

# **Una modificación al método de la 4,7-difenil-1,10-fenantrolina para la determi- nación del hierro en pequeñas cantidades de plasma**

ALFONSO QUIROZ M.<sup>1</sup>, CÉSAR DÍAS T.<sup>1</sup> Y ROBERT B. BRADFIELD<sup>2</sup>

Instituto Nacional de Nutrición  
Servicio Cooperativo Interamericano de Salud Pública  
Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social  
Lima - Perú

## **INTRODUCCION**

Las pequeñas cantidades de hierro presentes en las sustancias naturales se han determinado haciendo uso de diversos reactivos. La dipiridina y la 1,10-fenantrolina se emplearon hace algún tiempo (1) (2). Sin embargo, en la determinación del hierro en pequeñas cantidades de plasma se necesita un reactivo más sensible. Case (3) preparó la 4,7-difenil-1,10-fenantrolina (Batofenantrolina), cuyo complejo ferroso coloreado tiene un coeficiente de extinción molar de 22,400 en su punto de absorción máxima, que es a 533 milimicrones. El complejo obtenido con hierro divalente y la 1,10-fenantrolina tiene un coeficiente de extinción molar de 11,100 a 512 milimicrones. El complejo ferroso 4,7-difenil-1,10-fenantrolina se puede extraer de sus soluciones acuosas con ciertos solventes no miscibles, tales como alcohol isoamílico y alcohol n-hexílico (4). Smith y colaboradores (4) estudiaron la aplicación de este derivado fenantrolínico a la determinación de hierro

---

1. Químico del Instituto Nacional de Nutrición.

2. Consultor de Nutrición, Misión de Operaciones de EE.UU. en el Perú.

en agua. Peterson (5) y Peters y colaboradores (6) han publicado métodos para la determinación de hierro en muestras de 1 ó 2 ml. de plasma, haciendo uso de batofenantrolina.

En los estudios de anemia parasítica realizados por el Instituto de Nutrición en la región de la selva peruana, al lado de la determinación del hierro contenido en el plasma sanguíneo, era necesario determinar hemoglobina, hematocrito, recuento de glóbulos rojos y cobre plasmático en muestras de sangre pequeñas, debidas a las limitaciones que imponen la edad y otros factores en estudios de esta naturaleza realizados con niños pequeños. Por tal razón fué necesario adoptar los métodos existentes, que por lo general usan un mínimo de 1.0 ml. de plasma. En la modificación establecida se trabaja con 0.1 ml. de plasma.

## METODO

### *Material de vidrio*

Debe liberársele de hierro hirviéndolo primero con ácido nítrico 1:1 y lavándolo después con agua bidestilada. El material necesario es el siguiente:

- 1) Microtubos de  $0.5 \times 5.0$  cms.
- 2) Micropipetas de 0.1 y 0.2 ml.
- 3) Pipetas de transferencia.

### *Reactivos*

Todos se preparan con agua bidestilada en vidrio.

- 1) Solución de ácido tricloroacético al 20%. Se usa el reactivo redestilado.
- 2) Solución de acetato de sodio al 10%. Se usa la sal Q/P. Para liberar de hierro a la solución se agregan 2 ml. de la solución de clorhidrato de hidroxilamina y 4 ml. de la solución de batofenantrolina; se agita y se extrae el complejo coloreado con alcohol n-hexílico. Se repite la operación hasta que el alcohol n-hexílico usado en la extracción sea incoloro.
- 3) Solución de clorhidrato de hidroxilamina al 10%. Para liberarla de hierro se le trata con 4 ml. de la solución de acetato de sodio y 4 ml. de la solución de batofenantrolina y se procede como para la solución de acetato.

