

Determinación automatizada de *p*-aminohipurato e inulina en suero y orina

M. B. Prieto García, B. Tascón Astigárraga, B. Marín Fernández

Resumen

Se describe la adaptación a un sistema automático de un método enzimático para la determinación de inulina en suero y orina, usando inulinasa, glucosa oxidasa, hexoquinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa y glucosa-6-fosfato 1-deshidrogenasa. El método se basa en la hidrólisis de inulina por la inulinasa y la determinación de la fructosa liberada, previa transformación a glucosa. El procedimiento es lineal hasta 0,5 g/L de inulina en suero y hasta 10 g/L en orina. Los coeficientes de variación intra e interseriales, a diferentes concentraciones de inulina, oscilan entre el 3,9 y el 5,3 %. La recuperación de inulina en suero y orina es de 93 - 114 %. Los límites de detección son 15 mg/L y 90 mg/L de inulina en suero y orina respectivamente.

Asimismo, se describe la adaptación de un método químico para determinación de *p*-aminohipurato que requiere su reacción con un aldehído cromogénico, el dimetilaminocinamaldehído. Este procedimiento es lineal hasta 90 mg/L de *p*-aminohipurato en suero y hasta 10 g/L en orina. Los coeficientes de variación intra e interseriales, a diferentes concentraciones de *p*-aminohipurato, oscilan entre el 2,0 % y el 3,9 %. La recuperación de *p*-aminohipurato en suero y orina es de 91 - 112 %. Los límites de detección son 6 mg/L y 62 mg/L de *p*-aminohipurato en suero y orina, respectivamente.

Concluimos que ambos procedimientos automatizados proporcionan resultados fiables en un tiempo de análisis aceptable y simplifican notablemente el procesamiento de los numerosos especímenes necesarios por cada paciente en los estudios de función renal que emplean inulina y *p*-aminohipurato en perfusión continua.

Introducción

El filtrado glomerular se mide por la depuración renal de un marcador biológicamente inerte, que, además de ser metabólicamente inactivo, no influya en la función renal ni se vea modificada dicha depuración por efecto de ninguna otra sustancia. La inulina cumple a la perfección estos requisitos, puesto que este polímero de fructosa metabólicamente inerte es totalmente filtrado por el glomérulo, no experimenta ni reabsorción ni secreción tubular y no es tóxico. La evaluación de la función tubular, a su vez, se realiza determinando la depuración de una sustancia totalmente depurada a su paso por el riñón, como el *p*-aminohipurato, que además es secretado por los túbulos renales. Las depuraciones de inulina y *p*-aminohipurato son,

Summary

An automated enzymatic method for the determination of inulin in serum or urine, using inulinase, glucose oxidase, hexokinase, glucose-6-phosphate isomerase and glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase is described. The assay is based on the hydrolysis of inulin by inulinase and the determination of fructose released, previously converted to glucose. The assay is linear up to 0.5 g/L of inulin in serum and up to 10 g/L in urine. The intraassay and interassay coefficients of variation at different levels of inulin range from 3.9 to 5.3 %. Recovery of added inulin from serum and urine is 93 - 114 %. Detection limits are 15 mg/L and 90 mg/L of inulin in serum and urine respectively.

An automated chemical assay of *p*-aminohippurate involving its reaction with a chromogenic aldehyde, dimethylaminocinnamaldehyde, is also described. This assay is linear up to 90 mg/L of *p*-aminohippurate in serum and up to 10 g/L in urine. The intraassay and interassay coefficients of variation at different levels of *p*-aminohippurate range from 2.0 % to 3.9 %. Recovery of added *p*-aminohippurate from serum and urine is 91 - 112 %. Detection limits are 6 mg/L and 62 mg/L of *p*-aminohippurate in serum and urine respectively.

