

PUESTA A PUNTO DE UN MÉTODO ANALÍTICO

DETERMINACIÓN DE CREATININA EN ORINA BASADO EN LA REACCIÓN CINÉTICA DE JAFFÉ

Tutores: Dr. Óscar M. Hernández Torres y Dr. Francisco Jiménez Moreno

M^a Montserrat Ramón García

Curso 2016-2017

Resumen

La creatinina es un compuesto orgánico generado por la degradación de la creatina y el fosfato de creatina, que actúan como almacén de alta energía fácilmente convertible en ATP, en músculos y otros tejidos de algunos organismos vivos, se sintetiza de forma normal en hígado y páncreas. La creatinina es producida por el organismo en una cantidad proporcional a la masa y función muscular y es eliminada por filtración a través de los glomérulos renales y excretada por la orina.

Los niveles de creatinina permanecen relativamente constantes para individuos sanos, su concentración en la orina depende del volumen de diuresis, por lo que la prueba de depuración de la creatinina es una de las más sensibles para diagnosticar la función renal especialmente la velocidad de filtración glomerular, al ser la concentración de creatinina sérica dependiente casi exclusivamente de la velocidad de excreción por el riñón y así, niveles altos de este parámetro son indicativos de patologías nefropáticas.

En general, los métodos basados en la reacción de Jaffé y las modificaciones de este han sido los más ampliamente utilizados para la determinación de creatinina en los laboratorios clínicos. En estos métodos, la creatinina se hace reaccionar con una disolución alcalina de ácido pícrico para formar lentamente un cromóforo de color naranja-rojizo, si se sigue la variación de la absorbancia del compuesto formado en función del tiempo de reacción, se pueden establecer unas condiciones de trabajo que minimizan los efectos indeseables asociados a las potenciales especies interferentes que tiene la reacción en estudio.

En este trabajo se establece un método cinético basado en la reacción de Jaffé para la determinación de creatinina en orina. Se estudian todas y cada una de las variables experimentales que afectan a la reacción en estudio, así como el efecto matriz. Para ello se hace necesario plantear una metodología adecuada, realizar un screening de variables que pueden influir en la determinación, desarrollar un diseño experimental que permita encontrar las condiciones óptimas, validar la metodología determinando los parámetros de calidad del método y de la regresión y finalmente, evaluar la eficacia de la metodología desarrollada en muestras reales.

Summary

Creatinine is an organic compound generated by the degradation of creatine and creatine phosphate, which are responsible for storing energy in muscles and other tissues of some living organisms that is easily transformed into ATP. Creatinine is produced in the body in an amount proportional to the mass and muscular function, and it is removed by filtration through the renal glomeruli and excreted in the urine.

Creatinine levels remain relatively constant for healthy individuals, for which the concentration in urine depends on the volume of diuresis. Therefore, the creatinine clearance test is one of the most sensitive methods to diagnose renal function, especially glomerular filtration rate since serum creatinine concentration depends almost exclusively on the excretion rate of the kidney. Thus, high levels of this parameter indicate the presence of nephropathic pathologies.

In general, methods based on the Jaffé reaction and its variations have been widely used for the quantification of creatinine in clinical laboratories. In these methods, creatinine reacts with an alkaline solution of picric acid to form slowly an orange-reddish chromophore. If the variation of the absorbance of the formed compound with the reaction time is monitored, following some experimental conditions that minimize the undesired effects associated to potential interferences, the concentration of creatinine can be determined.

The aim of this work is to establish a kinetic method based on the Jaffé reaction for the determination creatinine in urine. All the experimental conditions that affect the reaction under study as well as the matrix effect were properly assessed. Therefore, it was necessary to propose a suitable methodology, perform a screening study to determine the variables that may influence the process and develop an experimental design that allows finding the optimum conditions. Furthermore, the proposed methodology was validated by determining the quality analytical parameters of the method and, finally, the extraction efficiency of the developed methodology for the analysis of real samples was evaluated.

Índice

1.- Introducción.....	1
1.1.- ¿Qué es la creatina?.....	1
1.2.- ¿Qué es la creatinina?.....	1
1.3.- Función de la creatinina.....	2
1.4.- Causas por las que aumentan los niveles de creatinina.....	2
1.5.- Antecedentes bibliográficos para la determinación de la creatinina.....	2
2.- Objetivos.....	3
2.1.- Generales.....	3
2.2.- Específicos.....	3
3.- Procedimiento experimental.....	4
3.1.- Instrumentos y aparatos.....	4
3.2.- Software y programas informáticos.....	4
3.3.- Material.....	4
3.4.- Reactivos y disoluciones.....	5
3.5.- Procedimientos.....	5
3.5.1.- Estudio de la reacción en función del NaOH.....	5
3.5.2.- Estudio de la reacción en función de la temperatura	5
3.5.3.- Rango de linealidad.....	6
3.5.4.- Curva de Calibrado.....	6
3.5.5.- Estudio de reproducibilidad en muestras sintéticas y biológicas.....	6
3.5.6.- Dilución de la muestra de orina.....	6
3.5.7.- Estudio de la respuesta del método con la cantidad de orina.....	6
3.5.8.- Adiciones estándar.....	7
3.5.9.- Recuperaciones.....	7
4.- Resultados y discusión.....	8
4.1.- Estudio de la reacción en función del NaOH.....	8
4.2.- Estudio de la reacción en función de la temperatura.....	10
4.3.- Rango de linealidad.....	10
4.3.1.- Método de velocidad inicial.....	11
4.3.2.- Método de la absorbancia a tiempo fijo.....	11
4.4.- Curva de calibrado.....	12
4.5.- Estudio de reproducibilidad de muestras sintéticas.....	13
4.6.- Determinación de creatinina en orina.....	14
4.6.1.- Estudio de la estabilidad en orina.....	14
4.7.- Estudio de reproducibilidad de la orina.....	15

4.8.- Estudio de recuperación.....	15
4.9.- Determinación de creatinina en diferentes orinas.....	16
5.- Conclusión	17
Glosario.....	18
Referencias.....	19

1.- Introducción

1.1.- ¿Qué es la creatina?

La creatina es un ácido orgánico nitrogenado que se encuentra en los músculos y células nerviosas de algunos organismos vivos. Es un derivado de los aminoácidos muy parecido a ellos en cuanto a su estructura molecular. Se sintetiza de forma natural en el hígado, el páncreas y en los riñones a partir de aminoácidos como la arginina, la glicina y la metionina a razón de un gramo de creatina por día. Constituye un vector inmediato y directo para transportar ATP y proveer de energía a las miofibrillas musculares. [1,2]

1.2.- ¿Qué es la creatinina?

