

## Determinación de la concentración sérica de cobre(II) (no unido a ferroxidasa)

J.A. Cocho<sup>a</sup>, O. Louro y J.C. Tutor

### Resumen

*Se describe un método para la determinación de la concentración de cobre(II) (no unido a ferroxidasa) en suero por espectrometría de absorción atómica con atomización electrotrémica. La técnica implica la extracción del cobre(II) con metil-isobutil-cetona después de haberlo complejoado con amino-pirrolidin-ditiocarbamato. Se estudia el efecto de la cantidad de reactivo, imprecisión y recuperación analítica. Se realiza también un estudio de valores de referencia sobre el grupo de 112 adultos de ambos sexos presuntamente sanos.*

### Introducción

Los estudio sobre la determinación de las concentraciones séricas de cobre(II) (no unido a ferroxidasa) —también conocido como cobre no-ceruloplasmínico— son escasos, habiéndose prestado a este tema poca atención tanto desde el punto de vista puramente analítico (1) como fisiopatológico.

### Summary

*A method for determination of serum concentration of copper(II) (non ferroxidase bound) by electrothermal atomic absorption spectrometry is described. Copper(II) is previously chelated with amino-pyrrolidin-dithiocarbamate and then extracted in isobutyl methyl ketone. The amount of reagent required for the extraction, reproducibility and analytical recovery are investigated. The reference intervals corresponding to 112 apparently healthy subjects from both sexes, is also studied.*

Los estudios de Frommer (2) sugieren que la determinación de esta magnitud bioquímica podría presentar interés en el seguimiento del tratamiento, así como en el diagnóstico diferencial entre la enfermedad de Wilson y otras enfermedades hepáticas. Plantea asimismo la inexactitud que conlleva su estimación a partir de las concentraciones de cobre(II) y ferroxidasa.

Se ha desarrollado un procedimiento para la determinación de cobre(II) (no unido a ferroxidasa) en suero por espectrometría de absorción atómica con atomización electrotrémica, permitiendo el cálculo de la concentración sérica de cobre(II) (unido a ferroxidasa) por diferencia con la concentración de cobre(II) «total».

La técnica implica la extracción del cobre(II) (no unido a ferroxidasa) mediante metil-isobutil-cetona, después de haberlo complejoado con amino-pirrolidin-ditiocarbamato.

Se ha realizado asimismo un estudio de los valores de referencia sobre un grupo de referencia integrado por 112 adultos de ambos sexos presuntamente sanos.

<sup>a</sup>Laboratorios de Alteraciones Metabólicas y Nutricionales y Laboratorio central, Hospital General de Galicia-Clínico Universitario, Santiago de Compostela, España.  
Recibido 11-1-91  
Aceptado 9-5-91

Finalmente, se ha hecho un estudio de la correlación de la concentración de masa de la ferroxidasa en suero y su concentración catalítica (actividad oxidásica) con las distintas fracciones de la concentración sérica de cobre(II) en un grupo de 67 pacientes no seleccionados.

## Material y métodos

### Instrumentación

Las medidas de absorción atómica se realizaron a 324,4 nm usando un espectrómetro de absorción atómica Perkin-Elmer modelo 1100B con lámpara de cátodo hueco y trabajando a 15 mA y con una rendija de 0,7 nm. La atomización se realizó en un horno Perkin-Elmer modelo HGA 700, usando tubos de grafito pirolíticos con plataforma de L'Vov (ref. 112660) y operando con las condiciones que aparecen en la tabla I. Las muestras fueron inyectadas en el interior del horno de grafito mediante un muestreador automático Perkin-Elmer modelo AS-70. Las lecturas de absorbancia fueron realizadas en altura de pico para el cobre(II).

Para la medida de los distintos reactivos se utilizaron micropipetas automáticas Oxford de volumen graduable, entre 40-200 y 200-1000  $\mu\text{L}$  según los casos, y un pipeteador-dilutor Hamilton Microlab M.