We conclude that both automated methods give reliable results with acceptable assay time and simpler processing of the numerous specimens per patient that are needed in renal function studies using continuous intravenous infusion of inulin and *p*-aminohippurate.

pues, las magnitudes básicas y más fiables para la estimación de la velocidad de filtrado glomerular y del flujo plasmático renal efectivo respectivamente, tanto en la práctica clínica como en investigación. Aunque el procedimiento no se emplea de forma habitual, por ser menos práctico que otros, sigue constituyendo el método de referencia. Tradicionalmente, el método más ampliamente aceptado para la medida de inulina ha sido el basado en la reacción de la antrona (1). En los últimos años, se han desarrollado varios métodos enzimáticos para la determinación de inulina en suero y orina (2-5). Algunos de ellos han sido automatizados con éxito para su empleo en analizadores automáticos (6,7). El procedimiento actual para determinar *p*-aminohipurato requiere la reacción de plasma desproteinizado u orina con un aldehído cromogénico, el dimetilaminocinamaldehído, en ácido diluido o etanol (8,9). El objetivo del presente trabajo ha sido la adaptación, para su utilización en un analizador automático BM/Hitachi 704 (Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania), de un método enzimático de dos etapas para la determinación de inulina y del método químico, anteriormente citado, para la determinación de *p*-aminohipurato.

Material y métodos

Instrumentación y reactivos

Determinación de inulina: Inulinasa (Novozym 230) en disolución (400 μ kat/L) (Novo Nordisk Bioindustrials). Inulina en su forma inyectable (Inutest[®]; Laevosan GmbH, Linz, Austria). Citrato 1,5 mol/L y sulfato amónico (Sigma Chemical Co., St. Louis, EEUU). Los demás reactivos (glucosa oxidasa, hexoquinasa, glucosa-6-fosfato 1-deshidrogenasa, glucosa-6-fosfato isomerasa y NADP/ATP) se obtuvieron de Boehringer Mannheim.

Determinación de *p*-aminohipurato: *p*-aminohipurato sódico (200 g/L) (Merck Sharp & Dohme, EEUU). Ácido tricloroacético 6,1 mol/L y dimetilaminocinamaldehído (Sigma Chemical Co.). Etanol 95% (Merck, Darmstadt, Alemania).

Todas las determinaciones se efectuaron en un analizador BM/Hitachi 704.

Especímenes

Como material de calibración para los procedimientos en suero y orina se eligieron disoluciones de inulina y *p*-aminohipurato preparadas en suero de calibración (C.f.a.s.; Boehringer Mannheim) y un control de concentración fisiológica de orinas (Lyphochek, Bio-Rad, Anaheim, EEUU) respectivamente, por proporcionar intervalos de respuesta lineal más amplios y mejor repetibilidad de inulina y *p*-aminohipurato, respecto a los obtenidos cuando se empleaban disoluciones acuosas de ambos compuestos en las calibraciones. Se tuvieron en cuenta las características de interés práctico que aportan los estándares así preparados frente a la simple disolución acuosa de las sustancias, como son una mayor estabilidad (presencia de azida sódica tanto en el multicalibrador como en el control de orina) y una composición similar a la de los especímenes reales.

Para la evaluación del procedimiento se añadieron cantidades conocidas de inulina y *p*-aminohipurato a materiales de control, Precinorm U (Boehringer Mannheim) o Lyphochek, así como a mezclas de sueros o de orinas.

Preparación de reactivos

Determinación de inulina: se prepararon cuatro disoluciones enzimáticas:

Agente hidrolizante 1. - Glucosa oxidasa (3783,3 μ kat/L) en solución amortiguadora citrato 0,2 mol/L (pH = 5) con 10% de H₂O₂ 0,0882 mol/L y ~ 883,3 μ kat/L de inulinasa.

Agente hidrolizante 2, idéntico al anterior pero sin inulinasa.

Reactivo R1. - Hexoquinasa (~ 32,7 μ kat/L) y Glucosa-6-fosfato 1-deshidrogenasa (~ 16,3 μ kat/L) en solución amortiguadora NADP/ATP.

Reactivo R2. - Glucosa-6-fosfato isomerasa (~ 700 μ kat/L) en sulfato amónico 3,2 mol/L.

Determinación de *p*-aminohipurato: se empleó, como desproteinizante, ácido tricloroacético 150 g/L en disolución acuosa y como único reactivo dimetilaminocinamaldehído 3,3 g/L en HCl 0,1 mol/L.

Procedimiento

Determinación de inulina:

Hemos adaptado el procedimiento descrito por Hellerstein S et al (4) para su empleo en un analizador BM/Hitachi 704 (tabla I).

* Principio de medida: la inulina se hidroliza a fructosa por reacción con inulinasa y la fructosa se determina por una serie de reacciones enzimáticas en cadena (figura 1).

