1	8,2	8,2	8,0	8,0
Magnesio agregado	0	2	3	5	8	10	15	20
Calcio	8,0	8,0	8,0	8,0	8,1	8,0	8,1	8,1
Fosfato agregado	0	1,25	2,50	5,00	7,00			
Calcio	8,4	8,4	8,3	8,3	8,2			
Bilirrubina agregada	0	2	5	10	15	20		
Calcio	8,2	8,1	8,1	8,2	8,2	8,2		
Hemoglobina agregada	0	25	50	100	200	300	400	500
Calcio	9,4	9,2	9,3	9,3	9,2	9,1	9,1	9,2

CUADRO 3
PRECISIÓN DEL ANÁLISIS DE CALCIO POR EL MÉTODO
DE LA O-CRESOLFTALEINA COMPLEXONA

Precisión en un mismo día				Precisión día a día			
No. de análisis	\bar{X} (mg/dl)	D.S. (mg/dl)	C.V. (%)	No. de análisis	\bar{X} (mg/dl)	D.S. (mg/dl)	C.V. (%)
20	5,7	0,097	1,7	23	6,4	0,104	1,6
20	9,7	0,097	1,0	23	9,0	0,250	2,7
20	13,8	0,205	1,5	23	13,8	0,300	2,2

Efecto de los componentes séricos:

Los valores de calcio observados al agregar cantidades crecientes de hierro, magnesio, fósforo, bilirrubina y hemoglobina a alícuotas de suero valores se muestran en el Cuadro 2.

Precisión:

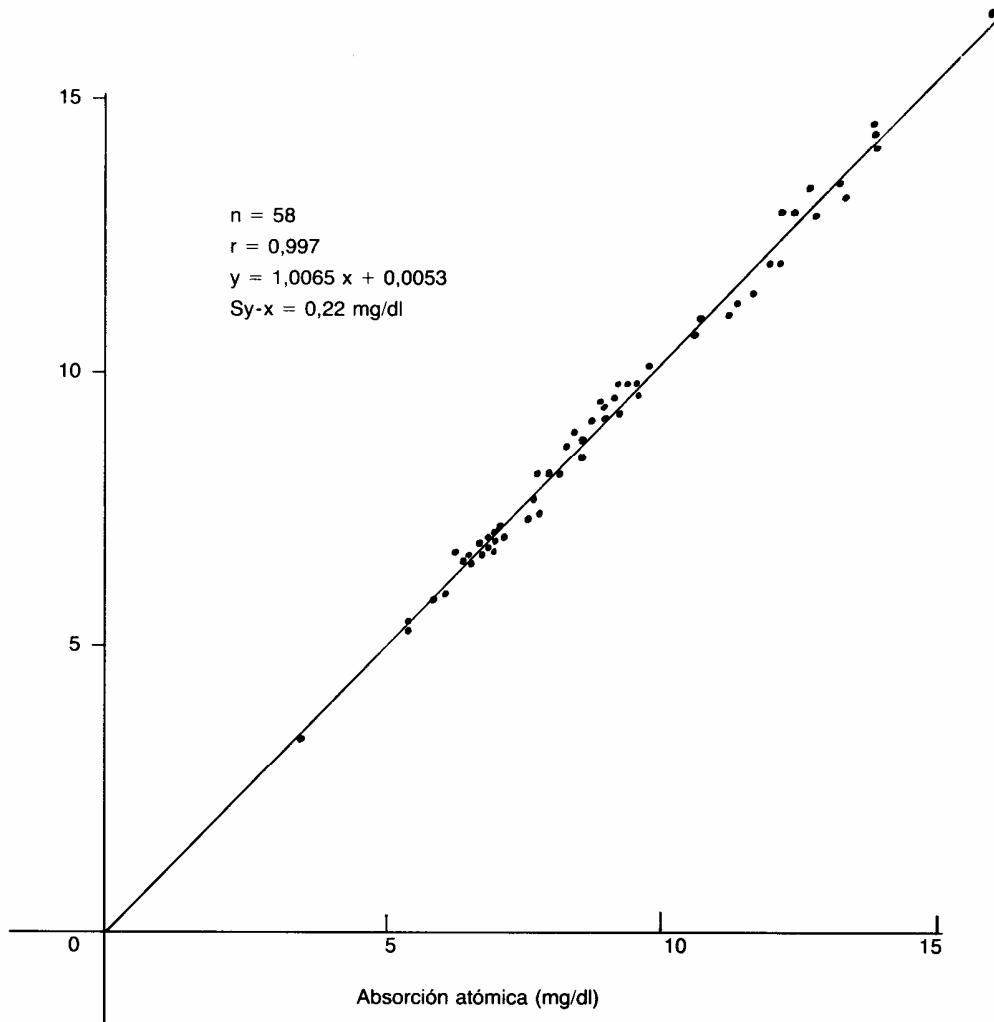
En el Cuadro 3 se muestran los resultados del análisis de precisión de un mismo día y día a día, para sueros conteniendo aproximadamente 6,9 y 14 mg/dl de calcio.