La creatinina es un compuesto orgánico generado a partir de la degradación de la creatina (que es un nutriente útil para los músculos). Es un producto de desecho del metabolismo normal de los músculos que habitualmente produce el cuerpo en una tasa muy constante (dependiendo de la masa de los muscular), y que normalmente filtran los riñones excretándola en la orina. La medida de la creatinina es el modo más simple de monitorizar la correcta función de los riñones. [3]

Los valores normales de creatinina se sitúan en hombres entre 0,7 y 1,3 mg/dL. En las mujeres, se sitúa entre 0,5 y 1,2 mg/dL. Se considera un valor relativamente alto aquel que se sitúe por encima de los 1,3 mg/dL en hombres y los 1,2 mg/dL en mujeres . Los valores más altos de 4 mg/dL se consideran como un fallo renal severo[3]. Los valores de creatinina en orina (muestra de 24 horas) puede variar de los 500 a los 2000mg/día. Los resultados dependerán de la edad y de la masa corporal. El rango normal según el sexo es[3]:

- en mujeres: entre 11 y 20 mg por kg de masa corporal.
- en hombres: entre 14 y 26 mg por kg de masa corporal.

Cuando los resultados de creatinina en orina están fuera de rangos normales puede ser debido a una ingesta rica en carne, la toma de algunos medicamentos, escaso flujo de sangre a los riñones, problemas renales o pérdida del tejido muscular.

1.3.- Función de la creatinina

Gran parte de la creatina se almacena en los músculos del cuerpo (alrededor del 90%), se sabe que un adulto que tenga 70 kg de peso corporal posee cerca de 120 g de creatina. Los músculos no son capaces de sintetizar la creatina y es por esta razón por la que la toman del torrente sanguíneo. La creatina constituye la fuente inmediata y directa para regenerar ATP (Adenosín trifosfato) un constituyente energético de las células musculares [2,3,4].

1.4.- Causas por las que aumentan los niveles de creatinina

Debemos tener en cuenta que es importantísimo analizar y conocer la tendencia que los niveles de creatinina han seguido a lo largo de un determinado plazo de tiempo, y nunca atender únicamente a un solo valor. Principalmente porque un valor que aumenta con el paso del tiempo (por ejemplo durante algunos meses o años) puede indicar que se están produciendo daños en los riñones, mientras que un nivel que disminuye indica una mejora de sus distintas funciones, y la desaparición de ese daño.[2,3]

En la mayoría de las ocasiones el aumento de los niveles de creatinina en la sangre se debe a problemas renales. Estas afecciones comprenden desde daños en el riñón hasta insuficiencia renal (ya sea crónica o aguda), pasando por la infección o la reducción del flujo de sangre. Puede aumentar por trastornos de las vías urinarias, sobre todo por obstrucción de las mismas. Por ejemplo, en caso de cálculos en la vejiga o malformaciones.[2,3]

Determinados problemas musculares como la descomposición de las fibras musculares (por lesión o cualquier otra afección que cause daños al músculo esquelético) influyen igualmente en su aumento, así como sufrir una contusión muscular masiva.[3]

1.5.- Antecedentes bibliográficos para la determinación de la creatinina.

Para la determinación de creatinina se han utilizado numeroso métodos entre los que cabe destacar: la cromatografía electrocinética micelar (MEKC), los métodos electroquímicos, la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) [7,8], y principalmente la reacción de Jaffé [8,9].

En el método de Jaffé la creatinina reacciona con el ácido pícrico en medio alcalino (reacción de Jaffé) produciendo lentamente un cromóforo de color naranja-rojizo, si se sigue la variación de la absorbancia del compuesto formado en función del tiempo de reacción, se pueden establecer unas condiciones de trabajo que minimizan los efectos indeseables asociados a los potenciales especies interferentes que tiene la reacción en estudio.

En general los métodos basados en la reacción de Jaffé y las modificaciones de este han sido los más ampliamente utilizados para la determinación de creatinina en los laboratorios clínicos. En la figura 1. se muestra la reacción de Jaffé [4,5,6].

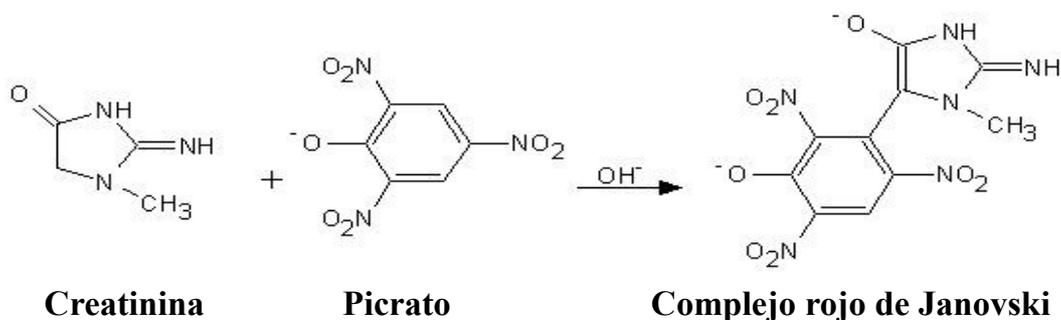


Figura 1. Reacción de Jaffé

2.- Objetivos

La presente memoria recoge el Trabajo de Fin de Grado, realizado en la asignatura Trabajo de Fin de grado en Farmacia y necesario para la superación de los 6 ECTS de los que consta la misma.

2.1.- Generales

El objetivo del Trabajo de Fin de Grado, es complementar la formación del alumno y promover la adquisición de una serie de competencias recogidas en la Guía Docente de la asignatura, tales como utilizar las fuentes de información bibliográfica, capacidad de estructurar, analizar, desarrollar y reflexionar de forma clara, concisa e inteligible, empleando la terminología y conceptos propios del campo de estudio, un problema relacionado con la profesión.

Por último, el Trabajo incluye la redacción, exposición y defensa del mismo ante un Tribunal nombrado al efecto.

2.2.- Específicos

Entre los objetivos específicos de este trabajo se incluye, en primer lugar, la revisión bibliográfica de artículos relacionados con la temática del trabajo empleando la aplicación "Punto Q" de la universidad de La Laguna.

Por otro lado, en la parte experimental del trabajo se establece un método cinético-espectrofotométrico basado en la reacción de Jaffé para la determinación de creatinina en orina. Se estudian todas y cada una de las variables experimentales que afectan a la reacción en estudio, así como el efecto matriz. Asimismo, se establece el intervalo dinámico de concentraciones en el que se puede aplicar la metodología desarrollada.

