

Laboratorio de Biología
Facultad de Ciencias
Universidad de Valladolid

Los anticoagulantes y la valoración del hierro sérico*

por
J. Planas

(Recibido para publicar el 15 de mayo de 1963)

Los métodos propuestos para la valoración del hierro sérico son muy numerosos y en general se diferencian en el reactivo cromógeno. Los principales reactivos empleados son el tiocianato sódico o potásico (3, 7, 13, 18), la o-fenatrolina (5, 15), el α - α' -dipiridilo (11), el α - α' - α'' -tripiridina (14, 17), la 4-7-difenil-1-10-fenantrolina (6, 8) o su derivado sulfonado (1, 16).

Las determinaciones pueden realizarse en el plasma o en el suero, indistintamente. Sin embargo, en el caso del empleo del plasma, no existe en la bibliografía una clara unanimidad en cuanto a las posibles interferencias de los anticoagulantes. Algunos autores no mencionan esta cuestión (7, 12, 13, 15, 18), pero otros recomiendan el empleo de plasma heparinizado (14, 17) ó excluyen al plasma oxalatado (2).

El empleo del plasma representa en los animales de pequeña talla una ventaja para obtener mayor volumen de líquido. La aplicación de micrométodos (19), requieren en general cubetas especiales y en última instancia representan siempre una disminución de la exactitud.

En los trabajos realizados anteriormente sobre el contenido en hierro sérico en mamíferos y aves (9), se ha utilizado el método

* Comunicación presentada a las VII Jornadas Bioquímicas Latinas, Santa Margherita Líg., 23-26 mayo 1963.

de RAMSAY (11) en el suero, pero también en ciertas aves hemos usado el plasma heparinizado. En la paloma (10) se ensayó el oxalato sódico, sin dosificación exacta, como agente anticoagulante y los resultados obtenidos eran 70 % más bajos que los conseguidos con el suero o con el plasma heparinizado.

El presente trabajo pretende analizar la posible interferencia de los anticoagulantes en la valoración del hierro sérico.

Material y métodos

Los métodos de valoración del hierro sérico escogidos son:

a) Método de RAMSAY (11) con el α - α' -dipiridilo; b) Método de SCHULTZE y col. (15) con o-fenatrolina; c) Método de SCALA y col. (13) con tiocianato potásico.

Los anticoagulantes ensayados han sido los siguientes: heparina (0,2 mg/ml); oxalato sódico (1-2 mg/ml), citrato sódico (5 mg/ml) y fluoruro sódico (10 mg/ml). Las concentraciones indicadas son las óptimas empleadas (4); los productos salinos son de procedencia Merk, mientras que la heparina es Leo.

El efecto de los anticoagulantes se ha estudiado por adición en diferentes concentraciones a una solución tipo de hierro (sal de Mohr) de una concentración de 200 μ gr Fe %, y por mezcla con sangre de varias especies animales (caballo, mulo, asno, cordero, cabra y pollo). Ha sido valorado el contenido en hierro de cada muestra de sangre según las tres técnicas indicadas. En los mamíferos ha sido posible analizar en un mismo animal la influencia de cada anticoagulante a distintas dosis; en el pollo, debido a su menor volumen sanguíneo, se han utilizado lotes de individuos de igual edad, mezclando la sangre de tres ejemplares para cada dosis.

Resultados

Ha sido realizado primeramente un estudio comparativo sobre la influencia de los anticoagulantes salinos a distinta concentración frente a una solución tipo de hierro, cuyos resultados pueden apreciarse en la tabla I. El efecto de estos compuestos se expresa en tantos por ciento de interferencia respecto a los valores obtenidos con la solución tipo sin anticoagulante.

La observación de los datos señalados en esta tabla muestran cómo, en general, los anticoagulantes estudiados, cuyas concentraciones máximas son las óptimas recomendadas, presentan una notable influencia en la valoración del hierro en una solución.

