

Control de aptitud de un procedimiento para el análisis de cromo en suero*

A. Montel Ruiz De Alda, J.L. López Colón, J.M. De Pradena y Lobón, G. Álvarez Bustamante, T. Hoya González

Resumen

En este trabajo se describe un procedimiento rápido y fiable para la determinación de cromo en suero utilizando espectrometría de absorción atómica con atomización electrotrémica y corrección de fondo por efecto Zeeman. El cromo es determinado directamente en el suero, sin pretratamiento de la muestra. El suero se diluye a la mitad con una solución de modificador de matriz de nitrato magnésico 3,5 % (p/v) y Tritón X-100 0,1% (v/v). La rampa de temperaturas del horno de grafito se caracteriza por una temperatura de pirólisis de 1500°C y una temperatura de atomización de 2550°C.

Se valida y se comprueban las características analíticas del procedimiento. El límite de detección para el suero diluido es de 0,8 nmol/L. La masa característica encontrada fue de 4,4 pg/0,0044 unidades de absorbancia. La curva de calibración es lineal entre 0 y 77 nmol/L, tiene un coeficiente de variación de los factores de respuesta de 3,8% y un coeficiente de correlación al cuadrado de 0,99971. La curva de calibración corta el eje «x» cuando el valor de «y» es igual a $1,6 \cdot 10^{-4} \pm 3,3 \cdot 10^{-4}$ para $P=0,05$. La pendiente obtenida con adiciones estándar de cromo, está incluida dentro del intervalo de confianza ($P=0,05$) de la curva de calibración con patrones acuosos; por lo tanto, no hay efecto matriz.

Para comprobar la precisión y exactitud del procedimiento se analiza diez veces cada día, tres días diferentes, una muestra de referencia Seronorm Trace Elements Serum lote 605113, con un valor diana de 30,8 nmol/L. El valor medio de cada día cumple con la prueba de comparación de medias de Student. La recuperación obtenida en la adición de 5,8 nmol/L, 11,5 nmol/L y 23,1 nmol/L fue de 103%, 97% y 99% respectivamente, con un coeficiente de variación medio de 2,4%.

Introducción

El cromo es un oligoelemento metálico que pertenece al grupo VIB de la tabla periódica, siendo su masa atómica de 51,996 g/mol. Se presenta en forma de sales de estabilidad variable, en las que la valencia del cromo oscila entre 2⁺ a 6⁺. La forma bivalente se oxida rápidamente a trivalente y las formas 4⁺ y 5⁺, solo se encuentran como intermediarias en la transformación de 3⁺ a 6⁺ (1).

* Este trabajo corresponde a una comunicación científica presentada y premiada en el XVIII Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular, celebrado en Puerto de la Cruz, Tenerife el 19, 20 y 21 de Mayo de 1999.

Summary

A reliable and rapid procedure is described for the determination of chromium in serum samples by electrothermal atomic absorption spectrometry and Zeeman background correction. Chromium in serum is directly determined without sample pretreatment. The serum samples are diluted 1 to 2 with a solution 3,5 g/L (w/v) magnesium nitrate matrix modifier and 0.1% (v/v) Triton X-100. The graphite furnace programme is characterized by a 1500°C ashing temperature and a 2550°C atomization temperature.

The procedure is validated and its analytical characteristics are checked. The detection limit is 0.8 nmol/L for the diluted serum. The mass characteristic is 4.4 pg/0.0044 absorbance units. The calibration curve is linear between 0 and 77 nmol/L, has a relative standard deviation (RSD) of the absorptivity at each point of 3.8%, and a square correlation coefficient of 0.99971. The standard solutions curve intercepts the «x» axis when the absolute value of «y» is $1.6 \cdot 10^{-4} \pm 3.3 \cdot 10^{-4}$ for $P=0.05$. The slope of the standard additions curve is included within the confidence limits ($P=0.05$) of the slope regression line for aqueous standards. Therefore, there is no matrix effect.

To determine the procedure precision and accuracy, a reference sample, Seronorm Trace Elements Serum Lot 605113, with a target value of 30.8 nmol/L, was analysed three days, ten times each day, and the mean value of each day complies with the «t-test» to compare mean values. The recovery of the standard additions was 103%, 97% and 99% for 5.8, 11.5 and 23.1 nmol/L, respectively. The mean relative standard deviation for these levels was 2.4%.