Utilizar las fuentes de información científicas de forma autónoma y saber gestionar adecuadamente esta información. Identificar, estructurar, analizar y resolver por medio del estudio y la reflexión, un problema relacionado con algún aspecto específico de la profesión.

El objetivo principal de este trabajo es encontrar las condiciones idóneas para la determinación de la creatinina en orina basado en la reacción de Jaffé.

Para alcanzar este objetivo es necesario:

- Establecer las condiciones experimentales adecuadas para la determinación de creatinina en orina por espectroscopía (UV-Visible).
- Estudiar el comportamiento y optimización de las variables experimentales que afectan a la técnica: pH de la muestra, volumen, temperatura, tiempo.
- Optimizar y validar el método.
- Aplicar la metodología desarrollada para el análisis de diferentes tipos de orina.

3.- Procedimiento experimental

En esta sección se describen tanto los instrumentos y aparatos utilizados en el desarrollo del trabajo, como los diferentes reactivos y disoluciones que se ha empleado. También se indican los programas informáticos y “*software*” que han servido de apoyo para evaluar los resultados obtenidos.

3.1.- Instrumentos y aparatos

- Espectrofotómetro Diodo Array Agilent 8453 (Avondale, PA, USA), con cubetas de cuarzo de 1 cm de camino óptico.
- pH-metro digital CRISON Digilab 517, equipado con un electrodo doble vidrio-calomelanos saturado.
- Balanza analítica (precisión 0,0001 g) Sartorius modelo CP2245.
- UV-visible ChemStation software. Versión B.04.01
- Aparato de ultrasonido Branson 3510-DTH Ultrasonic Cleaner.
- Termostato RMT Lauda a 25°C

3.2.- Software y programas informáticos

- UV-Visible ChemStation. Versión B.04.01
- Microsoft Excel 2010, Microsoft office, v.1406129.5000 (32 bits) para realizar los cálculos y la redacción del trabajo.

3.3.- Material

- Micropipetas Eppendorf Research® Family variables (100-1000 uL) con puntas de plástico desechables.
- Matraces aforados de 25 y 1000 mL.
- Pipeta de 20 mL.
- Vasos de precipitado de 25 y 50 mL.
- Probeta de 10 mL

El material volumétrico utilizado fue tipo A propio de un Laboratorio Analítico.

3.4.- Reactivos y disoluciones

Todos los reactivos utilizados para llevar a cabo las distintas experiencias han sido de calidad reactivo analítico (R.A.) y no se han sometido a ningún tipo de purificación. Las disoluciones empleadas, a excepción de aquellas en las que se ha especificado el disolvente, se prepararon disolviendo la cantidad adecuada de reactivo en agua destilada.

- Ácido clorhídrico, HCl 37% para análisis (ACS, ISO), (Panreac)
- Ácido pícrico hidratado, (C₆H₃N₃O₇), (Panreac)
- Hidróxido sódico, NaOH, (Panreac)
- Creatinina, (C₄H₇N₃O), (Panreac)

Ácido clorhídrico (HCl) 0,1 M. Se tomaron 8,0 mL de ácido concentrado y se aforaron a 1000 mL con agua destilada.

Hidróxido sódico (NaOH) 0,4 M. Se pesaron 16,10 g de NaOH y se disolvieron en agua destilada aforando a 1000 mL.

Disolución estándar de creatinina (C₄H₇N₃O) 40 mg/L. Se pesaron 0,0417 g de creatinina y se disolvieron en 1000 mL de HCl 0,1 N con la ayuda de un baño de ultrasonidos. Se conservó en la nevera a 4°C en ausencia de la luz (botella de topacio).

Disolución de ácido pícrico (2,4,6-trinitrofenol) 35 mM. Se pesaron 8,12 g de ácido pícrico y se disolvieron en 1000 mL de agua destilada con la ayuda de un baño de ultrasonidos.

3.5.- Procedimientos

3.5.1.- Estudio de la reacción en función del NaOH

En matraces de 25 mL se agregan por este orden, volúmenes variables de agua destilada entre 6,0 y 0 mL, un volumen de creatinina (3,0 mL) y un volumen variable de hidróxido sódico entre 0 y 6,0 mL, de forma que se completen 10 mL. A continuación se añadió 1,0 mL de disolución de ácido pícrico, se agitó y se realizaron los espectros cada minuto en el rango de 460 – 600 nm. Una vez hecho esto se midió el pH de cada una de las disoluciones.

3.5.2.- Estudio de la reacción en función de la temperatura

En matraces de 25 mL se agregaron por este orden: agua destilada (2,0 mL), creatinina (3,0 mL) e hidróxido sódico (2,3 y 4,0 mL). Se termostataron a la temperatura deseada y a continuación se añadió 1,0 mL de la disolución ácido pícrico, se agitó y se registran los espectros cada minuto en el rango de 450 – 600 nm.

3.5.3.- Rango de linealidad

Se hace un estudio del rango de linealidad. Para ello, en matraces de 25 mL se agregan en este orden volúmenes variables de HCl de 4,9 a 0 mL, volúmenes variables de creatinina de 0,1 a 5,0 mL, de forma que su suma sea de 5,0 mL, e hidróxido sódico (4,0 mL). Se termostatan a 25 °C y a continuación se añade 1 mL de ácido pícrico. Se registran los espectros de 1 a 30 min. en un rango de 460- 600 nm.

3.5.4.- Curva de Calibrado

Una vez estudiado el rango de linealidad se construye una curva de calibrado entre 20 y 160 µg de creatinina. Se preparan 10 disoluciones repitiendo tres veces las concentraciones inicial y final y dos veces dos concentraciones centrales. En matraces de 25 mL se agregan por este orden volúmenes variables de HCl 1M entre 4,5 y 1 mL de disolución, volúmenes variables de creatinina de 0,5 a 4,0 mL y volumen constante de NaOH (4mL). Todas las cinéticas se realizan registrando los espectros de absorbancia entre 460-600 nm cada 10 segundos después de la adición de 1,0 mL de pícrico a la disolución de creatinina y de termostatar a la temperatura deseada.

3.5.5.- Estudio de reproducibilidad en muestras sintéticas y biológicas

Se analizaron durante tres días consecutivos 10 disoluciones cada día; 5 de ellas preparadas con 2.0 mL de creatinina, 3,0 mL de HCl, 4,0 mL de NaOH. Y las otras 5 disoluciones preparadas con 3,5 mL de creatinina, 1,5 mL de HCl, 4,0 mL de NaOH. A continuación, se les añadió 1,0 mL de ácido pícrico. A continuación se procede igual que en la curva de calibrado (3.5.4).

