

DESARROLLO DE UN MÉTODO DE REFERENCIA BASADO EN DILUCIÓN ISOTÓPICA CON DOBLE TRAZADOR PARA LA DETERMINACIÓN DE CREATINA Y CREATININA EN SUERO HUMANO MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA BIDIMENSIONAL CON DETECCIÓN POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TANDEM (2D-LC-ESI-MS/MS)

Adriana González-Gago¹, Daniela del Carmen Pineda Cevallos¹ María Funes Menéndez¹, Pablo Rodríguez González¹, José Ignacio García Alonso¹

¹Departamento de Química Física y Analítica, Universidad de Oviedo, Avenida Julián Clavería, 8, 33006, Oviedo, España

1. Introducción

Las enfermedades renales afectan a cada vez más a la población, presentando elevadas tasas de mortalidad y morbilidad a nivel mundial. Además, debido al envejecimiento de la población se espera que su incidencia siga incrementándose aún más en el futuro, provocando una importante carga para los sistemas financieros de los sistemas sanitarios de todo el mundo [1].

La creatinina es una pequeña biomolécula inactiva que se genera como resultado de la ciclación no enzimática de la creatina en el proceso de producción de energía para el abastecimiento de músculos y células [2]. La creatinina pasa después al torrente sanguíneo para ser finalmente eliminada a través de la orina. La determinación de creatinina en suero es un parámetro clínico de gran importancia, ya que se utiliza para el cálculo de la tasa de filtrado glomerular (GFR) que se emplea habitualmente para la evaluación de la función renal [3]. Es por ello que, resulta imprescindible disponer de métodos analíticos que permitan su determinación fiable para poder diagnosticar correctamente los casos de fallo renal [4]. Debido al gran volumen de muestras que deben ser analizadas diariamente en hospitales para la determinación de creatinina los métodos que se utilizan con más frecuencia en la rutina clínica son los métodos espectrofotométricos basados en la reacción de Jaffe o en reacciones enzimáticas. Sin embargo, ambos presentan ciertos problemas de especificidad, sobre todo los basados en el método de Jaffe, y especialmente para aquellas muestras con altos niveles de concentración de creatinina [5–7]. Como consecuencia resulta necesario disponer de métodos de referencia o materiales de referencia certificados para poder contrastar adecuadamente los métodos de rutina para poder así garantizar la trazabilidad y comparabilidad de los resultados [8].

La espectrometría de masas se ha utilizado frecuentemente en la detección de biomoléculas como por ejemplo la creatinina, ya que ofrece algunas

ventajas frente a los inmunoensayos, como una mayor selectividad, especialmente cuando se utiliza como detector tras una separación cromatográfica y trabajando en el modo *Selected Ion Monitoring* (SRM). Como consecuencia existen numerosas publicaciones en las que se ha aplicado la Cromatografía Líquida en combinación con la Espectrometría de Masas (LC-MS/MS) para la determinación de creatinina en distintos tipos de muestras biológicas [9–11]. Sin embargo, la principal ventaja del empleo de la Espectrometría de Masas es la posibilidad de utilizar patrones marcados isotópicamente para el desarrollo de metodologías de cuantificación basadas en Dilución Isotópica (IDMS), considerados como procedimientos de medida de orden superior, por lo que permiten desarrollar potenciales métodos de referencia.

Actualmente existen varios métodos de referencia para la determinación de creatinina basados en IDMS que han sido aprobados por el JTCLM (*Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine*) [3,12–15]. Sin embargo, ninguno de ellos es capaz de considerar la posible interconversión creatina/creatinina que puede tener lugar durante el procedimiento de preparación de muestra pudiendo dar lugar a errores significativos en los resultados [16].