Este metal se distribuye por todo el organismo de forma homogénea en concentraciones similares en cualquier tejido u órgano, aunque experimenta una tendencia a concentrarse en bazo, hígado y médula ósea (2).

Los alimentos pueden ser causa de intoxicación por cromo, así las carnes, especias, nueces, pescado, salvado, yema de huevo, etc., son alimentos que por sus características pueden ser contaminados por este metal y por tanto ser susceptibles de producir toxicidad (3,4).

La vía más importante de penetración durante la actividad laboral es la respiratoria, produciendo rinitis, ulceración e incluso perforación del tabique nasal, bronquitis y congestión pulmonar crónica (5). Por esta vía, es absorbido principalmente por la hemoglobina de los eritrocitos, reduciéndose posteriormente a estado trivalente (6).

La lesión característica en la piel es la dermatitis química irritativa, y alérgica, de tipo eczematoso que aparece en las zo-

nas expuestas (7). Otra lesión importante son las úlceras cutáneas, que se producen cuando el cromo se deposita de una manera continua sobre la piel (8).

El cromo parece actuar como cofactor de la insulina, aunque no se conocen los verdaderos mecanismos de acción de éste sobre los carbohidratos, sí está probado que ejerce un efecto favorable en su metabolismo, considerándose necesario para el mantenimiento de la tolerancia normal de la glucosa (9,10). Se han descrito concentraciones bajas de cromo en suero en pacientes con intolerancia a la glucosa, diabetes mellitus, hiperlipemias y pacientes con nutrición parenteral (11), produciendo esta deficiencia neuropatía periférica e intolerancia a la glucosa (12).

Este elemento tiene una acción carcinogénica muy relevante cuando la exposición a este metal se produce por vía pulmonar siendo especialmente carcinogénicos, los cromatos y dicromatos alcalinos y el cromato de calcio. (2,13,14).

La habitual baja concentración de cromo en los especímenes biológicos, menor de 96 nmol/L, hace difícil la determinación del mismo. La espectrometría de absorción atómica con atomización electrotrémica tiene una alta sensibilidad analítica y una probada exactitud (15).

En este trabajo, se describe un procedimiento rápido y fiable para la determinación de cromo en suero.

Material y métodos

Debido a que la técnica de absorción atómica por llama no tiene la sensibilidad analítica necesaria para analizar muestras de este metal, el análisis de cromo en suero se ha realizado por absorción atómica electrotrémica con corrector de fondo Zeeman.

Especímenes

Los especímenes analizados en este trabajo, han sido el suero de referencia Seronorm y el suero extraído a un paciente. El suero de referencia ha sido reconstituido de acuerdo a las normas establecidas por el fabricante, mientras que el suero del paciente ha sido obtenido mediante venopunción antecubital en tubos de vacío. La limpieza de la piel se ha realizado con alcohol etílico 70%.

La centrifugación de la sangre (15 minutos a 1000 g) y posterior decantación del suero se ha realizado rápidamente, con el fin de que la muestra se encuentre durante el menor tiempo posible en el interior de los tubos de extracción, para evitar su posible contaminación.

Instrumentación

Para el análisis de cromo se ha utilizado un espectrómetro de absorción atómica Perkin Elmer modelo 4110 (Überlingen, Alemania), con efecto Zeeman longitudinal y calentamiento transversal, así como un muestreador Perkin Elmer AS-72, con capacidad para 75 muestras. El software empleado ha sido el programa AA WinLab versión 2.5 de Perkin Elmer (Norwalk, EEUU). También ha sido empleada una lámpara monoelemental de cátodo hueco Perkin Elmer, así como tubos de grafito pirrolizados con plataforma integrada y tapas Perkin Elmer.

Pipetas Eppendorf (Hamburg, Alemania), de 500 µL.

Puntas de pipeta Eppendorf Biopur Tips.