TABLA I

Efecto de varios anticoagulantes en la determinación del Fe en una solución tipo de 200 μ gr %. Las interferencias señaladas corresponden a valores medios de 4 determinaciones.

Anticoagulante	Concentración mg/ml	Método de valoración		
		Tiocianato Interferencia (%)	o-fenantrolina Interferencia (%)	α -dipiridilo Interferencia (%)
Fluoruro sódico	10	100	85	36
	5	100	63	2
	2,5	100	43	0
	1,2	100	21	0
Citrato sódico	5	100	82	6
	2,5	97	75	6
	1,5	15	59	0
	0,5	0	13	0
Oxalato sódico	2,5	100	82	67
	1,2	96	57	51
	0,5	90	30	0
	0,25	77	6	0

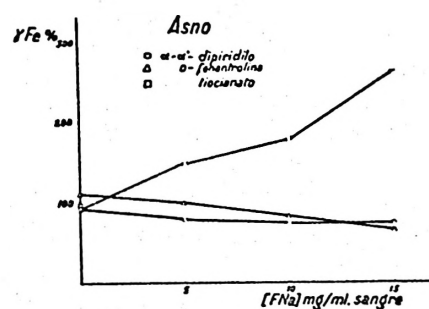


FIG. 1. Influencia del FNa en la determinación del hierro sérico en un mismo animal (asno) con las tres técnicas utilizadas. Los valores iniciales corresponden a los obtenidos en plasma heparinizado.

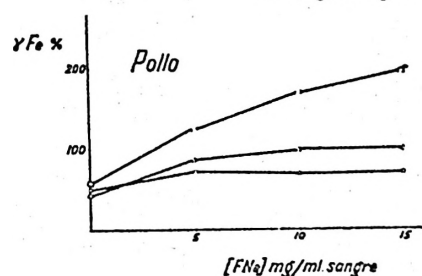


FIG. 2. Influencia del FNa en la determinación del hierro sérico en muestras de sangre de distintos ejemplares de pollo en cada concentración. Igualdad de signos que en la fig. 1.

El estudio directo de la influencia de los anticoagulantes en la determinación del hierro sérico se ha realizado en la sangre de diferentes mamíferos y en el pollo. Los resultados obtenidos

pueden apreciarse en las gráficas adjuntas (figuras 1 — 6), las cuales han sido elegidas como ejemplos dentro de las distintas experiencias realizadas. En todas ellas los valores de sideremia, a concentración cero de anticoagulante salino, corresponden a los obtenidos con plasma heparinizado.

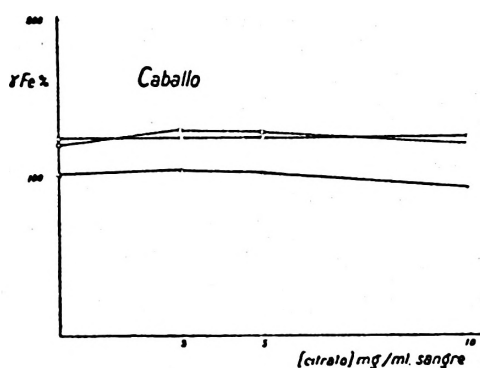


FIG. 3. Efecto de la concentración de citrato sódico en la sangre de un mismo animal (caballo) sobre la determinación de sus valores en hierro sérico. Igualdad de signos a las figuras anteriores.

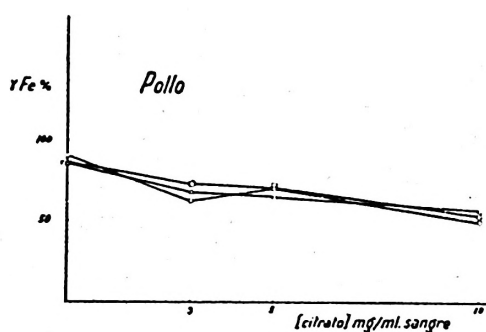


FIG. 4. Valores de sideremia en distintos ejemplares de pollo, frente a concentraciones crecientes de citrato sódico. Igualdad de signos a las anteriores figuras.

