

Automatización de la determinación de citrato con un analizador centrífugo

J.O. Alda, J.J. Puente, A. Giner, y J.E. Escanero

La determinación de citrato, metabolito crucial en el metabolismo intermediario, no es una técnica rutinaria en los laboratorios de Bioquímica Clínica, pudiéndose atribuir, en parte, a la falta de una metodología automatizada. El presente trabajo describe una técnica para determinaciones seriadas sobre analizadores centrífugos a partir de suero total. El comienzo de la reacción se enlenteció disminuyendo la concentración de citrato lisa, el cambio de la densidad óptica a 340 nm se estabiliza a los 10 minutos incluso para las más altas concentraciones de citrato añadidas (400 $\mu\text{mol/l}$)

La linealidad fue óptima entre 30 y 400 $\mu\text{mol/l}$ de citrato. El coeficiente de variación fue de 10.8% para un volumen de muestra de 100 μl y del 4.8% para 200 μl . El porcentaje de recuperación fue del $101 \pm 5\%$ ($X \pm D.E.$).

The citrate determination is not usual technique in clinical chemistry laboratories. It can be think that the lack of an automatized technique is the cause. The present paper describe a technique to sequential automatized determination in centrifugal analyzers from total serum. The start of reaction was slowed by delaying of the citratelase reaction. The change of optic density is stabilized on ten minutes up to 400 $\mu\text{mol/l}$ of citrate. The linearity was optimun between 30 and 400 $\mu\text{mol/l}$ of citrate concentration. The coeficient of variation was 10.8% when 100 μl are used as sample volumen and 4.8% when are 200 μl . The percentage of recovery was $101 \pm 5\%$ ($X \pm S.D.$).

Introducción

El citrato ocupa una posición central en el metabolismo intermediario. Además de su papel en el ciclo de Krebs, actúa como regulador alostérico tanto activador como inhibidor en rutas metabólicas tan cruciales como la glicolisis, así como donante de grupos acilo y fuente de potencial reductor¹, habiéndose descrito que sus niveles plasmáticos reflejan la regulación de la utilización intracelular de glucosa^{2,3}. De todo lo anterior se sugiere la importancia de su valoración en medicina en situaciones tan diversas como: hipoxia⁴, control de transfusiones, medicina deportiva⁵, estudios del metabolismo óseo⁶, etc. Sin embargo su determinación no es rutinaria, en parte, por falta de una metodología automatizada.

El presente trabajo pretende desarrollar un método auto-

matizado sobre analizador centrífugo para determinar citrato en plasma o suero sanguíneo.

Material y métodos

Instrumentación

Para la observación continuada de la reacción, se utilizó un espectrofotómetro Pye Unicam SP6 400 UV y para las pruebas a punto final un sistema analizador centrífugo Gemeni (Electro-Nucleonics Inc., 368 Passaic Avenue, Fairfield N.J. 07006); en este último caso las disoluciones fueron efectuadas automáticamente con el cargador del sistema (autoloader).

Reactivos

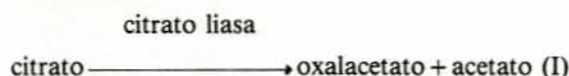
Los reactivos, utilizados fueron MDH (Boehringer 200379 de 50 U/mg), LDH (Boehringer 127230 de 550

Departamento de Bioquímica. Facultad de Medicina.
Universidad de Zaragoza

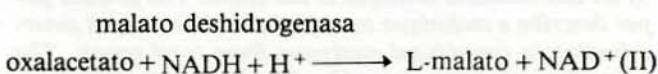
U/mg), NADH-Na₂ (Boehringer 127230) y citrato liasa (Boehringer 354074 0.25 U/mg)

Métodos

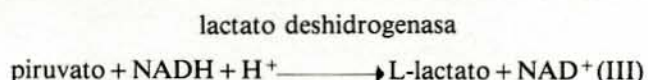
En la determinación de citrato se utilizaron 100 μ l de suero como dosis máxima capaz de ser dispensada por el cargador automático del sistema y 400 μ l de una disolución acuosa (disolución 1) conteniendo 0.375 g/l de NADH, 75 U/l de MDH 75 U/l de LDH, en un tampón de glicil-glicina 40 g/l de pH 8. En las medidas con el analizador centrífugo los 400 μ l de la disolución 1 se depositaron automáticamente en la cubeta externa del disco de muestras junto con los sueros o estandar y en la cubeta interna del disco 10 μ l de una disolución de citrato liasa conteniendo concentraciones que oscilaban entre 0.8 y 0.02 U. La adición de citrato liasa (C.E.4.1.3.6), al conjunto suero-disolución 1, iniciaba la reacción:



El método de partida fue el de Moellering y Gruber⁷, que utiliza la citrato liasa para producir oxalacetato como indica la reacción (I), el cual a su vez es reducido a malato por la malato deshidrogenasa (C.E. 1.1.1.37), con oxidación estequiométrica de NADH, que puede cuantificarse por el descenso de densidad óptica a 340 nm:



El oxalacetato se puede descarboxilar a piruvato, por lo que muchas de las técnicas usadas⁸ para la determinación de citrato incorporan lactato deshidrogenasa (C.E. 1.1.1.27) para medir el oxalacetato desviado por esta vía. Esta enzima cataliza la siguiente reacción:



Resultados

I. Estabilidad del conjunto suero-substrato

Los resultados relativos a la exploración de la estabilidad del conjunto suero-disolución 1, se representan en la figura 1, encontrándose una buena estabilización a partir de los 5 minutos de la mezcla, a 37° C. (Figura 1), por lo que las demás observaciones se iniciaron después de ese tiempo.

II. Calculo de la concentración de enzima iniciadora

En las técnicas manuales de valoración de citrato por citratoliasa los 1/2-2/3 de la reacción ocurren en los primeros 6 segundos. Lo que normalmente representa una gran ventaja porque acorta el tiempo de medida es un gran inconveniente en las técnicas de determinación seriada y automatizada en analizadores centrífugos, que efectúan su primera lectura unos 6 segundos después de la mezcla, con el consiguiente consumo de sustrato; por ello, uno de los

requerimientos para esta automatización es enlentecer el comienzo de la reacción.

El enlentecimiento del comienzo de la reacción fue abordado por tres vías: cambios del pH de la reacción, descenso de la temperatura y disminución de la concentración de citrato liasa. De estas tres posibilidades la única que resultó ser viable fue la última; de esta forma se cuantificó la influencia de la concentración de la enzima sobre el cambio de densidad óptica a 37° C. Los resultados de dicha influencia se representa en la Figura 2.

En dicha figura puede apreciarse que las concentraciones de enzima para las cuales las variaciones de la absorción óptica a 340 nm eran insignificantes en el primer minuto fueron las menores de 0.04 unidades. Por otra parte, el enlentecimiento en el comienzo de la reacción provoca un alargamiento del tiempo necesario para consumir el citrato presente en la muestra. Puesto que el rango de concentraciones de citrato en suero o plasma puede variar entre 67 y 400 μ mol/l⁹, se estimó que para las mayores concentraciones (400 μ mol/l) el tiempo necesario para consumir el total del sustrato era de 10 minutos, siendo este tiempo, el elegido para efectuar la última lectura (punto final).

III. Linearidad

Los resultados del análisis del rango de linearidad de la reacción estimado por medio de la valoración en el analizador centrífugo de muestras conteniendo entre 15 y 500 μ mol/l de citrato se recogen en la Figura 3.

En dicha figura se observa que el rango de linearidad para concentraciones de 0.04 unidades de enzima se mantuvo entre 30 y 400 μ mol/l de citrato. Asimismo se puede apreciar la importancia crítica de la concentración de la enzima, ya que cambios de un 50% en la misma provocan alteraciones de la linearidad en este rango, sobre todo teniendo en cuenta la labilidad de la enzima que en 3 horas a 20°C pierde mas del 50% de actividad.

IV. Precisión

Los valores obtenidos en 108 determinaciones seriadas de un mismo suero, utilizando para la medición 100 y 200 μ l (obtenidos por adición manual de otros 100) se recogen en la Tabla I. De los valores en ella recogidos se calculó el coeficiente de variación que resultó ser del 4.8% cuando las determinaciones se efectuaron con 200 μ l y del 10.8% cuando se utilizaron 100 μ l.

V. Recuperación del citrato añadido a muestras séricas

A 10 sueros de concentraciones conocidas de citrato divididos en 2 grupos, se les adicionó este sustrato en las cantidades necesarias para incrementar en 100 y 200 μ mol/l la concentración final del mismo. En la Tabla II se muestran los resultados esperados y encontrados en dichos sueros, así como el porcentaje de recuperación.

