

Metodología recomendada para la medición del contenido de cobre en especímenes biológicos

Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular
Comité Científico
Comisión de Elementos Traza¹

Documento A, Fase 3, Versión 4

Documento preparado por J. González Revaldería y J.A Cocho de Juan

Índice

- 0 Introducción
- 1 Objeto y campo de aplicación
- 2 Revisión metodológica
 - 2.1 Espectrometría de absorción molecular
 - 2.2 Voltametría de disolución anódica
 - 2.3 Activación neutrónica
 - 2.4 Espectrometría de absorción atómica de llama
 - 2.5 Espectrometría de absorción atómica con atomización electrotrémica
 - 2.6 Otras técnicas
- 3 Procedimientos analíticos recomendados
 - 3.1 Obtención de especímenes de suero y orina
 - 3.2 Procedimiento de medida de cobre en el suero por espectrometría de absorción molecular utilizando batocuproína
 - 3.3 Procedimiento de medida de la concentración de cobre en el suero por espectrometría de absorción atómica de llama
 - 3.4 Procedimiento de preparación del pelo para la medida de su contenido de cobre
 - 3.5 Procedimiento de medida de la concentración de cobre en la orina por espectrometría de absorción atómica con atomización electrotrémica
 - 3.6 Procedimiento de preparación de tejidos para la medida de su contenido de cobre
 - 3.7 Control de la calidad
- 4 Intervalos de referencia
- 5 Bibliografía

0 INTRODUCCIÓN

El cobre es un elemento traza esencial (oligoelemento) necesario para la adecuada acción de diversas enzimas [ferroxidasa (EC 1.16.3.1), citocromo-c oxidasa (EC 1.9.3.1), superóxido-dismutasa (EC 1.15.1.1.), dopamina-b-hidroxilasa (EC 1.14.17.1), etc.] (1,2). Se encuentra principalmente en las semillas, crustáceos, hígado y leguminosas. Los requerimientos diarios de este elemento están comprendidos entre 0,02 y 0,05 mmol/día (3). Las concentraciones séricas elevadas de este elemento en el suero se asocian a intoxicaciones (1,2) y de for-

ma inespecífica a infecciones, daño hepático, colestasis e insuficiencia del páncreas exocrino (4). Su déficit puede producir anemia hipocrómica y microcítica, alteraciones neurológicas, defectos de la queratinización y de la formación de cartílago y osificación, anomalías de la pigmentación de la piel, y otras (1). Asimismo, se relacionan con el cobre: la enfermedad de Wilson (incapacidad para secretar cobre unido a ferroxidasa desde el hígado) (5), la cirrosis biliar primaria, la enfermedad de Menkes (defecto genético del transporte y almacenamiento de cobre ligado al cromosoma X) (6) y la cutis laxa.

Para evaluar el contenido de cobre del organismo se han propuesto diversidad de métodos indirectos (entre ellos la medida de la actividad catalítica y/o masa de la ferroxidasa y actividad de la superóxido-dismutasa y de la citocromo-c oxidasa). Los métodos directos miden la concentración o el contenido de cobre en diversos especímenes (suero, orina, tejido) (7) y son los que aquí se consideran.

1 OBJETO Y CAMPO DE APLICACIÓN

Se revisan los métodos analíticos para la medida directa del contenido de cobre en especímenes biológicos y se detallan los procedimientos que presentan una mayor fiabilidad dentro de los que son más accesibles al laboratorio clínico.

2 REVISIÓN METODOLÓGICA (1,2,7-9)

2.1 Espectrometría de absorción molecular

Fueron los primeros métodos analíticos, desarrollados durante los años 50 y 60, para medir la concentración de cobre en el suero aunque después se adaptaron para realizar su medición también en la orina y los tejidos. Se basan en la absorción del complejo formado por el cobre (I+II) con un agente quelante. Entre estos los más empleados fueron el dietilditiocarbamato, la 4,7-difenil-1,10-fenantrolina, el 2,9-dimetil-4,7-difenil-1,10-fenantrolina (batocuproína), la bisciclohexanona oxalil dihidrazona (cuprizona) y la oxalildihidrazida. Los dos últimos presentan la mayor sensibilidad analítica (mayor absorptividad molar) pero hay que cuidar más las condiciones analíticas debido a la mayor facilidad de contaminación. El método de la batocuproína es el más específico de todos manteniendo una sensibilidad analítica aceptable. En la sección 3.2 se describe en detalle un procedimiento analítico para medir la concentración de cobre en el suero utilizando batocuproína.

