

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO.

FACULTAD DE QUIMICA.

METODO CUANTITATIVO PARA DETERMINACION DE ESTRIOL  
EN PLASMA HUMANO POR CROMATOGRAFIA DE GAS LIQUIDO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE QUIMICO FARMACEUTICO  
BIOLOGO. PRESENTAN:

PERLA ALTAMIRANO BUSTAMANTE.

PATRICIA FLORA ALVAREZ ROMERO.

MEXICO, D.F.

1973.

M. 171440



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

no Tesis  
AÑO 1973  
FECHA  
PROG M. t 12  
c



QUIMICA

A MIS PADRES:

Francisco Altamirano Amaya.

Ma. de Jesús Bustamante de Altamirano.

CON CARÍÑO, ADMIRACION y RESPETO.

A MIS HERMANOS:

Asdrubal Manuel,

Araceli,

Eréndira,

Nelly Francisca,

Myriam Marlenne.

A MIS MAESTROS.

SINCERAMENTE:

A LAS MADRES URSULINAS.

A MIS FAMILIARES Y AMIGOS.

A MIS PADRES Y HERMANA.

A MIS MAESTROS.

**AL Q.F.B.**

JESUS ALVAREZ DEL CASTILLO M.

A NUESTRA GRAN AMIGA:

MA. ESTHER ROSAS ZUMAYA.

AL SR. DR. RAUL VILLENA GARCIA. JEFE DEL DEPARTAMENTO  
DE HORMONAS DEL CENTRO DE INVESTIGACIONES MEDICAS Y PRUEBAS  
ESPECIALES DEL C.H. 20 DE NOVIEMBRE, A QUIEN AGRADECEMOS -  
SU VALIOSA COOPERACION EN LA REALIZACION DE ESTE TRABAJO.  
CON AFECTO A TERE COSTALES RUEDA, Q.F.B. EDITH SANTILLAN H.  
Y AL PERSONAL DEL DEPARTAMENTO DE HORMONAS.

## I.- SINTESIS Y METABOLISMO DE ESTROGENOS.

a).- Antecedentes Históricos. - La función endócrina del ovario consiste en la producción, por el folículo de Graff, de hormonas que mantienen los caracteres sexuales secundarios femeninos, como lo de muestra el hecho de que la castración produce involución de los mis mos en el animal adulto y que la administración de estas hormonas a los animales castrados mantienen el desarrollo de dichos caracteres, mientras que en los animales prepúberes provocan el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios precozmente.

El término estrógeno se emplea para designar a todas aquellas sustancias que producen modificaciones características en la vagina, en el útero y de otros caracteres sexuales que reciben el nombre de estado de estro o celo, y representa el estado de actividad sexual máxima, que es precedido y/o seguido por otros estados evolutivos - en los caracteres sexuales.

Hasta 1913 los únicos estrógenos que se mencionaban como presentes en la orina eran los tres compuestos clásicos (estrona, estradiol y estriol). Desde entonces se han encontrado y aislado en la orina de mujeres embarazadas cerca de 20 nuevas sustancias.

El estradiol fué aislado por Mac Corquodale et al., en 1935(24), del líquido folicular de ovarios de cerdos y posteriormente fué aislado por Huffman et al., de otras fuentes, incluyendo la orina de mujeres embarazadas(15), de tejidos placentarios(16), testículos de caballo en 1940(4) y orina de sementales(20).

La estrona (teelina), fué aislado por Doisy et al., (11) de muchas fuentes incluyendo la orina de mujeres embarazadas, tejidos placentarios(45) y bilis de vacas preñadas(33). Los resultados obtenidos al valorar la actividad biológica de la estrona y estradiol demuestran - que es mayor la de esta última.

El estriol (teelol) fué identificado por Marrian en 1930(28), en orina de mujeres embarazadas, y por Brown en 1931(7), en los tejidos placentarios.

b).- Química de los Estrógenos.- Desde el punto de vista químico todas las hormonas esteroideas derivan del núcleo ciclopentanoperhidrofenantreno (norestrano) que es un hidrocarburo policíclico saturado. Este núcleo está formado por los tres anillos hexagonales del fenantreno (A,B,C) unidos a un cuarto anillo pentagonal el ciclopentano (D).

