

**DETERMINACIÓN DE CREATININA EN ORINA -
MÉTODO DE DETECCIÓN ULTRAVIOLETA EN
MODO ISOCRÁTICO /
CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN**

MTA / MB – 027/A08



**MINISTERIO
DE TRABAJO
E INMIGRACIÓN**



**INSTITUTO NACIONAL
DE SEGURIDAD E HIGIENE
EN EL TRABAJO**

Organismos participantes en el Programa Nacional de Normalización de Métodos de Toma de Muestra y Análisis:

- Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo
 - Centro Nacional de Condiciones de Trabajo - Barcelona
 - Centro Nacional de Medios de Protección - Sevilla
 - Centro Nacional de Nuevas Tecnologías - Madrid
 - Centro Nacional de Verificación de Maquinaria - Vizcaya
- Gabinete de Seguridad e Higiene de Zaragoza - CA Aragón
- Instituto de Seguridad y Salud Laboral de la Región de Murcia - CA Murcia
- Centro de Seguridad y Salud en el Trabajo de Santander - CA Cantabria
- Instituto Asturiano de Prevención de Riesgos Laborales - CA Asturias

Coordinación:

Centro Nacional de Verificación de Maquinaria - Vizcaya

Edita:

Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo
C/ Torrelaguna, 73 - 28027 MADRID



DETERMINACIÓN DE CREATININA EN ORINA - MÉTODO DE DETECCIÓN ULTRAVIOLETA EN MODO ISOCRÁTICO / CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN

Palabras clave: creatinina, orina, cromatografía líquida con detector ultravioleta-visible

1. OBJETO Y CAMPO DE APLICACIÓN

Este método especifica el procedimiento a seguir y el equipo necesario para la determinación de creatinina en orina mediante cromatografía líquida de alta resolución con detección ultravioleta-visible (HPLC-UV) en el intervalo de concentración de 0,1 g/l orina a 4,0 g/l orina (9.1.).

El método es aplicable a la determinación de creatinina en orina. Este parámetro es utilizado frecuentemente para corregir los valores de concentración de los contaminantes o de sus metabolitos que se excretan en orina intentando paliar los fenómenos de dilución o saturación excesivas que pueden ocasionarse en muestras puntuales en la práctica del Control Biológico.

NOTA: La creatinina es un producto final endógeno del metabolismo humano. Su paso o aclaramiento desde la sangre al túbulo renal se realiza por filtración glomerular, no se reabsorbe por los túbulos renales y es teóricamente proporcional a su concentración en sangre. Puesto que la excreción de creatinina permanece relativamente constante para cada sujeto, mientras que el volumen de excreción urinario puede variar apreciablemente, se utiliza el nivel de creatinina en la orina como índice al que referir los valores de sustancias y/o sus metabolitos que se eliminan de igual forma a través de la filtración y no se reabsorben.

Los valores de concentración de los contaminantes o sus metabolitos se refieren al valor de la creatinina excretada en la misma muestra de orina, siempre que su mecanismo de eliminación urinario sea el que sigue la creatinina. Para la práctica de esta corrección se rechazan orinas cuyo valor de creatinina sea inferior a 0,5 g/l (4,42 mmol/l) o superior a 3,5 g/l (26,5 mmol/l) (9.2.).

Se considera como interferencia cualquier compuesto orgánico que presente el mismo o próximo tiempo de retención cromatográfico en las condiciones de operación descritas en este método.

2. FUNDAMENTO DEL MÉTODO

Las muestras de orina se centrifugan y se diluyen 100 veces con una disolución tamponada a pH 3,2. El análisis se lleva a cabo por cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa con detección ultravioleta a 236 nm.

3. REACTIVOS Y DISOLUCIONES

3.1. Agua ultra pura, calidad 1 de acuerdo con la norma ISO 3696 (9.6.).

3.2. Ácido acético, 99-100% para análisis. N° CAS 64-19-7.

NOTA: SUSTANCIA CORROSIVA. Frases (R) 10-35. Frases (S) (1/2-)23-26-45. Real Decreto 363/1995 (9.5).

3.3. Ácido ortofosfórico N° CAS 7664-38-2.

NOTA: SUSTANCIA CORROSIVA. Frases (R) 34. Frases (S) (1/2-) 26-45. Real Decreto 363/1995 (9.5).

3.4. Acetonitrilo, grado HPLC. N° CAS 75-05-8.

NOTA: SUSTANCIA TÓXICA E INFLAMABLE. Frases (R): 11, 23-24-25. Frases (S): (1/2-)16-27-45. Real Decreto 363/1995 (9.5).