¹Composición de la Comisión: J.A. Cocho de Juan, J.F. Escanero Marcen, M.D. Fernández González, L. García Beltrán, M. González Estechea (presidenta), J. González Revaldería, E. Herrero Huerta, I. Monreal Marquiegui, A. Montel Ruiz de Alda, S. Otero Martínez, C. Pintos Virgós y V. Seijas Martínez-Echevarría.

2.2 Voltimetría de disolución anódica

Este método se basa en la deposición, por reducción, de los iones de cobre en forma de cobre metálico sobre el ánodo (electrodo de mercurio). Tras ello el potencial se hace más positivo y se redissuelve este cobre (reoxidación) pasando de nuevo a la solución, lo cual produce una corriente proporcional a la concentración de cobre en la muestra. Este método se ha aplicado a la medida de la concentración de cobre en el suero pero está poco extendido y no ha sido validado suficientemente, excepto en análisis ambientales. Tiene la ventaja de poder medir la concentración de varios elementos al mismo tiempo debido a que el potencial del par ión/metal es característico de cada metal.

2.3 Activación neutrónica

Se fundamenta en la transformación del ^{63}Cu en ^{64}Cu inestable por bombardeo con neutrones. El ^{64}Cu tiene una semivida de 12,9 horas y se desintegra a ^{64}Ni estable emitiendo radiación gamma de 1,34 MeV. Tras la irradiación hay que separar químicamente el cobre ya que interfiere la radiación de 1,37 MeV del ^{23}Na . Permite el análisis de cobre en suero, orina y tejidos pero es laborioso y requiere un equipo costoso con personal muy cualificado. Se considera que es el método definitivo para la medida de la concentración o contenido de cobre.

2.4 Espectrometría de absorción atómica de llama

Se basa en que la energía de una llama de aire/acetileno hace que los átomos de cobre de una disolución se encuentren en estado fundamental y sean entonces capaces de absorber la radiación de 324,7 nm proveniente de una lámpara de cátodo hueco de cobre. La absorbancia es directamente proporcional a la concentración de cobre de la disolución (ley de Lambert-Beer-Bouguer). Mediante esta técnica puede medirse la concentración o el contenido de cobre en el suero, orina y tejidos.

Por sus características es la técnica de elección para medir la concentración de cobre en el suero en ausencia de un método de referencia. La línea de resonancia del cobre está lejos de las de otros elementos que habitualmente se encuentran en el suero. El límite de detección se sitúa alrededor de 0,06 mmol/L lo que es más que suficiente para las medidas séricas (en donde se encuentra en concentraciones de alrededor de 11,0 a 22,0 mmol/L), con lo que se pueden poner de manifiesto fácilmente los déficit de este elemento. En la sección 3.3 se describe un procedimiento analítico para la medida de la concentración de cobre en el suero por absorción atómica de llama.

Se han descrito múltiples métodos de preparación previa de la muestra desde los años 70. Actualmente se tiende a la menor manipulación posible de la misma evitando pasos previos de desproteinización o de extracción con disolventes orgánicos.

La medida de la concentración de cobre en la orina puede realizarse por espectrometría de absorción atómica de llama pero el método de elección es la espectrometría de absorción atómica con atomización electrotrémica y corrección de fondo por efecto Zeeman, ya que la primera no permite diferenciar entre concentraciones fisiológicas y bajas de este elemento.