* Procedimiento de medida: las soluciones de estándar y los especímenes de suero y orina se incuban con el agente hidrolizante correspondiente a 37 °C durante 1,5 horas. Transcurrida la incubación, son homogeneizados en un agitador tipo vortex-

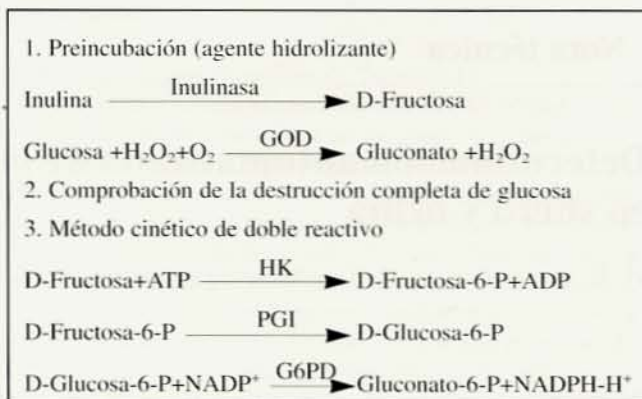


Figura 1. Procedimiento de medida de la inulina (GOD: glucosa oxidasa; HK: hexoquinasa; PGI: glucosa-6-fosfato isomerasa; G6PD: glucosa-6-fosfato 1-deshidrogenasa)

mixer y procesados por un método convencional para la determinación de glucosa con el fin de verificar la completa destrucción de ésta por ser un conocido interferente. La posterior determinación de inulina se efectúa con un método cinético de dos reactivos: en el analizador, 15 μ L del espécimen son incubados con 438 μ L del reactivo R1 durante 5 minutos y a continuación se añaden 50 μ L del reactivo R2. La medida cinética de absorbancia se realiza a 340 nm durante 40 s.

Determinación de *p*-aminohipurato: en la tabla I se detalla la adaptación del procedimiento descrito por Schwartz (9), para su empleo en un analizador BM/Hitachi 704. Las soluciones estándar y los especímenes de suero y orina son desproteinizados por dilución 1:2 con ácido tricloroacético y posterior centrifugación durante 4 minutos (100 x g). La determinación de *p*-aminohipurato se lleva a cabo con un método monorreactivo en el que 20 μ L del espécimen son incubados con 280 μ L del reactivo, dimetilaminocinamaldehído, durante 10 minutos con posterior lectura de absorbancia a punto final a 546 nm.

Protocolo de evaluación

Estudio de la imprecisión (10): para el estudio de la repetibilidad intraserial se realizaron veinte determinaciones, en tres días distintos, de dos disoluciones de concentraciones diferentes de *p*-aminohipurato y de inulina preparadas por adición de estos constituyentes a materiales de control (Precinorm U o Lyphochek) o a mezclas de sueros o de orinas. Para estudiar la repetibilidad interserial se realizó una determinación diaria en veinte días distintos de las mismas disoluciones. Se calcularon la media, la desviación típica y el coeficiente de variación. A la hora de establecer un criterio de aceptabilidad propio surgió la dificultad de que, por tratarse de constituyentes normalmente

Tabla I. Resumen de la adaptación de los métodos para su aplicación en un analizador BM/Hitachi 704

Constituyente	Inulina	PAH
Método de análisis	cinética a	1 punto
Volumen de muestra (μ L)	15	20
Volumen R1 (μ L)	438	280
Volumen R2 (μ L)	50	0
Longitud de onda (nm)	376/340	660/546
Método de calibración	lineal	lineal
[Estándar 1] (mg/L)	0	0
[Estándar 2] (mg/L)	400 (suero) 2000 (orina)	80 (suero) 2000 (orina)
Unidad	mg/L	mg/L

PAH: *p*-Aminohipurato

ausentes en especímenes biológicos, no se disponía de un coeficiente de variación biológica intraindividual con el que comparar y, por otra parte, no se encontraron datos de referencia en programas externos de garantía de la calidad. Así pues se optó por considerar válida la imprecisión habitualmente aceptada para otras determinaciones realizadas en pruebas funcionales con sustancias exógenas que tampoco sufren modificación en el organismo, como la prueba de la D-xilosa. Con esta referencia, se consideraron aceptables los coeficientes de variación intra e interseriales, como máximo, en torno al 5 % (11).