3.5.6.- Dilución de la muestra de orina

Se toma 1,0 mL de la muestra de orina y se diluye con HCl 0,1 M en un matraz de 25 mL.

3.5.7.- Estudio de la respuesta del método con la cantidad de orina

Se realizó con volúmenes variables de orina diluida de 0,2 a 1,0 mL y HCl de 4,8-4,0 mL (volumen total 5,0 mL), 4,0 mL NaOH 0,4 M y se termostatan a 25°C. A continuación, se procede igual que en la curva de calibrado (3.5.4).

En un matraz de 25 mL se añade 1,0 mL de orina diluida, 4,0 mL de HCl 0,1 M y 4,0 mL de NaOH. Se termostatan y se le añade 1,0 mL de pícrico. Todas las cinéticas se realizan registrando los espectros de absorbancia entre 460-600 nm cada 30 segundos después de la adición de 1,0 mL de pícrico a la disolución de creatinina y de termostatar a la temperatura deseada. La orina se conserva en nevera a 4°C y se repite el procedimiento varios días consecutivos.

3.5.8.- Adiciones estándar

Se realizaron añadiendo volúmen constante de orina diluida (0,2 mL), volúmenes variables de creatinina (0 a 2,0 mL), volúmenes variables de HCl de 4,8 a 2,8 mL, de forma que su suma sea de 5,0 mL y un volumen constante de NaOH (4,0 mL). Con la adición de 1,0 mL de ácido pícrico. A continuación se procede igual que en la curva de calibrado (3.5.4).

3.5.9.- Recuperaciones

Se realizó un estudio de recuperación con una muestra de orina en el que se prepararon 15 muestras. Cinco muestras a las que se les añadió 0,5 mL de orina diluida, 4,5 mL de HCl y 4,0 mL de NaOH. A las otras diez muestras se le añadieron un volumen constante de orina diluida (0,2 mL), volúmenes variables de creatinina (0,5 a 1,0 mL), volúmenes variables de HCL (4,3 a 3,8 mL) y un volumen constante de NaOH (4,0 mL). Por último, la adición de 1,0 mL de ácido pícrico. A continuación se procede igual que en la curva de calibrado (3.5.4).

4.- Resultados y discusión

4.1.- Estudio de la reacción en función del NaOH

Se utilizan volúmenes variables de NaOH de 0 a 6,0 mL como se explica en el procedimiento experimental (3.4.1).

Tabla 1. Variación del pH con respecto a los mL de NaOH

<u>mL NaOH</u>	<u>pH</u>
0	1.80
0,7	3.02
1	11.97
2	12.47
3	12.57
4	12.67
5	12.71
6	12.72

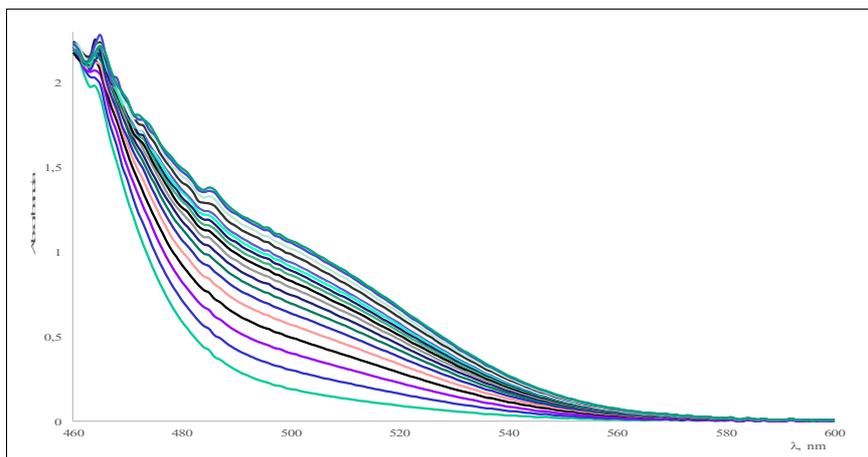


Figura 2. Variación de los espectros de absorción con el tiempo de 120 ug creatinina y 4,0 mL de NaOH a 25 °C.

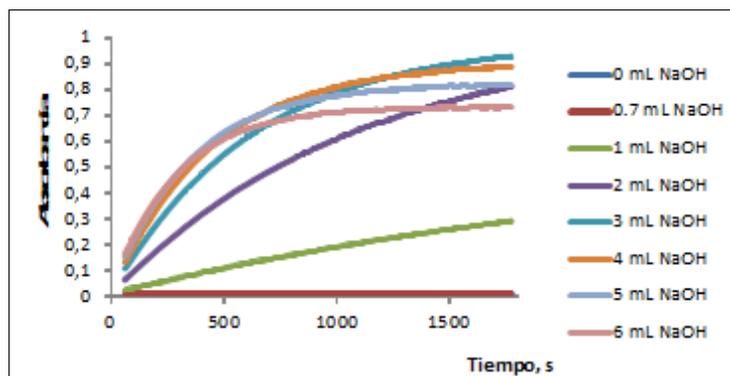


Figura 3. Variación del volúmen de NaOH 4 M

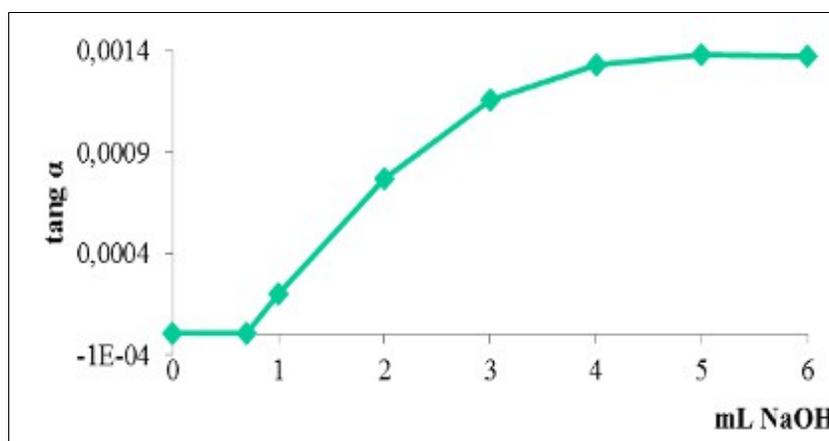


Figura 4. Variación de la absorbancia a 490 nm con el volúmen de NaOH de 4 nm.

Se observa que a partir de 4,0 mL de NaOH la velocidad inicial permanece constante, asimismo, se observa una degradación del producto formado, por lo que se elige un volúmen de NaOH a añadir de 4,0 mL para ensayos posteriores.