En dicha tabla puede observarse que los porcentajes de recuperación del citrato añadidos oscilaron en torno al 100% (101 \pm 5% - X \pm D.E.), lo que expresa la bondad del método descrito.

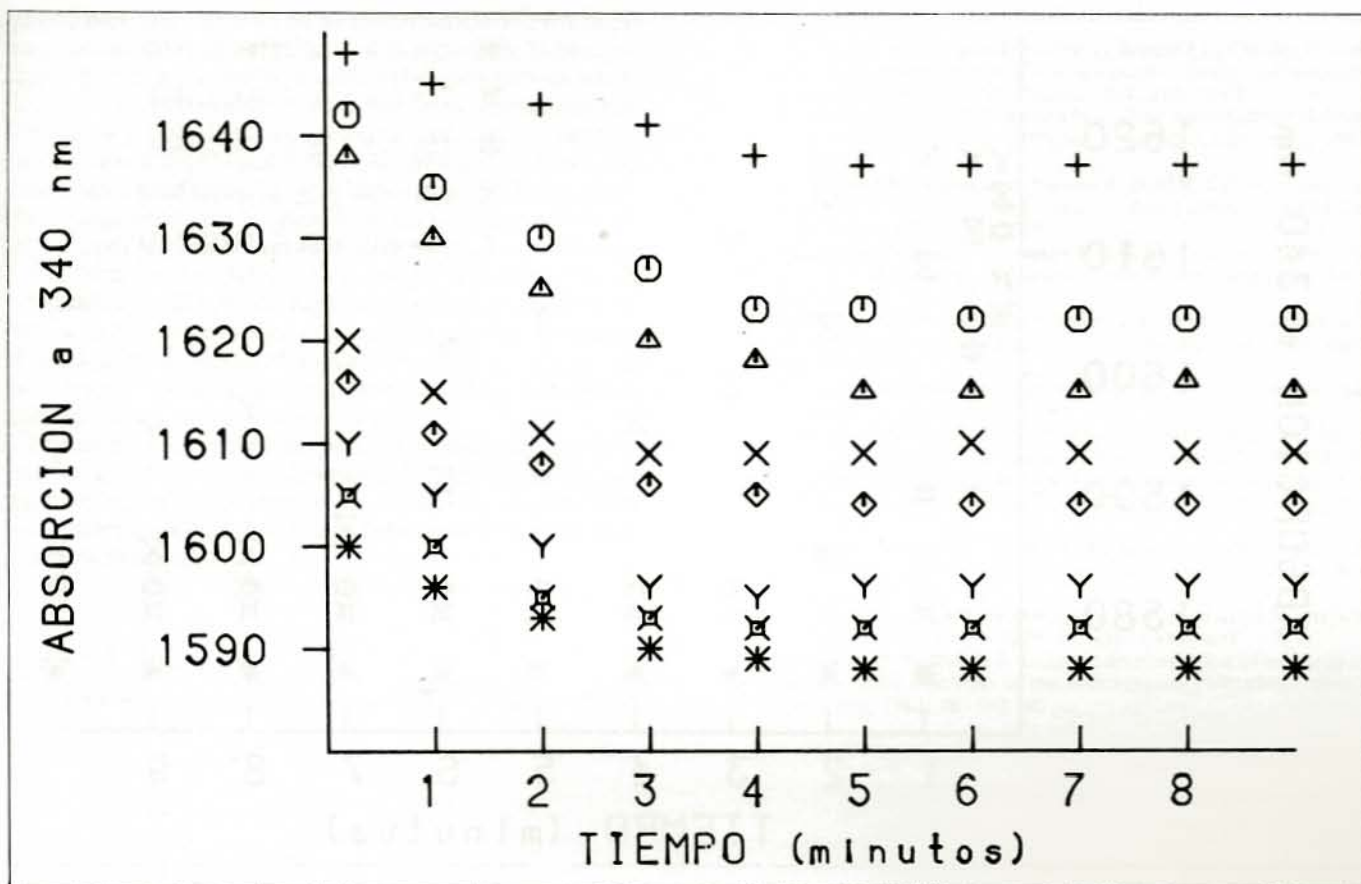


Figura 1. Cambios en la absorción óptica a 340 nm del conjunto suero - (NADH+H⁺, MDH, LDH y tampón glicil-glicina, pH=8) registrados durante 9 minutos para 8 sueros diferentes. Cada signo representa los valores de uno de los sueros estudiados.