Estudio comparativo del método de la o-cresolftaleína complexona con un método por absorción atómica:

Se analizaron 58 muestras de suero con valores de calcio entre 3,5 y 16,4 mg/dl por el método en estudio y por absorción atómica. Cada muestra se analizó por ambos métodos el mismo día para evitar variaciones por inestabilidad empleando la misma solución patrón en ambas metodologías. Los resultados se muestran en el Figura 2.

FIGURA 2

REGRESIÓN LINEAL DEL ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE UN MÉTODO DE REFERENCIA
Y EL DE O-CRESOLFTALEINA COMPLEXONA



Intervalo de referencia:

Un intervalo de referencia ($\bar{X} \pm 2$ D.S.) de 8,2 a 9,7 mg/dl de calcio sérico, fue obtenido mediante el análisis de 101 muestras de suero de adultos ambulatorios sin patología aparente. El promedio fue 9,0 mg/dl y la desviación estándar 0,369 mg/dl.

Estabilidad de los reactivos:

Al analizar una muestra de suero, una solución patrón de calcio y dos sueros control comerciales con un reactivo de color que contenía solución de o-cresoltaleína complexona y solución amortiguadora de AMP preparadas al mismo día, se obtuvo valores de calcio de 7,5; 9,6; 9,9 y 6,9 mg/dl respectivamente. Al analizar las mismas muestras con reactivos almacenados por 6 meses a temperatura ambiente los valores obtenidos fueron de 7,5; 9,6; 9,9 y 7,0 mg/dl respectivamente. Sin embargo, al mezclar la solución de o-cresoltaleína complexona con la solución de AMP, el reactivo de color obtenido fue estable por ocho horas aproximadamente.

DISCUSIÓN

Actualmente el análisis de calcio sérico puede efectuarse en forma rápida y con muy buena precisión y exactitud mediante métodos por absorción atómica (2). No obstante esta alternativa no es factible para todos los laboratorios por el alto costo del equipo y su mantenimiento.

De la gran variedad de métodos desarrollados para la determinación de calcio sérico, el método de la o-cresoltaleína complexona ha sido acogido por muchos investigadores y casas comerciales (1, 5). Sin embargo, al utilizar reactivos y metodologías comerciales basados en este principio no obtuvimos reproducibilidad en los resultados. Al evaluar el método propuesto se encontró que la intensidad del producto final coloreado depende en gran medida de la temperatura (Fig. 1). Como la absorbancia disminuye al aumentar la temperatura, el patrón y la muestra deben leerse a la misma temperatura, de lo contrario se obtiene un error de aproximadamente 1,6 por ciento por cada grado centígrado de diferencia entre patrón y muestra. Para evitar las variaciones producidas por el calentamiento del espectrofotómetro cuando se leen muchas muestras, se recomienda analizar un patrón por cada seis determinaciones.