Los métodos que se han descrito para el análisis de orina por llama miden la concentración de cobre en orina bien directamente, tras concentración o tras extracción de la misma. Los dos primeros métodos tienen el problema del alto contenido en sales de las muestras que puede afectar a los resultados. La extracción puede ser fuente de interferencias o contaminaciones. En caso de analizar las muestras de orina por esta técnica es aconsejable preparar los patrones en una matriz salina similar a las de las orinas.

La medida del contenido de cobre en tejido, en especial hepático, por técnica de llama presenta el inconveniente de no diferenciar entre valores normales y bajos. En general, esto puede no ser un gran inconveniente ya que habitualmente se mide el contenido de cobre en el hígado para el diagnóstico de la enfermedad de Wilson en donde los contenidos son, al menos, 5 veces superiores al intervalo de referencia.

El contenido de cobre en el pelo puede medirse mediante esta técnica pero es un espécimen hoy en día desaconsejado ya que el contenido de cobre varía según la distancia del pelo al cuero cabelludo, por el uso de cosméticos, etc., lo que hace necesario un cuidadoso lavado del pelo antes de la toma de la muestra teniendo cuidado de no arrastrar algo del cobre capilar. En la sección 3.4 se describe un procedimiento para la preparación de los especímenes de pelo para la medida de su contenido de cobre.

2.5 Espectrometría de absorción atómica con atomización electrotrémica

Con esta técnica se consiguen más bajos límites de detección que con la de llama debido a una serie de factores entre los que se encuentran un mayor control de la temperatura de atomización, mayor tiempo de residencia de la nube atómica en el paso óptico, menor influencia del fondo, etc.

Debido a la concentración de este elemento en el suero ha de hacerse una dilución previa del mismo de, al menos, 1:15 lo que puede aumentar la imprecisión de la medida. Como la técnica de llama tiene suficiente sensibilidad analítica y es más rápida que la de atomización electrotrémica, se considera la técnica de elección.

Para la medida fiable de las concentraciones de cobre en orina la técnica más adecuada es la de atomización electrotrémica con corrección de fondo por efecto Zeeman longitudinal (el empleo de una corrección de fondo por Zeeman transversal produce pérdidas de sensibilidad analítica de alrededor del 50%, pero aún así la calidad de corrección de fondo del efecto Zeeman frente a la lámpara de deuterio es mejor (10). En la sección 3.5 se describe un procedimiento analítico para su medida.

La medida del contenido de cobre en un tejido por absorción atómica con atomización electrotrémica permite detectar con fiabilidad los valores fisiológicos y bajos. En la sección 3.6 se describe un procedimiento de preparación de la muestra previo a su análisis.

La medida de la concentración de cobre no unido a ferroxidasa en el suero por Espectrometría de absorción atómica con atomización electrotrémica puede ser útil, junto con la concentración o la concentración catalítica de la ferroxidasa en el suero y la concentración de cobre en la orina y su contenido en el hígado para el diagnóstico de la enfermedad de Wilson. El método se basa en la extracción del cobre no unido con metil-isobutil-cetona tras su acomplejamiento con amino-pirrolidin-ditiocarbamato (11). Este método es laborioso. Puede emplearse una estimación indirecta (5)

$$[\text{Cobre unido a ferroxidasa } (\mu\text{mol/L})] = [\text{ferroxidasa } (\mu\text{mol/L})] \times 0,05$$

$$[\text{Cobre no unido a ferroxidasa}] = [\text{cobre}] - [\text{cobre unido a ferroxidasa}]$$

2.6 Otras técnicas

La polarografía diferencial, la espectrofluorimetría de rayos X, la espectrometría de emisión por arco y la espectrometría de

emisión de plasma acoplado a radiofrecuencias no se han considerado aquí debido a que son técnicas muy específicas, de baja o nula implantación en el laboratorio clínico, precisan equipos caros y complejos y proporcionan resultados similares a los encontrados con las técnicas descritas.