La comparación de estas gráficas muestra una evidente influencia en varios anticoagulantes que afectan distintamente a las valoraciones realizadas con los tres métodos.

El fluoruro sódico (figura 1) ejerce una marcada influencia con la técnica del tiocianato, incrementando las determinaciones un 100 % en la dosis óptima. Frente a las otras técnicas ocasio-

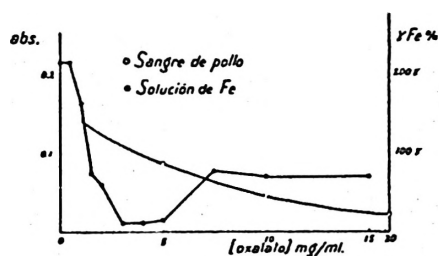


FIG. 5. Efecto de la concentración de oxalato sódico en la valoración del hierro por el método de Ramsay (10).

○ en sangre de pollo: valores medios de 4 experiencias con ejemplares diferentes.

● en solución tipo de hierro: valores medios de 3 determinaciones.

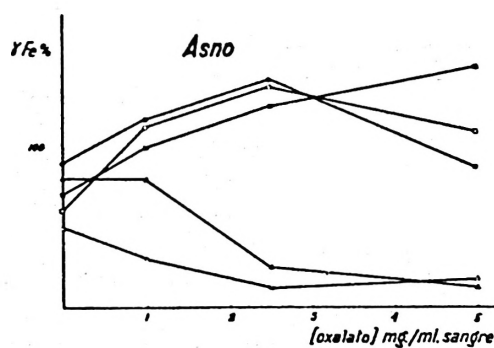


FIG. 6. Influencia de la concentración de oxalato sódico en la valoración del hierro sérico en un mismo animal (asno); resultados obtenidos en dos ejemplares. Igualdad de signos a las figuras anteriores.

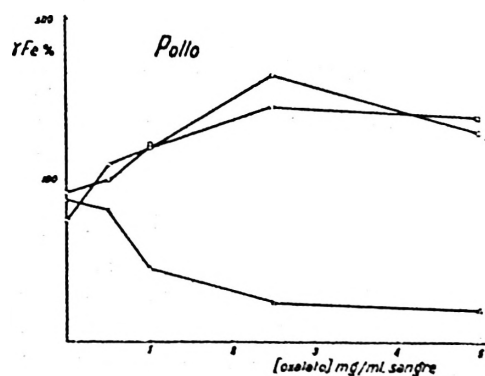


FIG. 7. Valores de hierro sérico en muestras de sangre de diferentes pollos, frente a concentraciones crecientes de oxalato sódico. Igualdad de signos a las figuras anteriores.

na un descenso del orden de 20 - 25 %, en la misma dosis. En las experiencias con sangre de pollo (figura 2), se aprecia cómo los valores obtenidos con las distintas técnicas se van diferenciando entre sí cada vez más de acuerdo con el incremento de concentración de F Na.

El citrato sódico no influye en la determinación del hierro sérico (figura 3), pues incluso en concentraciones dobles de la óptima, la diferencia observada no sobrepasa a las 10 γ Fe %. La ausencia de acción de este anticoagulante se hace también apreciable por la concordancia de datos obtenidos con los tres métodos frente a sangre de pollo (figura 4).

El oxalato sódico presenta un comportamiento especial; en concentraciones altas, superiores a los 5 mg/ml, interfiere negativamente en la valoración (figura 5). Por el contrario, el estudio más detallado en concentraciones inferiores (de 0,5 a 5 mg/ml), nos muestra un efecto distinto según el método considerado (figuras 6 y 7) en las distintas especies estudiadas. Así, en las proximidades de la dosis óptima, la o-fenantrolina acusa un descenso del 50 γ Fe %, mientras que los otros métodos manifiestan un efecto contrario.