3.5. Sal sódica del ácido 1-octanosulfónico

3.6. Creatinina Clinical Standard, Material de referencia certificado NIST.

3.7. Disolución patrón de creatinina en agua (1 g/l). Se pesan 10 mg de creatinina y se enrasa a 10 ml con agua en matraz aforado. Se filtra. Esta disolución tendrá un valor de 1g/l (8,84 mmol/l). Se trasvasa a viales de 1,5 ml y se guardan en el congelador hasta su uso.

3.8. Disolución tampón, de pH 3,2. Se pesan 2,16 g de sal sódica del ácido 1-octanosulfónico y se disuelve en 1l de agua para obtener una concentración de 10 mmol/l. El pH se ajusta a 3,2 con ácido ortofosfórico.

3.9. Disolución de fase móvil (fm). Se prepara mezclando la disolución tampón pH 3,2 preparada como se indicó en apartado 3.8. con acetonitrilo en la proporción 95:5.

4. APARATOS Y MATERIAL

4.1. Frascos de polietileno para el muestreo de orina.

4.2. Jeringas Hamilton de 10 μ l y 100 μ l.

4.3. Matraces aforados de 10 ml y 1000 ml.

4.4. Filtro de 0,45 μ m para filtrar agua y orina.

4.5. Viales de 2 ml para inyector automático y sus tapones con septum.

4.6. Densímetro para medir la densidad de la orina.

4.7. Pipeta automática de 1-10 ml.

4.8. Micropipeta electrónica 100 - 1000 μ l.

4.9. Agitador ultrasónico

4.10. Balanza capaz de pesar 0,01 mg.

4.11. Agitador mezclador Mixer 820 de Swelab Instrument o similar.

4.12. Columna cromatográfica con precolumna, Agilent Zorbax SB-Aq 4,6x150 mm 3,5 micras o similar.

4.13. Sistema cromatográfico formado por cromatógrafo líquido con detector ultravioleta (HPLC-UV) y sistema de tratamiento de datos.

5. TOMA DE MUESTRA

Las muestras de orina se recogen en frascos de polietileno y se mantienen a 4 °C hasta el momento de su análisis, que debe tener lugar durante las dos semanas siguientes a la toma de muestra (véase tabla 2 del anexo)

6. PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS

6.1. Preparación de la muestra

6.1.1. La muestra de orina se lleva a temperatura ambiente agitándola en un sistema mezclador (4.11.) durante 30 minutos y posteriormente se centrifuga a 800 r.p.m. durante 5 minutos.

6.1.2. Se introducen 10 μ l de orina centrifugada en viales para inyector automático, se pesa, se añade 990 μ l de la disolución de fase móvil (3.9.) y se pesa el vial de nuevo.

6.1.3. Se encapsula el vial y se determina la concentración de creatinina mediante HPLC-UV.

6.2. Preparación de patrones y curva de calibrado

6.2.1. Preparación de patrones. Se preparan los patrones de la recta de calibración a partir de la disolución patrón de creatinina en agua de 1 g/l preparada según el apartado 3.7, tomando 1; 5; 10; 20; 30 y 40 microlitros de dicha disolución y completando el volumen hasta 1 ml con la disolución de fase móvil. Los patrones así preparados corresponden a 1; 5; 10; 20 y 40 mg/l de fase móvil, que son finalmente equivalentes a 0,1; 0,5; 1,0; 2,0 y 4,0 gramos de creatinina por litro de orina.

NOTA: Todas las disoluciones se preparan llevando a cabo un control gravimétrico (con balanza de precisión) de las mediciones volumétricas. Este control gravimétrico mejora la calibración y por ende la calidad de los resultados analíticos. Alternativamente las disoluciones pueden ser preparadas utilizando únicamente microjeringas y material volumétrico calibrado.

6.2.2. Curva de calibración. Se representa la altura absoluta de pico obtenida en el análisis de los patrones de calibración frente a sus respectivas concentraciones, obteniéndose así la curva de calibración.

6.3. Condiciones cromatográficas

Para el desarrollo del método se ha utilizado un sistema cromatográfico HPLC Agilent serie 1100 con detector ultravioleta y estación de tratamiento de datos.

Las condiciones cromatográficas utilizadas para la determinación de la creatinina en orina son:

Columna cromatográfica:	Agilent Zorbax SB-Aq 4,6x150 mm 3,5 micras
Temperatura:	22 °C
Fase móvil:	disolución tampón 3,2: acetonitrilo (95:5)
Longitud de onda:	236 nm
Volumen de inyección:	10 μ l
Flujo:	1 ml/min
Tiempo de retención:	11,3 min
Tiempo de análisis:	13 min

7. CÁLCULOS

7.1. La concentración de creatinina expresada en miligramos por litro de fase móvil se determina por interpolación de la altura de pico absoluta del compuesto, obtenida en el análisis de las muestras, en la curva de calibrado.