Estudio de linealidad y recuperación: se estudió la rectilinealidad de los procedimientos para *p*-aminohipurato e inulina en suero y en orina utilizando, como mínimo, ocho concentraciones, obtenidas por adición de los constituyentes a mezclas de sueros o de orinas, en el intervalo de concentraciones que se trata de alcanzar habitualmente en los estudios de función renal que emplean estas sustancias. Las determinaciones se efectuaron por duplicado en tres días consecutivos y se calcularon las medias resultantes. Se valoró la linealidad de la respuesta mediante la inspección visual de las rectas de regresión lineal y se calculó el porcentaje de recuperación de cara a evaluar el posible error sistemático proporcional. Se aceptó como válida una recuperación media entre 90 y 110 %, siempre y cuando no hubiera ninguna determinación inferior al 85 % ni superior al 115 % (12).

Detectabilidad: para establecer el límite de detección de los procedimientos, se tomaron como blancos una mezcla de sueros y otra de orinas, ambas sin contenido de *p*-aminohipurato ni de inulina. Dado el origen biológico de los blancos y puesto que no recibieron ninguna manipulación excepcional, no se consideró necesario analizar simultáneamente un espécimen con baja concentración de cada constituyente, puesto que no hay razón alguna para que el error aleatorio obtenido al analizar el blanco sea diferente del obtenido al analizar un espécimen de baja concentración. Se realizaron veinte determinaciones consecutivas de cada espécimen y se calculó el límite de detección, para un riesgo $\alpha = 0,01$ en una prueba unilateral con $n = 20$, como la media de las determinaciones del blanco más 2,539 veces la desviación típica del blanco (10).

Resultados y discusión

Empleando como materiales de calibración disoluciones acuosas de inulina y *p*-aminohipurato respectivamente, los coeficientes de variación intra e interseriales obtenidos no proporcionaron los resultados deseados, con base en el criterio de aceptabilidad expuesto anteriormente (datos no mostrados). Además, se obtenía respuesta rectilínea, por inspección visual,

en un intervalo menos amplio que cuando la calibración se efectuaba con disoluciones de inulina y *p*-aminohipurato preparadas en suero de calibración o en un material de control de orinas, de concentración fisiológica, lo que podría conducir, en casos de pacientes con baja reserva renal funcionante, a que algunos especímenes tuvieran que sufrir manipulaciones adicionales para conseguir realizar las determinaciones. Esto resulta especialmente engorroso si se tiene en cuenta que los estudios que utilizan estos compuestos, administrados al paciente en perfusión continua, suelen requerir la determinación de los mismos en varios especímenes por cada paciente, tanto de suero como de orina, recogidos en intervalos de tiempo establecidos a lo largo de toda la prueba.

Así, utilizando los materiales de calibración descritos en el apartado material y métodos, se observaron coeficientes de variación intra e interseriales entre el 2,0 y el 5,3 %. Los resultados del estudio de imprecisión se resumen en la tabla II.

El intervalo de linealidad para la determinación de *p*-aminohipurato en suero fue de 10 - 90 mg/L y en orina de 500 a 10000 mg/L, obedeciendo a las ecuaciones de regresión lineal simple:

$$[p\text{-aminohipurato suero}]_{\text{medida}} = 0,932 [p\text{-aminohipurato suero}]_{\text{esperada}} - 0,054 \quad (r = 0,9989)$$

$$[p\text{-aminohipurato orina}]_{\text{medida}} = 1,00 [p\text{-aminohipurato orina}]_{\text{esperada}} + 18,9 \quad (r = 0,9983)$$

El intervalo de linealidad para la inulina en suero fue de 50 a 500 mg/L y en orina de 500 a 10000 mg/L:

$$[inulina suero]_{\text{medida}} = 0,994 [inulina suero]_{\text{esperada}} + 0,59 \quad (r = 0,9984)$$

$$[inulina orina]_{\text{medida}} = 0,934 [inulina orina]_{\text{esperada}} + 169 \quad (r = 0,9997)$$

Por inspección visual, los resultados del estudio de linealidad se consideraron aceptables, puesto que abarcan ampliamente el intervalo analítico requerido sin precisar manipulaciones adicionales de los especímenes.