Tabla I

Concentración de citrato determinada sobre un solo suero en 108 mediciones, 36 utilizando 100 μ l, 36 con 200 μ l, y el resto con 200 μ l de un ultrafiltrado del mismo suero.

muestra	Suero	Suero	Ultrafiltrado
volumen	100 μ l	200 μ l	200 μ l
determinaciones	36	36	36
media en μ mol/l	124	121	127
desviación estándar	9.1	4.3	3.3

Tabla II

Recuperación de citrato añadido a suero. Las concentraciones de citrato están expresadas en μ mol/l.

Suero	Añadido	Esperado	Encontrado	Recuperado
130	100	230	232	101
164	100	264	269	102
110	100	210	218	104
097	100	202	197	97
125	100	228	225	98
122	200	322	306	95
158	200	358	347	97
101	200	301	325	108
125	200	330	325	98
121	200	320	339	106

Discusión

La citrato liasa utilizada para la determinación de citrato por Moellering y Gruber⁷ tenía una alta especificidad por su sustrato. Sin embargo, su preparación contenía una enzima contaminante: la oxalacetato decarboxilasa (C.E. 4.1.1.3), lo que requería la adición de lactato deshidrogenasa para evitar las pérdidas de sustrato. En previsión de similares actividades contaminantes se utilizó también la lactato deshidrogenasa en la técnica automatizada, aunque autores como Toftegaard-Nielsen⁸ no comparten el punto de vista relativo a la contaminación de la ci-

trato liasa en niveles que pueden afectar los valores de medida del citrato; en consecuencia, considerar innecesaria la adición de lactato deshidrogenasa, aun cuando con ello se aporte una mayor garantía. Sin embargo, este autor determinó sistemáticamente las concentraciones óptimas de reactivos, pero el método por él descrito requiere, como la mayoría de los publicados por otros autores^{7,9}, la precipitación de las proteínas. Otros autores en cambio, han considerado la desproteinización como innecesaria, bien por haber utilizado condiciones subóptimas¹⁰, bien por-