Cada lectura del patrón se usará para calcular la concentración de las tres muestras leídas previamente y las tres muestras leídas posteriormente al mismo. Por lo tanto no es recomen-

ble utilizar curvas de calibración preestablecidas para calcular los valores de calcio en las muestras.

Por otra parte, los errores aditivos se disminuyeron introduciendo un blanco interno que elimina la absorbancia debida al calcio contaminante en la cristalería y un blanco de muestra que elimina la absorbancia debida a pigmentos y turbiedad. En los laboratorios donde se utiliza cristalería libre de calcio puede eliminarse el blanco interno para simplificar el procedimiento y el cálculo de la concentración en los sueros. El uso de blanco de muestra puede obviarse si el suero no presenta turbiedad o hemólisis. Las muestras con concentraciones de bilirrubina hasta 20 mg/dl no producen interferencia aún omitiendo el blanco de muestra. El reactivo de color contiene 8-hidroxiquinolina para eliminar la interferencia producida por el magnesio (4). Se ha descrito que la adición de cianuro de potasio al reactivo de color enmascara la presencia de otros metales (1). A pesar de que omitimos este reactivo por su gran toxicidad, el hierro (5 mg/dl) y el magnesio (20 mg/dl) no interfieren significativamente. Tampoco lo hacen el fosfato, la bilirrubina y la hemoglobina hasta concentraciones de 7,0; 20 y 500 mg/dl respectivamente (Cuadro 2). Se ha descrito que el dimetilsulfóxido actúa como agente solubilizante de la o-cresoltaleína complexona, ayuda a aclarar la solución final cuando los sueros presentan lipemia moderada, disminuye la absorbancia del blanco de reactivos y elimina variaciones que se producen en la pendiente de la curva de calibración en presencia de proteína (1). Nosotros encontramos que, en efecto, el dimetilsulfóxido disminuye la absorbancia del blanco y el efecto de turbiedad moderada, sin embargo, disminuye la sensibilidad del método y produce un error constante negativo, por lo que no se cumple la ley de Beer y Lambert. Por estas razones nosotros no utilizamos dimetilsulfóxido en la preparación del reactivo de color. En el método propuesto, las pruebas de recuperación fueron satisfactorias, obteniéndose porcentajes de recuperación entre 98,7 y 103,3; lo que demuestra que las proteínas y otros componentes séricos no producen errores proporcionales y no alteran la pendiente. Esto se afirma en el estudio comparativo con absorción atómica al obtener una pendiente de 1,0065.

El método que describimos utiliza solución amortiguadora de 2-amino-2-metil -1 -propanol a pH 10,2. Este amortiguador fue introducido por Moorehead y Biggs (8) en un método automatizado en sustitución de la dietilamina. El

AMP tiene las ventajas de que no es irritante, no es tóxico y puede amortiguar el sistema a pH 10. A este pH, la o-cresolftaleína complexona casi no se disocia y las lecturas de absorbancia de los blancos son bajas.

El método propuesto presenta una precisión adecuada, con coeficientes de variación día a día de 1,6; 2,7 y 2,2 por ciento, para sueros con concentraciones de calcio de 6,4; 9,0 y 13,8 mg/dl respectivamente. La precisión obtenida es semejante a la del método propuesto por Baginski Slawa (1), que al ser evaluado en seis laboratorios diferentes presentó coeficientes de variación desde 1,5 hasta 3,8 por ciento, con muestras de suero conteniendo desde 6,7 hasta 14,6 mg/dl.

El método de la o-cresolftaleína complexona es ampliamente aceptado por su alta correlación con absorción atómica (1, 5, 8). Esto lo corroboramos en este estudio, donde al comparar 58 muestras con valores de calcio sérico entre 3,6 y 16 mg/dl, por ambos métodos el coeficiente de correlación fue 0,997 y la ecuación de regresión lineal $y = 1,0065 X + 0,0053$.