7.2. Los resultados pueden expresarse en gramos de creatinina por litro de orina mediante la siguiente expresión:

$$C_{\text{creatinina}} \text{ (g/l)} = c_{\text{creatinina}} \text{ (mg/l fm)} \times 100(FD) \times 10^{-3} \text{ (g/mg)}$$

siendo:

$C_{\text{creatinina}} \text{ (g/l)}$	es la concentración de creatinina en gramos por litro de orina
$c_{\text{creatinina}} \text{ (mg/l fm)}$	es la concentración de creatinina en miligramos por litro de fase móvil (fm)
$100(FD)$	es el factor de dilución (la creatinina contenida en la orina se diluye 100 veces en la fase móvil)

7.3. Los resultados pueden expresarse en milimoles de creatinina por litro de orina mediante la siguiente expresión:

$$C_{\text{creatinina}} \text{ (mmol/l)} = \frac{C_{\text{creatinina}} \text{ (g/l)} \times 1000 \text{ (mmol/mol)}}{113,2 \text{ (g/mol)}}$$

siendo:

$C_{\text{creatinina}} \text{ (mmol/l)}$	es la concentración de creatinina en milimoles por litro de orina
$C_{\text{creatinina}} \text{ (g/l)}$	es la concentración de creatinina en gramos por litro de orina
$113,2 \text{ (g/mol)}$	es el peso molecular de la creatinina

8. PRECISIÓN

8.1. El intervalo de trabajo se encuentra comprendido entre las concentraciones 0,1- 4,0 g/l orina equivalente a 0,88 - 35,34 mmol/l orina.

8.2. El límite de detección para la creatinina en orina, calculado utilizando una curva de calibración construida con patrones de baja concentración en el intervalo 0,013-0,284 g/l orina equivalente a 0,11-2,5 mmol/l orina según el criterio expuesto en la referencia bibliográfica 9.7. es de 0,005 g/l orina, equivalente a 0,05 mmol/l de orina.

8.3. La precisión del método estimada en términos de desviación estándar relativa resultó estar en torno al 2% en el intervalo ensayado (véase tabla 1 del anexo).

8.4. La recuperación media encontrada en un ensayo (véase tabla 1 del anexo) en el que se adicionaron cantidades conocidas de creatinina a una orina real, a tres

niveles de concentración resultó ser aproximadamente del 100%. El sesgo estimado para el método en base a este ensayo de recuperación es inferior al 2%.

8.5. La incertidumbre expandida ($k=2$) del método estimada a partir del ensayo de adiciones conocidas de creatinina a una orina real, teniendo en cuenta también la incertidumbre que proviene de la cantidad pesada en la balanza utilizada para el control gravimétrico de muestras y patrones, es del 6%.

8.6. En el anexo del método y junto con los detalles de la validación efectuada en el laboratorio se recogen los valores de sesgo, precisión e incertidumbre calculados a partir de los resultados obtenidos en la participación durante los últimos años (10 muestras) en un programa interlaboratorios de control de calidad para la determinación de creatinina en orina. Los valores, como cabría esperar resultan ser ligeramente más altos que los encontrados a partir de las pruebas intralaboratorio (véase tabla 3 del anexo).

9. BIBLIOGRAFÍA

9.1. Tsikas, D., Wolf, A., Frölich, J.C. **Simplified HPLC Method for Urinary and Circulating Creatinine**, Clin. Chem. 50 (1) 201-203, 2004.

9.2. Alessio, L., et al. **Reliability of urinary creatinine as a parameter used to adjust values of urinary biological indicators**, Int Arch Occup Environ Health 55 99-106, 1985.

9.3. J.C. Miller, J.N. Millar. **Estadística para química analítica**. Addison-Wesley, Iberoamericana, Wilmington. 100-103 (1993).

9.4. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. **Protocolo de validación para determinaciones en muestras biológicas de interés en Higiene Industrial**. MTA/PV-IV(2)/98.

9.5. Real Decreto 363/1995 de 10 de marzo (BOE. 5.6.95). **Reglamento sobre notificación de sustancias nuevas y clasificación, envasado y etiquetado de sustancias peligrosas**. Modificado el Anexo 1 por la Orden de 13.9.95 (BOE 19.9.95).

