

ARTÍCULOS ORIGINALES

Evaluación de un método directo para la determinación de hierro (II+III) con ferrozina modificado con tiourea

J. L. Castaño Vidriales^a, J. L. Araquistain Alcain^b, C. Amores Antequera

Resumen

Se ha efectuado una evaluación de un método directo para la determinación de hierro (II+III) con ferrozina modificado con tiourea para eliminar la contaminación producida por el ión cobre (II), estudiando los siguientes aspectos: imprecisión intraserial e intermuestral, recuperación, contaminación entre reactivos y correlación con el método ferrozina sin modificar. Asimismo, se ha determinado la concentración mínima de tiourea (0,39 mol/L) necesaria para eliminar la contaminación entre reactivos producida por los iones cobre (II) contenidos en el reactivo utilizado para determinar proteína en el analizador ERIS-6170.

Summary

We have evaluated the ferrozine method modified with thiourea for iron (II+III) assay in order to prevent copper (II) interference. We have studied the following aspects: inter-run and intra-run imprecision, recovery, analytical range, sample to sample carryover and between-reagents carryover. We have studied the correlation between the ferrozine method and the ferrozine with thiourea method. Also, we have studied the minimal concentration of thiourea (0,39 mol/L) necessary to prevent the between-reagents carryover that copper (II) reagent for protein determination in biuret method produces in iron (II+III) determination using the ERIS-6170 analyzers.

Introducción

Para la determinación en suero del hierro (II+III) se han utilizado diversos métodos: espectrometría de absorción atómica, métodos electroquímicos y, los más utilizados, espectrometría óptica de absorción molecular («métodos colorimétricos»)(^{1,3}). Entre estos últimos, existen dos grupos: métodos indirectos, basados en la precipitación ácida de las proteínas o la diálisis del suero, y métodos directos: donde un detergente solubiliza tanto las proteínas como el complejo coloreado(¹).

Los compuestos con el grupo reactivo «ferroína», =N—C—C—N=, forman complejos coloreados con el ión hierro (II)(^{1,2}). Los cromógenos más utilizados y con un mayor coeficiente de absorción molar son: batofenantrolina, 2,4,6-tripiridil-S-triazina (TPTZ), terosita, ferrozina(^{4,5}) y fereno S(¹⁻⁶).

La interferencia producida por el cobre (II) en los sustratos cromogénicos para la determinación de hierro (II+III)(^{5,6,7}), es importante en situaciones que cursan con concentraciones séricas de hierro (II+III) disminuidas y elevadas de cobre (II) (embarazo, linfomas) y también en análisis automatizado, en el que se pueden producir contaminaciones entre reactivos(⁸). Se han descrito compuestos como ácido tioglicólico, neocuproína o tiourea, capaces de disminuir dicha interferencia(^{5,6,7}).

Continuando los estudios para la determinación de hierro (II+III) realizados por los autores(^{9,10}), en el presente trabajo, se ha realizado una evaluación de un método directo con ferrozina modificado con tiourea para eliminar la interferencia producida por el cobre (II).

^aHospital do Meixoeiro. Vigo.^bAmbulatorio Virgen Peregrina de Pontevedra.

Recibido 14/6/89

Aceptado 22/12/89

Material y métodos

Instrumentación

Analizador ERIS-6170 (Merck-Olympus-Eppendorf), equipado con procesador de datos e impresora Epson EX-800.

Reactivos

Se ha utilizado el reactivo para la determinación de hierro (II+III) por el método de ferrozina directo «ERIS-test hierro» (Merck, art. 19725), y el reactivo para la determinación de proteína «ERIS-test proteína» (Merck, art. 19703), método del biuret; también se han utilizado las sustancias puras de grado analítico siguientes: tiourea, (Merck, art. 7979), sulfato cúprico (Probus) y sal de Mohr (sulfato ferroso y amonio hexahidratado, Probus); así como los sueros control: Seronorm (Merck, art. 15016, lote 21) y Pathonorm L (Merck, art. 15015, lote 20).

El método «ERIS-test hierro» se basa en la liberación del hierro (III) unido a la transferrina mediante el clorhidrato de guanidina y reducción con ácido ascórbico a hierro (II) el cual forma con ferrozina un complejo rojo. La intensidad de color formado es directamente proporcional a la concentración de hierro (II+III) en la muestra.