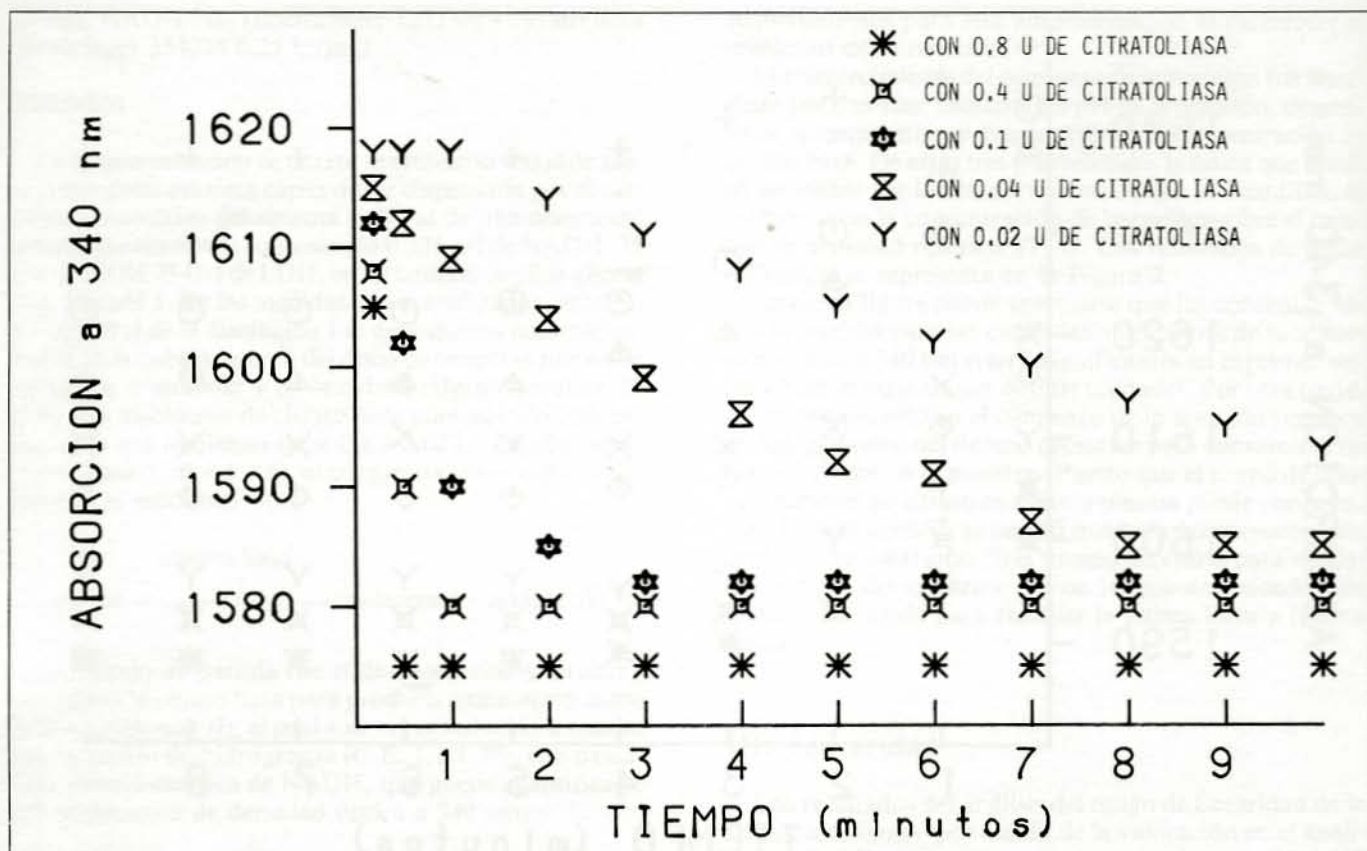


Figura 2. Variaciones de la absorción óptica a 340 nm tras la adición de distintas concentraciones de citrato liasa al conjunto suero - (NADH+H⁺, MDH, LDH y tampón glicil-glicina) registradas durante 10 minutos.