Para las distintas operaciones auxiliares se utilizó una centrífuga de sobremesa Jouan modelo B3-11 y un agitador «vortex» Hellma.

Todo el material utilizado fue lavado durante 48 horas con ácido nítrico (1,4 mol/L) y lavado tres veces con agua destilada antes de ser usado.

### Reactivos

—Metil-isobutil-cetona (ref. Merck 6146).

—Amino-pirrolidin-ditiocarbamato (ref. Sigma P-8765).  
—Patrón de cobre Titrisol (ref. Merck 9987).  
—ácido nítrico (ref. Merck 456).  
—Tritón X-100 (ref. Merck 12298).  
—Agua obtenida mediante un sistema Milli-Q (Millipore)

### Procedimientos

**Determinación de cobre(II) (no unido a ferroxidasa):** Se transfieren 200  $\mu\text{L}$  de suero a un tubo de centrifuga (previamente tratado con ácido nítrico) y a éste se añaden 200  $\mu\text{L}$  de la disolución de amino-pirrolidin-ditiocarbamato. Se homogeneiza bien la mezcla y se centrifuga ésta durante 3 minutos a 1300 g para asegurarse de que la totalidad del volumen queda en el fondo del tubo. Se añade 600  $\mu\text{L}$  de metil-isobutil-cetona saturada de agua y se realiza la extracción mediante agitación en «vortex» durante 50 segundos, a continuación se centrifugan los tubos tapados durante 5 minutos a 1300 g. Finalmente se transfieren 200  $\mu\text{L}$  de la fase orgánica a las copas de teflón del muestreador automático de la cámara de grafito para la medida de la concentración de cobre(II).

**Determinación de cobre(II) en suero:** Los especímenes se diluyen en una proporción 1:15 con una disolución de ácido nítrico (0,03 mol/L) en agua y conteniendo 2 mL/L de Triton X-100®.

La concentración catalítica de la ferroxidasa se determina a 30 °C, utilizando *o*-dianisidina como sustrato, en un analizador Cobas Fara de Roche Diagnostics (3). La concentración de masa de la ferroxidasa en suero se determina por inmunodifusión radial utilizando placas NOR-Partigen (Instituto Behring) y sueros de control de la misma procedencia.

**Tabla I**

#### A. Programa de temperaturas y condiciones instrumentales para la determinación de cobre(II) tras extracción con metil-isobutil-cetona

Etapa	Temperatura (°C)	Rampa(s)	Duración(s)
Secado	120	18	17
Mineralización	700	15	25
Atomización	2700	0	5
Limpieza	2700	1	2

#### B. Programa y condiciones instrumentales para la determinación de cobre(II) en suero

Etapa	Temperatura (°C)	Rampa(s)	Duración(s)
Secado 1	9	10	10
Secado 2	140	10	35
Mineralización	700	15	20
Atomización	2200	0	6
Limpieza	2600	1	7

Volumen de muestra 10  $\mu\text{L}$ . Gas interno argón, caudal 5 nL/s excepto durante la atomización que fué de 0,17 mL/s en el primer caso y de 0 mL/s en el segundo.

## Resultados

### Programa de temperaturas

Para la optimización de las condiciones de trabajo usando metil-isobutil-cetona como disolvente se realizaron las correspondientes curvas de mineralización y atomización (figura 1).

Las condiciones finales aparecen recogidas en la tabla I.

### pH de la extracción

El intervalo de pH óptimo para la extracción del complejo Cu(II)-amino-pirrolidin-ditiocarbamato en metil-isobutil-cetona es (0,1 — 8) (4).

No se ha realizado ajuste de pH sobre las muestras con el fin de evitar la liberación parcial del cobre(II) que pudiera estar unido a la ferroxidasa. Por esta misma causa los patrones acuosos de cobre no se preparan en medio ácido.