Los resultados del estudio de recuperación se resumen en las figuras 2 y 3. En todos los especímenes procesados el porcentaje de recuperación osciló entre el 91 y el 112 % para la determinación de *p*-aminohipurato (recuperación media: 92,9 % en suero y 101 % en orina) y entre el 93 - 114 % para la de inulina (recuperación media: 101 % en suero y 98 % en orina). El estudio de detectabilidad mostró buenos resultados, dado que los límites de detección no fueron superiores a los límites inferiores de linealidad y en ningún caso se obtuvieron límites de de-

Tabla II. Estudio de imprecisión

	Intraserial				Interserial				
	\bar{x} (mg/L)	<i>s</i> (mg/L)	CV (%)	<i>n</i>	\bar{x} (mg/L)	<i>s</i> (mg/L)	CV (%)	<i>n</i>	
<i>p</i> -Aminohipurato (suero)	29	0,93	3,2	20	34	1,3	3,8	20	
	64	1,5	2,3		71	2,9	3,9		
<i>p</i> -Aminohipurato (orina)	1740	42	2,4	20	1026	29	2,8	20	
	3802	76	2,0		1982	73	3,7		
Inulina (suero)	197	10	5,1	20	213	10	4,7	20	
	381	16	4,2		390	18	4,6		
Inulina (orina)	1215	58	4,8	20	520	5,0	5,0	20	
	1906	74	3,9		1094	5,3	5,3		

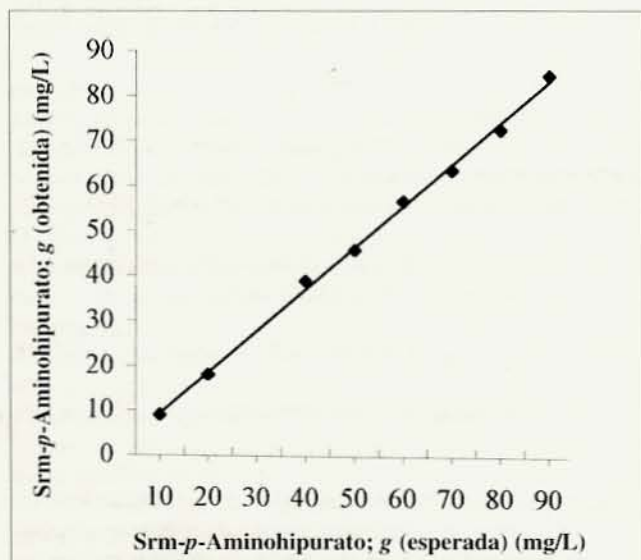
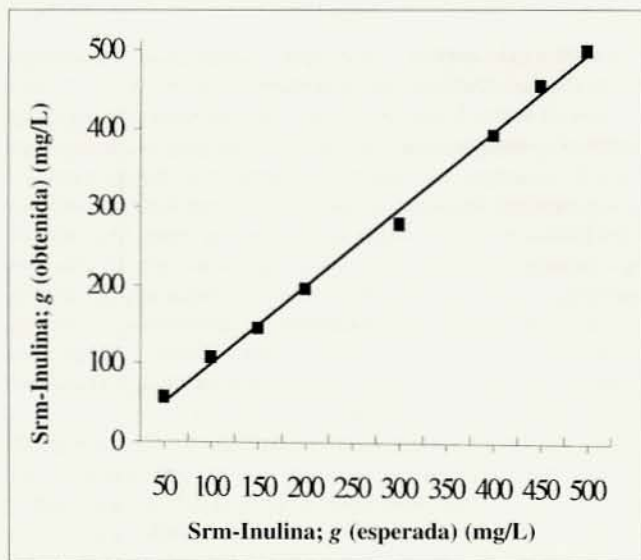


Figura 2. Estudio de recuperación de inulina y *p*-aminohipurato en especímenes de suero.

tección cercanos a las concentraciones habitualmente alcanzadas en estudios de función renal. Los valores calculados fueron los siguientes:

- p*-aminohipurato suero: 6 mg/L;
- p*-aminohipurato orina: 62 mg/L;
- inulina suero: 15 mg/L;
- inulina orina: 90 mg/L.

En conclusión, hasta hace poco la cuantificación de inulina y *p*-aminohipurato, sustancias administradas en perfusión continua en algunos estudios de función renal, resultaba tediosa tanto por el elevado número de especímenes de suero y orina requeridos para cada paciente como por tratarse de procedimientos poco automatizados y que empleaban reactivos insidiosos (1,9). La automatización de los mismos ha supuesto una clara ventaja en este sentido y ha permitido hacerlos más asequibles para cualquier laboratorio. A tenor de los resultados presentados, se puede concluir que los métodos adaptados en este trabajo para la determinación de inulina y *p*-aminohipurato en el analizador BM/Hitachi 704 permiten cuantificar estos constituyentes de modo fiable en un intervalo de concentraciones suficientemente amplio para los valores habitualmente alcanzados en estudios de función renal.

