Controlli necessari per i reattivi chimici ad uso chimico-clinico

B. ROCCHI

Laboratori di controllo Carlo Erba S.p.A., Milano

Premessa

Lo scopo di questo intervento è quello di inquadrare il tema del controllo dei reattivi; è quindi opportuno chiarire quali sono gli elementi che rendono razionali, efficaci e sicuri i controlli analitici e, prima ancora, precisare il nome da attribuire ai prodotti chimici puri ed ai prodotti in soluzione o comunque preparati per la diretta utilizzazione analitica. Questa distinzione va fatta per sgomberare il campo dalla confusione che può insorgere se si impiegassero indifferentemente gli stessi termini per le due diverse serie di prodotti destinati alle operazioni analitiche. Chiamerò quindi prodotti chimici le sostanze pure, e reattivi le soluzioni o preparazioni pronte per l'impiego diretto nelle tecniche analitiche specifiche.

In una moderna organizzazione aziendale in genere il controllo di qualità va concepito a svolgimento integrale: ha inizio con il controllo di tutte le materie prime, secondo norme già predisposte e prosegue con il controllo dei processi produttivi, in particolare di quelle fasi che sono determinanti per il livello di qualità del prodotto finito. Solo seguendo in modo sistematico ogni fase della produzione, controllando cioè i parametri più significativi del prodotto, si potrà ottenere un prodotto finito di qualità corrispondente alle caratteristiche prefissate, e cioè conforme alle esigenze d'uso.

Non è quindi possibile parlare, nel nostro caso, dei reattivi se prima non si sono ben definite le caratteristiche dei prodotti chimici che costituiscono le materie prime corrispondenti.

Prodotti chimici

La purezza dei prodotti chimici è soprattutto legata ai limiti di sensibilità dei mezzi analitici e strumentali oggi disponibili. I metodi di controllo disponibili ed i limiti della loro sensibilità (Tab. 1) garantiscono la valutazione di gradi di purezza spinti fino a limiti estremi.

**Tecniche analitiche di alta sensibilità per il controllo di routine
di prodotti chimici ad uso scientifico**

T E C N I C A	LIMITI DI SENSIBILITÀ SULLE SOLUZIONI IN ESAME	
Colorimetria	0,01	p.p.m.
Spettrofotometria U.V.	1	p.p.m.
Spettrofotometria ad assorbimento atomico	0,01	p.p.m.
Spettrofluorimetria	0,00001	p.p.m.
Polarografia	1	p.p.m.
Cromatografia su strato sottile	1	p.p.m.
Gas-cromatografia a ionizzazione	0,1	p.p.m.
Gas-cromatografia a cattura di elettroni	0,001	p.p.m.

Le impurezze svelabili con questi mezzi vanno eliminate, e la loro eventuale presenza residua va determinata quantitativamente.

I metodi attualmente usati per purificare i reagenti sono: 1) operazioni chimiche e fisiche preliminari quali precipitazioni, neutralizzazioni, ossidazioni, riduzioni, filtrazioni, adsorbimento su supporti solidi, ecc.; 2) cristallizzazione; 3) distillazione e rettifica; 4) distillazione con setacci molecolari; 5) distillazione molecolare; 6) purificazione con gas-cromatografia preparativa; 7) purificazione con fusione zonale; 8) sublimazione. Si può valutare facilmente che i mezzi strumentali disponibili in un comune laboratorio per la purificazione di solventi e di sali non sono adeguati alle moderne esigenze.

Nel campo chimico-clinico, sono ormai numerose le tecniche analitiche richiedenti l'impiego di strumentazione complessa, il cui buon funzionamento deve essere verificato mediante l'impiego di prodotti chimici e di soluzioni di riferimento di adeguata purezza.

Queste soluzioni sono utilizzate per la « taratura » o « calibrazione » degli strumenti di misura; poichè esse debbono dare una garanzia assoluta è necessario disporre per la loro preparazione di prodotti chimici caratterizzati da un grado di purezza elevato e costante.

Fra gli strumenti che richiedono una taratura ricorderò il potenziometro. Non è concepibile misurare il pH senza taratura preliminare dello strumento con appropriate soluzioni di riferimento di pH noto da prepararsi secondo formule consacrate dai testi più accreditati. La preparazione delle soluzioni di riferimento richiede accorgimenti particolari, quali la miscelazione dei sali secondo rapporti stechiometrici molto precisi, il controllo dell'assenza di acqua nel caso di reagenti anidri o del contenuto in acqua nel caso di rea-

genti con acqua di cristallizzazione, l'impiego di acqua rigorosamente deionizzata e priva di anidride carbonica, ecc.

