

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.
13. Jg. 1975, S. 489-491

Bestimmung des Serumkupfers mit der Atomabsorptionsspektrometrie

Von H. v. Campenhausen und O. Müller-Plathe

Aus dem Zentrallaboratorium (Chefarzt: Dr. O. Müller-Plathe) des Allgemeinen Krankenhauses Altona, Hamburg

(Eingegangen am 12. Mai/26. Juni 1975)

Zusammenfassung: Es wird eine vereinfachte Modifikation der atomabsorptionsspektrometrischen Serumkupferbestimmung mit Enteiweißung, jedoch ohne Inkubation bei 90 °C angegeben. Das Verfahren zeichnet sich durch hohe Präzision und Richtigkeit sowie durch Linearität im gesamten klinisch interessanten Bereich aus.

Determination of serum copper by atomic absorption spectrometry

Summary: A simple modification of the atomic absorption method for the determination of serum copper is described, with deproteinization but without incubation at 90 °C. The method is characterized by high precision and accuracy, and it is linear throughout the clinically important range.

Einführung

Bei der Bestimmung des Serumkupfers nach dem von *Olson & Hamlin* (1, 2) beschriebenen Verfahren wird nach erfolgter Enteiweißung mit Trichloressigsäure 15 Minuten lang bei 90 °C inkubiert, anschließend zentrifugiert und der Überstand zur Messung eingesetzt. Bei der nachfolgend beschriebenen Modifikation ergibt sich durch den Fortfall der Inkubation ein weniger störanfälliger Arbeitsgang, zudem werden höhere Extinktionen im Meßansatz erzielt.

Material und Methoden

Geräte

Atomabsorptionsspektrophotometer

Für die vorliegende Untersuchung wurde das Gerät FMD 3 der Firma Carl Zeiss, 7082 Oberkochen, verwendet.

Vibrationsmischer Whirlmix (Cenco Instruments, Breda, Niederlande)

Reagenzien

1. Cäsiumchlorid z. A. (Merck Nr. 2038)
2. 3 mol/l Trichloressigsäurelösung, etwa 40% (Merck 811)
3. Cation-Cal (Merz und Dade, 8 München 50, Lerchenstraße 5)

Lösungen

1. Enteiweißungslösung (Trichloressigsäure 1,5 mol/l, Cäsiumchlorid 3 mmol/l). 250 mg Cäsiumchlorid in 250 ml Trichloressigsäure auflösen. Auffüllen mit doppelt destilliertem Wasser auf 500 ml.
2. Blindlösung. 100 ml Lösung 1 mit 400 ml doppelt destilliertem Wasser mischen.
3. Standardlösung: Cation-Cal. Zweckmäßige Kupferkonzentration zur Kalibrierung um 30 µmol/l.

Methodik

Zu 2,0 ml Serum oder Kalibrierlösung gibt man in schwermetallfrei gespülten Zentrifugengläsern unter ständiger Vibration auf dem Whirlmix 500 µl Enteiweißungslösung. 15 Minuten bei Raumtemperatur stehen lassen und anschließend scharf zentrifugieren. Der Überstand wird direkt zur Messung der Extinktion angesaugt. Nullpunkteinstellung mit der Blindlösung.

Geräteeinstellungen (für FMD 3): Hohlkathodenlampe Cu, Heizstrom 10 mA.

Hohlkathodenlampe etwa 60 Minuten, Gerät mit Flamme etwa 15 Minuten einbrennen lassen.

