

ARTÍCULOS ORIGINALES

Determinación del cobre sérico no unido a ferroxidasa I* (ceruloplasmina)

J.A. Cocho^a, O. Louro, J.C. Tutor.

Resumen

Se describe un método para la determinación de cobre no unido a ferroxidasa I en suero por espectrometría de absorción atómica con atomización electrotérmica. La técnica implica la extracción del cobre con metil-isobutil-cetona después de haberlo complejado 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 un grupo de 112 adultos presuntamente sanos de ambos sexos.

Introducción

Los estudios sobre la determinación de las concentraciones séricas de cobre no unido a ferroxidasa I son escasos, habiéndose prestado a este tema poca atención, tanto desde el punto de vista puramente analítico (1), como fisiopatológico.

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

Summary

A method for determination of serum non-ferroxidase bound by electrothermal atomic absorption spectrometry (ETA-AAS) was described. Copper was previously chelated with amino-pyrrolidin-dithiocarbamate and then extracted in isobutyl methyl ketone. The amount of reagent required for the extraction, imprecision and analytical recovery were investigated. The reference interval corresponding to 112 supposedly healthy individuals from both sexes, was also studied.

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 y ferroxidasa I.

Se ha desarrollado un procedimiento para la determinación de cobre no unido a ferroxidasa I en suero por espectrometría de absorción atómica con atomización electrotérmica, permitiendo el cálculo del cobre unido a ferroxidasa I por diferencia de la concentración sérica de cobre.

La técnica implica la extracción del cobre no ligado a la ferroxidasa I mediante metil-isobutil-cetona, después de haberlo complejado 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 clínicamente sanos.

Finalmente, se ha hecho un estudio de la correlación de la concentración de masa de la ferroxidasa I y su concentración catalítica (actividad oxidásica) con las distin-

^a Laboratorio de Alteraciones Metabólicas y Nutricionales y Laboratorio Central, Hospital General de Galicia-Clinico Universitario, Santiago de Compostela, España.

Recibido 11-1-91
Aceptado 9-5-91

Este artículo fue publicado en *Química Clínica* 1991; 10 (5). Dado las múltiples imprecisiones que aparecían hemos considerado adecuada la publicación de una versión corregida.

*Término adoptado según las recomendaciones de la IUPAC y aceptadas por la SEQC.

tas fracciones de las concentraciones de cobre sérico 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 1100 B 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 no unido a ferroxidasa I y en área de pico para el cobre.

Para la medida de los distintos reactivos se utilizaron micropipetas automáticas Oxford de volumen graduable, entre 40-200 y 200-1000 μL según los casos, y un pipeteador-diluidor 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 al 10 % (v/v) 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).
- Acido nítrico (ref. Merck 456).
- Triton X-100[®] (ref. Merck 12298).
- Agua obtenida mediante un sistema Mili-Q (Millipore)

Procedimientos

Determinación de cobre no unido a ferroxidasa I: Se transfieren 200 μL de suero en un tubo de centrifuga (previamente tratado con ácido nítrico) y a éste se añaden 200 μL de la disolución de amino-pirrolidin-ditiocarbamato. Se homogeneiza bien la mezcla y se centrifuga esta durante 3 minutos a 1300 g para asegurarse de que la totalidad del volumen queda en el fondo del tubo. Se añade 600 μL 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 μL 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.

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

La concentración catalítica de la ferroxidasa I se determinó a 30 °C, utilizando *o*-dianisidina como sustrato, en un analizador Cobas Fara de Roche Diagnostics (3). La ferroxidasa I en concentración de masa (inmunoreactiva) se determinó 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 tras extracción con metil-isobutil-cetona

<u>Etapa</u>	<u>Temperatura (°C)</u>	<u>Rampa (s)</u>	<u>Duración (s)</u>
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 en suero

<u>Etapa</u>	<u>Temperatura (°C)</u>	<u>Rampa (s)</u>	<u>Duración (s)</u>
Secado 1	90	10	10
Secado 2	140	10	35
Mineralización	700	15	20
Atomización	2200	0	6
Limpieza	2600	1	7

Volumen de muestra 10 μL . Gas interno argon, caudal 5 mL/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-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 que pudiera estar unido a ferroxidasa I. Por esta misma causa los patrones acuosos de cobre no se preparan en medio ácido.

Tiempo de 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-amino-pirrolidin-ditiocarbamato.

Cantidad de amino-pirrolidin-ditiocarbamato

Diferentes cantidades de amino-pirrolidin-ditiocarbamato fueron añadidas a un patrón de 6 $\mu\text{mol/L}$, llevadas a un volumen prefijado y sometidas al proceso de extracción con metil-isobutil-cetona. Los resultados aparecen en la figura 2.

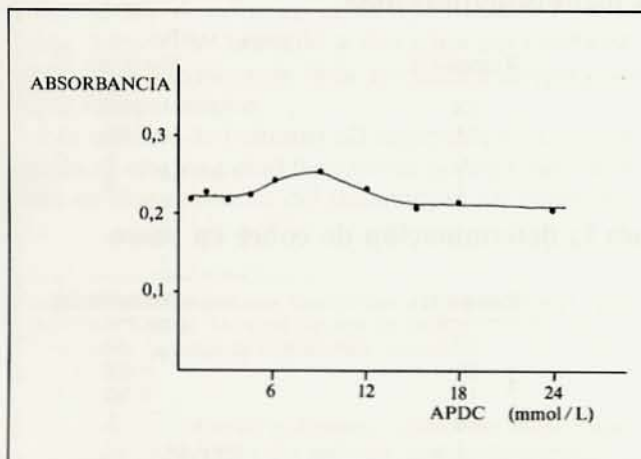


Figura 2. Efecto de la cantidad de amino-pirrolidin-ditiocarbamato sobre la extracción del complejo.

