

ANÁLISIS SANGUÍNEO EX-VIVO DE POTASIO CON ELECTRODOS SELECTIVOS

CARBAJAL C.

Secc. Bioelectrónica
CINVESTAV - IPN

RESUMEN

Se describe un analizador automático para potasio, que utiliza un electrodo selectivo a circulación. El aparato incluye una microcomputadora basada en el controlador "8052". Efectúa una medición por minuto con muestras de 70 microlitros. También consta de autocalibración.

INTRODUCCION

Los instrumentos para análisis químico extracorpóreo de la sangre comercialmente disponibles incluyen algunos medidores de pO₂, pCO₂, y pH, unos pocos sistemas especiales que se utilizan durante la cirugía (1).

El número limitado de sistemas disponibles es debido en parte a la dificultad asociada al desarrollo de sensores que retengan su selectividad, sensibilidad y estabilidad durante la exposición prolongada al ambiente hostil que representa la sangre humana. Sin embargo, los sistemas de laboratorio para muestras discretas pueden controlar estrictamente la temperatura y agregar anticoagulantes.

Por el contrario, los sensores en contacto con el cuerpo humano deben funcionar bajo las condiciones impuestas por éste. Las diferencias se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 1. Condiciones de operación y ambientales para los sistemas in vitro e in vivo.

	in vitro	in vivo
control de temperatura	si	no
control del flujo	si	no
calibración del sistema	frecuente	una vez (previa)
limpieza del sensor	frecuente	no
tamaño el sensor	no hay límite	muy pequeño
tiempo expuesto a la muestra	minutos	horas/días
esterilización del sensor	no	si
muestra anticoagulada	si	no
medio físico	controlado	muy hostil (sin control)

M E T O D O L O G I A

Con el fin de evitar la exposición permanente de los sensores a la sangre, nosotros desarrollamos un instrumento que conserva las ventajas de la medida in-vitro, utilizando volúmenes pequeños de sangre en cada análisis (70 microlitros). La técnica de medida empleada es la de Análisis por inyección del fluido (FIA, fluid injection analysis). El instrumento es directamente aplicable durante los procedimientos de cirugía cardiopulmonar y de depuración sanguínea (diálisis), donde la sangre del paciente está disponible en un circuito extracorporeal.

La técnica consiste en inyectar rápidamente un volumen pequeño de la sustancia a analizar en un flujo de reactivo, de manera de insertar este volumen por desplazamiento del reactivo. Posteriormente, la sustancia inyectada puede ser tratada y transportada hasta la célula de medida. En contraste con el autoanalizador "Technicon", la FIA está basada en la formación de zonas de la sustancia a analizar bien definidas intercaladas dentro del flujo del reactivo.

Debido a la ausencia de burbujas de aire, el flujo es más regular y no hay efectos de compresión. A excepción del intervalo de tiempo necesario para el condicionamiento del sensor(es), el sistema está listo desde el instante en que la bomba (que genera el flujo) es puesta en marcha.

Además, como la reacción entre la muestra y el reactivo no alcanza siempre el equilibrio, la temporización exacta del ciclo es esencial. El tiempo transcurrido a partir de la introducción de la muestra hasta la medición es únicamente dependiente de la velocidad de bombeo, y a causa de la ausencia de burbujas de aire en el sistema, una buena reproductibilidad de la temporización es posible.

La dispersión controlada de la muestra, que se produce durante su pasaje a través del sistema, resulta en una curva típica de la FIA en el sensor (de forma gaussiana). La dispersión puede ser controlada en función de las necesidades de la técnica analítica (diámetro y longitud del tubo, volumen de la muestra y velocidad de bombeo).

La esencia de la técnica consiste en la conservación de la integridad de la muestra en el tubo, facilitando un mezcla controlada por difusión solamente. En efecto, el gradiente de concentración así formado es la llave de la información analítica. La experiencia debe desarrollarse bajo condiciones de flujo laminar.

Las partes esenciales de sistema de análisis por inyección del fluido son: un medio de propulsión del fluido, un sistema de inyección de la sustancia a analizar, el sensor y una parte encargada de la conformación de la señal proveniente del sensor. Evidentemente, existen varias posibilidades de combinar los componentes.

S O L U C I O N P R O P U E S T A

La figura 1 presenta un diagrama de la solución que nosotros proponemos. Se trata de un sistema automatizado en su integralidad. En la parte del ciclo correspondiente a la inyección de la muestra con ayuda de la bomba P1, la bomba P2 está detenida, las válvulas A1 y A3 están abiertas, mientras que las válvulas A2 y A4 están cerradas. Por el contrario, cuando el reactivo es impulsado con ayuda de la bomba P2, la bomba P1 está parada, A1 y A3 cerradas, A2 y A4 abiertas. La bomba P2 está colocada de manera de aspirar la solución a analizar (sangre) para evitar hemólisis.