Spalt 0,1 mm

Sperrfilter 0

Wellenlänge 324,8 nm

Brennerhöhe 8 Skalenteile

Luft 15,5 Skalenteile

Brenngas Acetylen 7,0 Skalenteile

Anzeigefunktion E (Extinktion)

Berechnung:

$$\frac{E_{\text{Probe}}}{E_{\text{Standard}}} \cdot C_{\text{Standard}} = \mu\text{mol/l Cu}$$

Ergebnisse

Wiederfindungsversuche

Da handelsübliche Kontrollseren mit Angabe des atomabsorptionsspektrometrisch gemessenen Kupfergehaltes nicht zur Verfügung stehen, wurde die Richtigkeit durch Wiederfindungsversuche untersucht (Abb. 1). Die Konzentrationen über 30 µmol/l wurden durch Zugabe einer konzentrierten Kupferlösung (394 µmol/l), diejenigen unter 30 µmol/l wurden durch Verdünnung eines Pool-Serums mit Albuminlösung (60 g/l) dargestellt. Die Eiweißkonzentration lag bei allen Versuchen

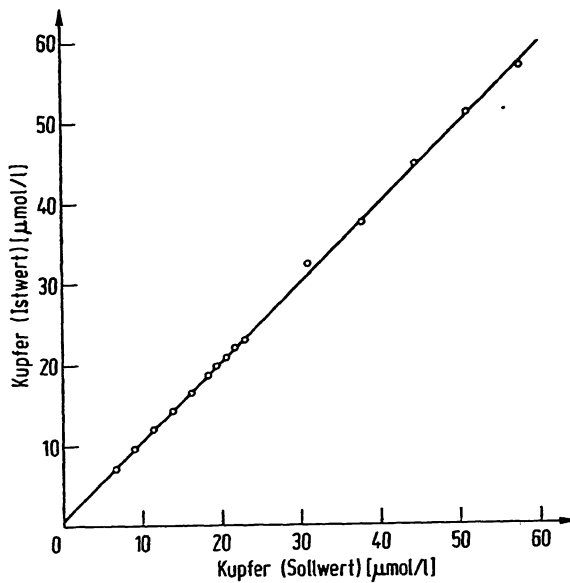


Abb. 1. Wiederfindungsversuche. 15 Doppelbestimmungen im Konzentrationsbereich von 6,6–57,6 $\mu\text{mol/l}$.
Abszisse: Sollwerte; Ordinate: Meßwerte.
Regressionsgleichung: $y = 0,725 + 0,979 x$

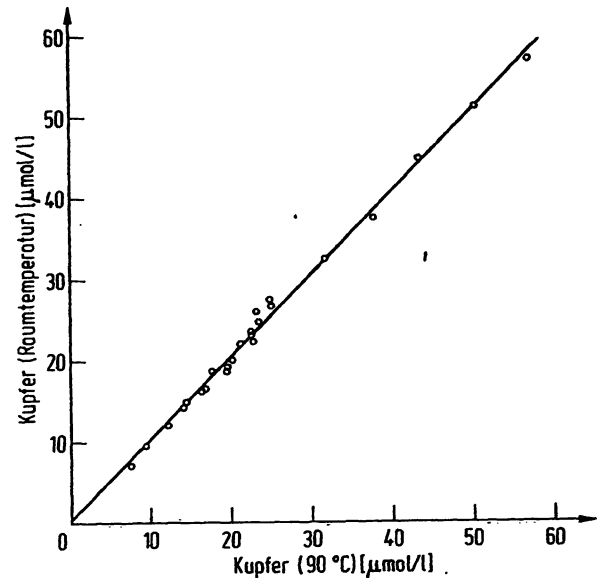


Abb. 2. Inkubation nach Eiweißpräzipitation bei Raumtemperatur (Ordinate) und bei 90 °C (Abszisse). Vergleich der Ergebnisse.
Regressionsgleichung: $y = 0,323 + 1,009 x$
Korrelation: $r^2 = 0,994$.

zwischen 50 und 75 g/l. Die Wiederfindung betrug bei 15 Versuchen im Konzentrationsbereich von 6,6 bis 57,6 $\mu\text{mol/l}$ im Durchschnitt $101,75 \pm 2,44\%$, wobei sich die größten Abweichungen (ungerichtet) im niedrigen Konzentrationsbereich unter 10 $\mu\text{mol/l}$ fanden. Die Methode ist von 0 bis mindestens 60 $\mu\text{mol/l}$, also im gesamten klinisch relevanten Bereich, linear (Abb. 1).