4.2.- Estudio de la reacción en función de la temperatura

Se estudia la variación de la cinética con la temperatura entre 20 y 50 °C. Como se puede observar en la figura 5.

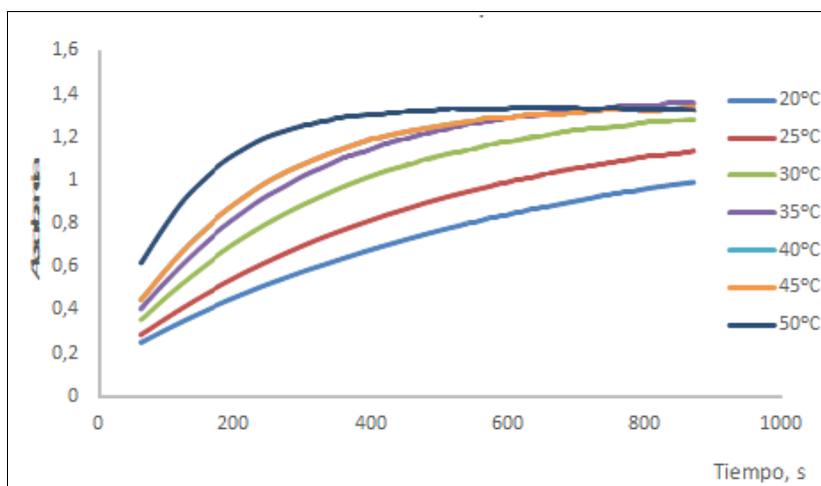


Figura 5. Variación de la absorbancia a 490 nm con el tiempo en función de la Temperatura.

Se observa que a medida que aumenta la temperatura aumenta la velocidad inicial. Sin embargo, dadas las condiciones ambientales o reproducibilidad del método, se elige la temperatura de trabajo a 25 °C, porque hay reacción cinética y es más fácil controlar las condiciones ambientales para que la temperatura no varíe tanto.

4.3.- Rango de linealidad

Se hace un estudio del rango de linealidad como se describe en la parte experimental variando la concentración de creatinina entre 4-200 µg.

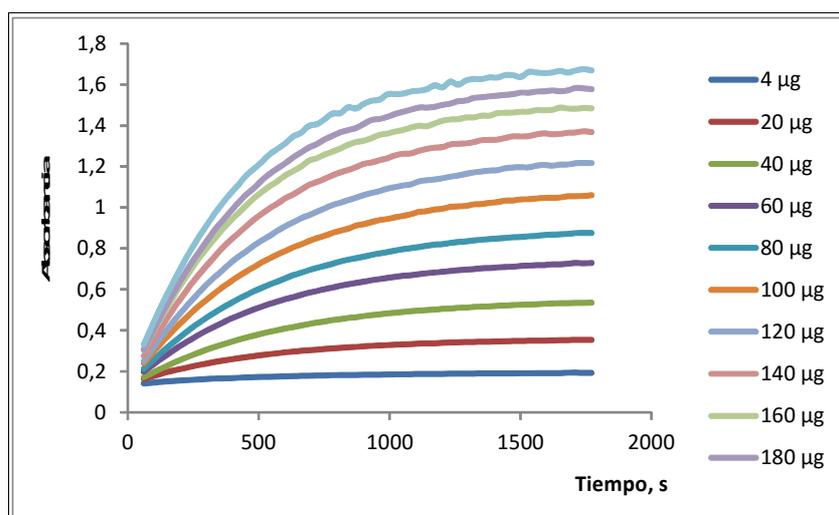


Figura 6. Variación de la absorbancia a 490 nm con el tiempo en función de la cantidad de creatinina.

Se hace un estudio de la linealidad en función de la velocidad inicial y el tiempo fijo a tres longitudes de onda diferentes; 490, 510 y 520 nm.

4.3.1.- Método de velocidad inicial

Se mide la variación de la absorbancia con el tiempo en los primeros cinco minutos y se representa la pendiente frente a la cantidad de creatinina. Se hace un estudio de regresión con los parámetros estadísticos de la regresión y residuales y se observa que los dos últimos puntos se desvían de la linealidad. Por lo que se elige como rango de trabajo de 4-160 μg de creatinina.

4.3.2.- Método de la absorbancia a tiempo fijo

Se hace un estudio de regresión a 6, 10 y 20 minutos a tres longitudes de onda; 490, 510 y 520 nm. Se observa un comportamiento similar al representar la absorbancia frente a la concentración de creatinina. Al hacer un estudio de regresión se observa en todos los casos falta de linealidad para los dos últimos puntos. Por lo que se elige como rango de trabajo de 4-160 μg .

Se hace un estudio exhaustivo de la variación de la regresión frente a la concentración de creatinina para los tiempos entre 1 y 30 minutos, y se representan sus coeficientes de correlación y pendientes en función del tiempo.

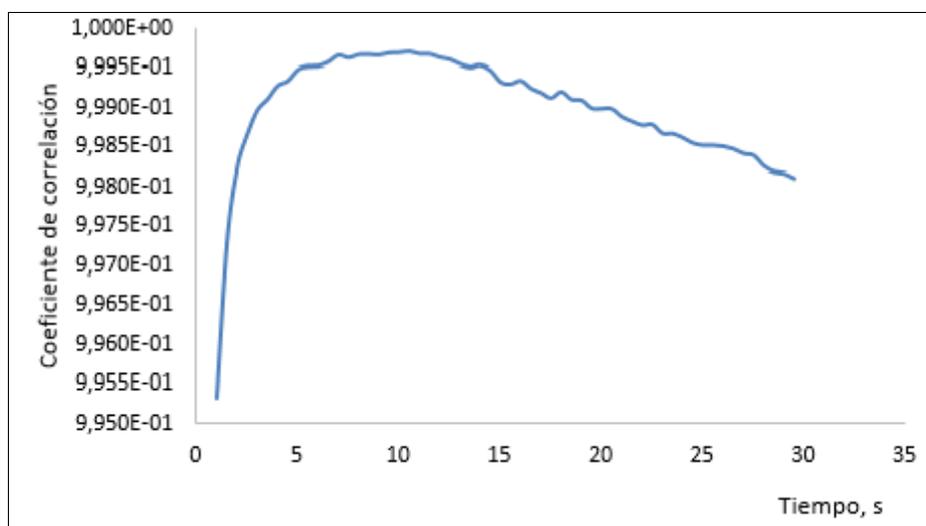


Figura 7. Variación del coeficiente de correlación frente al tiempo.

