

MINISTERIO DE INDUSTRIA Y ENERGIA

Registro de la Propiedad Industrial



ESPAÑA

10 ES	11 NUMERO	10 A1
	21 485.763	
22	FECHA DE PRESENTACION	
	7-11-1979	

PATENTE DE INVENCION

Concedido el Registro de acuerdo con los datos que figuran en el presente documento y en el contenido de la memoria adjunta.

50 PRIORIDADES:	52 FECHA	53 PAIS
51 NUMERO		
29543A/78	8-11-1978	Italia

47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	G01N 33/16; G01J 3/52	

54 TITULO DE LA INVENCION
"UN METODO DIRECTO PARA LA DETERMINACION DE HIERRO EN SUERO SANGUINEO"

71 SOLICITANTE (S)
R.C.C.-SOCIETA RICERCHE DI CHIMICA CLINICA S.r.l. (E-9002)

DOMICILIO DEL SOLICITANTE
Via Leopardi 27, Milán, Italia

72 INVENTOR (ES)
Ferruccio Angelo Roberto CERIOTTI

73 TITULAR (ES)

74 REPRESENTANTE
DON ALBERTO DE ELZABURU MARQUEZ (P.-73.300)

jga

1 Campo del invento

Este invento se refiere a un método y a las composiciones relativas que han de emplearse para la determinación directa de hierro en suero sanguíneo.

5 Fundamento del invento

Se conocen diversos métodos para la determinación directa de hierro en el suero sanguíneo. Algunos de estos métodos se basan en la posibilidad de formar complejos coloreados entre el ion hierro divalente y agentes formadores de complejos tales como BP (4,7-difenil-1,10-fenantrolina), TPTZ (2,4,6-tris-(2-piridil)-s-triazina) y ferrozina [sal disódica de 3-(2-piridil)-5,6-bis-(4-sulfofenil)-s-triazina; véase L.L. Stookey: Analytical Chemistry, 42, No 7, 779, 1970] y determinar espectrofotométricamente el complejo formado. La bibliografía específica establece que la ferrozina es particularmente adecuada porque forma con el hierro divalente un complejo coloreado de muy alta absorbancia ($\epsilon = 27.100$) soluble en agua y estable a pH entre 3,5 y 11 y preferiblemente entre 4 y 9.

20 La mayor parte de los métodos para determinación de hierro en suero descritos en la técnica anterior requieren (1) disociación del hierro de la transferrina de suero por tratamiento con ácidos minerales fuertes en presencia de un agente reductor, (2) desproteínización de suero por precipitación de proteínas, por ejemplo, con ácido tricloroacético, (3) determinación del ion hierro bivalente que permanece en la solución por reacción de color con ferrozina después de que el pH de la solución se lleva a un valor entre 3 y 6 con tampón (véase P. Carter: Anal. Biochem. 40, 450, 1971).

1 Otros métodos se conocen como métodos "direc-
tos", que no requieren precipitación de las proteínas (véa
se por ejemplo J.P. Persijn y otros, Clin. Chim. Acta 35,
91, 1971; J.M. White y otros, Clin. Chem. Vol. 19, No. 5,
5 526, 1973; R. Ruutu: Clin. Chim. Acta 61, 229, 1975).

 Estos métodos implican generalmente el empleo
de tampones en un intervalo de pH que corresponde al pun-
to isoeléctrico de la mayor parte de las proteínas del
suero y por consiguiente a su máxima inestabilidad. La
10 precipitación de proteínas que interferirían fuertemente
con los resultados analíticos se evita por adición de de-
tergentes. Estos deben también conseguir la separación
del hierro de la transferrina sin hacer descender el pH.
Sin embargo la composición variable de proteínas de los
15 diversos sueros no permite una protección uniforme y esta-
ble frente a la formación de turbidez en cada caso. En
efecto, no se evitan diferencias individuales por la lec-
tura de la absorbancia inicial o del ensayo en blanco pues
to que, en algunos casos, puede superponerse al complejo
20 coloreado una turbidez impredecible. Además, la libera-
ción del hierro de la transferrina puede no ser completa
dando valores erróneamente bajos. Por las razones ante-
riores el comité de expertos en hierro del Comité Interna-
cional para la normalización en hematología ha rechazado
25 como un método de hierro en suero de referencia cualquie-
ra de los numerosos métodos "directos" sin precipitación
de proteínas conocidos hasta ahora (véase E. W. Rice y
otros, Clin. Chim. Acta 53, 391, 1974).