3 PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS RECOMENDADOS

La metodología más apropiada para la medida de cobre en especímenes biológicos es la espectrometría de absorción atómica. En el caso de especímenes séricos es adecuada la técnica de llama, mientras que para la cuantificación en orina e hígado es necesario utilizar la atomización electrotrémica. Las técnicas de espectrometría de absorción molecular deberían ser abandonadas en beneficio de éstas.

3.1 Obtención de especímenes de suero y orina

a) Suero

Se recomienda el empleo de suero obtenido en tubos de vacío específicos para elementos traza (una vez comprobado que no presentan concentraciones detectables de cobre) o bien con jeringa de plástico. Deben evitarse los tubos de vacío con gel separador. Se permite un cierto grado de hemólisis ya que el cobre se reparte en partes aproximadamente iguales entre el suero y los eritrocitos. Es recomendable realizar las extracciones a la misma hora del día (por ejemplo, entre las 08 y 10 horas) debido al ritmo circadiano que presentan las concentraciones de este elemento en el suero.

Una vez extraída la sangre y coagulada se centrifuga durante 10 minutos a 500 g con el tapón puesto en el tubo para evitar contaminaciones procedentes de la centrifuga y evaporaciones. El suero puede conservarse en tubos de polipropileno o poliestireno bien tapados durante 15 días a temperatura ambiente o de manera prácticamente indefinida a -20°C . Todo el material que ha de estar en contacto con el espécimen (tubos de ensayo, puntas de pipeta, contenedores, etc.) ha de lavarse previamente, dejarlo entre 12 y 24 horas en una solución de ácido nítrico 1 ó 2 mmol/L y enjuagarlos varias veces con agua destilada y desionizada antes de su uso.

b) Orina

Las orinas han de recogerse idealmente durante 24 horas sobre 10 mL de HCl 6 mol/L en recipientes de plástico previamente lavados con HNO_3 1 mol/L. Una vez mezcladas se alicuotan y se conservan a -20°C hasta su procesamiento. Tras descongelarlas es necesario homogeneizarlas bien y centrifugarlas.

3.2 Procedimiento de medida de cobre en el suero por espectrometría de absorción molecular utilizando batocuproína

a) Condiciones analíticas

Medir la absorbancia de muestras y patrón a 480 nm frente a un blanco con HCl, ácido tricloroacético y cromógeno en las mismas proporciones que la muestra y agua en lugar del sobrenadante de la desproteínización.

b) Preparación de muestras y patrones

Tomar 2 mL de suero y mezclarlos con 1 mL de HCl 1 mol/L. Dejar 20 minutos a temperatura ambiente y añadir 1 mL de ácido tricloroacético 1,23 mol/L; mezclar y centrifugar.

Mezclar 2 mL de sobrenadante con la solución cromogénica (disulfonato de batocuproína 0,53 mmol/L, acetato sódico 3,3 mol/L, piro-sulfato de sodio 0,1 mol/L, *p*-metilaminofenol 5,5 mmol/L). Como patrón se emplea una solución acuosa de 31,5 $\mu\text{mol/L}$ de cobre.

c) Características metrologicas

El procedimiento es lineal hasta 126 $\mu\text{mol/L}$ y su detectabilidad en el suero es del orden de 3 $\mu\text{mol/L}$. La imprecisión intra-serial es inferior al 10% y la interserial al 15%. Es un procedimiento de fácil acceso por parte de cualquier laboratorio pero tiene la desventaja de que interfiere la hemólisis, precisa cantidades de suero elevadas (1-2 mL), se requiere desproteínización previa del suero y digestión de la orina, y su análisis consume mucho tiempo. Este procedimiento puede automatizarse tras la desproteínización.