Resultados

Especificidad del método de determinación de hierro (II+III)

Para evaluar la especificidad de la determinación del hierro (II+III) con el método ferrozina respecto al cobre (II) se prepararon nueve soluciones de cobre (II) con un intervalo de concentraciones desde 0 a 2550 $\mu\text{mol/L}$, efectuando a partir de una solución madre de 2550 $\mu\text{mol/L}$ las siguientes diluciones: 3:4, 1:2, 1:3, 1:4, 1:8, 1:16 y 1:32; y analizando la solución madre, las siete diluciones y el diluyente para determinar la respuesta en forma de hierro (II+III) (figura 1, curva 1).

Especificidad del método modificado con tiourea

Se tomaron cinco reactivos «ERIS-test hierro» añadiendo a cada uno de ellos, respectivamente, soluciones crecientes de tiourea: 0; 0,13; 0,26; 0,39; 0,53 mol/L⁽¹⁰⁾. Se analizan las nueve soluciones de cobre (II) del apartado anterior, procesándolas como muestras, determinando la respuesta que en forma de hierro (II+III) se obtienen utilizando los reactivos ferrozina modificados con tiourea (figura 1, curvas 2-5).

Usando el reactivo «ERIS-test hierro» modificado mediante la adición de 0,39 mol/L de tiourea, se han realizado los siguientes procedimientos de evaluación.

Imprecisión intraserial e interserial

Se estudiaron a tres concentraciones, analizando el

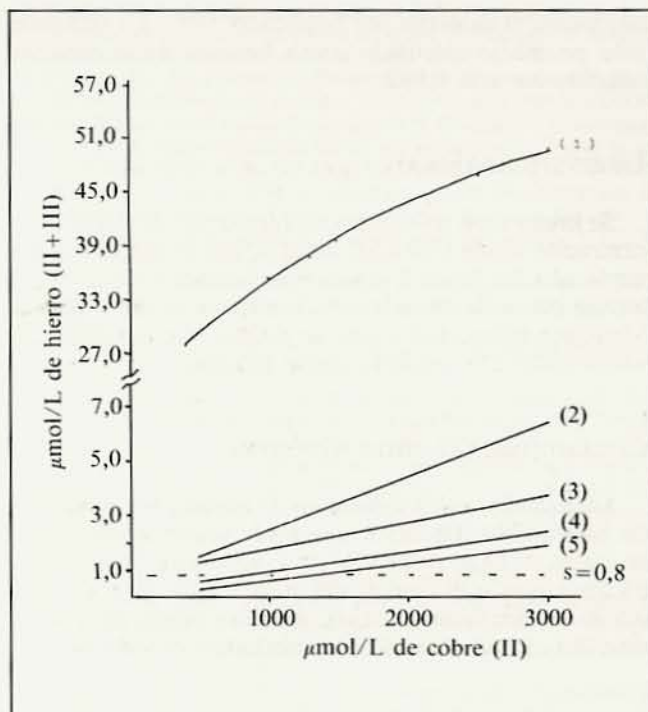


Figura 1. Curva 1: efecto del cobre (II) sobre el reactivo de ferrozina sin tiourea. Curva 2-5: efecto del cobre (II) sobre el reactivo de ferrozina modificado con las siguientes concentraciones crecientes de tiourea: 0,13; 0,26; 0,39; 0,53 $\mu\text{mol/L}$.

mismo suero de control 20 veces consecutivas y durante 10 días respectivamente^(11,12,13) (tabla I).

Recuperación

Partiendo de una solución de 855 $\mu\text{mol/L}$ de hierro (II) se añaden 17,9; 35,8 y 53,7 $\mu\text{mol/L}$ (0,1; 0,2 y 0,3 ml respectivamente) a alícuotas de 4,7 ml del mismo suero, que después de igualarlas en volumen (hasta 5 ml) con agua

Tabla I
Imprecisión intraserial

n	\bar{x} ($\mu\text{mol/L}$)	s ($\mu\text{mol/L}$)	CV (%)
20	16,9	0,6	3,55
20	24,8	0,3	1,21
20	36,3	0,7	1,93

Imprecisión interserial

10	16,5	0,4	2,42
10	23,8	0,8	3,36
10	32,8	0,4	1,22

Pie de tabla I

n = número de datos

\bar{x} = media

s = desviación estándar

CV = coeficiente de variación

EA= error aleatorio

destilada, se analizan por triplicado^(12,15,16). La recuperación promedio calculada como fracción de la cantidad añadida ha sido 0,982.