 Por otro lado, la desproteínización del suero
30 alarga sensiblemente el procedimiento y constituye una eta

1 pa crítica puesto que los filtrados del suero, después de
la precipitación de las proteínas, pueden no ser perfecta-
mente transparentes; además, se requiere un tampón con-
centrado para ajustar el pH a un intervalo adecuado para
5 la reacción cromógena y éste puede ser una fuente de con-
taminación de hierro. La presencia de cobre que, en cier-
tas circunstancias patológicas pueden alcanzar niveles
muy altos, puede interferir fuertemente en métodos espec-
trofotométricos, especialmente los basados en el empleo de
10 ferrozina. (Véase Hugh y otros, Clin. Chem. Vol. 17, No.
9, 950, 1971; J.R. Duffy y otros, Clin. Biochem. 10, 122,
1977).

Resumen del invento

15 Este invento proporciona un método y composicio-
nes para ser empleados en forma de un conjunto de diagnós-
tico para una determinación de hierro en suero sin requere-
rir la desproteínización y separación del hierro. El mé-
todo y las composiciones de acuerdo con este invento tie-
nen también la ventaja de que la liberación de hierro de
20 la transferrina es completa obteniéndose a un pH bajo sin
adición de tampones, en presencia de un agente reductor,
en condiciones experimentales que permiten un completo y
rápido desarrollo del complejo coloreado, sin formación
de turbidez, evitando así el empleo de agentes tensioacti-
25 vos. El método es muy sencillo y fácilmente susceptible
de automatización.

Lo fundamental de este invento es el descubri-
miento sorprendente de que: 1) añadiendo ácido clorhídri-
co a suero para alcanzar un pH de 2,1 o inferior, no se
30 forma turbidez; y 2) la reacción entre la ferrozina y el

1 hierro es completa incluso a este pH, permitiendo así medidas muy exactas del contenido de hierro del suero por determinaciones colorimétricas.

5 Además se ha encontrado que la presencia de tiosemicarbacida en estas condiciones elimina cualquier interferencia de cobre sin afectar negativamente o complicar inadecuadamente el procedimiento para la determinación del hierro.

10 De acuerdo con el método directo de este invento, a un suero que contiene hierro que va a determinarse se le añade ácido clorhídrico para llevar el pH a un valor entre 1,6 a 4,0, preferiblemente entre 1,7 y 2,1. También se añaden a la muestra de suero que ha de ensayarse un agente reductor para llevar el ion hierro a la forma di-

15 valente, ferrozina y tiosemicarbacida. Después que se completa la adición de estos reaccionantes, la muestra se mezcla cuidadosamente y a continuación, después de dejarla reposar a la temperatura ambiente durante 5 a 20 minutos, el contenido de hierro de la muestra se determina colorimétricamente por medio del complejo coloreado.

20

Por consiguiente, se mide la absorbancia a 562 nm frente a un reactivo en blanco, es decir, una muestra que contiene la misma mezcla que antes con exclusión de la ferrozina. La evaluación del contenido de hierro se hace

25 por medio de una curva patrón obtenida de soluciones en agua, tamponadas al mismo pH que la muestra de ensayo, que contienen los reaccionantes anteriores y una cantidad pesada de hierro. El ácido clorhídrico que se añade a la muestra de suero para liberar hierro de la transferrina,

30 para obtener el pH deseado es generalmente una cantidad

1 tal que sus concentraciones en la muestra de ensayo estén
comprendidas entre 0,04 mol/l y 0,15 mol/l, preferiblemen-
te entre 0,05 mol/l y 0,12 mol/l. Se emplea preferible-
mente ácido ascórbico como agente reductor. Las concen-
5 traciones tan bajas como 1,5 mg/ml en la muestra de ensa-
yo son suficientes para dar lugar a un desarrollo comple-
to de color. En la práctica usual, se emplean ventajosa-
mente concentraciones de 5 mg/ml a 10 mg/ml. El color au-
menta incrementando la concentración de ferrozina hasta
10 0,4 mg/ml en la muestra de ensayo. Sin embargo, puede ob-
servarse un desarrollo de color completo también a concen-
traciones inferiores si la lectura se realiza al menos 20
minutos después que se ha realizado la reacción.

Con fines prácticos, la concentración de ferro-
15 zina en la muestra de ensayo se mantiene generalmente des-
de aproximadamente 0,4 mg/ml hasta aproximadamente 1 mg/ml.

La tiosemicarbazida, incluso a concentraciones
muy bajas en la muestra de ensayo evita completamente la
interferencia de cobre a un intervalo de pH entre 1,7 y
20 2,1. A intervalo de pH superior la tiosemicarbazida es
más eficaz que otros agentes tales como tiourea y no reac-
ciona con hierro. Las concentraciones de tiosemicarbazi-
da que se emplean generalmente de acuerdo con una realiza-
ción de este invento están comprendidas generalmente en-
25 tre 0,5 mg/ml y 1 mg/ml.