3.3 Procedimiento de medida de la concentración de cobre en el suero por espectrometría de absorción atómica de llama

a) Condiciones analíticas

Se emplea un espectrómetro de absorción atómica de llama. La lámpara de cátodo hueco idealmente ha de ser mono-elemental para obtener la máxima intensidad de señal luminosa. Sin embargo, con lámparas multielementales pueden medirse concentraciones de 0,6 $\mu\text{mol/L}$ con una dilución del espécimen 1:1. La línea que se utiliza es la de 324,7 nm que está libre de interferencias y es la más intensa. La intensidad de corriente más habitual es de 15 mA (25 mA en las multielementales). La rendija se ajusta a 0,7 nm y se orienta la lámpara de manera que la señal luminosa que llegue al detector sea máxima. Una vez realizado esto se ajusta la ganancia a 100 (ajuste automático en los aparatos actuales). En general, no es necesario un precalentamiento prolongado de la lámpara ya que los aparatos actuales compensan automáticamente las diferencias en intensidad de la emisión aunque un periodo de 10 a 15 minutos es recomendable.

Se emplea una llama de acetileno-aire con presiones comprendidas entre 85 y 100 kPa, y 345 y 450 kPa, respectivamente. El mechero habitual de 10 cm de paso óptico es adecuado y ha de orientarse de manera que se obtenga la máxima señal con una solución acuosa de cobre de 31,5 $\mu\text{mol/L}$ mediante el ajuste en altura, profundidad y alineación. El haz de luz proveniente de la lámpara de cátodo hueco ha de formar un área nítida en el centro del mechero a 1 cm por encima del mismo. Esto puede comprobarse interponiendo en el haz una hoja de papel blanco. La velocidad de aspiración del nebulizador adecuada es de 4 mL/min y el tiempo de integración de la señal de, al menos, 0,5 s para evitar una oscilación demasiado elevada de la misma. Antes de realizar la lectura dejar que se establezca la señal (en los aparatos modernos esto se realiza automáticamente).

Otras comprobaciones adicionales que han de realizarse son: Que exista agua en el bucle de seguridad del desagüe de la cámara de nebulización y que se encuentre anclado el mechero.

b) Preparación de la muestra

Debido a la poca intensidad relativa de la línea de 324,7 nm del cobre la dilución de la muestra ha de ser la menor posible. Ha de llegarse a una solución de compromiso entre sensibilidad analítica y dilución que evite problemas de atasco en el tubo de aspiración del nebulizador y de partículas sólidas en la

ranura del mechero. Se han propuesto diluciones 1:1 y 1:4 (12). Con la primera se obtiene más sensibilidad analítica mientras que con la segunda (que es la empleada en el análisis del cinc) se evitan problemas de obstrucción. La dilución más adecuada es la 1:1 ya que permite detectar concentraciones muy bajas de cobre y el empleo de lámparas multielementales. Para evitar la obstrucción del nebulizador es suficiente emplear sueros bien desfibrinados y hacer un lavado con agua entre muestra y muestra de suero.

c) Preparación de los patrones

Es suficiente preparar tres soluciones patrón: 4,0, 8,0 y 16,0 $\mu\text{mol/L}$ (ya teniendo en cuenta que las muestras se introducen diluidas 1:1 con lo que los ajustes de la concentración han de programarse como 8,0, 16,0 y 32,0 $\mu\text{mol/L}$). Estos patrones pueden prepararse con HCl 0,1 mol/L (12) pero no es imprescindible. Si se ha comprobado la linealidad de la curva de calibración es suficiente emplear un único punto de calibración (31,5 $\mu\text{mol/L}$). Para evitar diferencias de viscosidad con el suero es necesario prepararlos con glicerina 0,66 mol/L. Existen disoluciones comerciales de 15,80 mmol/L a partir de la cual se puede preparar una solución de almacenamiento de 158 $\mu\text{mol/L}$ que es estable, al menos, tres meses a temperatura ambiente. A partir de esta se preparan los patrones cada vez que se realicen las medidas.

El blanco se realiza con la solución de glicerina 0,66 mol/L. Con esta se establece la línea base.

d) Características metrológicas

El procedimiento es lineal, al menos, hasta 31,5 $\mu\text{mol/L}$. Presenta una imprecisión intraserial de alrededor del 3% tanto en concentraciones en el límite inferior del intervalo de referencia como dentro del mismo o en la zona superior. La imprecisión interdía y la inexactitud relativa son inferiores al 10%. Límite de detección: 0,08 $\mu\text{mol/L}$. Este método es el de elección debido a su rapidez (ya que la preparación de los especímenes es mínima), economía de reactivos y relativa ausencia de interferencias. Sin embargo, la metodología presentada no está disponible en todos los laboratorios.