Intervalo analítico

Se prepararon soluciones de hierro (II) de distinta concentración desde 17,9 a 537 $\mu\text{mol/L}$ que se analizaron por triplicado. La figura 2 es una representación de la absorbancia obtenida de cada solución frente al valor teórico. Mediante inspección visual se estima que el método es lineal hasta 537 $\mu\text{mol/L}$, como mínimo.

Contaminación entre muestras

Analizando cuatro soluciones de elevada concentración de hierro (II+III) (35,8 $\mu\text{mol/L}$), seguidas de cuatro muestras de agua destilada^(11,16) y calculando la contaminación como la diferencia del primer valor bajo y la media de los dos últimos bajos, dividido por la concentración del último alto, el valor obtenido ha sido cero.

Contaminación entre reactivos

La contaminación entre reactivos⁽¹⁷⁾ que se produce al determinar en un suero hierro (II + III) cuando previamente se ha determinado proteína por el método del biuret⁽¹⁰⁾ se ha estudiado utilizando tanto el reactivo de ferrozina como el reactivo de ferrozina modificado con 0,39 mol/L de tiourea, sometiendo a una misma muestra de suero control al siguiente proceso^(10,17):

a) Se determinó el hierro (II + III) en 10 alícuotas del suero control y se calculó la media de la serie (\bar{x}_{Fe}).

b) Se determinaron en 10 alícuotas alternativamente proteína y hierro (II + III), y se calculó la media de las concentraciones del hierro (II + III) tras las determinaciones de proteína ($\bar{x}_{(\text{P})\text{Fe}}$).

c) Se compararon los valores de las dos medias (x_{Fe} y $x_{(\text{P})\text{Fe}}$) y la diferencia se calculó como fracción de contaminación entre reactivos (C_1) usando la siguiente fórmula:

$$C_1 = \frac{\bar{x}_{(\text{P})\text{Fe}} - \bar{x}_{\text{Fe}}}{\bar{x}_{\text{Fe}}}$$

Los resultados obtenidos, se indican en la tabla II.

Comparación con el método no modificado

Se ha efectuado un estudio de comparación entre los resultados obtenidos en 60 sueros de pacientes con el método con ferrozina y el método con ferrozina modificado con tiourea (concentración de hierro (II + III) en las muestras desde 3 a 45 $\mu\text{mol/L}$), evaluando la commutabilidad de ambos métodos a través de la regresión no paramétrica de Passing-Bablok⁽¹⁸⁾ obteniéndose la siguiente ecuación:

$$y = 0,989 x - 0,76$$

con unos intervalos de confianza al 0,95 de la pendiente de 0,970 a 1 y para la ordenada en el origen de -0,98 a -0,46 y donde y = método ferrozina con tiourea ($\mu\text{mol/L}$) x = método ferrozina ($\mu\text{mol/L}$).