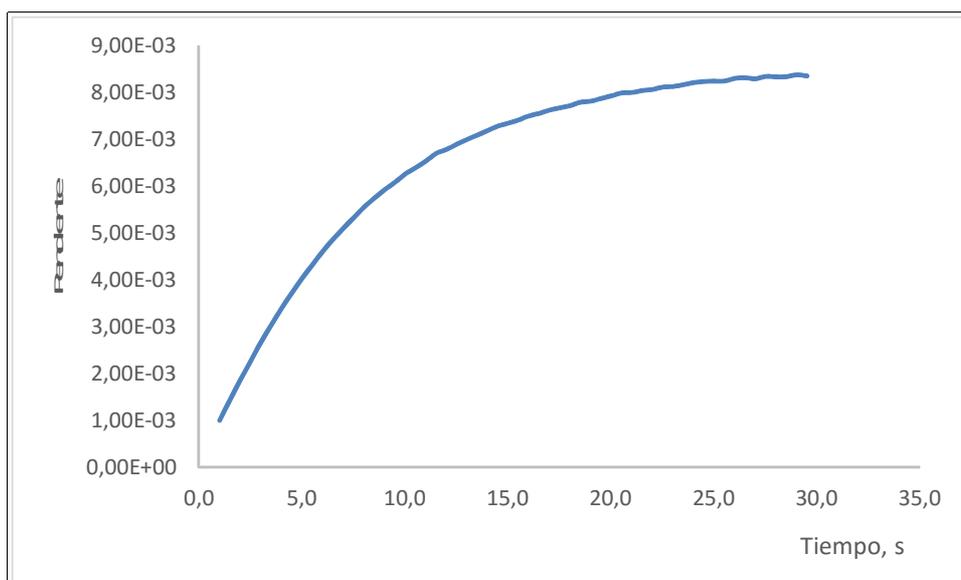


Figura 8. Variación de la pendiente a lo largo del tiempo

En el caso del coeficiente de correlación entre 5 y 12 minutos se alcanza un valor máximo y después comienza a disminuir. En el caso de la pendiente, aumenta continuamente pero a partir de 10 minutos esta variación es menor. Por lo que se elige como tiempo fijo 10 minutos

4.4.- Curva de calibrado

Se realizó la curva de calibrado en el intervalo de linealidad encontrado en el apartado anterior tal como se describe en el procedimiento (3.5.4.). Se estudia el calibrado por los métodos de la velocidad inicial de los primeros cinco minutos y a tiempo fijo a los 10 minutos.

Tabla 2. Calibrado por los métodos de la velocidad inicial y tiempo fijo a los 10 minutos.

Calibrado ^a	Pendiente \pm error ^b	Ordenada origen \pm error ^b	$S_{y/x}$ ^c	R^2	LOD ^d	LOQ ^d
Parámetros de calibrado por el método de las velocidades iniciales						
490	1,347E-5 \pm 1,003E-7	5,715E-5 \pm 1,055E-5	7,51E-06	0,99996	1,67	5,57
510	1,048E-5 \pm 7,896E-8	2,468E-5 \pm 8,311E-6	5,91E-06	0,99996	1,69	5,64
520	7,930E-6 \pm 5,874E-8	1,904E-5 \pm 6,183E-6	4,40E-06	0,99996	1,66	5,54
Parámetros de calibrado por el método del tiempo fijo de 10 minutos						
490	6,594E-3 \pm 1,884E-4	0,1712 \pm 0,0198	1,41E-02	0,99938	6,42	21,39
510	5,144E-3 \pm 1,279E-4	3,872E-2 \pm 1,3466E-2	9,57E-03	0,99953	5,58	18,61
520	3,897E-3 \pm 9,276E-5	2,366E-2 \pm 9,765E-3	6,94E-03	0,99915	5,35	17,82

^aintervalo de trabajo: 20-160 μg , para n = 10 niveles de calibración
^bintervalo de confianza asociado: $t_{n-2} \cdot SD$ (t=2,31)
^cdesviación estándar de los residuales de la recta de calibrado
^dcalculados como se describe en el texto

En la tabla se muestran los parámetros de calidad de la curva de calibrado no observándose variaciones significativas entre las diferentes longitudes de onda para el método de las velocidades iniciales ni para el método del tiempo fijo. Sin embargo, en ambos casos se observa una mayor pendiente a 490 nm, lo que demuestra una mayor sensibilidad.

Los límites se calcularon de acuerdo al procedimiento desarrollado por Miller et al. (10), tal y como se señala en las ecuaciones cuyos valores se muestran también en la tabla anterior.

$$\text{LOD} = \frac{3 \cdot S_{y/x}}{b}$$

$$\text{LOQ} = \frac{10 \cdot S_{y/x}}{b}$$

siendo $S_{y/x}$ la desviación estándar de los residuales de la recta de calibrado.

4.5.- Estudio de reproducibilidad de muestras sintéticas

Se hace un estudio de reproducibilidad en tres días diferentes en muestras sintéticas de diferentes concentraciones como se muestra en la tablas:

Tabla 3. Determinación de 80 µg y de creatinina por el método de la velocidad inicial y del tiempo fijo (10 minutos) a 490, 510 y 520 nm en tres días consecutivos.

	490 nm		510 nm		520 nm	
	Encontrado, µg	% R	Encontrado, µg	% R	Encontrado, µg	% RR
Adición de 80 µg de Creatinina						
Método de la velocidad inicial						
Intra- Día 1	79,54 ± 0,32	99,42	79,88 ± 0,32	99,85	79,88 ± 0,31	99,84
Intra- Día 2	79,41 ± 0,32	99,26	79,92 ± 0,32	99,90	79,86 ± 0,31	99,83
Intra- Día 3	78,60 ± 0,32	98,25	79,67 ± 0,32	99,59	79,77 ± 0,32	99,71
Inter-Días	79,18 ± 0,14	98,98	79,82 ± 0,14	99,78	79,84 ± 0,14	99,80
Método Absorbancia tiempo fijo (10 minutos)						
Intra- Día 1	79,20 ± 1,22	99,00	79,27 ± 1,06	99,09	79,03 ± 1,01	98,79
Intra- Día 2	79,17 ± 1,22	98,97	79,36 ± 1,06	99,19	79,16 ± 1,01	98,95
Intra- Día 3	78,37 ± 1,22	97,96	79,03 ± 1,06	98,79	79,02 ± 1,01	98,78
Inter-Días	78,91 ± 0,53	98,64	79,22 ± 0,46	99,03	79,07 ± 0,44	98,84

Tabla 4. Determinación de 90 µg de creatinina por el método de la velocidad inicial y del tiempo fijo (10 minutos) a 490, 510 y 520 nm en tres días consecutivos.