Reactivos, material de control y calibración

Los reactivos utilizados son de alta calidad, detallándose a continuación los procedimientos empleados:

Modificador de matriz

Se ha empleado modificador de matriz con el fin de obtener sales de cromo estables a altas temperaturas, con lo que se ha

conseguido evitar el efecto matriz, la calibración por adiciones y la digestión de la muestra. La preparación del modificador de matriz se realiza de la siguiente manera: en un matraz aforado de 1000 mL, se añaden 3,5 g de nitrato magnésico suprapur de Merck (Darmstadt, Alemania), 2 mL de Tritón X-100 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) y agua MILLI-Q (Molsheim, Francia) de 18 MΩ de resistividad c.s.p.1000 mL.

Patrones

La calibración se ha realizado con un patrón primario de cromo Perkin Elmer certificado, cuyo valor de referencia es de 1 g/L en solución acuosa con ácido nítrico al 2%. Como patrones de trabajo se han utilizado patrones acuosos diluidos en modificador de matriz 1:1 (v:v), de concentración final: 38,5, 19,2, y 9,6 nmol/L. El blanco utilizado se compone de agua MILLI-Q y modificador de matriz en proporción 1:1 (v:v).

Control interno

Se ha empleado un control interno de suero Nycomed (Seronom Trace Elements Serum, Lote 605113), cuyo valor de referencia es de 30,7 nmol/L y un intervalo de aceptabilidad de 25 – 36,5 nmol/L.

Procedimiento

La muestra empleada en el análisis de cromo es suero diluido 1:1 (v:v), en modificador de matriz. La dilución se realiza añadiendo a 500 µL de modificador de matriz 500 µL de suero, homogeneizando la muestra con la misma punta de pipeta y evitando la formación de burbujas.

Las condiciones instrumentales empleadas en el análisis de cromo, se esquematizan en la tabla I

Tabla I. Condiciones instrumentales para el análisis de cromo

Longitud de onda	357,9 nm
Rendija	0,7 nm
Lámpara	25 mA
Lectura	Área de pico
Tiempo de integración	3 s
Volumen de muestra	20 µL

Con el fin de conseguir la mayor sensibilidad analítica posible, se ha utilizado un programa de temperaturas (tabla II), que comienza por un breve precalentamiento de la muestra, seguido de dos etapas de secado para evaporar el agua de la misma. Posteriormente y para eliminar la materia orgánica se procede a una etapa de mineralización a 800 °C, aumentando posteriormente a 1500 °C, con el fin de eliminar totalmente el efecto matriz. Por último la lectura se realiza a 2550 °C, por ser la temperatura de atomización en la que se ha alcanzado mayor sensibilidad analítica.

Tabla II. Descripción del programa de temperaturas

Etapas	Temperatura °C	Tiempo rampa s	Tiempo s	Flujo Argon mL/min
Calentamiento	80	5	10	250
Secado	100	5	20	250
Secado	130	5	30	250
Mineralización	800	35	15	250
Mineralización	1500	20	20	250
Atomización	2550	0	3	0
Limpieza	2600	1	5	250