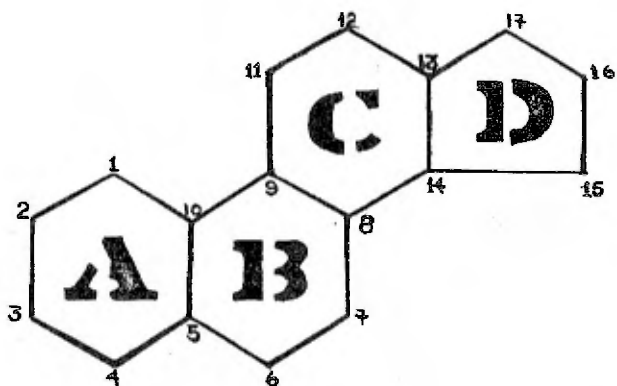
En la fig., No.1, puede verse el ciclopentanoperhidrofenantreno con su fórmula completa en la que se han numerado todos los átomos de carbono, llevando la numeración del 1 al 17 en la forma dispuesta convencionalmente para los esteroideas. Cada átomo de carbono está unido a dos átomos de hidrógeno exceptuando aquellos carbonos comunes a dos anillos que solo están unidos a un átomo de hidrógeno, en este último caso se encuentran los carbonos 5,8,9,10,13,y14. La unión de los dos átomos de hidrógeno a los átomos de carbono se hace por las valencias libres de estos o sea con las que no forman el anillo.

El átomo C-3 es uno de los más importantes porque todas las hormonas esteroideas presentan sustituyentes oxigenados en ésta posición ya sea un oxhidrilo como en la androsterona, o un grupo cetónico como en la testosterona. Además el grupo comprendido entre C-3 y C-5 - con dobles enlaces y sustituyentes es el que determina en gran parte la acción biológica específica de algunas hormonas en tal forma que los más pequeños cambios en lo que se refiere a dobles enlaces, adiciones o sustracciones de sustituyentes, modifican o anulan la acción biológica hormonal.

Los estrógenos naturales o foliculoides pertenecen al grupo de esteroideas con 18 átomos de carbono y derivan del estrano (fig.No.2), que es un hidrocarburo saturado que tiene un grupo metilo en C-13.

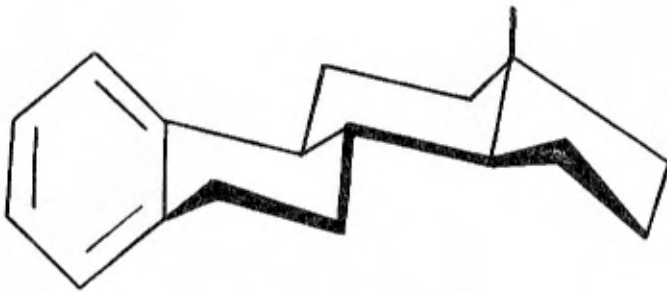
Los estrógenos naturales son: estradiol, estrona y estriol, (fig. No. 3). Una de las características de estas hormonas es que el anillo A del núcleo es de tipo bencénico y ha tomado el carácter aromático porque presenta tres dobles enlaces en C-1:2, C-3:4, y C-5:10, - precisamente para acomodar estos dobles enlaces se ha perdido el gru





C I C L O P E N T A N O P E R H I D R O P E N A N T R E N O .

Figura No. 1



**ESTRANO**

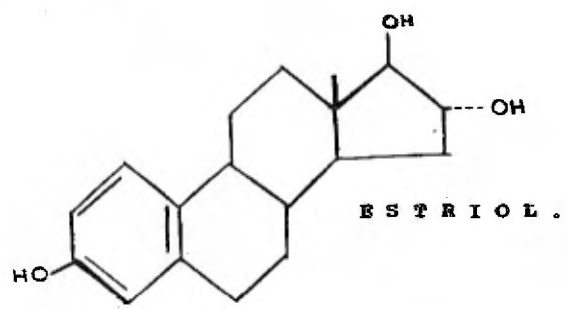
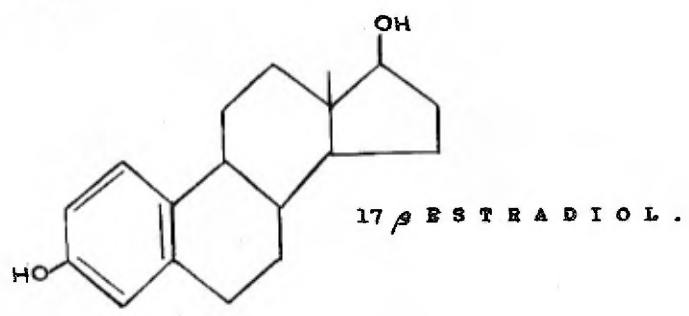
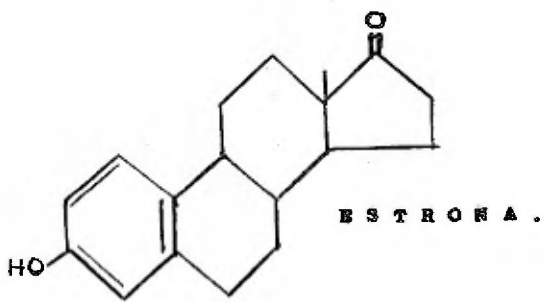