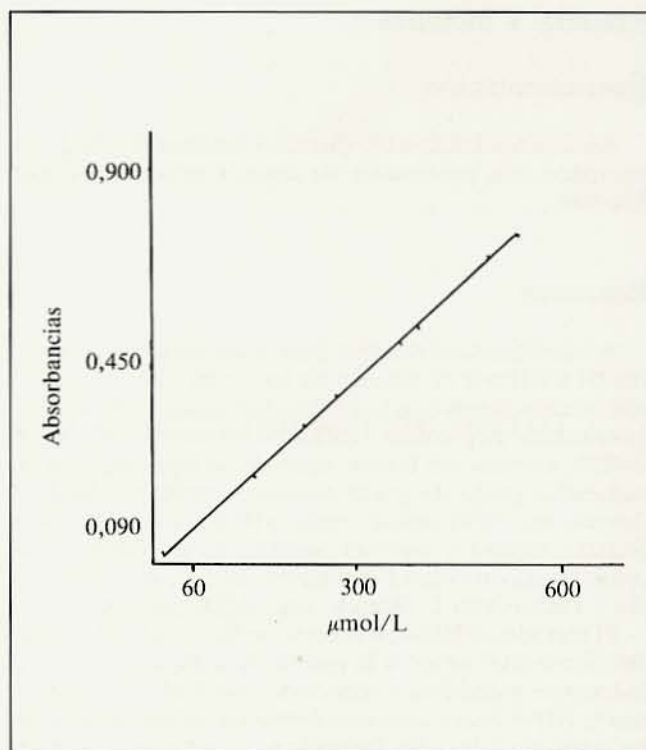


Figura 2. Linealidad

Discusión

La interferencia producida por el cobre (II) en la determinación del hierro (II + III) con ferrozina ha sido ampliamente estudiada⁽⁵⁻⁷⁾ produciéndose un complejo cobre (II)-ferrozina con un 10 % del coeficiente de absorción molar producida por el complejo hierro (II)-ferrozina⁽⁷⁾, y es importante no sólo debido al cobre (II) del propio suero, sino también en casos como el descrito previamente⁽¹⁰⁾ en que se produce una contaminación entre reactivos.

La tiourea se ha utilizado para eliminar la interferencia producida por el ión cobre (II), el cual según Ra-

Tabla II
Contaminación entre reactivos

	Ferrozina	Ferrozina-tiourea
n	9	9
\bar{x}_{Fe} ($\mu\text{mol/L}$)	132	131
$\bar{x}_{(\text{P})\text{Fe}}$ ($\mu\text{mol/L}$)	202	134
s_{Fe} ($\mu\text{mol/L}$)	2	1,2
$s_{(\text{P})\text{Fe}}$ ($\mu\text{mol/L}$)	4,4	1,7
td	45,8	4,6
P	<0,01	<0,01
C_1	0,53	0,02

n = número de datos

\bar{x}_{Fe} = media sin posible contaminación

$\bar{x}_{(\text{P})\text{Fe}}$ = media tras la determinación de proteína

s_{Fe} = desviación estándar de los valores sin posible contaminación

$s_{(\text{P})\text{Fe}}$ = desviación estándar tras la determinación de proteína

td = resultado de la prueba t ($p < 0,01$)

P = Grado de significación estadística de las diferencias

C_1 = Contaminación entre reactivos

tajczak⁽¹⁹⁾ en presencia de un exceso de cuatro a cinco veces de tiourea, es reducido, formándose posteriormente un complejo cobre (I)-tiourea^(7,19).

En el presente trabajo se ha estudiado el uso de tiourea para eliminar la interferencia producida por el cobre (II) hasta una concentración de 2550 $\mu\text{mol/L}$, cien veces superior a la habitualmente presente en un suero y debida a la contaminación que se produce cuando después de determinar proteína en un suero, por el método del biuret, se determina el hierro (II+III) con un método directo con ferrozina en el analizador ERIS-6170. Los resultados obtenidos son inferiores a los obtenidos en el método ferrozina directo⁽¹²⁾ y con unos errores aleatorios inferiores a los errores permisibles médicamente recomendados⁽¹⁵⁾, por los distintos autores^(4,6) $\mu\text{mol/L}$ según la reunión de Aspen⁽¹⁹⁾.

Se ha decidido utilizar una concentración de 0,39 mol/L de tiourea en el reactivo de ferrozina modificado, porque es la concentración mínima que cumple el criterio de rebajar la interferencia por el cobre (II) a menos de una vez la máxima desviación estándar del método modificado (0,8 $\mu\text{mol/L}$), cuando se analiza el reactivo para determinar proteína (biuret) con una concentración de cobre (II) de 394 $\mu\text{mol/L}$ (concentración a la que se atribuye la contaminación interreactivos⁽¹⁰⁾) (Figura 1).

En el estudio de comparación de métodos se obtienen resultados significativamente menores para el reactivo modificado con tiourea (diferencia constante = 0,76 $\mu\text{mol/L}$) diferencia que como demostraron Duffy y Gaudin⁽⁷⁾ es debida al cobre de los propios sueros, ya que los valores obtenidos con el método ferrozina directo incluyen el hierro (II+III) y el cobre (II); y por el contrario, la tiourea consigue enmascarar el cobre mediante reducción y complejación.