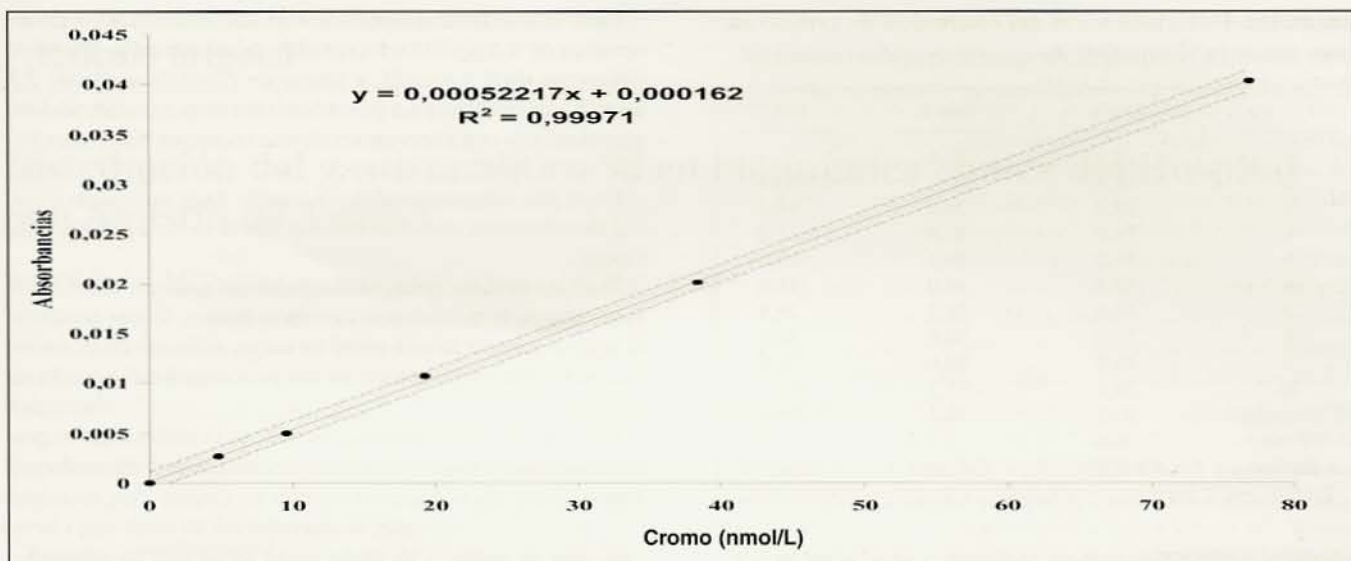


Figura 1. Curva de calibración con los límites de tolerancia y confianza.

Para la evaluación de este procedimiento se han estudiado los siguientes aspectos: sensibilidad analítica, linealidad, interferencias analíticas, exactitud y precisión.

Resultados

Sensibilidad analítica

Se ha realizado el cálculo de la masa característica del método dando como resultado 4,4 pg/0,0044 unidades de absorbancia.

Se analizaron 30 blancos acuosos para determinar el límite de detección del procedimiento. Se toma como valor del mismo el triple de la relación entre la desviación típica de las absorbancias de los blancos y la pendiente de la calibración acuosa dividida por la dilución utilizada con las muestras de suero. El valor resultante es 0,8 nmol/L. El límite de cuantificación, calculado como diez veces la relación antes mencionada, es 2,7 nmol/L.

Linealidad

Con objeto de comprobar la linealidad del procedimiento, se realizó una curva de calibración con patrones acuosos de 5 puntos (figura 1), con concentraciones desde 4,8 nmol/L hasta 76,9 nmol/L diluidos 1 a 2 con el modificador de matriz, de la misma manera que las muestras de suero. El coeficiente de variación de los factores de respuesta, relación entre la absorbancia y la concentración, es inferior al 5% (3,8%), por lo que la calibración entre 0 y 77 nmol/L se puede considerar lineal. Además, se puede considerar que la recta de regresión pasa por

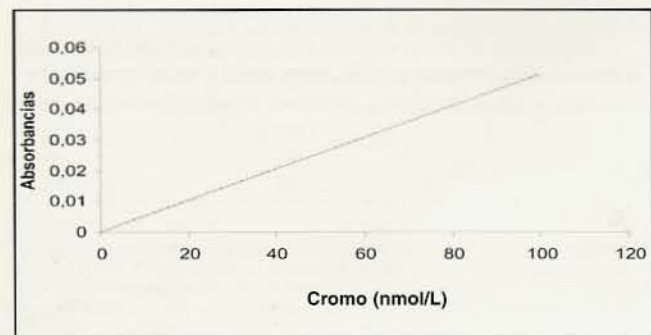


Figura 2. Ausencia de efecto matriz. Pendiente de las adiciones estándar (línea continua). Límite de confianza al 95% de la pendiente de la calibración con patrones acuosos (líneas discontinuas).

el origen al estar incluido este valor dentro del intervalo de confianza al 95% del valor de la ordenada en el origen ($b=1,6286 \cdot 10^{-4} \nabla 3,3068 \cdot 10^{-4}$). El coeficiente de correlación al cuadrado de la recta de regresión es 0,99971.

Interferencias analíticas

Se realizó una curva de calibración por el método de las adiciones estándar, adicionando a un suero cantidades de cromo necesarias para alcanzar una concentración final de aproximadamente 48, 96 y 192 nmol/L, a la vez que se hacía una curva de calibración con patrones acuosos (figura 2).