3.4 Procedimiento de preparación del pelo para la medida de su contenido de cobre

Se cortan trozos de unos 0,5 cm de largo y se lavan con 5 mL de Triton X-100[®], 10 mL/L, mezclando durante 2 horas. Después se enjuaga con agua desionizada varias veces y se añaden 3 mL de EDTA- Na_2 0,1 mol/L agitando durante 2 horas. Se vuelve a enjuagar con agua desionizada y se seca hasta peso constante a 75 °C en un horno. Unos 50 mg de pelo se digieren con 1 mL de H_2O_2 10 mol/L a 65-70 °C hasta sequedad (unas 8 horas). Se repite el proceso otra vez. El residuo se disuelve en 1 mL de HNO_3 0,5 mol/L durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se añaden 4 mL de agua desionizada. Se mide por espectrometría de absorción atómica de llama de manera análoga al suero (preparando los patrones en HNO_3 , 0,1 mol/L) o bien mediante atomización electrotrémica.

3.5 Procedimiento de medida de la concentración de cobre en orina por espectrometría de absorción atómica con atomización electrotrémica

a) Condiciones analíticas

Ha de emplearse una lámpara de cátodo hueco monoelemental para obtener la mayor intensidad de señal luminosa, la longi-

tud de onda de 324,7 nm y la rendija de 0,7 nm. Las cámaras de grafito han de ser pirolíticas con plataforma tipo L'Vov. Existe un gran número de programas para el análisis de cobre. En general suelen presentar una etapa, sencilla o doble, de secado (a 120 °C ó a 90 y 120 °C, respectivamente), una de mineralización alrededor de 1000 °C y la de atomización alrededor de 2300 °C (10). Un programa rápido y al alcance de cualquier equipo es el siguiente (2):

	T(°C)	Rampa (s)	Tiempo (s)	Flujo gas (mL/min)
Secado	100	10	20	300
Mineralización	900	10	30	300
Atomización	2400	1	3	50

utilizando un volumen de muestra de 20 μL . Idealmente se emplea lectura en área de pico y la integración se lleva a cabo durante 4 ó 5 s. Se puede añadir un paso adicional de lavado a 2600 °C.

Si no se posee un sistema de corrección de fondo adecuado puede ser necesaria una quelación con aminopirrolidina ditio-carbamato y posterior extracción pero tiene el problema de una mayor manipulación del espécimen, con la consiguiente posibilidad de contaminación y de pérdidas del cobre en las extracciones.

b) Preparación de la muestra

En general es adecuada una dilución 1:5 de las muestras de orina. No hay definido ningún modificador de matriz que mejore la medición de la concentración de cobre. Puede usarse una solución de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 5,5 mmol/L en Triton X-100[®] 2 mL/L o bien una solución sólo con Triton X-100[®].

c) Preparación de los patrones

Se pueden preparar patrones de 0,4, 0,8 y 1,6 mmol/L que se diluyen también 1:5 con el modificador de matriz de las muestras. A partir de una solución comercial de 15,8 mmol/L (por ejemplo, de la empresa Merck, referencia 1.09987.0001) se prepara una solución de almacenamiento de 158 $\mu\text{mol/L}$ en HNO_3 0,1 mol/L. Esta solución es estable, al menos, tres meses a temperatura ambiente. Los patrones han de prepararse en cada análisis. Tanto las puntas de pipeta como las cubetas y contenedores han de estar lavados previamente con ácido y enjuagados con agua desionizada como en el caso del suero.