### Tiempo de la extracción

Diferentes alícuotas de un patrón de 6  $\mu\text{mol/L}$  fueron sometidas a períodos crecientes de extracción entre 10 y 120 segundos. La extracción fue ya total para un período de 10 segundos. Se adoptó como estándar un tiempo de 50 segundos para asegurarse una completa y reproducible extracción del complejo Cu(II)-amino-pirrolidin-ditiocarbamato.

### Cantidad de amino-pirrolidin-ditiocarbamato.

Diferentes cantidades de amino-pirrolidin-ditiocarbamato añadidos a un patrón de 6  $\mu\text{mol/L}$ , llevadas a un volumen prefijado y sometidas al proceso de extrac-

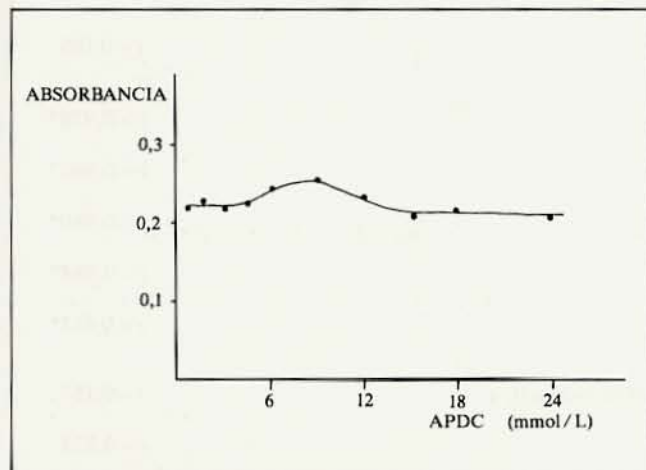


Figura 1. Efecto de la cantidad de amino-pirrolidin-ditiocarbamato sobre la extracción del complejo.

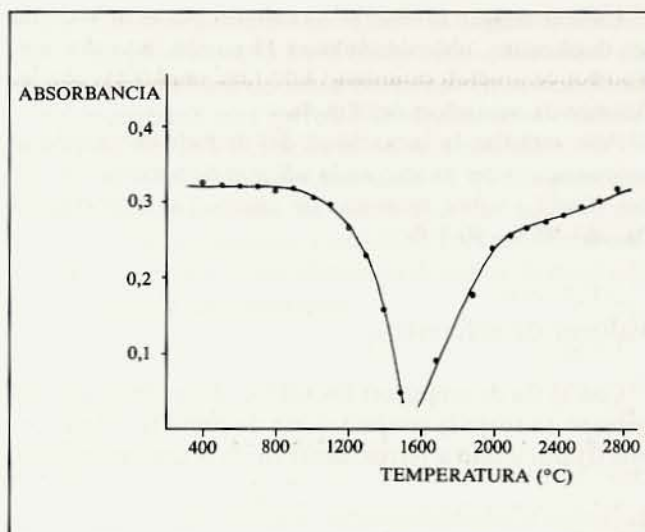


Figura 2. Curvas de mineralización y atomización del complejo Cu(II)-amino-pirrolidin-ditiocarbamato extraído con metil-isobutil-cetona.

ción con metil-isobutil-cetona. Los resultados aparecen en la figura 2.

Los resultados muestra que la máxima respuesta se produce con concentraciones entre 6 y 12 mmol/L, pero las diferencias entre 0,5 y 24 mmol/L y el exceso de amino-pirrolidin-ditiocarbamato parece no tener ningún efecto adverso. La concentración finalmente elegida fue de 24 mmol/L.

### Calibración

Para obtener la gráfica de calibración, para cobre(II) (no unido a ferroxidasa), se prepararon diariamente disoluciones acuosas de un patrón de cobre manteniendo 1,1, 1,6 y 3,1  $\mu\text{mol/L}$  y fueron sometidas al procedimiento estándar de extracción.