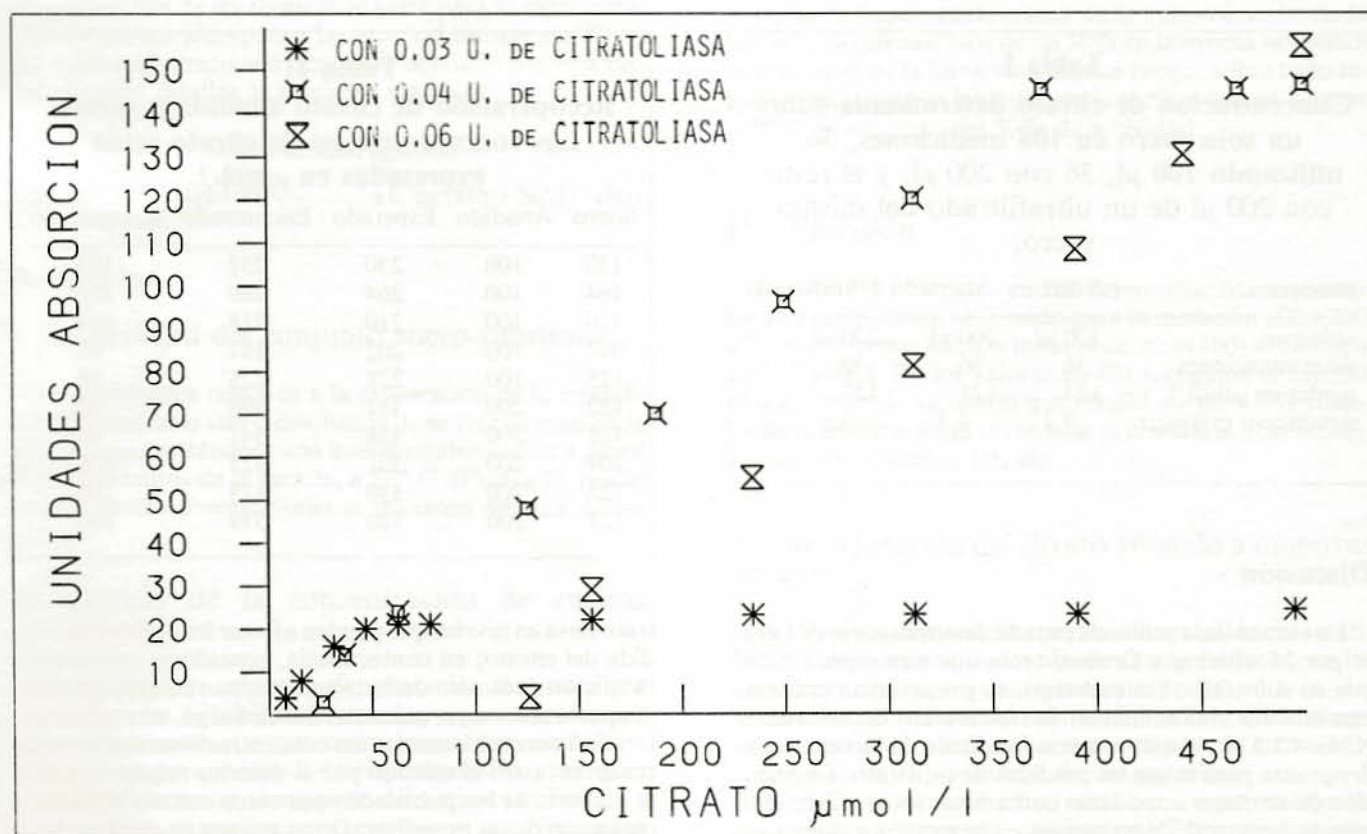


Figura 3. Relación entre decrementos en las unidades de absorción óptica a 340 nm y concentraciones de citrato añadido (μmol/l) para tres cantidades diferentes de enzima.

que no han dado detalles de su procedimiento¹¹. En nuestra publicación no se considera imprescindible la precipitación proteica y cuando se utilizó el dispositivo de ultrafiltración (Worthington "Ultrafree") recomendado por Tompkins y Toffaletti¹² se consiguió reducir el tiempo de estabilización del conjunto suero-disolución 1 hasta 3 minutos, sin modificarse los resultados finales. Estos autores consiguieron con la ultrafiltración que la reacción catalizada por la citrato liasa fuera completa en 2-3 minutos.

Por otra parte el pH utilizado en este trabajo se fijó en 7.8 aunque el pH óptimo para la actividad citrato liasa se estime en 8.2⁸, este mismo autor señala que los descensos estimados en la velocidad de reacción a pH 7.7 y 8.7 eran menores del 5% de la actividad máxima, lo permite poder trabajar en un amplio rango de pH.

En suma, nuestro método permite ser utilizado en laboratorios que disponiendo de analizador centrifugo requieren determinar seriadamente los valores de citrato, bien para determinaciones analíticas rutinarias bien para análisis experimentales.

Bibliografía

1. Srere P A. The molecular physiology of citrate. Nature 1965; 205:

766-770.

2. Thomassen A, Toftegaard-Nielsen T, Bagger J P, Charles P, Lovgreen N A, Sorensen N S. Circadian plasma citrate rhythms in juvenile diabetics. Acta Med Scand 1981; 210: 163-171.
3. Toftegaard-Nielsen T, Sorensen N S. Daily plasma citrate rhythms in man during feeding and fasting. Scand J Lab Invest 1981; 41:281-287.
4. Henriksen J M, Toftegaard-Nielsen T, Dahl R. Effects of physical training on plasma citrate and exercise-induced asthma. Scand J Clin Lab Invest 1981; 41: 225-229.
5. Toftegaard-Nielsen T, Thomsen P E B. Leg and splanchnic arteriovenous differences of plasma citrate in exercising man. Am J Physiol 1979; 46: 120-127.
6. Schira J C, Depierre D, Courvoisier. Dosage de la citratémie dans les cancérs avec métastases osseuses. Schweiz Med Wschr 1978; 108: 1656-1660;
7. Moellering H, Gruber W. Determination of citrate with citrate lyase. Analyt Biochem J 1966; 17: 369-376.
8. Toftegaard-Nielsen T. A method for enzymatic determination of citrate in serum and urine. Scand J Clin Lab Invest 1976, 36: 513-519.
9. Welshman S G, McCambridge H. The estimation of citrate in serum and urine using a citrate lyase technique. Clin Chim Acta 1973, 46: 243-246.
10. Zender R, Torrente C, Schneider U. Analyse du citrate plasmatique par voie enzymatique sans deproteination. Clin. Chim. Acta 1969; 24: 335-340.
11. Farnsworth M, Beardslee R. Citrate in serum or urine by enzymatic analysis. Clin Chem 1979; 25: 1157 (Abstract).
12. Tompkins D, Toffaletti J. Enzymic determination of citrate in serum and urine, with use of the Worthington "Ultrafree" device. Clin Chem 1982; 28: 192-195.