El blanco consiste en una mezcla 1:5 de agua con modificador de matriz.

d) Características metrológicas

Este procedimiento tiene una imprecisión intraserial inferior al 10% e interdiaria inferior al 15%. El límite de detección es de 0,01 $\mu\text{mol/L}$. La espectrometría de absorción atómica con atomización electrotrémica es la técnica de elección para el análisis de orinas debido a su mayor sensibilidad analítica (si se utiliza llama no se pueden separar adecuadamente los valores fisiológicos y los bajos, aunque generalmente lo que interesan son las concentraciones elevadas). Sin embargo, es una técnica relativamente lenta y necesita de un aparataje costoso y un cierto entrenamiento para su correcto empleo.

3.6 Procedimiento de preparación de tejidos para la medida de su contenido de cobre

Con el fin de estandarizar las condiciones analíticas es preferible la medida en tejido seco. El tejido (generalmente procedente de una punción-aspiración con aguja fina) se seca, en un re-

ciente exento de elementos traza, a 90 °C durante el tiempo suficiente hasta que se consigue masa constante. Si la masa está comprendida entre 2 y 15 mg se somete a hidrólisis ácida con 200 µL de HNO₃ ultrapuro en un recipiente de polipropileno de 3-5 mL de capacidad, cerrado a rosca herméticamente, durante 2-5 horas según se trate de tejido blando o hueso, respectivamente (2). Posteriormente, se deja enfriar el recipiente antes de abrirlo y se añade agua desionizada a la disolución final adecuada (por ejemplo, se pueden añadir 1,8 mL para obtener un volumen final de 2 mL). La calibración más adecuada se realiza con un material de referencia (por ejemplo, hígado bovino NIST, ref. 1577) o bien por el método de adición de patrón pero éste tiene la desventaja de su lentitud. El sistema de corrección de fondo por efecto Zeeman es preferible en este tipo de análisis aunque puede emplearse la corrección de fondo con lámpara de deuterio.

Los sistemas que emplean hidróxido de tetrametilamonio o la calcinación de la materia orgánica presentan problemas de imprecisión, laboriosidad y riesgos de contaminación. La hidrólisis con otros ácidos como el perclórico presentan problemas de ajuste del volumen final.

3.7 Control de la calidad

a) Materiales de control

Para suero pueden utilizarse los Lyphocheck (Bio-Rad), Seronorm Trace Elements (Nycomed) u otros similares.

Para orina pueden utilizarse los de la firma Lyphocheck Quantitative Urine (Bio-Rad), Seronorm TE Urine (Nycomed) u otros similares.

b) Programas de evaluación externa de la calidad

Es recomendable participar de modo asiduo en al menos un programa externo de control de calidad. La mayoría de los programas de bioquímica incluyen el cobre entre los parámetros ofertados para suero.

Existen asimismo numerosos programas externos de evaluación de la calidad específicamente diseñados para elementos traza que incluyen el cobre. Como ejemplo podemos citar el TEQAS de Surrey (Inglaterra), el de la SFBC (Francia) y el de QUEBEC (Canada).

4 INTERVALOS DE REFERENCIA (2,6,7,13-18)

Suero-Cobre; concentración de sustancia*

– Hasta los 6 meses:	3,1-11,0 µmol/L
– De 6 meses a 6 años:	14,1-29,8 µmol/L
– De 6 años a 12 años:	12,6-25,1 µmol/L
– Hombres:	11,0-22,0 µmol/L
– Mujeres:	12,6-24,3 µmol/L
– Embarazo a término:	18,5-47,4 µmol/L

Paciente-Excreción de cobre; cantidad de sustancia (24 h)**

– Grupos de Referencia	0,047-0,55 µmol/24h
– Enfermedad de Wilson	>1,57 µmol/24h

Hep-Cobre; contenido de sustancia***

– Grupos de Referencia	0,16-0,55 mmol/kg (tejido seco)
– Enfermedad de Wilson	>3,9 mmol/kg (tejido seco)

Pil-Cobre; contenido de sustancia

– Segmentos proximales	0,06-0,25 mmol/kg
– Segmentos distales y pelo en general	0,31-0,94 mmol/kg

Suero Libre-Cobre (no unido a ferroxidasa); concentración de sustancia

– Grupos de Referencia	0,79 - 1,57 µmol/L
– Enfermedad de Wilson	> 3,15 µmol/L

* Se eleva de forma similar al embarazo a término durante la terapia con estrógenos (debido al aumento de síntesis de ferroxidasa), anticonceptivos orales y antiepilépticos.