I contenitori devono essere generalmente di vetro resistente all'idrolisi, che non ceda facilmente ioni di metalli alcalini e silice ma nel caso dei prodotti chimici e dei reattivi alcalini, debbono essere invece di plastica, data l'azione corrosiva esercitata dagli alcali nei confronti dei recipienti di vetro. La prevenzione degli inquinamenti da batteri e da muffe richiede spesso una sterilizzazione preliminare alla conservazione.

Anche per i dosaggi fotometrici è indispensabile ricorrere a sostanze di riferimento aventi un grado di purezza elevato e chiaramente definito: fra di esse basterà citare a titolo di esempio il colesterolo e la bilirubina.

Il colesterolo va purificato mediante preparazione del bromo-derivato, con saturazione del doppio legame in posizione 5-6, e successive purificazione e idrolisi del derivato ottenuto. Oltre a controllare le costanti fisiche del colesterolo, come il punto di fusione (da misurarsi preferibilmente con un calorimetro differenziale) e il potere rotatorio, è anche necessario verificare la sua purezza cromatografica mediante una tecnica su strato sottile, ed eventualmente mediante il gas-cromatografo. È inoltre necessario saggiare il suo potere cromogeno con reazioni adatte. La bilirubina, la cui caratteristica di purezza è verificabile in base all'assorbimento a 542 nm, deve avere un $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ compreso fra 59.100 e 62.300. Analoghe garanzie di purezza vanno previste per tutte le altre sostanze chimiche da impiegarsi come standard di riferimento.

Nelle determinazioni fotometriche la comparsa di colorazioni anormali è frequentemente legata alla presenza di impurità: il grado di purezza dei prodotti chimici impiegati dev'essere tale da evitare o da mantenere entro limiti prefissati le interferenze, come pure l'eventuale colorazione dei «bianchi».

Per le misure spettrofotometriche in solventi, è necessario conoscere e controllare l'assorbimento dato dal solvente puro impiegato alle lunghezze d'onda utilizzate per la misura. Sono oggi disponibili in commercio solventi dotati di altissima trasparenza fino al lontano U.V. Per alcune determinazioni fluorimetriche sono anche previsti solventi esenti da fluorescenza, fino a garantire un limite massimo di impurezze fluorescenti, espresse in chinino, inferiore a 10^{-10} M.

Nel caso dei prodotti chimici impiegati per preparare reattivi destinati alle analisi chimico-cliniche, è opportuno conoscere quali impurezze possono interferire nell'impiego analitico. Ad esempio, l'acido acetico glaciale per analisi chimico-cliniche dev'essere privo di acido gliossilico, di aldeidi e di anidride acetica. Conciliare l'elevato grado di stato anidro con l'assenza di anidride è un problema tecnico che può essere risolto solo mediante speciali accorgimenti.

Dopo aver definito il grado di purezza dei prodotti chimici in funzione dell'impiego a cui essi sono destinati, occorre garantirsi che questa caratteristica di purezza venga mantenuta nel tempo. La purezza è costante nel tempo quando il prodotto chimico è stabile. La stabilità dev'essere verificata a sua volta nei confronti di tutti i fattori che potrebbero comprometterla: il calore, l'aria, l'umidità, la luce, le impurezze contenute nel prodotto, le impurezze e le cessioni chimiche del contenitore, ecc.

In alcuni casi può essere opportuno stabilire dei limiti di tempo per la stabilità del prodotto, ma tale sistema non è il più soddisfacente.

I sali e le sostanze igroscopiche vanno confezionati e conservati in modo da proteggerli dall'umidità atmosferica, il cui assorbimento, oltre che dell'alterazione del titolo, è assai spesso anche responsabile di alterazioni chimiche (idrolisi, ossidazioni, ecc.).

Nel caso di prodotti chimici alterabili è necessario procedere il più delle volte alla loro « stabilizzazione ». La scelta dello stabilizzante va effettuata tenendo presenti, oltre ai criteri di efficacia, quelli di non interferenza nell'impiego del prodotto e, all'occorrenza, di una sua facile eliminazione in occasione dell'impiego. Le aggiunte di stabilizzante vanno comunque sempre dichiarate in etichetta, con il loro nome chimico e con la percentuale presente. Un'adeguata stabilizzazione può anche essere ottenuta mediante semplici accorgimenti nel corso del confezionamento. Ad esempio il fenolo tende per sua natura a colorarsi nel tempo per effetto dell'ossigeno dell'aria e di inevitabili ed infinitesime impurezze che possono essere cedute dai contenitori in vetro; la condizione migliore per preservarlo dall'alterazione di colore senza impiegare stabilizzanti, è quella di distillare il prodotto direttamente entro il contenitore e lasciarlo solidificare nel suo interno: l'aria influirà solo sulla superficie superiore, e il vetro non potrà influire sulla massa di fenolo posta all'interno del contenitore. Altro accorgimento, quando l'aria fosse responsabile di alterazioni, è il confezionamento del prodotto con protezione di gas inerte, ad esempio azoto.