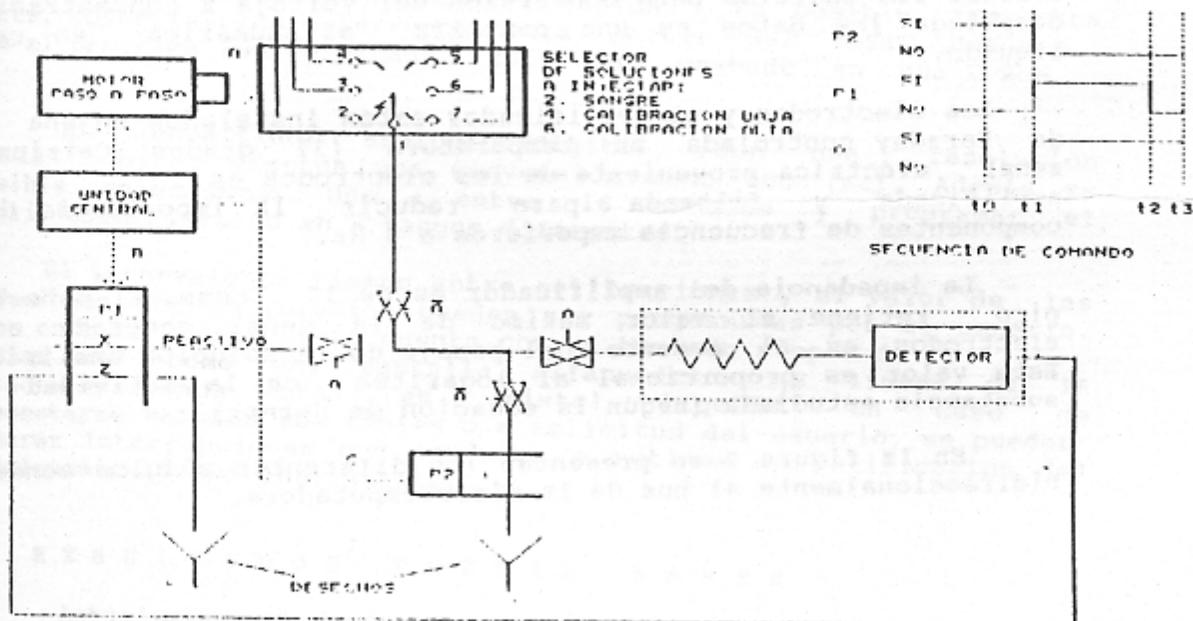


Figura 1. Esquema funcional del analizador sanguíneo ex-vivo

La bomba peristáltica P1, situada en el circuito de circulación principal, sirve para propulsar el reactivo y la muestra inyectada hasta el sensor. En virtud del número importante de rodillos de la bomba y a la ausencia de burbujas de aire, las pulsaciones del flujo no representan un problema.

CALIBRACION

El sistema cuenta con dos soluciones que son inyectadas siguiendo el mismo procedimiento que con la sangre. La selección de soluciones es hecha con una válvula de 6 vías, controlada con un motor a pasos (figura 1). Un canal suplementario de la bomba P1 es empleado para aspirar el fluido que ya pasó a través del sensor y enviarlo a un recipiente de desechos.

SENSORES

Consisten en electrodos selectivos para iones. Por el momento la célula cuenta solamente con un electrodo para Potasio, basado en la Valinomicina como agente activo disuelta en una membrana de PVC. El electrodo de referencia es del tipo Ag/AgCl. Ambos electrodos fueron fabricados en el Lab. de Electrodos selectivos de la Universidad de Nancy I, (Francia).

ELECTRONICA

Existe una unidad central encargada de la gestión del conjunto: adquisición del voltaje generado entre electrodos, comando del subsistema de selección de la solución a analizar, así como de las bombas y de la válvula de inyección. También realiza los cálculos para conversión del voltaje a concentración, y despliega los datos en una pantalla alfanumérica en cristal líquido.

Los electrodos y el amplificador están instalados en una jaula de Faraday controlada en temperatura (37 grados Celsius). La señal eléctrica proveniente de los electrodos es amplificada y filtrada para reducir la importancia de los componentes de frecuencia superiores a 5 Hz.