Desgraciadamente, no se evita totalmente la manipulación previa de los especímenes, dado que continúa precisándose de

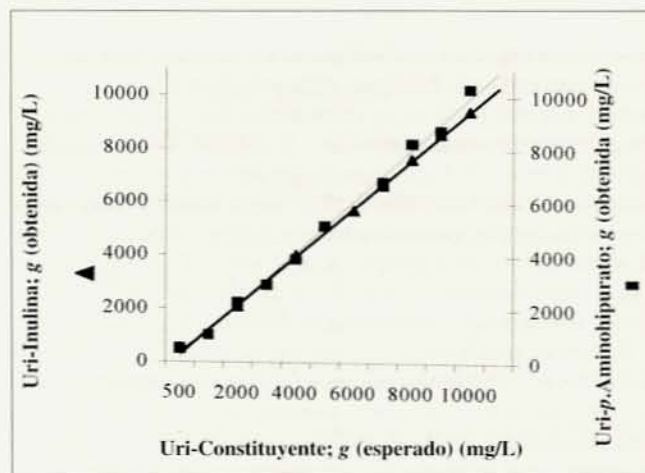


Figura 3. Estudio de recuperación de inulina y *p*-aminohipurato en especímenes de orina.

una incubación manual, en ambos casos, previa a la determinación efectuada en el analizador automático.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido realizado en parte gracias al proyecto de investigación FIS 94/0075 dirigido por Serafín Málaga, médico adjunto del Servicio de Pediatría del H. Central de Asturias, al que expresamos nuestro agradecimiento por solicitar nuestra colaboración para participar en el estudio sobre la función renal en el riñón único que Montserrat Antón, ha llevado a cabo en nuestro centro hospitalario bajo su dirección.

También agradecemos a Novo Nordisk Bioindustrials el suministro gratuito de la enzima Inulinasa (Novozym 230) requerida para dicho estudio.

Correspondencia:
M. B. Prieto García
c/ Isla de Cuba, nº 8 - 1º
33011 Oviedo, Asturias

Bibliografía

1. White RP, Samson FE. Determination of Inulin in Plasma and Urine by Use of Anthrone. *J Lab Clin Med* 1954; 43: 475-8.
2. Degenaar CP, Frenken LAM, v Hooff JP. Enzymatic Method for Determination of Inulin. *Clin Chem* 1987; 33: 1070-1.
3. Kuehnle HF, Van Dahl K, Schmidt FH. Fully Enzymatic Inulin Determination in Small Volume Samples without Deproteinization. *Nephron* 1992; 62: 104-7.
4. Hellerstein S, Berenbom M, Alon U, Warady BA. Automated Enzymatic Determination of Inulin. *Clin Chem* 1993; 39: 2211-2.
5. Sugita O, Tomiyama Y, Matsuto T, Okada M, Gejyo F, Arakawa M, et al. A New Enzymatic Method for the Determination of Inulin. *Ann Clin Biochem* 1995; 32: 561-5.
6. Delanghe J, Bellon J, De Buyzere M, Van Daele G, Leroux-Roels G. Elimination of Glucose Interference in Enzymatic Determination of Inulin. *Clin Chem* 1991; 37: 2017-8.
7. Summerfield AL, Hortin GL, Smith CH, Wilhite TR, Landt M. Automated Enzymatic Analysis of Inulin. *Clin Chem* 1993; 39: 2333-7.
8. Parekh CK, Kirpan J, Peterson GL, Hassert GL, Murphy BF. Automated Simultaneous Determination of *p*-Aminohippurate and Creatinine in Plasma or Urine. *Clin Chem* 1974; 20: 348 - 52.
9. Schwartz LB, Gewertz BL, Bissell MG. Chemical Assay of *p*-Aminohippuric Acid Simplified by Use of Dimethylaminocinnamaldehyde in Ethanol. *Clin Chem* 1988; 34: 16.
10. Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular. Selección y evaluación de sistemas analíticos. Martínez M., dir. Barcelona: SEQC; 1994
11. Eberts TJ, et al. A Simplified Colorimetric Micromethod for Xylose in Serum or Urine, with Phloroglucinol. *Clin Chem* 1979; 25: 1440-3.
12. Cortés M, Alsina J, Salas A. Selección y evaluación de métodos analíticos. En: F. González Sastre, dir. *Bioquímica Clínica*. 1ª Ed. Barcelona: Barcanova; 1994. p. 40