Präzision

Der Variationskoeffizient in der Serie beträgt 1,55% ($\bar{x} = 23,25 \mu\text{mol/l}$; $s = 0,36 \mu\text{mol/l}$; $n = 22$).

Bei Untersuchungen von Tag zu Tag (über 4 Monate) errechnet sich ein Variationskoeffizient von 2,3%. Die hohe Extinktion (etwa 0,1 im Bereich um 30–32 $\mu\text{mol/l}$) gewährleistet eine hohe Stabilität der Anzeige auch bei niedrigen Kupferkonzentrationen des Morbus *Wilson*.

Vergleich mit der Bezugsmethode (1, 2)

Der Verzicht auf die Inkubation bei 90 °C hat offenbar keinen wesentlichen Einfluß auf die Ergebnisse der Bestimmung (Abb. 2). Die entsprechende Regressionsgleichung lautet

$$y = 0,323 + 1,009 x$$

Lediglich bei flüssigen Kontrollseren ergaben sich unterschiedliche Ergebnisse, nämlich regelmäßig etwas höhere Werte bei der 90°-Inkubation:

für Lab-Trol	+ 0,6 $\mu\text{mol/l}$ = 2,7%,
für Patho-Trol	+ 0,3 $\mu\text{mol/l}$ = 1,5%.

Diskussion

Wenn die Enteiweißung in der hier beschriebenen Weise als feinflockige Präzipitation auf dem laufenden Vibrationsmischer mit möglichst geringem Verdünnungseffekt durchgeführt wird, kann auf das Erhitzen des Ansatzes verzichtet werden. Die Vorteile liegen auf der Hand:

Vereinfachung und Verkürzung des Arbeitsablaufes, Erhöhung der Präzision durch Fortfall unkontrollierbarer Verdampfungs- und Spritzeffekte sowie Vermeidung grober Verklumpung des Präzipitats bei der Hitzeinwirkung. Wie die Wiederfindungsversuche beweisen, wird das Kupfer auch ohne Erhitzen vollständig aus der Eiweißbindung freigesetzt. Die Konzentration der Trichloressigsäure beträgt im Endansatz 0,3 mol/l und liegt damit im üblichen Bereich (3). – Die Kupferbestimmung im nichtenteiweißten, sondern lediglich 1 + 1 verdünntem Serum (4, 5) hat sich für Serienmessungen bei uns nicht bewährt.

Der Nachteil des hier geschilderten Vorgehens, das relativ große Probevolumen, kann unseres Erachtens zu Gunsten des hohen Meßsignals in Kauf genommen werden. Steht wenig Serum zur Verfügung, kann die Enteiweißung im Verhältnis 1:1 durchgeführt werden. Bei unverändertem Eichansatz müssen die so gewonnenen Ergebnisse mit dem Faktor 1,6 multipliziert werden.

An Stelle eines flüssigen eiweißhaltigen Standards, wie z. B. Cation-Cal, kann auch eine wäßrige Standardlösung treten. In diesem Falle ist jedoch ein Volumenverdrängungseffekt von etwa 5–6% wegen der außerordentlich konzentriert durchgeführten Enteiweißung in Rechnung zu stellen.

Literatur

1. Olson, A. D. & Hamlin, W. B. (1968), *Atom. Abs. Newsl.* 7, 69.
2. Olson, A. D. & Hamlin, W. B. (1969), *Clin. Chem.* 15, 438–444.
3. Richterich, R., *Klinische Chemie*, Verlag S. Karger, Basel 1971.
4. Sprague, S. & Slavin, W. (1965), *Atom. Abs. Newsl.* 4, 228–233.
5. Heinemann, G. (1972), *diese Z.* 10, 467–472.

Dr. O. Müller-Plathe
Allgemeines Krankenhaus Altona
2000 Hamburg 50,
Paul-Ehrlich-Straße 1