- 4) Solución 0.001 M de 4,7-difenil-1,10-fenantrolina<sup>1</sup>. Se pesa la cantidad necesaria de batofenantrolina y se disuelve en alcohol etílico de 95% o más, bidestilado en vidrio. Se completa a volumen con agua bidestilada, de tal manera que la solución final tenga alrededor de 50% de alcohol.
- 5) Alcohol n-hexílico Q/P.
- 6) Solución "stock" de hierro. Contiene 100 mcg. de hierro por mililitro. Se prepara disolviendo 70.2 mg. de sulfato ferroso-amónico,  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , en agua bidestilada ligeramente acidificada con ácido sulfúrico Q/P y llevando el volumen a 100 ml.
- 7) Solución patrón de hierro. Contiene 1 mcg. de hierro por mililitro. Para prepararla se toma 1 ml. de la solución "stock" y se lleva el volumen a 100 ml. con agua bidestilada.
- 8) Mezcla de reactivos. Se prepara con un volumen de solución de hidroxilamina, dos volúmenes de solución reguladora de acetato y dos volúmenes de solución de batofenantrolina. El volumen total preparado depende de las necesidades del trabajo.

### *Procedimiento*

El plasma se desproteíniza con ácido tricloroacético. Se agrega una solución reguladora de acetato de sodio e hidroxilamina como reductor, conjuntamente con el agente cromogénico. El complejo ferroso-batofenantrolina se extrae de su solución acuosa por un solvente no miscible; hemos encontrado como el más apropiado el alcohol n-hexílico.

- 1) Poner 0.1 ml. del plasma (fresco, heparinado, citrado u oxalatado) en microtubos y agregar 0.1 ml. de agua bidestilada.
- 2) Colocar al baño maría hirviente por un minuto (hasta que el plasma cambie de color). Sacar del calor y enfriar rápidamente al chorro de agua fría.
- 3) Agitar con agitador mecánico (nosotros usamos uno de 1.525 r.p.m.).

---

1. La batofenantrolina se puede adquirir de The Frederick Smith Chemical Co. (Columbus, Ohio, U.S.A.).

- 4) Agregar 0.1 ml. de la solución de ácido tricloroacético y agitar inmediatamente a fondo con el agitador.
- 5) Poner al baño maría hirviente por un minuto; enfriar rápidamente al chorro de agua fría y volver a agitar; calentar nuevamente por dos minutos al baño maría hirviente; volver a enfriar al chorro de agua fría y agitar nuevamente. Así se obtiene un precipitado fino y se evita pérdida de Fe por oclusión.
- 6) Tapar los tubos y centrifugar a 3.000 r.p.m. por unos 10-15 minutos.
- 7) Tomar una alícuota de 0.1 ml. del sobrenadante. Agregar 0.1 ml. de la mezcla de reactivos y agitar con el agitador.
- 8) Agregar 0.1 ml. de alcohol n-hexílico. Tapar los tubos y agitar a fondo con el agitador mecánico durante un minuto.
- 9) Centrifugar a 3.000 r.p.m. por unos 10-15 minutos.
- 10) Mediante una pipeta de transferencia pasar un volumen adecuado del sobrenadante a las microceldas del espectrofotómetro Beckman DU y leer a 533 m $\mu$ , poniendo a cero el aparato con alcohol n-hexílico.

En dos o más microtubos colocar 0.1 ml. de la solución patrón de hierro (100 mmcg. de Fe) y agregar 0.1 ml. de agua bidestilada. En uno o más microtubos poner 0.2 ml. de agua bidestilada, para blanks. Con los patrones y blanks seguir el procedimiento indicado, paralelamente a las muestras de plasma, pero prescindiendo de los calentamientos y agitaciones de las etapas 2 y 5 de la centrifugación de la etapa 6.

### Cálculos

$$\frac{(M-B) \times 100}{P-B} = \text{mcg. de Fe/100 ml. de plasma}$$

donde:

M = densidad óptica de la muestra.

B = densidad óptica del blank.

P = densidad óptica de la solución patrón.

## DISCUSION

La desproteínización con ácido tricloroacético, realizada conforme se indica en el procedimiento, es rápida y sin complicaciones. El precipitado obtenido es muy fino y sedimenta con facilidad, debido a los cambios de temperatura y a la agitación mecánica; como consecuencia, se evitan las pérdidas de hierro por oclusión.