9.6. ISO 3696:1987, **Water for laboratory use - Specifications and test methods**.

9.7. CURRIE, L. A., **Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities (IUPAC Recommendations 1995)**, Pure & Appl. Chem., 6, 10, 1995, pp 1699-1723.

ANEXO

Validación del método

En este anexo se recogen los datos obtenidos durante el proceso de validación del método para la determinación de creatinina en orina, siguiendo los criterios indicados en el "Protocolo de validación para determinaciones en muestras biológicas de interés en Higiene Industrial" (9.5.).

Para el estudio de precisión y recuperación e incertidumbre se han efectuado adiciones de cantidades conocidas de creatinina sobre una orina real de bajo contenido en creatinina para conseguir tres niveles de concentración que cubren prácticamente todo el intervalo de trabajo (véase tabla 1).

El ensayo de estabilidad y conservación se ha realizado con dos muestras de orina real a dos niveles diferentes de concentración, una orina con concentración alta de creatinina 1,30 g/l orina (11,48 mmol creatinina/l orina) y otra con concentración baja 0,58 g/l orina (5,09 mmol creatinina/l orina) (véase tabla 2).

La tabla 3 muestra los resultados obtenidos durante dos años en la participación en el Programa Interlaboratorios de Control de Calidad para el análisis de creatinina en orina del Instituto FIOH de Finlandia. A partir de dichos resultados se han calculado los valores de precisión, sesgo e incertidumbre para el método y que se recogen junto a la tabla 3. Estos valores, como cabría esperar, resultan ser más altos que los calculados en las prueba intralaboratorio.

Tabla 1

Estudio Intralaboratorio

Muestra	Adición de creatinina g/l orina	Concentración esperada g/l orina	Concentración encontrada g/l orina	Nº Réplicas	DER (Desviación estándar relativa) %	DER Recuperación %	Sesgo %
Orina	-	-	0,45	6	3,38		
Nive I	0,50	0,92	0,93	6	1,94	100,26	0,26
Nive II	1,00	1,40	1,42	6	0,70	101,34	1,34
Nive III	1,51	1,88	1,87	6	0,68	99,33	0,67

$$DER_{Promedio} = \sqrt{\frac{\sum (DER_i)^2}{4}} = 2,01\% ; Sesgo_{Promedio} = \sqrt{\frac{\sum (REC_i)^2}{3}} = 0,88\%$$

$$u_{Combinada} = \sqrt{u_{Variabilidad}^2 + u_{Sesgo}^2}$$

$$u_{Variabilidad} = DER_{Promedio} = \sqrt{\frac{\sum (DER_i)^2}{4}} = 2,01\%$$

$$u_{sesgo} = \sqrt{Sesgo_{Promedio}^2 + u_{Adición}^2} = 2,01\%$$

donde:

$$u_{Adición} = \sqrt{u_{balanza}^2 + u_{variabilidad - pesadas}^2 + u_{pureza}^2} = 2,11\%$$

$$u_{\text{Combinada}} = \sqrt{u^2_{\text{Variabilidad}} + u^2_{\text{Sesgo}}} = 3,04\%$$

$$U_{\text{Expandida}} = k \cdot u_{\text{Combinada}} = 6\% \quad (k = 2)$$

Nota: Para el cálculo de la incertidumbre se han tenido en cuenta, además de las componentes de sesgo y precisión, las correspondientes a la balanza (existe un control gravimétrico de las medidas volumétricas) y de la pureza del material de referencia utilizado, habiéndose considerado, por el contrario, despreciables las componentes relacionadas con el almacenamiento de las muestras, la calibración y la deriva del cromatógrafo.

Tabla 2

Estudio de estabilidad y conservación de las muestras

Muestra	Tiempo del análisis Temperatura de almacenamiento	Concentración creatinina g/l	Nº de réplicas	DER (Desviación éstandar relativa) %	Diferencia %
M-1	Inmediato	0,58	6	1,8	-
M-2	Inmediato	1,30	6	2,0	-
M-1	3 días	0,58	6	0,4	-
M-2	T ^a ambiente	1,24	6	2,6	+ 0,4
M-1	3 días	0,58	6	0,4	-
M-2	4 °C	1,28	6	0,4	- 1,6
M-1	3 días	0,59	6	0,6	+ 1,7
M-2	- 20 °C	1,30	6	0,8	- 0,2
M-1	15 días	0,58	6	1,8	-
M-2	4 °C	1,25	6	1,0	+ 4,1
M-1	15 días	0,59	6	1,1	+ 1,7
M-2	- 20 °C	1,27	6	0,5	- 2,2

M-1 y M-2 son las muestras de orina seleccionadas correspondientes a dos niveles considerados alto bajo, en cuanto a su concentración de creatinina.