La reacción de los reaccionantes con el suero
se realiza generalmente añadiendo a un volumen de suero
dos volúmenes de una solución que contiene ácido ascórbico,
ferrozina y tiosemicarbazida en cantidades determina-
30 das en HCl de concentración apropiada. Esta última solu-

1 ción se prepara antes de llevar a cabo el ensayo y es estable hasta las dos horas.

5 La lectura frente al reactivo en blanco puede realizarse también en la misma cubeta en la que se lleva a cabo la reacción entre los reactivos y el suero. En este caso, el suero se añade primero con la solución de los reactivos excluyendo la ferrozina y se realiza una primera lectura a 562 nm para el reactivo en blanco.

10 A continuación, se añade ferrozina en cantidad suficiente y se realiza una segunda lectura a la misma longitud de onda para la determinación del contenido de hierro. Esta posibilidad de realizar lecturas diferenciales en una única cubeta reduce tanto la cantidad de suero como el número de operaciones requeridas. En un procedimiento alternativo, los reactivos sólidos pueden añadirse también en forma de pequeñas tabletas a la mezcla de suero y ácido clorhídrico. Estas tabletas pueden contener la cantidad requerida de ácido ascórbico y ferrozina o la cantidad requerida de tiosemicarbazida con excipientes comunes tales como derivados de hidratos de carbono y polietilenglicoles de alto peso molecular.

20 El método de este invento proporciona resultados muy satisfactorios cuando los ensayos para determinar la reproductibilidad se llevan a cabo en sueros a concentraciones diferentes.

25 Además, cuando a muestras de sueros agrupados se añaden soluciones de hierro normalizadas para aumentar las concentraciones de la muestra, la representación gráfica de los valores de la absorbancia para las concentraciones de hierro añadido pasan por el punto de adición ce-

30

1 ro. Así, la concentración de hierro original de la mues-
tra puede determinarse por extrapolación a la abscisa,
proporcionando la exactitud del método. La absorbancia
calculada de los experimentos de adición coincide con la
5 encontrada con las soluciones de hierro normalizadas. El
método de este invento se comparó con otros métodos cono-
cidos, tanto implicando desproteínización como procedimien-
tos directos. Se eligió la absorción atómica (AA) (des-
pués de haber averiguado su fiabilidad por experimentos
10 de reproductibilidad y recuperación) como el método de com-
paración debido a estar indudablemente exento de interfe-
rencias con cobre. Se determinó el hierro en 26 sueros
que cubrían un amplio intervalo de concentraciones por 1)
un método de flujo automatizado (AT) (B. Zak y otros, Clin.
15 Vol. 11, Nº 6, 641, 1965), que implica la separación de
hierro de la transferrina, diálisis y formación de comple-
jo con ferrozina; 2) el método de este invento (DRC); el
método de absorción atómica (AA) que implica desproteini-
zación; un método directo comercial identificado como DML
20 y un método directo comercial identificado como DM2. Es-
tos dos últimos métodos se basan esencialmente en el mé-
todo descrito por K. Lauber (Zeit. Klin. Chem. 3, 96, - -
1965).

25 Los resultados se recogen en la Tabla I siguien-
te.

T A B L A I

Suero Nº	µg de hierro por 100 ml de suero				
	AT	AA	DRC	DM 1	DM 2
1	4	10	11	**70	**Ilegible
2	15	17	16	17	20
3	24	34	36	*45	□ Ilegible
4	33	48	50	45	40
5	40	40	39	*45	35
6	44	45	44	45	45
7	51	52	52	39	48
8	55	55	55	50	40
9	59	60	58	55	50
10	66	70	75	55	53
11	73	72	72	67	60
12	79	70	66	78	75
13	82	84	83	72	60
14	87	88	87	83	70
15	91	93	97	83	75
16	94	90	92	89	75
17	98	96	98	**133	100
18	108	110	108	105	85
19	120	125	128	*128	110
20	128	127	126	122	112
21	140	140	138	**200	125
22	150	145	145	134	125
23	163	155	152	**172	140
24	180	175	180	167	155
25	213	210	217	194	175
26	241	238	239	228	225

*Formación de turbidez

**Formación de turbidez rápidamente creciente

□ Hemólisis ligera

1 Los resultados de la Tabla I muestran que hay
una excelente correlación entre el método de este invento
y el método de absorción atómica (AA) para el intervalo
completo de concentraciones. Para concentraciones menores
5 que 60 µg/dl y superiores a 160 µg/dl, AT está en una co-
rrelación menos satisfactoria con AA que el método de este
invento. Con el conjunto DM1 se observa frecuentemente
turbidez que en algunos casos es responsable de valores
erróneamente elevados. Con el conjunto DM2, en muestras
10 ocasionales, se desarrolla una turbidez rápidamente crecien-
te que evita cualquier posibilidad de lectura; e incluso
se ha encontrado una ligera hemólisis dando lugar a inter-
ferencias. Además, los valores encontrados son usualmen-
te inferiores que los obtenidos con los otros métodos.