Adición de 96 µg de Creatinina						
Método de la velocidad inicial						
Intra- Día 1	93,75 ± 0,32	97,65	93,94 ± 0,32	97,86	93,89 ± 0,31	97,80
Intra- Día 2	93,46 ± 0,31	97,35	94,15 ± 0,32	98,07	93,93 ± 0,31	97,85
Intra- Día 3	94,71 ± 0,32	98,66	95,70 ± 0,32	99,69	97,26 ± 0,45	101,31
Inter-Días	93,97 ± 0,14	97,89	94,60 ± 0,14	98,54	94,49 ± 0,14	98,43
Método Absorbancia tiempo fijo (10 minutos)						
Intra- Día 1	94,36 ± 1,21	98,29	96,83 ± 1,05	100,87	96,67 ± 1,01	100,70
Intra- Día 2	96,57 ± 0,44	100,59	96,55 ± 1,05	100,57	96,46 ± 1,01	100,48
Intra- Día 3	95,45 ± 1,21	99,43	98,40 ± 1,06	102,50	98,09 ± 1,01	102,18
Inter-Días	94,62 ± 0,52	98,56	97,26 ± 0,45	101,31	97,07 ± 0,44	101,12

Como se puede observar en la tablas, para ambas concentraciones se encuentran recuperaciones entre 97 y el 102 % para todos los métodos y longitudes de onda.

4.6.- Determinación de creatinina en orina

4.6.1.- Estudio de la estabilidad en orina.

Se hace un estudio de estabilidad de la orina como se indica en el procedimiento experimental (3.5.6), observándose que la orina es estable por más de tres días. Como se indica en el apartado experimental (3.5.7) se analizaron volúmenes variables de orina entre 0,2 y 1,0 mL de orina encontrando que sus contenidos se encuentran en el rango de la curva de calibrado. Con objeto de obtener los mejores resultados se estableció como volumen de muestra diluida 0,5 mL.

Para la determinación de creatinina en orina se comparan los resultados obtenidos con los de la curva de calibrado (4.4) anteriormente descrita y se expresan los resultados con una incertidumbre aplicando las siguientes ecuaciones [10]:

$$\bar{x}_0 \pm \frac{t_{n-2,\alpha} s_{x_0}}{\sqrt{m}}$$

donde

$$s_{x_0} = \frac{s_{y/x}}{b_1} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(y_0 - \bar{y})^2}{b_1^2 \sum (x_i - \bar{x})^2}}$$

- \bar{x}_0 = número de réplicas de la muestra desconocida
- n = número de muestras utilizadas para preparar la curva de calibrado
- y_0 = señal de la muestra desconocida
- \bar{x}_0 = concentración predicha

4.7.- Estudio de reproducibilidad de la orina

Se analiza una orina tres días consecutivos y se obtienen los resultados que se muestran en la siguiente tabla dónde se observa que los resultados obtenidos son similares entre los métodos utilizados a las diferentes longitudes de onda y entre días

Sin embargo, tanto por el método de la velocidad inicial como por el del tiempo fijo se observan resultados más parecidos cuando se mide a 490 nm. Asimismo, se observan mejores resultados con el método de la velocidad inicial que con el del tiempo fijo.

Tabla 5. Determinación de creatinina por el método de la velocidad inicial y del tiempo fijo a 490, 510 y 520 nm durante varios días consecutivos.

Método de la velocidad inicial						
	490 nm		510 nm		520 nm	
	Muestra	Orina	Muestra	Orina	Muestra	Orina
Método de la velocidad inicial						
Día 1	34,10 ± 0,37	1704,90 ± 18,28	34,46 ± 0,37	1722,87 ± 18,47	34,57 ± 0,36	1728,29 ± 18,15
Día 2	33,67 ± 0,43	1683,34 ± 21,70	32,24 ± 1,40	1612,19 ± 69,83	34,04 ± 0,43	1701,99 ± 21,56
Día 3	34,84 ± 0,36	1741,97 ± 18,22	35,63 ± 0,37	1781,36 ± 18,37	35,63 ± 0,37	1781,36 ± 18,37
Media	34,20 ± 0,39	1710,07 ± 19,40	34,11 ± 0,71	1705,48 ± 35,56	34,74 ± 0,39	1737,22 ± 19,36
DS	0,59	29,66	1,72	85,92	0,81	40,43
Método Absorbancia tiempo fijo (10 minutos)						
Día 1	33,50 ± 1,41	1675,12 ± 70,38	33,34 ± 1,23	1666,98 ± 61,28	32,52 ± 1,18	1626,24 ± 58,90
Día 2	32,66 ± 1,67	1632,98 ± 83,67	32,89 ± 1,23	1644,58 ± 61,41	32,24 ± 1,40	1612,19 ± 69,83
Día 3	35,08 ± 1,40	1754,13 ± 69,87	35,00 ± 1,22	1749,79 ± 60,81	34,98 ± 1,16	1748,93 ± 58,23
Media	33,75 ± 1,49	1687,41 ± 74,64	33,74 ± 1,22	1687,12 ± 61,17	33,25 ± 1,25	1662,45 ± 62,32
DS	1,23	61,50	1,11	55,42	1,50	75,22

4.8.- Estudio de recuperación

Se hace un estudio de recuperación como se indica en la parte experimental (3.4.8) adicionando dos cantidades diferentes de patrón de creatinina (20 y 40 µg). Como se observa en la tabla, las recuperaciones se encuentran entre 94 y 103% obteniéndose los mejores resultados por el método de la velocidad inicial a 490 nm.

Tabla 7. Determinación de creatinina por el método de la velocidad inicial y del tiempo fijo a 490, 510 y 520 nm.

Método de la velocidad inicial								
490 nm			510 nm			520 nm		
Encontrado, µg	Recuperado***	% R	Encontrado, µg	Recuperado***	% R	Encontrado, µg	Recuperado***	% RR
21,77 ± 0,13			22,37 ± 0,14			22,38 ± 0,13		
41,93 ± 0,35	20,15	100,76	43,27 ± 0,36	20,90	104,49	43,14 ± 0,35	20,76	103,80
61,84 ± 0,33	40,07	100,17	63,51 ± 0,33	41,14	102,85	63,58 ± 0,33	41,20	102,99
Método Absorbancia tiempo fijo (10 minutos)								
21,37 ± 0,52			21,27 ± 0,45			20,98 ± 0,43		
40,94 ± 1,36	19,58	97,88	40,86 ± 1,18	19,59	97,96	39,82 ± 1,14	18,85	94,24
60,91 ± 1,26	39,54	98,86	60,92 ± 1,10	39,64	99,10	59,93 ± 1,06	38,95	97,38

Muestra orina
Muestra orina fortificada 1*
Muestra orina fortificada 2**
* Adiciona de 20 µg Creatinina
** Adiciona de 40 µg Creatinina
*** µg Creatinina recuperados = (µg Creatinina encontrados muestra fortificada) - (µg Creatinina encontrados muestra orina)

4.9.- Determinación de creatinina en diferentes orinas

El método propuesto se aplica a la determinación de diferentes orinas como se muestra en la tabla 8.