La impedancia del amplificador es de 10 ohms. El detector de pico retiene el valor máximo de la señal generada en los electrodos en el momento del pasaje de la solución analizada. Este valor es proporcional al logaritmo de la actividad de la sustancia estudiada (según la ecuación de Nernst).

En la figura 2 se presentan los diferentes módulos conectados bidireccionalmente al bus de la microcomputadora.

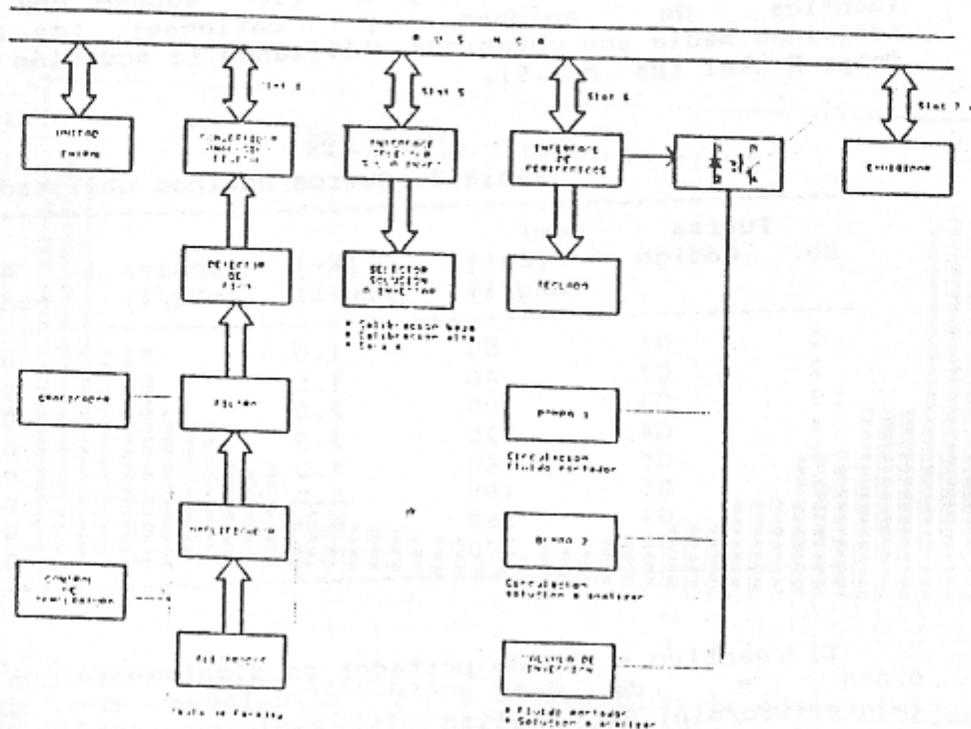


Figura 2. Diagrama eléctrico del analizador sanguíneo ex-vivo

El microcontrolador 8052H-BASIC fue escogido para la unidad por contar con un intérprete BASIC instalado en su ROM interna, lo cual permite una programación simple y rápida. La frecuencia relativamente alta del reloj permite ejecutar programas de gestión de procesos relativamente rápida. Es posible, por otra parte, controlar las interrupciones a partir del BASIC. Una vez que el programa fue terminado, éste fue grabado en una EPROM.

El convertidor analógico/digital, con una resolución de 12 bits, efectúa una conversión cada 100 (ms). Además es posible seleccionar uno entre 16 canales y programar el amplificador interno en 8 rangos diferentes.

El intervalo de tiempo entre calibraciones y el valor de las soluciones de calibración pueden ser programadas por el usuario. Para esto el instrumento cuenta con un teclado simple de 12 teclas así como una pantalla alfanumérica (2 líneas de 16 caracteres cada una) en cristal líquido. En caso de presentarse valores aberrantes o a solicitud del usuario, se pueden generar interrupciones que conducen a rutinas de verificación del funcionamiento del instrumento.

RESULTADOS PRELIMINARES

Actualmente el instrumento es capaz de realizar una medida cada minuto con 70 microlitros de la sustancia a analizar. Se están efectuando mejoras que creemos nos permitirán realizar medidas con 20 microlitros.

Con el fin de controlar la calidad de las medidas se utilizó una gama de sueros bovinos preparados por BIOFRANCE, S.A. cuyas concentraciones iónicas de Sodio y Potasio eran conocidas. El cálculo de la fuerza iónica fue hecho tomando en consideración las concentraciones de Na y K (se supuso una concentración idéntica de aniones y cationes). Los coeficientes de actividad media son obtenidos utilizando la ecuación de Debye-Hckel ($Ba = 1.5$).