15 Descripción detallada del método del invento

Soluciones

- 1) 100 mg de tiosemicarbazida, 1 g de ácido ascórbico y
100 mg de ferrozina se colocan en un frasco volumétrico
de 100 ml y a continuación se disuelven con HCl 0,1 molar.
20 La solución se lleva hasta el volumen con HCl 0,1 molar.
- 2) La misma solución, con exclusión de ferrozina, se pre-
para para el reactivo en blanco.

Las soluciones se emplean dentro del intervalo
de dos horas.

- 25 3) Para preparar soluciones normalizadas, se disuelven
100 mg de tiosemicarbazida, 1 g de ácido ascórbico y 100
mg de ferrozina con un tampón de glicina 0,1 molar a pH
2,1 y se lleva hasta volúmenes de 100 ml con el mismo tam-
pón.

- 30 4) Las soluciones normalizadas para hierro se preparan

1 por diluciones apropiadas de una solución normalizada de almacenamiento que contiene 100 µg/ml de hierro al 99,9%. Las soluciones a las concentraciones deseadas de 25 a 400 µg/dl se preparan diariamente.

5 Procedimiento:

A 2 ml de solución (1) se añade 1 ml de suero en una cubeta; la cubeta se cubre con una película inerte plástica (por ejemplo: Parafilm[®]) y la solución se mezcla por inversión. Después de dejar reposar durante 5 minutos la solución se mezcla de nuevo y después de 5 minutos más, se lee la absorbancia a 562 nm frente a un reactivo en blanco preparado añadiendo 1 ml de suero a 2 ml de solución (2).

15 Para la curva normalizada, a 2 ml de solución (3) se añade 1 ml de las diversas soluciones de hierro (4). Después de mezclar se leen las absorbancias relativas frente al blanco añadiendo a 2 ml de solución (1) a 1 ml de tampón de glicina, debido a que pueden estar presentes trazas de hierro también en la glicina más pura.

20 Las absorbancias se representan gráficamente frente a las concentraciones de hierro normalizadas.

Cuando la reacción se lleva a cabo en una única cubeta, se añade 1 ml de suero a 2 ml de solución (2) y se lleva a cabo una primera lectura a 562 nm. A continuación, se añaden 100 µl de una solución de 2 g/dl de ferrozina y después de la mezcla por inversiones repetidas y reposo durante 10 minutos, se realiza una segunda lectura a 562 nm.

1

REIVINDICACIONES

5

Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los que se recogen en las reivindicaciones siguientes:

10

1ª.- Un método directo para la determinación de hierro en suero sanguíneo, que comprende: (a) hacer reaccionar el suero sanguíneo con ferrozina en presencia de un agente reductor para llevar el ión hierro a la forma divalente, tiosemicarbazida y ácido clorhídrico a un pH entre 1,7 y 2,1, sin adición de tampones ni agentes tensioactivos y (b) determinar colorimétricamente el contenido de hierro de la muestra por medio del complejo coloreado formado entre ión hierro y ferrocina frente a un reactivo en blanco.

15

2ª.- El método de la reivindicación 1ª, en el que el agente reductor es ácido ascórbico.

20

3ª.- El método de la reivindicación 1ª, en el que la concentración de ácido clorhídrico en la muestra de ensayo sometida a medida colorimétrica está comprendida entre 0,05 mol/l y 0,12 mol/l.

25

4ª.- El método de la reivindicación 1ª, en el que la concentración de ferrozina en la muestra de ensayo sometida a determinación colorimétrica está comprendida entre 0,4 mg/ml y 1 mg/ml.

30

5ª.- El método de la reivindicación 1ª, en el que la concentración de tiosemicarbazida en la muestra de ensayo sometida a determinación colorimétrica está compren

1 dida entre 0,5 mg/ml y 1 mg/ml.

6a.- El método de la reivindicación 2a, en el que la concentración de ácido ascórbico en la muestra de ensayo es de al menos 1,5 mg/ml.

5 7a.- "UN METODO DIRECTO PARA LA DETERMINACION DE HIERRO EN SUERO SANGUINEO".

Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede y para los fines que se han especificado.

10 Esta Memoria consta de doce hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 20 NOV 1979

P.A.

Alberto de Elzaburu
Por Poder



JAC