Discusión

Las interferencias de los anticoagulantes salinos en la valoración del hierro en una solución tipo es notable y general. El método con tiocianato se muestra el más sensible, pues su reacción con el hierro es afectada por diversos factores y sustancias (2, 12). El método con α - α' -dipiridilo según RAMSAY (11) es el que muestra, por el contrario, una menor interferencia.

La influencia de los anticoagulantes salinos puede explicarse por la propiedad que estos compuestos presentan en formar complejos con el hierro. Es conocido como los iones citrato y oxalato forman quelatos con este metal, fijando total o parcialmente al hierro, según su concentración. El complejo citrato-hierro es el menos estable y es afectado, como hemos comprobado, por la temperatura, el tiempo y la luz. Es por ello explicable la escasa influencia que se aprecia con el método de RAMSAY, por la ebullición a que somete las muestras, con lo cual se rompe el quelato formado.

La interferencia del FNa se puede atribuir a la formación con el hierro del complejo $[\text{Fe F}_6]^{3-}$, como es frecuente en este compuesto.

El efecto de los anticoagulantes en la determinación del hierro sérico debería presentar una misma influencia y cabrían esperar resultados semejantes. Las experiencias realizadas, sin embargo, nos muestran comportamientos especiales que resul-

tan a veces difíciles de explicar. Así, el incremento que ocasiona el fluoruro sódico, con el tiocianato o las modificaciones que ocasiona el oxalato sódico. Los resultados obtenidos con este último anticoagulante frente al reactivo del α - α' -dipiridilo nos ha sorprendido, especialmente cuando RAMSAY (11) señala que su método puede emplearse también con plasma oxalatado. Los datos obtenidos con las diferentes especies estudiadas nos confirman cómo la presencia del oxalato sódico ocasiona un incremento progresivo de la sideremia hasta un máximo, que corresponde a la dosis de 2,5 mg/ml, para decrecer luego claramente a concentraciones superiores.

La existencia de impurezas de hierro en los anticoagulantes podría explicar en parte estos efectos. Pues mientras el método de la o-fenantrolina no las revela, los otros reactivos dan valores que oscilan en el límite máximo (0,002 %) que señala la casa Merck para estos productos. Se requiere un estudio particular a este respecto a fin de precisar el contenido exacto en impurezas.

Resumen

Ha sido estudiada la influencia que ejercen los anticoagulantes sobre la determinación del hierro en una solución y en el plasma.

Se ha analizado comparativamente los anticoagulantes salinos (fluoruro, citrato y oxalato sódico) y la heparina, frente a tres métodos de valoración diferentes (o-fenantrolina, α - α' -dipiridilo y tiocianato potásico).

Se ha comprobado una notable interferencia en las determinaciones del hierro en una solución tipo. En la valoración del hierro sérico se ha demostrado cómo el citrato sódico no influye en las determinaciones, pero que el fluoruro y el oxalato sódico pueden introducir errores considerables en los resultados.

Los valores más concordantes obtenidos con los tres métodos han sido conseguidos con el plasma heparinizado.

Summary

Anticoagulants and the evaluation of serum iron

The methods described for the determination of serum iron are indiscriminately applicable for use in serum or in plasma.

The opinions of the different authors on the interference of saline anticoagulants in the evaluation of serum iron are not generally in agreement (2, 5, 7, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 18).

In the present work, an attempt is made to effect a global analysis of the possible interference of anticoagulants in the evaluation of the iron. A combined study is carried out of the

influences exercised on three different types of evaluation methods: a) Potassic thiocyanate method (13); b) α - α' -dipyridil method (11); and c) o-phenanthroline method (15). The anticoagulants were heparine and the salines, sodic fluoride, sodic citrate and sodic oxalate.