La pendiente de la recta de regresión de las adiciones estándar ($5,1321 \cdot 10^{-4}$ abs-L/nmol), cuyo coeficiente de correlación al cuadrado es 0,99912, está incluida dentro del límite de confianza al 95% de la pendiente de la regresión de la curva de calibración realizada con los patrones acuosos ($5,2217 \cdot 10^{-4} \nabla 0,1231 \cdot 10^{-4}$ abs-L/nmol), por lo que podemos afirmar que no existe efecto matriz y que se pueden utilizar patrones acuosos para obtener la curva de calibración.

En la figura 3, se observa la práctica supresión de la matriz comparada con la señal que produce un suero con una concentración de cromo de 30,7 nmol/L.

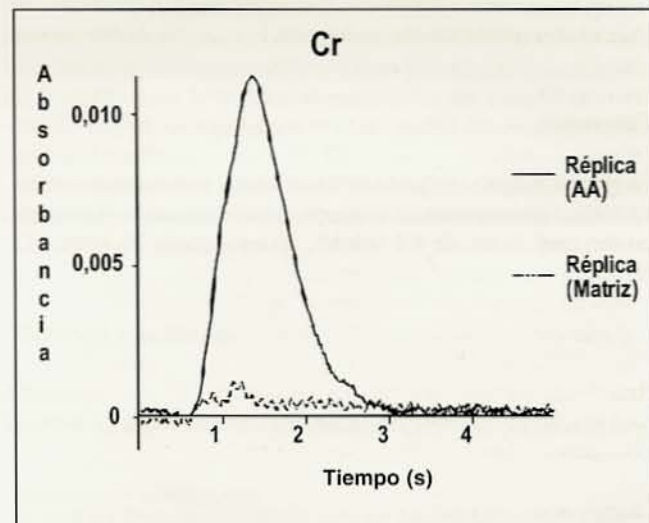


Figura 3. Lectura en área de pico de un suero de 30,7 nmol/L, obtenido en nuestro laboratorio (se observa la práctica inexistencia de efecto matriz).

Tabla III. Determinación del contenido de cromo en una muestra Seronorm de concentración conocida

	Día 1	Día 2	Día 3
1	28,5	30,6	31,3
2	32,5	30,2	30,4
3	29,0	29,4	30,4
4	29,8	30,8	31,2
5	31,2	30,4	29,8
6	30,8	30,0	31,0
7	29,4	31,2	29,8
8	31,3	30,0	30,4
9	30,6	30,6	29,6
10	28,8	31,3	30,6
\bar{x} (nmol/L)	30,2	30,4	30,4
CV (%)	4,6	1,9	1,8
t-Student	P= 0,171	P=0,089	P=0,096

Exactitud y precisión

Se analizó un suero Seronorm Trace Elements Serum (Lote 605113) de concentración diana de 30,8 nmol/L y un intervalo de 25,0 a 36,5 nmol/L, tres días sucesivos y diez muestras cada día, obteniéndose una concentración media de 30,4 nmol/L con un coeficiente de variación medio del 2,8%. Se realiza una prueba t de Student de comparación de medias con el valor medio obtenido en cada uno de los tres días, no observándose diferencia estadísticamente significativa ($P < 0,05$) en ninguno de los tres días (tabla III).

Recuperación

Además de la determinación de cromo en una muestra de suero de concentración 5,8 nmol/L, se comprobó la exactitud del método al observar las recuperaciones obtenidas en la adición al suero de 5,8; 11,5 y 23,1 nmol/L que fueron de 6; 11,2 y 22,6 nmol/L respectivamente, lo que suponen una recupera-

Tabla IV. Estudio de la recuperación

Adición	Práctico	Recuperación (%)	CV (%)
5,8 nmol/L	6 nmol/L	103	3,1
11,5 nmol/L	11,2 nmol/L	97	2,3
23,1 nmol/L	22,6 nmol/L	98	1,8
\bar{x}		99,3	2,4

ción de 103%, 97% y 98 % (tabla IV).