Para el cobre(II) se prepararon disoluciones de un patrón de cobre(II) conteniendo 7,9, 15,7 y 31,5  $\mu\text{mol/L}$ .

Para el control de los resultados de cobre(II) en suero se utilizan como control interno distintos sueros de control comerciales y como control externo se participa en el programa de control de calidad para cobre(II) y cinc(II) organizado por la Société Française de Biologie Clinique.

### Imprecisión e inexactitud

La imprecisión intraserial se estudió midiendo 8 veces un suero, obteniéndose un valor medio de cobre(II) (no unido a ferroxidasa) de 1,73  $\mu\text{mol/L}$  y una desviación estándar de 0,07  $\mu\text{mol/L}$ , que implica un coeficiente de variación del 3,8 %. Esta imprecisión también se estudió por el método de los duplicados y se obtuvo para 180 parejas un valor medio de 1,40  $\mu\text{mol/L}$  (amplitud 0,70-4,47  $\mu\text{mol/L}$ ) y un coeficiente de variación del 6,3 %.

La imprecisión interserial se calculó por el método de los duplicados, obteniendo para 15 parejas un valor medio de 1,46  $\mu\text{mol/L}$  (amplitud 1,02-1,86  $\mu\text{mol/L}$ ) y un coeficiente de variación del 5,8 %.

Para estudiar la inexactitud del método se calcula la recuperación del mismo en la adición de patrones de cobre ( $\text{CuCl}_2$ ) sobre muestras de suero. La recuperación fue del 95,5 - 99,7 %.

### Valores de referencia

Con el fin de establecer los valores de referencia se determinó en suero la concentración de cobre(II) y la de cobre(II) (no unido a ferroxidasa) en un grupo de adultos,

clínicamente sanos y que no tomaban ningún tipo de medicamentos, integrado por 72 hombres y 40 mujeres. Los resultados obtenidos aparecen recogidos en la tabla II. Todas las distribuciones son gaussianas excepto la del cobre(II) (no unido a ferroxidasa) en el grupo de mujeres.

### Aplicación al estudio de una población patológica

En 67 pacientes no seleccionados con distinto proceso patológicos se calcularon los coeficientes de correlación entre las distintas magnitudes bioquímicas estudiadas. Los resultados obtenidos se indican en la tabla III.

**Tabla II**  
Valores de referencia de la concentración sérica de cobre(II) y de cobre(II)(no unido a ferroxidasa) en adultos ( $\mu\text{mol/L}$ )

	<i>n</i>	Media	Mediana	<i>s</i>	Intervalo referencia
COBRE(II)*					
—Hombres	72	15,70	15,90	2,47	10,75-20,64
—Mujeres	40	17,38	17,47	3,20	10,98-23,79
COBRE(II) (no unido a ferroxidasa)					
—Hombres	72	1,34	1,32	0,24	0,86-1,83
—Mujeres	40	1,31	1,28	0,26	0,78-1,84

\* $P \approx 0,006$

**Tabla III**  
Correlación entre distintas magnitudes bioquímicas séricas en pacientes no seleccionados ( $n=67$ )

Ferroxidasa, <i>b</i> frente a ferroxidasa, <i>p</i>	$r=0,979^*$
$\frac{\text{Ferroxidasa, } b}{\text{Ferroxidasa, } p}$ frente a ferroxidasa, <i>p</i>	$r=0,087$
$\frac{\text{Ferroxidasa, } b}{\text{Ferroxidasa, } p}$ frente a ferroxidasa, <i>b</i>	$r=0,105$
Cobre(II), <i>c</i> frente a ferroxidasa, <i>p</i>	$r=0,978^*$
Cobre(II) (unido a ferroxidasa), <i>c</i> frente a ferroxidasa, <i>p</i>	$r=0,980^*$
Cobre(II), <i>c</i> frente a ferroxidasa, <i>b</i>	$r=0,980^*$
Cobre(II) (unido a ferroxidasa), <i>c</i> frente a ferroxidasa, <i>b</i>	$r=0,984^*$
Cobre(II) (unido a ferroxidasa), <i>c</i> frente a $\frac{\text{Ferroxidasa, } b}{\text{Ferroxidasa, } p}$	$r=0,613^*$
Cobre(II) (no unido a ferroxidasa), <i>c</i> frente a [cobre(II) (unido a ferroxidasa)], <i>c</i>	$r=0,157$
Cobre(II) (no unido a ferroxidasa), <i>c</i> frente a cobre(II), <i>c</i>	$r=0,224$