Tabla 2. Sueros bovinos utilizados

No.	Fuerza Código	Coef. [Na+] (mEq/l)	[K+] (mEq/l)	Iónica (mEq/l)	Act. media	(K+) (mEq/l)
1	G1	50	1.0	51	0.82	0.8
2	G2	80	1.5	82	0.79	1.2
3	G3	100	2.0	102	0.78	1.6
4	G4	120	3.0	123	0.76	2.3
5	G5	140	4.0	144	0.75	3.0
6	G6	160	6.0	166	0.74	4.5
7	G7	180	8.0	188	0.73	5.9
8	G8	200	16.0	216	0.72	11.6

El reactivo o fluido portador es simplemente una solución de 0.050 M de CaCl₂ y circulando con gasto de 500 (microlitro/min). Se realizó la medición del voltaje entre electrodos para los 8 sueros bovinos, efectuando tres repeticiones para cada uno.

Se obtuvo correlación lineal estrecha entre el logaritmo de la actividad iónica del suero y el voltaje, y la pendiente tuvo el valor predicho por la ecuación de Nernst para la temperatura. De modo que esta recta puede usarse para la determinación del Potasio (ver figura 3).

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

El analizador es un autómata convivial, de fácil empleo. Por otra parte, la termostatación fue fácil debido a la talla reducida de los electrodos. Como los líquidos son transportados a lo largo de las canalizaciones, el enjuague de los electrodos es realizado de una manera bastante eficaz. (Los electrodos están en contacto con la sangre solamente 15 segundos y durante 45 con el reactivo).

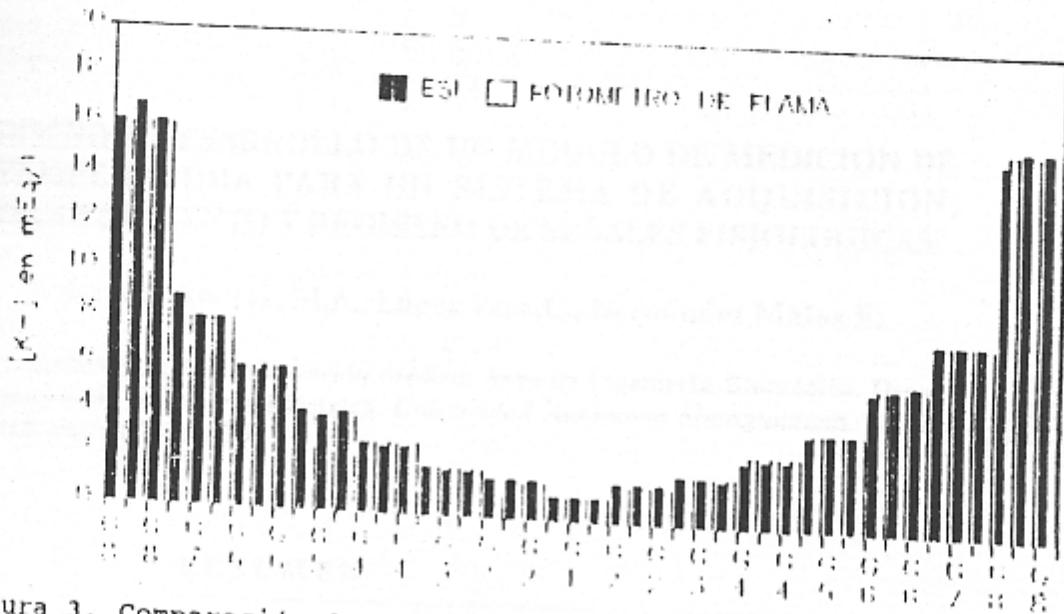


Figura 3. Comparación de resultados de medición de concentración de K+ entre el analizador sanguíneo con electrodos selectivos y el metodo de referencia(espectrofotometro de flama).

Es previsible que en los próximos años se incremente mucho la utilización de procedimientos quirúrgicos y de técnicas de depuración que impliquen determinaciones químicas como la realizada con el instrumento desarrollado, si bien existen aún mucho problemas técnicos que resolver de los electrodos selectivos.

REFERENCIAS

1. Fogt EJ. Clin Chem 1990;36(8B):1573
2. Betteridge D. Anal Chem 1978;50:832A
3. Carbajal CS. Contribution a l'automatisation des analyseurs cliniques a electrodos selectives.Tesis de Doctorado.Universidad de Nancy I, Francia 1990.