Figura No. 3.

po metilo en C-10. La estrona tiene un grupo hidroxilo en C-3 y un grupo cetónico en C-17; el estradiol posee dos grupos oxhidrilo en C-3 y C-17 en posición beta y el estriol que tiene dos grupos hidroxilo en C-3 y C-17 en posición beta y un tercero en C-16 en posición alfa.

c).- Biosíntesis y Metabolismo de los Estrógenos en el ovario y durante el embarazo normal.- Las investigaciones realizadas en años recientes muestran que los órganos endócrinos productores de esteroides forman estrógenos.

Bajo condiciones fisiológicas normales, el ovario puede ser considerado como la fuente principal en la formación de estrógenos. Durante el embarazo la placenta contribuye en su formación y a término del embarazo la producción de estrógenos es de 100 a 1000 veces mayor que la del ovario.

Los estrógenos se elaboran también en el testículo aunque en menor cantidad. Además, es bien conocido que la corteza adrenal toma parte en la formación de estrógenos, tanto en hombres como en mujeres; y se ha establecido que la corteza adrenal produce por sí misma los llamados estrógenos adrenales y otras formas precursoras que son convertidas a estrógenos en otros tejidos.

Biosíntesis.- El ovario secreta dos tipos de hormonas femeninas, las foliculares o estrógenos producidos por las células de la teca interna o por el estrato granuloso del folículo De Graff en desarrollo y las hormonas progestacionales que derivan de la actividad de las células del cuerpo lúteo, que se forman en el ovario después de la ruptura del folículo.

Como ya mencionamos anteriormente, la síntesis de los estrógenos humanos se efectúa en: ovario, adrenales, testículo y durante el embarazo en la unidad feto-placentaria que contribuye a la formación de estriol en cantidades significantes, bajo condiciones normales.

El estriol es el principal estrógeno que se encuentra en la sangre y orina de mujeres embarazadas. En ausencia de embarazo el

estrógeno que se produce en mayor cantidad es el 17-beta estradiol.

La biosíntesis de los estrógenos en el ovario se efectúa a partir del acetato activo (AcetilCo.A). La vía implica la síntesis inicial de colesterol, el cual después de una serie de desdoblamientos de la cadena lateral y oxidaciones es convertido finalmente mediante la acción de un sistema 20,22 desmolasa, en delta 5-pregnenolona, siendo esta el esteroide "pivote" del cual derivan todas las demás - hormonas esteroides. La delta 5-pregnenolona se convierte a progesterona por la acción de las enzimas 3 beta hidroxideshidrogenasa y la delta 5 isomerasa, estas enzimas transforman el grupo 3 beta -- hidroxilo de la delta 5-pregnenolona a un grupo ceto en el carbono 3 y transforman la doble ligadura entre los carbonos 5:6 a la posición C-4:5 de la progesterona. Esta, posteriormente, puede ser hidroxilada en C-17 en posición alfa formando la 17 alfa hidroxilada progesterona; y al mismo tiempo la 17 alfa hidroxilada pregnenolona, se transforma por medio de una deshidrogenasa a 17 alfa hidroxilada progesterona. Estos dos compuestos pueden hidrolizarse por medio de una desmolasa y dar origen a la dehidroepiandrosterona y la androstenediona, esta última por la acción de la 17-beta hidroxilasa se transforma a testosterona. A partir de la androstenediona y la testosterona se efectúa la síntesis estrógena.