Los datos anteriormente citados corroboran los resultados de exactitud y precisión obtenidos con la muestra de Seronorm.

Discusión

El procedimiento evaluado es lineal en las concentraciones estudiadas, que comprenden desde concentraciones séricas de cromo muy bajas, de 4,8 nmol/L, hasta altas de 76,9 nmol/L.

Dada la sensibilidad analítica obtenida: concentración característica de 4,4 pg/0,0044 unidades de absorbancia, límite de detección de 0,8 nmol/L y límite de cuantificación de 2,7 nmol/L, se considera un procedimiento muy sensible incluso para muestras con concentraciones de cromo en suero muy bajas.

Es un procedimiento preciso y exacto, tanto utilizando material de referencia, como un suero al que se le han realizado adiciones.

También se debe destacar la rapidez del análisis, así como la evidencia de la inexistencia de efecto matriz, lo que posibilita el análisis directo de este metal en suero, evitando las contaminaciones que se producen en los procesos de digestión de muestras.

Por todo lo anteriormente expuesto, se considera que el procedimiento evaluado es eficaz para el análisis de cromo en suero.

Correspondencia
A. Montel Ruiz de Alda
Servicio de Toxicología
Instituto de Medicina Preventiva
C/ Donoso Cortes nº 92
28015 Madrid
E-mail: amontel@eresmas.com

Bibliografía

- Vanderlinde RE, Hayne FJ. Cromo. En: Química Clínica. Pesce A, Kaplan L, eds. Buenos Aires:Editorial Médica Panamericana. 1990. p. 532-8.
- Martí JA, Desoille H. Cromo. En: Medicina del Trabajo. 2da ed. Martí JA, Desoille H, eds. Barcelona: Masson. 1993. p. 227-33.
- Delgado AR, De la Gala F, García P. Fisiopatología y fuentes de exposición de los principales metales tóxicos. En: Metales pesados tóxicos: Normativa actual y técnicas de análisis. 1ra ed. Madrid:Mapfre Medicina. 1996. p. 14.
- OMS. Chrome. En: Aspects sanitaires et nutritionnels des oligoelements et des elements en traces. Ginebra:OMS. 1997 p.156-61.
- Dingle AF. Nasal disease in chrome workers. Clin Otolaryngol 1992; 17:287-8.
- García Ariño C. Diagnóstico clínico de las intoxicaciones por plomo, mercurio, cromo y cadmio. En: Metales pesados tóxicos: normativa actual y técnicas de análisis. 1ra ed. Madrid:Mapfre Medicina. 1996. p. 37.
- Avnstorp C. Cement eczema. An epidemiological intervention study. Acta Derm Venereol Suppl. 1992;179:1-22.
- Gisbert JA. Intoxicaciones por otros metales. En: Medicina legal y toxicología. Gisbert JA ed. 4ta ed. Barcelona:Masson.1998.p. 752.
- Kimura K. Role of essential trace elements in the disturbance of carbohydrate metabolism. Nippon Rinsho 1996;54: 79-84.
- Woo J, Cannon DC. Intermediarios metabólicos e iones inorgánicos. En: Diagnóstico y tratamiento clínicos por el laboratorio. Todd-Sanford-Davidsohn, eds., 8ª edición. Barcelona: Salvat, 1988.p.204.
- Zima T, Mestec O, Tesar V, Tesafova P, Nemecek K, Zak A, et al. Chromium levels in patients with internal diseases. Biochem Mol Biol Int 1998;46:2.
- Itokawa Y. Trace elements in long-term total parenteral nutrition. Nippon Rinsho. 1996;54:172-8.
- Speizer FE. Enfermedades pulmonares de origen ambiental. En: Harrison. Principios de medicina interna. 13ra edición. Madrid: Interamericana Mc Graw-Hill. 1994. p. 1359.
- Mao Y, Zang L, Shi X. Generation of free radicals by Cr(IV) from lipid hydroperoxides and its inhibition by chelators. Biochem Mol Biol Int. 1995;36:327-37.
- Romero RA, Salgado O; Rodríguez-Iturbe, Tahan JE. Blood levels of chromium in diabetic and nondiabetic hemodialysis patients. Transplantation Proceedings 1996;28.