Reattivi

La preparazione dei reattivi presuppone una conoscenza approfondita del metodo analitico al quale il prodotto è destinato. I metodi analitici ad uso clinico sono numerosi, e sono basati frequentemente su principi diversi. Mentre la scelta e la raccomandazione dei metodi più idonei è di pertinenza di apposite commissioni, esistenti o da istituirsi a livello nazionale e internazionale, è invece preciso compito del produttore dei reattivi garantire che questi corrispondano esattamente alle esigenze specifiche del metodo.

Il reattivo deve essere preparato con prodotti chimici appositamente preparati e purificati, operando nelle condizioni più idonee. È necessario scegliere in modo razionale il materiale dei contenitori impiegati, control-

lare in modo sistematico le caratteristiche dei diluenti e il rapporto di diluizione determinando l'esatto titolo della soluzione; questo titolo va frequentemente ricontrollato specie quando si tratta di soluzioni igroscopiche o di limitata stabilità.

L'intera serie di soluzioni o di reattivi destinati ad una determinata operazione analitica va controllata globalmente in laboratorio mediante una determinazione sperimentale relativa alla sostanza da dosare.

Le operazioni di controllo vanno condotte sistematicamente per ogni lotto di reattivi al momento del loro collaudo, e vanno ripetute periodicamente per verificarne la stabilità.

Il controllo dev'essere effettuato mediante determinazioni specifiche da condurre su campioni di riferimento. Per le tecniche fotometriche dovranno essere controllate almeno tre concentrazioni diverse dello standard, come anche il valore fornito dalla prova in bianco; verrà così verificata, ove prevista, la linearità della curva fotometrica e verrà controllato il coefficiente di estinzione ottica per unità di sostanza dosata. Ovviamente, se il metodo è stato opportunamente scelto, il coefficiente di estinzione dovrà avere un valore sufficientemente elevato, onde consentire una precisione ed un'accuratezza di misura soddisfacenti. L'estinzione data dal «bianco», infine, dovrà essere tale da non compromettere l'esattezza delle misure.

Come campioni di riferimento vengono usate soluzioni di sostanze pure, oppure sieri di controllo. Mentre soluzioni di sostanze pure presentano il vantaggio di una composizione costante ed esattamente nota, i sieri di controllo hanno ben difficilmente una composizione uniforme, ma in compenso, a differenza delle soluzioni pure, presentano caratteristiche di «ambiente» simili molto più a quelle dei substrati biologici da analizzare.

I reattivi destinati ad essere impiegati negli analizzatori automatici richiedono l'esecuzione di controlli specifici con i medesimi analizzatori. Per il collaudo di questi reattivi è necessario che gli intervalli di valore registrati sul grafico e riferiti a quantità scalari della sostanza da determinare siano sufficientemente ampi, in modo da garantire un basso coefficiente di errore di lettura.

Conclusioni

La preparazione di un reattivo ad uso chimico-clinico dev'essere effettuata tenendo conto delle esigenze di impiego. Ciò presuppone la conoscenza delle metodologie in uso, sia nei loro aspetti tecnologici, sia nei loro principi teorici.

Un controllo efficace della qualità richiede una definizione chiara e razionale delle caratteristiche richieste, che riguardano in modo particolare la purezza chimica dei prodotti impiegati e l'esatta funzionalità dei reattivi, in un preciso controllo effettuato su soluzioni di riferimento. Il prodotto chi-

mico usato come reagente dev'essere purificato in modo da corrispondere a quei parametri che maggiormente influenzano o che caratterizzano la reazione, ed il reattivo va poi controllato in modo sistematico, mediante l'esecuzione di determinazioni sperimentali, condotte in relazione all'uso, con metodi manuali o con metodi automatici.

In un campo di attività tanto delicato come quello delle analisi chimico-cliniche, la produzione dei reattivi dev'essere effettuata con estrema razionalità, e i reattivi devono essere sottoposti a controlli analitici multipli, utilizzando parametri specifici e significativi. La preparazione dei reattivi richiede una esperienza tecnica e scientifica specifica, e un senso di responsabilità non inferiore a quello richiesto per la produzione dei farmaci.