En este trabajo se presenta un método de referencia para la determinación de creatina y creatinina, basado en un trabajo previo en el que se desarrolló una metodología de cuantificación por dilución isotópica empleando un doble trazador para la corrección de la interconversión de especies [17]. Esta metodología proponía el empleo de trazadores mínimamente marcados (¹³C₁-creatinina y ¹³C₂-creatinina) y medida de las distribuciones isotópicas de ambos mediante ESI-MS/MS tras la separación mediante cromatografía líquida de intercambio catiónico. Sin embargo, con este método la determinación de creatina en algunas muestras se veía comprometida debido a la supresión de la ionización de los analitos en la fuente ESI por

efectos de matriz. Para mejorar dicho método y hacerlo aplicable a todo tipo de muestras en este trabajo se ha recurrido a la cromatografía líquida bidimensional (2D-LC). En la primera dimensión se emplea una columna de fase reversa a cuya salida se recoge una fracción que contiene a los dos analitos, por lo que el tiempo de análisis no se alarga, que es transferida a la segunda dimensión, donde se lleva a cabo una separación por intercambio catiónico en ausencia de matriz. El método propuesto se ha validado mediante el análisis de materiales de referencia certificados y aplicado a la determinación de creatina y creatinina en muestras reales.

2. Resultados y discusión

Para llevar a cabo este trabajo se utilizó un sistema instrumental de cromatografía líquida bidimensional acoplada a espectrometría de masas con fuente de ionización de *electrospray* (Figura 1).

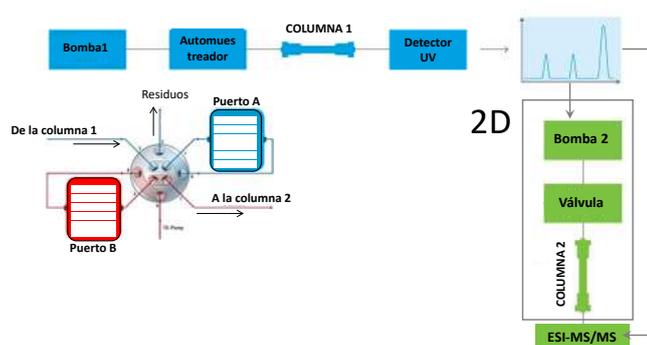


Figura 1

Optimización de las condiciones cromatográficas

La optimización de las condiciones cromatográficas se llevó a cabo inyectando disoluciones patrón de creatina y creatinina. En primer lugar, se optimizó la separación en la primera dimensión utilizando una columna de fase reversa y monitorizando la señal mediante un detector UV-VIS. Debido a su baja retención en la columna de fase reversa ambos analitos eluyeron en una única fracción (Figura 2).

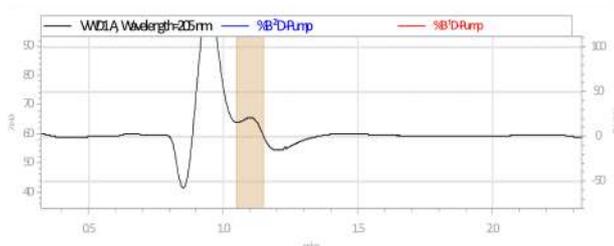


Figura 2

Una vez determinado el tiempo de retención al que eluían los analitos se recogió la fracción correspondiente para ser enviada a la segunda

dimensión en la que se llevó a cabo su separación en una columna de intercambio catiónico con posterior detección por espectrometría de masas (Figura 3).

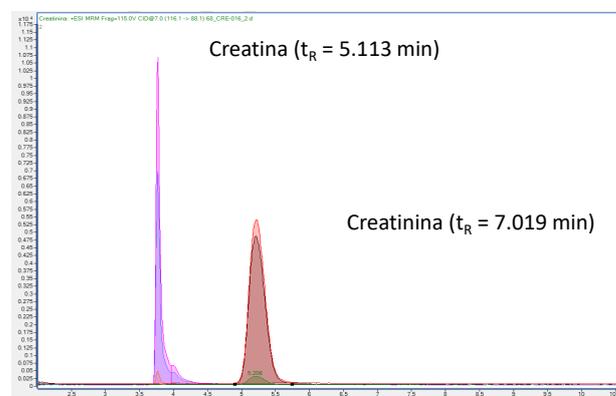


Figura 3

Puesto que el detector UV-vis no es específico fue necesario realizar un estudio para determinar el tiempo exacto al que se debía recoger la fracción para conseguir que ambos analitos fueran transferidos a la segunda dimensión. Para ello se recogieron fracciones consecutivas en la zona en la que se observó el pico cromatográfico en el detector UV-VIS y todas ellas se midieron en la segunda dimensión para comprobar que efectivamente ambos analitos se recogían correctamente en la fracción seleccionada. Como resultado de este estudio se concluyó que era necesario recoger la fracción número 1 (Figura 4).