En diversas pruebas de recuperación realizadas agregando 50 mcg. de hierro a cada muestra de plasma se hicieron dos extracciones con alcohol isoamílico y una con alcohol n-hexílico. Con este último, menos miscible, se obtuvieron recuperaciones muy satisfactorias (recuperación promedio, 100.1%). Con el alcohol isoamílico las recuperaciones fueron algo más bajas (recuperación promedio, 97.9%).

Los porcentajes de recuperación y los promedios se dan en el cuadro N° 1.

Knapp (7) también encontró una respuesta mejor usando alcohol n-hexílico.

Para comparar el método propuesto con el de Peterson (5) se procedió a la determinación del hierro en diez muestras duplicadas de plasma, obteniéndose resultados concordantes con ambos métodos, como puede apreciarse en el cuadro N° 2. El promedio de las diferencias entre el método propuesto y el de Peterson fué de 1.4 mcg. con una desviación standard de 1.16. Esta diferencia promedio fué menor que las diferencias individuales entre los duplicados.

## SUMARIO

Se propone una modificación a los métodos espectrofotométricos para la determinación del hierro en pequeñas cantidades de plasma o suero sanguíneos. El procedimiento es fácil de realizar, no precisa material complicado ni caro y presenta la gran ventaja de requerir solamente 0.1 ml. de plasma para la determinación.

Los resultados obtenidos demuestran que había menor diferencia entre los métodos comparados que entre los duplicados de un método.

## SUMMARY

A modification of the bathophenanthroline (4,7-Diphenyl-1,10-phenanthroline) procedure for the determination of iron in plasma is described. The analytical results obtained are compared with a widely used bathophenanthroline procedure. More efficient extraction procedures permit a much smaller sample (.1 ml.) than customarily used. The technique is of particular value where sample size is limited.

## CUADRO N° 1

COMPARACION DE LOS PORCENTAJES, DE RECUPERACION DE FIERRO EN PLASMA, DE DOS EXTRACCIONES CON ALCOHOL ISOAMILICO Y UNO CON ALCOHOL N-HEXILICO

Alcohol isoamílico (2)	Alcohol n-hexílico (1)
95.0%	102.0%
100.0%	97.5%
97.5%	102.5%
95.0%	100.0%
92.5%	102.5%
97.7%	97.5%
100.0%	100.0%
100.0%	97.5%
102.5%	100.0%
100.0%	102.3%
95.0%	97.5%
100.0%	102.3%
Promedio: 97.9%	100.1%

## CUADRO N° 2

COMPARACION DEL METODO PROPUESTO CON EL DE PETERSON,  
POR DETERMINACION DEL HIERRO EN 10 MUESTRAS  
DUPLICADAS DE PLASMA

Mcg. de Hierro en 100 ml. de plasma

Método propuesto	Método de Peterson	Diferencia
49.2	47.5	1.7
48.3	46.7	1.6
53.3	53.3	0.0
60.1	58.1	2.0
51.7	49.3	2.4
53.3	53.0	0.3
77.4	78.1	— 0.7
49.3	46.1	3.2
50.2	47.9	2.3
30.1	28.7	1.4

M.D.  $\pm$  s. d. = 1.4  $\pm$  1.16 mcg.

## REFERENCIAS

- (1) Smith, G. F., y Richter, F. P.: "Phenanthroline and Substituted Phenanthroline Indicators", G. Frederick Smith Chemical Co., Columbus, Ohio, 1941.
- (2) Brandt, W. W., y Smith, G. F.: *Anal. Chem.* 21, 1313 (1949).
- (3) Case, F. H.: *J. Org. Chem.* 16, 1541 (1951).
- (4) Smith, G. F., McCurdy, W. H., y Diehl, H.: *Analyst* 77, 418 (1952).
- (5) Peterson, R. E.: *Anal. Chem.* 25, 1337 (1953).
- (6) Peters, T., Giovannello, T. J., Apt, L., y Ross, J. F.: *J. Lab. Clin. Med.* 48, 280 (1956).
- (7) Knapp, W. G.: *Anal. Chem.* 31, 1445 (1959).