** También se eleva en la cirrosis biliar, hepatitis crónica activa, artritis reumatoide y proteinuria.

*** También se eleva en la sarcoidosis y cirrosis biliar.

5 BIBLIOGRAFÍA

1. Ohuot O, Tarallo P. Le cuivre. En: Les Oligoelements en Medicine et Biologie. Paris: Lavoisier TEC & DOC; 1991: p. 459-88.
2. Fernández MD. Cobre. En: Elementos traza: Aspectos bioquímicos, analíticos y clínicos. Barcelona: Publicaciones de la SEQC, 1998: p.223-59.
3. National Research Council. Recommended dietary allowances. 10ª ed. Washington DC: Academic Press; 1989.
4. The Society for Minerals and Trace Elements. Diagnostics of copper metabolism defects. J Trace Elements Med Biol 1996; 10: 263
5. Cox DW, Roberts EA. Wilson Disease. En: Sleisenger & Fordtran's: Gastrointestinal and Liver Disease, 6ª ed. New York: Saunders; 1998: p. 1104-12.
6. Taylor A. Detection and monitoring of disorders of essential trace elements. Ann Clin Biochem 1996; 33: 486-510.
7. Arnaud J. Determination du cuivre et du cinc. En: Techniques d'analyse des oligoelements. Paris: Lavoisier TEC & DOC; 1995: p. 77-89.
8. Baruthio F, Pierre F, Arnaud J. Comparisons interlaboratoires cuivre-cinc seriques. Ann Biol Clin 1990; 48: 239-46.
9. Arnaud J, Chappuis P, Zawislak R, Jaudon MC, Bullanger J. Mise au point d'un dosage d'element trace par absorption atomique electrotermiq. Ann Biol Clin 1989; 47: 583-95.
10. Slavin W. Graphite furnace AAS for biological materials. Sci Tot Environ 1988; 71: 17-35.
11. Cocho JA, Louro O, Tutor JC. Determinación del cobre sérico no unido a ferroxidasa I (ceruloplasmina). Quim Clin 1992; 11: 142-6.
12. Monreal JJ, Cocho JA, Seijas MV, Deulofeu R, Navajo JA, González C, et al.. Determinación de las concentraciones séricas de cobre y de zinc. Estudio multicéntrico. Quim Clin 1994; 13: 60-7.
13. Arnaud J, Chappuis P, Jaudon MC, Bellanger J. Marqueurs biologiques nutritionnels des carences en cinc, cuivre et selenium. Ann Biol Clin 1993; 51: 589-604.
14. Pediatric Reference Ranges. 3ª ed. Washington DC: AACC; 1997.
15. Iyengar V, Woittiez J. Trace elements in human clinical specimens: evaluation of literature data to identify reference values. Clin Chem 1988; 34: 474-81.
16. Cornelis R, Heinzow B, Herber RFM, Molin Christensen J, Poulsen OM, Sabbioni E, et al. Sample collection guidelines for trace elements in blood and urine. J Trace Elements Med Biol 1996; 10: 103-27.
17. Caroli S, Alimonti A, Coni E, Petrucci F, Senofonte O, Violante N. The assessment of reference values for elements in human biological tissues and fluids: A systematic review. Crit Rev Anal Chem 1994; 24: 363-98.
18. NCCLS. Control of preanalytical variation in trace element determinations. Approved Guideline. NCCLS C38-A, Vol 17, N°13. Villanova: NCCLS; 1997.

Correspondencia:
SEQC
Comisión de Elementos Trazas
Padilla, 323-325
08025 Barcelona