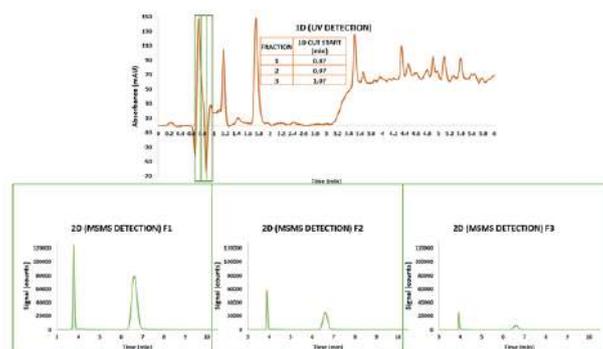


Figura 4

Optimización de las condiciones de medida

Las condiciones de trabajo para la detección de creatina y creatinina también fueron optimizadas utilizando patrones (Tabla 1). En primer lugar, se seleccionaron las transiciones de medida. Para ello se seleccionó como ion precursor el ion molecular de cada una de estas sustancias y para seleccionar un ion producto se realizó un barrido de iones producto y se seleccionó en cada caso

aquel que tenía mayor intensidad. La energía de colisión, así como los parámetros de la fuente también se optimizaron siguiendo el mismo criterio.

Tabla 1

COMPUESTO	ION PRECURSOR	FÓRMULA MOLECULAR	ION PRODUCTO	FÓRMULA MOLECULAR	EC (eV)
CREATINA	132.1	C ₄ H ₉ N ₃ O ₂	90.1	C ₃ H ₈ NO ₂	8
CREATININA	114.1	C ₄ H ₇ N ₃ O	86.1	C ₃ H ₈ N ₃	7

PARÁMETRO DE LA FUENTE	VALOR ÓPTIMO
Temperatura del gas (°C)	250
Caudal del gas (L/min)	9
Presión del nebulizador (psi)	45
Temperatura de "sheath gas" (°C)	400
Caudal de "sheath gas" (L/min)	8
Voltaje del capilar (V)	2500
Voltaje "Nozzle" (V)	0

Por último, se estudió la influencia de los efectos de matriz sobre el tiempo de retención y los volúmenes inyectados. Para ello se inyectó en el sistema un extracto de una muestra de suero, se ensayaron volúmenes de inyección de 1, 5 y 10 µL y se recogieron 3 fracciones en cada caso (Figura 5). Los tiempos de retención no variaron siendo en todos los casos la primera fracción la que proporcionó señales más elevadas para ambos analitos. En cuanto al volumen de inyección, para la creatinina y en menor medida para la creatina, se observaron efectos de matriz para un volumen de inyección de 10 µL por lo que finalmente se seleccionó un volumen de 5 µL como óptimo.

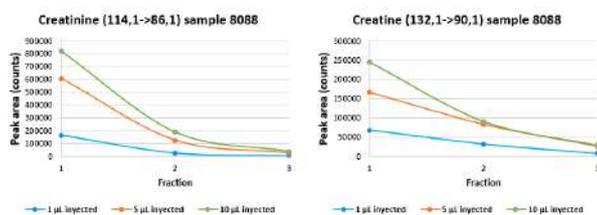


Figura 5

Método de cuantificación basado en IDMS con doble trazador

Como ya se ha comentado en la introducción el mayor reto de la cuantificación fiable de creatinina en muestras biológicas es la detección de la posible interconversión entre creatina y creatinina que puede tener lugar durante los procedimientos seguidos para la preparación de la muestra. Con el fin de evaluar los factores de interconversión se ha propuesto una metodología basada en el empleo de dos trazadores mínimamente marcados, por un lado, la creatinina marcada en un átomo de ¹³C (¹³C₁-creatinina) y por otro lado la creatina marcada con dos átomos de ¹³C (¹³C₂-creatina). Estos trazadores son añadidos a la muestra antes de comenzar el procedimiento de tratamiento de muestra (Figura 6). Puesto que estos patrones mínimamente marcados se van a comportar

exactamente igual que sus análogos de abundancias naturales, si existe interconversión se va a poder detectar fácilmente a través de la presencia de ¹³C₂-creatinina y ¹³C₁-creatinina.