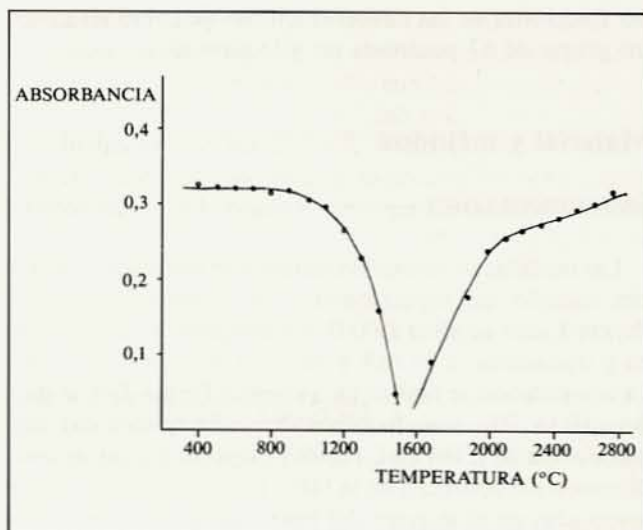


Figura 1. Curvas de mineralización y atomización del complejo Cu-amino-pirrolidin-ditiocarbamato extraído con metil-isobutil-cetona.

Los resultados muestran que la máxima respuesta se produce con una concentración de entre 6-12 mmol/L, pero no se producen diferencias de importancia con concentraciones 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 no unido a ferroxidasa I, se prepararon diariamente disoluciones acuosas de un patrón de cobre conteniendo 1,1, 1,6 y 3,1 $\mu\text{mol/L}$ y fueron sometidas al procedimiento estándar de extracción.

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

Para el control de los resultados de cobre 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 y zinc 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 no unido a ferroxidasa I 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 $\mu\text{mol/L}$ (intervalo 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 $\mu\text{mol/L}$ (intervalo 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 (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 la concentración cobre sérico y la de cobre no unido a ferroxidasa I en un grupo de adultos, clínicamen-

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

Aplicación al estudio de una población patológica

En 67 pacientes no seleccionados con distintos procesos 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 y cobre no unido a ferroxidasa I en adultos ($\mu\text{mol/L}$)

	<i>n</i>	Media	Mediana	<i>s</i>	Intervalo Referencia
COBRE					
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 NO UNIDO A FERROXIDASA I					
Hombres	72	1,34	1,32	0,24	0,86- 1,83
Mujeres	40	1,31	1,28	0,26	0,78- 1,84

* $P \leq 0,006$

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

Magnitudes correlacionadas		Coefficiente de correlación
Ferroxidasa I, <i>b</i>	Ferroxidasa I, <i>q</i>	$r = 0,979^*$
Ferroxidasa I, <i>b</i>	Ferroxidasa I, <i>q</i>	$r = 0,087$
Ferroxidasa I, <i>q</i>		
Ferroxidasa I, <i>b</i>	Ferroxidasa I, <i>b</i>	$r = 0,105$
Ferroxidasa I, <i>q</i>		
Cobre, <i>c</i>	Ferroxidasa I, <i>q</i>	$r = 0,978^*$
Cobre (unido a ferroxidasa I), <i>c</i>	Ferroxidasa I, <i>q</i>	$r = 0,980^*$
Cobre, <i>c</i>	Ferroxidasa I, <i>b</i>	$r = 0,980^*$
Cobre (unido a ferroxidasa I), <i>c</i>	Ferroxidasa I, <i>b</i>	$r = 0,984^*$
	Ferroxidasa I, <i>b</i>	
Cobre (unido a ferroxidasa I), <i>c</i>		$r = 0,613^*$
ferroxidasa I, <i>p</i>		
Cobre (no unido a ferroxidasa I), <i>c</i>	Cobre (unido a ferroxidasa I), <i>c</i>	$r = 0,157$
Cobre (no unido a ferroxidasa I), <i>c</i>	cobre <i>c</i>	$r = 0,224$

* $P < 0,001$

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

Discusión

Los valores de referencia obtenidos para la concentración sérica de cobre 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 no unido a ferroxidasa I 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 I.

En los hombres el cobre no unido a ferroxidasa I representa aproximadamente el 8,5 % de la concentración sérica de cobre 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 sérico y la ferroxidasa I determinada como concentración de masa (inmunorreactiva) o como concentración catalítica (actividad oxidásica) no mejoran de modo significativo al considerar el cobre unido a ferroxidasa I en vez de cobre.

Contrariamente a lo señalado en recién nacidos (6), en este grupo de pacientes adultos no se encontró una correlación estadísticamente significativa entre el contenido de actividad catalítica (actividad oxidásica específica) y

la ferroxidasa I determinada por un método inmunoquímico o su concentración catalítica. Como es lógico se obtuvo una correlación altamente significativa entre el contenido de actividad catalítica de la ferroxidasa I (actividad oxidásica específica) y el cobre unido a ferroxidasa I expresado por unidad de masa de la proteína específica. ($r=0,613$ $P<0,001$)

No se encontró una correlación significativa del cobre no unido a ferroxidasa I con el cobre o el cobre unido a ferroxidasa I, lo que sugiere que durante el tratamiento de complejación con amino-pirrolidin-ditiocarbamato y extracción con metil-isobutil-cetona no se produce una liberación de cobre integrado en la molécula de ferroxidasa I.

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-caerulo-plasmin 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* 1991; 25: 119-125.
4. Ximénez Herraiz L. Espectroscopia 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.