Diferencia es la diferencia en porcentaje entre la concentración media obtenida en las muestras analizadas al cabo de t días y las analizadas de forma inmediata tras la toma de muestra.

Tabla 3

Resultados obtenidos en la participación de un PICC

Referencia Muestra	Valor Obtenido (V _O) mmol/l	Valor de Referencia (V _R) mmol/l	DER Interlaboratorio %	Nº laboratorios	Valor Normalizado V _N = (V _O /V _R)	Sesgo {1-V _N }
crea-0503	8,3	7,7	8,5	21	1,08	0,08
crea-0504	11,4	10,9	7,8	21	1,05	0,05
crea-0505	11,4	11,4	14,0	18	1,00	0,00
crea-0506	17,9	16,7	10,0	18	1,07	0,07
crea-0601	8,2	8,0	7,1	19	1,02	0,02
crea-0602	13,5	13,2	8,6	19	1,02	0,02
crea-0603	9,8	10,0	9,6	18	0,98	0,02
crea-0604	8,0	8,0	9,3	18	1,00	0,00
crea-0605	6,3	6,3	5,5	17	1,00	0,00
crea-0606	16,5	16,0	6,2	17	1,03	0,03

$$u_{\text{Combinada}} = \sqrt{u_{\text{Var}}^2 + u_{\text{Sesgo}}^2}$$

$$u_{\text{Var}} = DER_{V_N} = 3,15$$

$$u_{\text{sesgo}} = \sqrt{\text{Sesgo}_{\text{Promedio}}^2 + u_{\text{Ref}}^2} = 4,49$$

donde:

$$\text{Sesgo}_{\text{Promedio}} = \sqrt{\frac{\sum (\text{Sesgo}_i)^2}{10}} = 3,98\%$$

$$u_{\text{Ref}} = \frac{S_R}{\sqrt{N_{\text{Lab}}}} = \frac{8,95}{\sqrt{18,6}} = 2,07$$

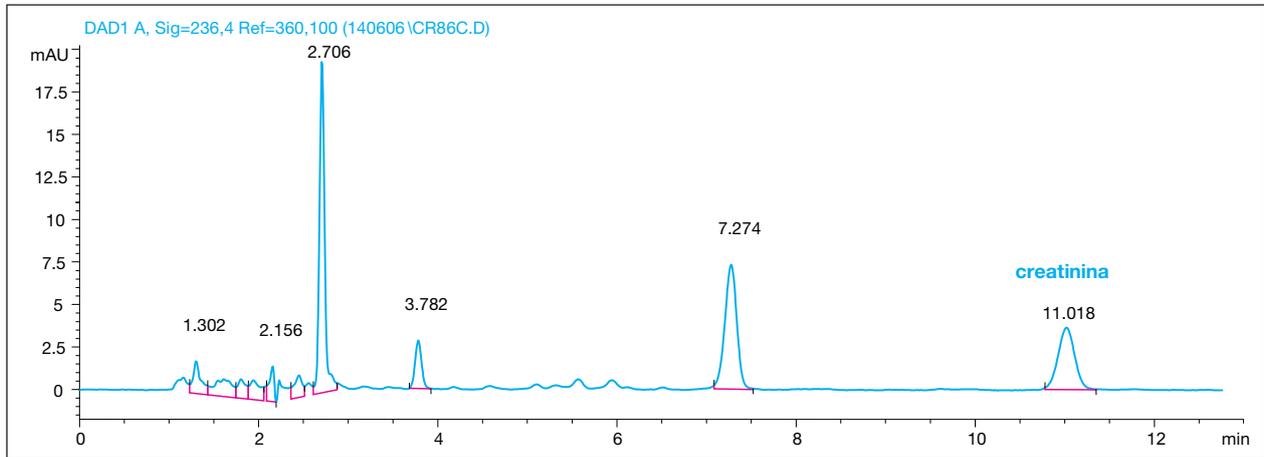
$$S_R = \sqrt{\frac{\sum (DER_{\text{Interlaboratorios}})^2}{10}} = 8,95\%$$

$$u_{\text{Combinada}} = \sqrt{u_{\text{Var}}^2 + u_{\text{Sesgo}}^2} = 5,48\%$$

$$U_{\text{Expandida}} = k u_{\text{Combinada}} = 11\% (k = 2)$$

Figura 1

Cromatograma de creatinina en orina en las condiciones indicadas en este método





MINISTERIO
DE TRABAJO
E INMIGRACIÓN



INSTITUTO NACIONAL
DE SEGURIDAD E HIGIENE
EN EL TRABAJO