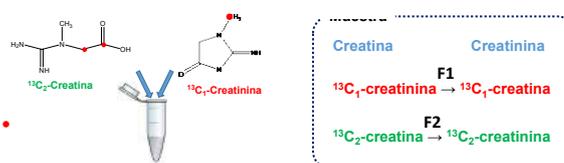


Figura 6

Conocida la cantidad de estas formas marcadas de la creatina y la creatinina va a ser posible la determinación de los factores de interconversión entre ambas.

Para determinar la concentración de todas las especies presentes en la mezcla se midieron para cada analito 4 transiciones consecutivas (Tabla 2).

Tabla 2

Creatina		Creatinina	
Ion precursor	Ion producto	Ion precursor	Ion producto
114.1	86.1	132.1	90.1
115.1	87.1	133.1	91.1
116.1	88.1	134.1	92.1
117.1	89.1	135.1	93.1

A partir de las áreas de dichas transiciones se obtuvieron las fracciones molares mediante la deconvolución del perfil isotópico (IPD) de la mezcla (Ecuación 1) y a partir de ellas los correspondientes factores de interconversión F1 (% de creatinina transformado en creatina) y F2 (% de creatina transformado en creatinina).

Ecuación 1

$$\begin{bmatrix} A_{mix}^1 \\ A_{mix}^2 \\ A_{mix}^3 \\ \dots \\ A_{mix}^{n-1} \\ A_{mix}^n \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A_{nat}^1 & A_{13C1}^1 & A_{13C2}^1 \\ A_{nat}^2 & A_{13C1}^2 & A_{13C2}^2 \\ A_{nat}^3 & A_{13C1}^3 & A_{13C2}^3 \\ \dots & \dots & \dots \\ A_{nat}^{n-1} & A_{13C1}^{n-1} & A_{13C2}^{n-1} \\ A_{nat}^n & A_{13C1}^n & A_{13C2}^n \end{bmatrix} \begin{bmatrix} x_{nat} \\ x_{13C1} \\ x_{13C2} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} e^1 \\ e^2 \\ e^3 \\ \dots \\ e^{n-1} \\ e^n \end{bmatrix}$$

Utilizando la estrategia descrita se determinaron los factores de interconversión F1 y F2 para un total de 93 muestras de suero con distintos niveles de concentración de creatinina, resultando despreciables al emplear la metodología propuesta en este trabajo.

Validación del método

Para terminar, se llevó a cabo la validación del método propuesto. La exactitud se evaluó mediante análisis de dos materiales de referencia

certificados. El método propuesto proporcionó una buena exactitud con errores relativos inferiores a 2% para los dos materiales de referencia analizados. La precisión del método se evaluó en términos de repetibilidad ($n = 4$) y reproducibilidad ($n = 4$ y $m = 5$) analizando una muestra de suero y siempre se obtuvieron coeficientes de variación inferiores a 1.3%. Los límites de detección y cuantificación obtenidos mediante la medida repetida de blancos fueron de 0.002 y 0.005 mg/dL respectivamente y las incertidumbres expandidas obtenidas en el análisis de una muestra de suero estuvieron siempre por debajo del 3.5%.

3. Conclusiones

El empleo de la Dilución Isotópica mediante Cromatografía Líquida bidimensional acoplada a Espectrometría de Masas en Tándem (2D-HPLC-ESI-MS/MS) utilizando un doble trazador ($^{13}\text{C}_2$ -creatina y $^{13}\text{C}_1$ -creatinina) ha permitido obtener los factores de interconversión durante todo el proceso analítico para una cuantificación exacta y precisa de creatina y creatinina en muestras de suero humano.