\* $P < 0,001$

*b*=concentración catalítica ( $\mu\text{kat/L}$ ) *c*=concentración de sustancia ( $\mu\text{mol/L}$ ); *p*=concentración de masa ( $\text{mg/L}$ ).

## Discusión

Los valores de referencia obtenidos para la concentración sérica de cobre(II) muestran una diferencia significativa en función del sexo ( $P \cong 0,006$ ), lo cual está de acuerdo con los resultados de otros autores (5). No obstante para el cobre(II) (no unido a ferroxidasa) no se encontró una diferencia significativa en función del sexo ( $P = 0,4$ ). Estos resultados corroboran el hecho de que las mayores concentraciones séricas de cobre en las mujeres se deberían a un efecto hormonal sobre la síntesis hepática de ferroxidasa.

En los hombres el cobre(II) (no unido a ferroxidasa) representa aproximadamente el 8,5 % de la concentración sérica de cobre(II) y en las mujeres el 7,5 % aproximadamente, lo cual es asimismo concordante con los datos de la bibliografía (5).

En el grupo de pacientes estudiado, las correlaciones entre la concentración de cobre(II) sérico y la concentración de masa de ferroxidasa o su concentración catalítica no mejoran de modo significativo al considerar el cobre(II) (unido a ferroxidasa) en vez de la totalidad del cobre(II).

Contrariamente a lo señalado en recién nacidos (6), en este grupo de pacientes adultos no se encontró una correlación estadísticamente significativa entre el contenido catalítico de la ferroxidasa y su concentración de masa

o su concentración catalítica. Como es lógico se obtuvo una correlación específica y el cobre ceruloplasmínico expresado por unidad de masa de la proteína específica.

No se encontró una correlación significativa entre cobre(II) (no unido a ferroxidasa y con el cobre(II) «total» o el cobre(II) (unido a ferroxidasa), lo que sugiere que durante el tratamiento de complejación con amino-pirrolidin-ditiocarbamato y extracción con metil-isobutilcetona no se produce una liberación de cobre(II) integrado en la molécula de ferroxidasa.

## Bibliografía

1. Blomfield J, Macmahon RA. Microdetermination of plasma and erythrocyte copper by atomic absorption spectrophotometry. *J Clin Path* 1969; 22: 136-143.
2. Frommer DJ. Direct measurement of serum non-ceruloplasmin copper in liver disease. *Clin Chim Acta* 1976; 68: 303-307.
3. Louro MO, Tutor JC. Determinación de la actividad oxidásica de la ceruloplasmina en el Cobas Bio y Cobas Fara. *Acta Bioquim Clin Latinoam* 1990; en prensa.
4. Ximénez Herraiz L. Espectroscopía de Absorción Atómica Vol II. Madrid: Publicaciones Analíticas, 1980; 325.
5. Jacob RA. Trace Elements. En: Tietz NW, dir. *Textbook of Clinical Chemistry*. Philadelphia: Saunders, 1986: 965-996.
6. Tutor JC, San José ME, Paz JM, Porto JA, Fraga JM. Ceruloplasmina y su actividad oxidásica en recién nacidos. *Acta Bioquim Clin Latinoam* 1985; 19: 159-165.