Por todo lo comentado, se recomienda a los posibles usuarios del analizador ERIS-6170, reformular el reactivo para la determinación de hierro (II+III) mediante la adición de 0,39 mol/L de tiourea, para eliminar la posible interferencia debida al cobre (II) y, a los usuarios de métodos con ferrozina automatizados, que estudien esta posible contaminación que también ha sido descrita en otros analizadores como los Hitachi⁽⁸⁾

- Bakker AJ, Lerk R, Reitsma F, Reitsma B, Vrij V. Determining iron without copper interference from carryover of total protein Reagent in Hitachi Analyzers. *Clin Chem* 1988; 11: 2376.
- Castaño JL, Araquistain JL. Determinación de hierro sérico: Estudio de correlación de dos métodos. *Análisis Clínicos* 1988 51: 134-136.
- Araquistain JL, Castaño JL, Gutierrez B, Gonzalez I. Contaminación en la determinación de hierro por el reactivo de Biuret en un analizador ERIS-6170. *Rev Diag Biol* 1989; 38: 76-77.
- Barnett RN, Youden WM. A revised scheme for the comparison of quantitative methods. *Amer J Clin Payhol* 1970; 54: 545-462.
- Castaño JLV, Araquistain JLA. Evaluación del analizador ERIS-6170. *Química Clínica* 1988; 7: 83-95.
- Barnett RN, Weisbrot JM. Selección de métodos En: Barnett RN, dir. *Estadística en el laboratorio clínico*. Barcelona: Reverté, 1983; 150-164.
- White GH, Frasser CG. The evaluation kit for clinical chemistry. *J Autom Chem* 1984; 6: 122-141.
- Neil CR, Garber CC. Evaluación de métodos En: Kaplan AL, Pesce JA, dirs. *Química Clínica, teoría análisis y correlación*. Buenos Aires: Ed. Médica Panamericana, 1986; 392-417.
- Peters T, Westgard JO. Evaluation of methods En: Tietz NW dir. *Textbook of clinical chemistry*. Philadelphia: Saunders, 1986: 410-423.
- Naudin C, Vassault A, Truchard A. SFBC Protocol étude de la contamination dans les analyseurs biochimiques. *Ann Biol Clin* 1988; 46: 213-219.
- Passing H, Bablok W. Comparison of several regresió procedures for method comparison studies and determiantion of samples sizes. Application of liner regresion procedures for method comparison studies in clinical chemistry. Part II. *J Clin Chem Clin Biochem*, 1984; 22: 431-445.
- Ratajczak HM, Pajdowski L. The system copper (II)-thiourea in 0,1 N nitric acid. *J Inorg Nucl Chem* 1974; 36: 459-461.
- Elevitch FR. CAP Aspen conference 1976: analytical goals in clinical chemistry. Skokie: College of American Pathologists, 1977.

Bibliografía

- Weissman N, Pigezzi VJ. Iones inorgánicos. En: Henry RJ, Cannon DC, Winkelman JW dir. *Química clínica. Bases y técnicas*. Barcelona: Jims, 1980: 643-762.
- Fairbanks VF, Klee GG. Biochemical aspects of Hematology. En: Tietz NW, dir. *Textbook of clinical chemistry*. Philadelphia: Saunders, 1986: 1495-1589.
- Perrotta G. Iron and iron-binding capacity. En: Pesce JA, Kaplan LA, dirs. *Methods in clincial chemistry*. St. Louis: Mosby, 1987: 1258-1261.
- Stokey LL. A new spectrometric agent for iron. *Anal Chem* 1976; 48: 1216-1220.
- Artiss JD, Winogradow S, Zak B. Spectrometric study of several sensitive reagent for serum iron. *Clin Biochem* 1981; 14: 311-315.
- Dermn DP, Green A, Bothewell TH, Graham B, McNamara L, MacPhail P, Baynes RD. A systematic evaluation of bathophenanthroline, ferrozine and ferene in an ICSH-based method for the measurement of serum iron. *Ann Clin Biochem* 1989; 26: 144-147.
- Duffy JR, Gaudin J. Copper interference in the determination of iron in serum using ferrozine. *Clin Biochem* 1977; 10: 122-123.