Tabla 8. Determinación de creatinina en diferentes muestras de orina utilizando la reacción de Jaffé a diferentes longitudes de onda por diferentes métodos cinéticos.

	490 nm		510 nm		520 nm	
	Método de la velocidad inicial					
	µg Creatinina	µg Creatinina/mL orina	µg Creatinina	µg Creatinina/mL orina	µg Creatinina	µg Creatinina/mL orina
Orina 1*	34,10 ± 0,37	1704,90 ± 18,28	34,46 ± 0,37	1722,87 ± 18,47	34,57 ± 0,36	1728,29 ± 18,15
Orina 2*	34,79 ± 0,36	1739,52 ± 18,22	35,59 ± 0,37	1779,56 ± 18,37	35,70 ± 0,36	1785,08 ± 18,06
Orina 3*	16,38 ± 0,40	819,02 ± 19,95	16,79 ± 0,47	839,37 ± 23,66	16,86 ± 0,40	843,22 ± 19,80
Orina 4*	36,50 ± 0,36	1825,14 ± 18,08	37,14 ± 0,36	1856,80 ± 18,24	37,20 ± 0,36	1860,02 ± 17,94
Orina 5*	54,44 ± 0,34	2721,76 ± 16,81	55,92 ± 0,34	2796,14 ± 16,93	55,96 ± 0,33	2797,98 ± 16,64
Orina 6***	30,84 ± 0,37	1541,94 ± 18,56	31,80 ± 0,44	1589,95 ± 22,13	31,93 ± 0,44	1596,58 ± 21,75
Orina 7**	15,10 ± 0,40	755,03 ± 20,08	15,72 ± 0,41	785,79 ± 20,25	15,62 ± 0,40	781,23 ± 19,92
Método Absorbancia tiempo fijo (10 minutos)						
Orina 1*	33,50 ± 1,41	1675,12 ± 70,38	33,34 ± 1,23	1666,98 ± 61,28	32,52 ± 1,18	1626,24 ± 58,90
Orina 2*	34,63 ± 1,40	1731,73 ± 70,01	34,48 ± 1,22	1723,95 ± 60,96	33,38 ± 1,17	1668,99 ± 58,67
Orina 3*	15,22 ± 1,54	761,04 ± 77,03	14,70 ± 1,58	734,76 ± 78,87	13,78 ± 1,29	688,77 ± 64,65
Orina 4*	35,60 ± 1,39	1780,18 ± 69,70	35,00 ± 1,22	1750,14 ± 60,81	33,85 ± 1,17	1692,70 ± 58,54
Orina 5*	53,42 ± 1,30	2670,77 ± 64,78	53,18 ± 1,13	2659,23 ± 56,41	52,44 ± 1,08	2622,16 ± 54,16
Orina 6***	30,30 ± 1,43	1515,02 ± 71,45	30,38 ± 1,47	1519,21 ± 73,50	29,55 ± 1,41	1477,27 ± 70,63
Orina 7**	14,86 ± 1,54	742,76 ± 77,17	14,49 ± 1,35	724,36 ± 67,27	13,73 ± 1,29	686,55 ± 64,67

* Mujer
** Hombre
*** Niño

5.- Conclusión

La conclusión principal de este trabajo ha sido el desarrollo, la optimización y la validación de una metodología analítica que permite la determinación de la creatinina en orina.

Tras este estudio, se llegó a la conclusión de que el método de la velocidad inicial es más adecuado para la determinación de creatinina que el de la velocidad a tiempo fijo debido fundamentalmente a que el primero se basa en la variación de la señal de la reacción de 10 medidas, y la del tiempo fijo en una única medida.

Para el estudio de las diferentes variables se eligieron tres longitudes de onda, 490, 510, 520 nm, observándose que a $\lambda=490$ nm, la sensibilidad es mayor aunque el espectro del compuesto formado y el del pícrico se encuentren muy solopados, sin embargo el resto de parámetros son prácticamente iguales.

Se ha validado el método para la determinación de creatinina en orina, demostrándose la robustez del método, se han evaluado parámetros de la regresión como la desviación estándar, el coeficiente de determinación siempre superior a 0.997 lo cual garantiza una relación lineal entre la concentración de creatinina y la absorbancia.

Se ha aplicada la metodología desarrollada a muestras reales. Se observó que las muestras de orina son estables a 4 °C para la determinación de creatinina al menos por 72 h.

Glosario

ATP	adenosín trifosfato
MEKC	cromatografía electrocinética micelar
HPLC	cromatografía líquida de alta eficacia
CE	electroforesis capilar
CMC	concentración micelar crítica
UV- VISIBLE	ultravioleta visible
$S_{y/x}$	desviación estándar de los residuales de la recta de calibrado
LOQ	límite de cuantificación
LOD	límite de detección
m	número de réplicas de la muestra desconocidas
n	número de muestras utilizadas para preparar la curva de calibrado
y_0	señal de la muestra desconocida
x_0	concentración predicha
SD	desviación estándar

Referencias

- [1] <http://kopernix.com/?q=creatinina>
- [2] <http://www.viatusalud.com/documento.asp?ID=4080>
- [3] <http://www.medicinapreventiva.com.ve/laboratorio/creatinina.htm>
- [4] Rodríguez N., Torres D., Carvajal M. Confiabilidad del Método de Jaffé modificado por laboratorios Heiga para la determinación automatizada de la creatinina. Revista de la Facultad de Farmacia, Vol. 42, 2001
- [5] Joseph D. Artiss, Raymond E. Karcher, Sandra L. Collins, Bennie Zak. Microchemical Journal, 65 (2000) 277-282
- [6] J. Clin. Chem. Clin. Biochem. Vol 24, 1986. pp. 565-570. Jaffé Reaction Products
- [7] M. Jaffé. Z. Physiol. Chem., 10 (1886) 391
- [8] Darren A. Johns, Eithne Dempsey. Analytica Chimica Acta, 459 (2002) 187-198
- [9] Brett A. Johns, Theodore Broten, María T. Straniesi, Molahan, Jacquelynn, J. Cook, Marie A. Journal of Chromatography B, 759 (2001) 343-348
- [10] Miller, J. N., Miller J. C.: Estadística y Quimiometría para Química Analítica: Ed. Pearson Education S.A: Madrid, 2002; 125-127