In the first place a study has been made of the interferences in the determination of iron, starting from a standard solution of 200 μ gr. %. The results can be seen in Table I, where it is observed that all the saline anticoagulants interfere noticeably. Their action is explained by the formation of iron chelates with the citric and oxalic ions, and of the complex $[\text{Fe F}_6]^{3-}$ with the fluorides.

The direct study of the influence of the anticoagulants has been carried out by addition in the blood of different mammals (horse, mule, ass, sheep and goat) and in the chicken, the values thus obtained being compared with those of heparinized plasma.

The sodic fluoride (fig. 1), in its optimum dose as an anticoagulant (10 mg/ml), causes a decrease of 20 to 25 % in the determinations with o-phenanthroline and α - α' -dipyridil, and an increase of 100 % with the thiocyanate. The values with different bloods of chickens (fig. 2) get farther and farther apart from one another with the increase in concentration of FNa.

The sodic citrate does not interfere in the evaluation (fig. 3), and the data agree in the three methods with regard to the chicken plasma (fig. 4).

The sodic oxalate presents us with a special kind of behaviour. Thus, in the presence of α - α' -dipyridil, it interferes negatively in high concentrations (fig. 5), but in lower concentrations it varies according to the method (figs. 6 and 7).

Bibliografía

- (1) BEALE, R. N., BOSTROM, J. O. y TAYLOR, R. F.: *J. Clin. Pathol.*, **15**, 156, 1962.
- (2) DREYFUS, J. C. y SCHAPIRA, G.: *Le Fer*. Ed. L'Expansion, París, 1958.
- (3) FISCHL, J.: *Clin. Chim. Acta*, **5**, 164, 1960.
- (4) HAWK, P. B., OSER, B. L. y SUMMERSON, W. H.: *Practical Physiological Chemistry*. McGraw-Hill, 13th Ed., 1954.
- (5) HEILMEYER, L. y PLÖTNER, K.: *Das Serumeisen und die Eisenmangelkrankheit*. G. Fischer, Jena, 1937.
- (6) KOK, D'A. y WILD, F.: *J. Clin. Pathol.*, **13**, 241, 1960.
- (7) OLIVA, G.: *La sideremia e il ricambio del ferro in condizioni normali e patologiche*. Ed. Luigi Pozzi, Roma, 1948.
- (8) PETERSON, R. E.: *Anal. Chem.*, **25**, 1337, 1953.

- (9) PLANAS, J.: *Nature*, **187**, 1126, 1960; *ibid.*, **189**, 668, 1961; *ibid.*, **197**, 186, 1963.
- (10) PLANAS, J. y COCHO, D.: *R. esp. Fisiol.*, **18**, 115, 1962.
- (11) RAMSAY, W. N. M.: *Clin. Chim. Acta*, **2**, 214, 1957.
- (12) RAMSAY, W. N. M.: *Adv. Clin. Chem.*, **1**, 1, 1958.
- (13) SCALA, E., CASTALDO, A. y RUIZ, G.: *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.*, **36**, 1048, 1960.
- (14) SCHADE, A. L., OYAMA, J., REINHART, R. W. y MILLER, J. R.: *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, **87**, 443, 1954.
- (15) SCHULTZE, H. E., HEIDE, K. y MÜLLER, H.: *Behringwerk-Mitteilungen*, **32**, 25, 1957.
- (16) TRIDER, P.: *J. Clin. Pathol.*, **9**, 170, 1956.
- (17) TRUHAUT, R., GOSSE, CH., DE LESDAIN, N. y PAOLETTI, C.: *Ann. Biol. Clin.*, n.º 10-12, 1, 1959.
- (18) VANNORTI, A. y DELACHAUX, A.: *Der Eisenstoffwechsel und seine klinische Bedeutung*. Benno Schwabe, Basel, 1942.
- (19) WOODRUFF, C. W.: *J. Lab. and Clin. Med.*, **53**, 955, 1955.