El método propuesto ha proporcionado una buena exactitud y precisión en términos de repetibilidad y reproducibilidad. Los límites de detección y cuantificación resultan adecuados teniendo en cuenta los niveles normales de creatinina en suero y las incertidumbres expandidas obtenidas en el análisis de una muestra de suero fueron aceptables al encontrarse siempre por debajo del 3.5%.

El empleo de la cromatografía bidimensional ha permitido mejorar el rendimiento del sistema instrumental de trabajo al eliminarse en la primera dimensión una buena parte de la matriz de la muestra, mejorando así la calidad de la separación mediante cromatografía de intercambio catiónico en la segunda dimensión y prolongando el tiempo de trabajo sin necesidad de limpiar el sistema instrumental. El tiempo total necesario para cada inyección de cada muestra incluyendo el tiempo de equilibrado es de unos 25 minutos, permitiendo realizar entre 30-40 inyecciones por sesión de trabajo.

Agradecimientos

Este trabajo ha recibido financiación del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades a través del Proyecto PGC2018-097961-B-I00.

4. Referencias

- [1] Liyanage T., Ninomiya T., Jha V., Neal B., Patrice H.M., Okpechi I., et al. (2015) *The Lancet*, 385(9981), 1975–1982.
- [2] Stokes P., O'Connor G. (2003) *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 794(1), 125–136.
- [3] Pottel H., Björk J., Courbebaisse M., Couzi L., Ebert N., Eriksen B.O., et al. (2021) *Ann. Intern. Med.*, 174(2), 183–191.
- [4] Roelofsen-de Beer R. J. A. C., van Zelst B. D., Vroiling A. B., de Rijke Y. B., Ramakers C. (2019) *Clin. Chem. Lab. Med.*, 57(5), 659–667.
- [5] Feldman-Kiss D., Li D., Cleve R., Sinclair G., Dubland J.A., Wang L. (2022) *Pediatric Nephrology*, 37(6), 1347–1353.
- [6] Dissanayake R., Ranaweera K., Dias P., Priyadarshani A., et al. (2022) *Clin. Exp. Health Sci.*, 12, 11-17.
- [7] Greenberg N., Roberts W.L., Bachmann L.M., Wright E.C., Dalton R.N., Zakowski J.J., et al. (2012) *Clin. Chem.*, 58(2), 391–401.
- [8] Teo T.L., Lippa K.A., Mackay L., Yong S., Liu Q., Camara J.E., et al. (2019) *Anal. Bioanal. Chem.*, 411(28), 7341–7355.
- [9] Bernstone L., Jayanti A., Keevil B. (2019) *Clin. Mass Spectrom.*, 11, 21–26.
<https://doi.org/10.1016/j.clinms.2018.11.004>
- [10] Kučerová K., Krčmová L.K., Mikanová Z., Matysová L., Melichar B., Švec F. (2019) *J. Chromatogr. A.*, 1607.
- [11] Scribel L., Zavascki A.P., Matos D., Silveira F., Peralta T., Gonçalves Landgraf N., et al. (2020) *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 1137.
- [12] Siekmann L. (1985), *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 23 (3), 137-144.
- [13] Welch M.J., Cohen A., Hertz H.S., Ng K.J., Schaffer R., der Lijn P. van, et al. (1986) *Anal. Chem.*, 58(8), 1681–1685.
- [14] Dodder N.G., Tai S.S.C., Sniegowski L.T., Zhang N.F., Welch M.J. (2007) *Clin. Chem.*, 53(9), 1694–1699.
- [15] Dai X., Fang X., Yang M., Li H., He Y. (2008) *Anal. Lett.*, 41(16), 2912–2922.
- [16] Camara J.E., Lippa K.A., Duester D.L., Gasca-Aragon H., Toman B. (2012) *Anal. Bioanal. Chem.*, 403(2), 527–535.
- [17] Fernández-Fernández M., Rodríguez-González P., Añón Álvarez M.E., Rodríguez F., Álvarez Menéndez F., García Alonso J.I. (2015) *Anal. Chem.*, 87(7), 3755–3763.