El intervalo de referencia obtenido en 101 adultos ambulatorios fue de 8,2 a 9,7 mg/dl. Estos valores son ligeramente más bajos a los reportados por otros investigadores (9), las diferencias las atribuimos fundamentalmente a que en el método propuesto eliminamos la interferencia por contaminación de la cristalería, por turbiedad y por hemólisis.

AGRADECIMIENTO

Agradecemos a la Dra. Marta Sánchez, del Laboratorio de Nefrología en el Hospital San Juan de Dios, por su colaboración con los análisis de calcio sérico por absorción atómica.

ABSTRACT

A method for the determination of calcium in serum was modified and evaluated. It was found that the absorbance readings diminish with the increase in temperature. Temperature elevations in the spectrophotometric cell may produce erroneous results. An internal blank avoids interference by contamination of the glassware with calcium, and a sample blank corrects for turbidity or pigments present in the sample. The reaction is linear up to 20 mg/dl. The average recovery was 100,4 percent, with a range of 99,2 percent to 103,0 percent.

Magnesium, iron, phosphate, bilirubin and hemoglobin do not interfere significantly. Within run precision (C. V.) was 1, 7percent, 1,0 percent y 1,5 percent and day to day precision was 1,6 percent, 2,7 percent and 2,2 percent for samples with low, normal and high values of serum calcium respectively. A reference interval of 8,2-9,7 mg/dl was obtained for an outpatient population of 101 apparently normal adults. The proposed method highly correlates with an atomic absorption procedure.

BIBLIOGRAFÍA

1. Baginski, E.S. y Slawa, S.M. Calcium in biological fluids. *Selected Methods for the Small Clinical Chemistry Laboratory* 1982; 9:125-129.
2. Cali, J.P., Bowers, G.N. y Young, D.S. A referenc method for the determination of total calcium in serum. *Clin. Chem.* 1973; 19:1208-1213.
3. Clark, E.P. y Collip, J.B. A study of the Tisdall method for the determination of blood serum calcium with a suggested modification. *J. Biol. Chem.* 1925; 63:461-464.
4. Connerty, H.V. y Briggs, A.R. Determination of serum calcium by means of orthocresolftalein complexone. *Am. J. Clin. Path.* 1965; 45:290-296.
5. Fraser, D., Glenville, J., Sang, W.K. e Ingeborg, C.R. Calcium and phosphate metabolism. En: Tietz, N.W., ed., *Textbook of Clinical Chemistry*. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1986; 1317-1372.
6. Gambino, S.R. y Fonseca, I. Comparison of serum calcium measurements obtained with the SMA 12/60 and by atomic absorption spectrophotometry. *Clin. Chem.* 1971; 17:1047-1049.
7. Gindler, E.M. Y King, J.D. Rapid colorimetric determination of calcium in biologic fluids with methylthymol blue. *Am. J. Clin. Path.* 1972; 58:376-382.
8. Klass, C.S. The use of the indicator calcein, and its fluorescence, in a rapid, ultramicrotitration of serum calcium. *Am. J. Clin. Path.* 1962; 37:655-659.
9. Moorehead, W.R. y Biggs, H.G. 2-amino-2-metil-1 propanol as the alkalizing agent flan improved continuous-flow cresolphthalein complexone procedure for calcium in serum. *Clin. Chem.* 1974; 20:1458-1462.
10. Sánchez, M. Intervalos de referencia de calcio sérico total en Costa Rica por el método de absorción atómica (en poblaciones ambulatoria y hospitalaria). *Rev. Cost. Cienc. Méd.* 1984; 6(1):31-37.
11. Statland, B.E. y Winkel, P. Sources of variation in laboratory measurements. En: Henry, J.B., ed., *Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*. 16° edición, Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1979; 3-28.