

E. Jiménez Guillén¹, C. Prado Burguete¹, A. Martínez Ruiz² C. M^a Puche Morenilla²
 (1)Instituto de Seguridad y Salud Laboral de la Región de Murcia
 (2)Servicio de Análisis Clínicos Hosp. Univ. Virgen de la Arrixaca

Introducción y Objetivos

- En higiene industrial, la interpretación de los datos cuando se mide la concentración de un biomarcador en orina hace necesario, en muchos casos, corregir los resultados debido al grado de dilución de la orina.
- Un método de corrección consiste en utilizar los valores de creatinina como base de cálculo para medir otros compuestos presentes en este fluido biológico.
- La creatinina es un metabolito urinario de depuración renal que se utiliza para estandarizar las orinas en relación a los bioindicadores de exposición química laboral.



- Desarrollar un método sencillo y rápido para la determinación de la creatinina urinaria mediante la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).
- Aplicar el método para el análisis de la concentración de creatinina en orinas y comparar los resultados con los obtenidos mediante la utilización de un analizador automático, basado en el método cinético de Jaffé
- Analizar la estabilidad de las muestras almacenadas en refrigeración (4°C) y congelación (-18°C) para distintos periodos de tiempo.

Experimental

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Desarrollo del método: Disoluciones patrón acuosas de creatinina y estándares de concentración conocida
 Las muestras de orina, y BIORAD, se filtran (0.45 µm de tamaño de poro) y se diluyen con fase móvil (1/10)

MUESTRAS DE URINA ANALIZADAS

Se han analizado 40 orinas mediante ambos métodos, el cromatográfico y otro basado en la reacción cinética de Jaffé.

METODO CINÉTICO

La determinación de creatinina se realizó en un analizador automático Cobas 6000 (Roche Diagnostic®).
 Tipo de medición: Cinética
 Longitud de onda (sub/princ.): 570/505
 Volumen de la muestra: 10µL.
 Intervalo de medición: (4.2- 622 µg/ml)

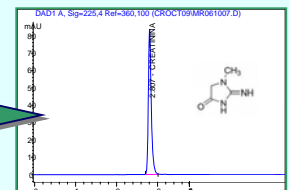
ESTUDIO DE LAS CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

Las orinas se guardaron en viales que se encapsularon y almacenaron en refrigeración y congelación para ser analizadas mediante HPLC a los 8, 15, 60 y 90 días.

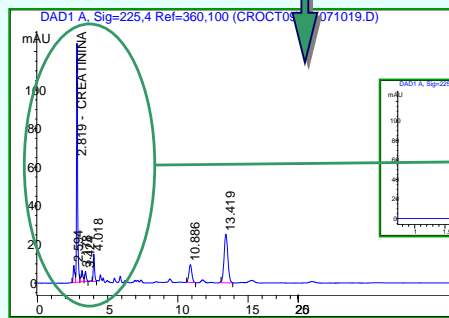


MÉTODO CROMATOGRÁFICO

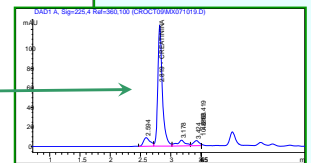
Columna : XDB-C18 (Agilent) (4,6 x 250 mm; 5 µm)
 Fase móvil : Disolución tampón Ortofosfórico 0,1 % / Metanol (90:10)
 Flujo : 1 ml/min en gradiente
 Temperatura : 40° C
 Volumen de inyección : 2 µl
 Tiempo de análisis : 35 min
 Detección: 225 nm



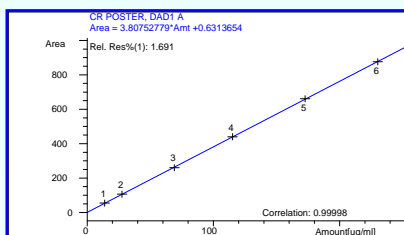
Cromatograma obtenido para un patrón de creatinina



Cromatograma obtenido para una muestra de orina.



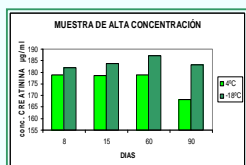
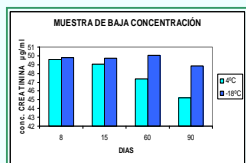
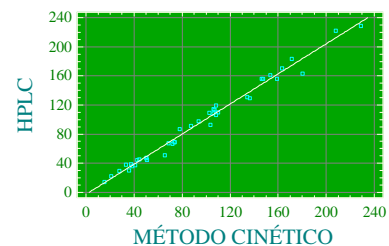
Resultados y conclusiones



MÉTODO HPLC	
AREA = 3,8075 X (conc. CREATININA) + 0,6314	
Coef. Correlación	0,99998
Rango	3 - 300 µg/ml
L.D. / L.O.	1,9 µg/ml / 6,40 µg/ml

MUESTRA	conc. µg/ml media (n = 6)	CV (conc) %
estandar 10 µg/ml	10,11	2,3
estandar 30 µg/ml	30,03	2,4
estandar 100 µg/ml	101,9	3,1
biored	75,53	2,1
muestra orina 1	35,94	2,1
muestra orina 2	74,33	1,8
muestra orina 3	233,39	2,1

COMPARACIÓN DE AMBOS MÉTODOS



ESTUDIO DE LAS CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

DÍAS	REFRIGERACIÓN	CONGELACIÓN	REFRIGERACIÓN	CONGELACIÓN
8	49,57	49,79	178,83	181,98
15	49,07	49,74	178,7	183,75
60	47,34	50,04	178,81	187,05
90	45,21	48,86	168,22	183,23

Concentración media (n=6, µg/ml) obtenida para distintos periodos de tiempo

Del análisis estadístico de los resultados (test ANOVA) se puede concluir que la forma más adecuada de conservación es el almacenamiento de las muestras en congelador (-18 °C). En estas condiciones la creatinina permanece estable durante al menos 90 días.

Los métodos se han comparado utilizando el análisis de regresión lineal considerando los resultados obtenidos mediante el analizador automático como variable independiente. Los límites de confianza obtenidos para la pendiente y la ordenada en el origen (nivel de confianza del 95%) indican que estos parámetros no difieren en forma significativa de los valores "ideales" de 1 y 0 por lo que no hay diferencias sistemáticas entre los dos métodos utilizados.

MÉTODO HPLC = 1.03450 X MÉTODO CINÉTICO - 2.40372
 Coef. Correlación = 0.99278 Sa = 2.20025 Sb = 0.0202769