La 19 hidroxilasa actúa para formar la 19 hidroxilada androstenediona y la 19 hidroxilada testosterona. Por medio de una enzima aromatizadora se produce el 17 beta estradiol y la estrona (reacción reversible), el estriol se origina del 17 beta estradiol por una hidroxilación en C-16 en posición alfa (fig.No.4).

La estrona, el estradiol y el estriol, al igual que otros metabolitos han sido aislados del tejido placentario. Según Brown(6), el incremento en la producción de estrógenos a través del embarazo es paralelo al aumento del peso de la placenta. Stark et al., (41) demostraron que el 80% de la actividad estrogénica está presente en los microsomas, mitocondrias y el sobrenadante de los extractos -



placentarios.

La concentración de estrógenos en sangre aumenta durante el embarazo (estradiol, estrona y estriol) que están presentes, principalmente como conjugados con ácido glucurónico o sulfatos. Roy y Brown (38) reportaron valores de estrógenos en sangre en gammas % durante el embarazo a término: estradiol 0.2 a 1.7; estrona 0.5 a 9.0 y estriol 2.3 a 19.6.

Durante la primera parte del embarazo la relación de estriol a estradiol y estrona es aproximadamente 2:1, mientras que al final es de 10:1. El cambio en la relación de excreción de los tres metabolitos no parece ser debido a una alteración en el metabolismo del estradiol, ya que Fishman et al., (12) muestran que esta hormona es metabolizada de manera similar en mujeres embarazadas y no embarazadas.

Por muchos años se reconoció que la muerte del feto tiene un efecto significativo sobre la excreción de estrógenos y la determinación de estriol se puede usar como un medio para investigar el sufrimiento o muerte fetal. Los estudios hechos por Cassmer (8), establecen definitivamente que la máxima secreción de estrógenos por la placenta depende del mantenimiento de una adecuada circulación fetal en la misma.

Hasta ahora, no ha sido posible obtener pruebas concluyentes de la conversión de acetato marcado; colesterol; delta 5-pregnenolona o progesterona a estrógenos en la placenta perfundida y se asume generalmente que el órgano usa ciertos precursores presentes en la circulación materna o fetal para la síntesis de estrógenos.

Ryan (40) demostró la eficiencia de los microsomas de la placenta humana para aromatizar esteroides de C-19, esteroides neutros o esteroides fenólicos tales como estrona, estradiol y estriol. La testosterona se convierte en esta preparación placentaria a estradiol y la delta 4 androsten 3,17 diona a estrona en mayor rendimiento. La conversión de la dehidroepiandrosterona a estrona también se demostró. Mientras el estradiol y la estrona son metabolizados en el hígado -

materno a estriol, no hay evidencias de que esta reacción se realice en preparaciones placentarias, a pesar del hecho de que la placenta contiene grandes cantidades de estriol. Ryan(40) demostró que los esteroides 16-hidroxilados, tales como la 16 alfa hidroxitestosterona y la 16 hidroxí androstenediona, son rápidamente convertidos a estriol por una preparación placentaria, por lo que sugirió que los esteroides 16 alfa hidroxilados tienen importancia fisiológica en la formación de estriol.

El feto, por otro lado, ha demostrado tener capacidad para hidroxilar esteroides en C-16. La adrenal fetal es capaz de convertir progesterona a 16 alfa hidroxí progesterona y el hígado fetal es capaz de metabolizar estradiol y estrona a estriol tanto "in vivo" como "in vitro"(9).

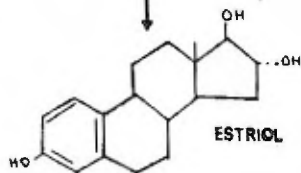
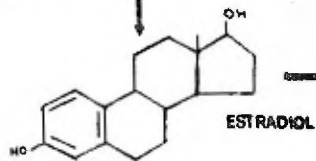
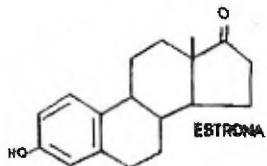
Mancuso et al., (25) muestran que el feto, tiene capacidad para aromatizar la androstenediona y la testosterona pero es incapaz de aromatizar la dehidroepiandrosterona. El tejido fetal muestra una gran actividad de la sulfoquinasa, gran parte de esteroides C-19 y C-18, están presentes en el feto como sulfatos. Por otro lado, la placenta contiene sulfatasas que hidrolizan rápidamente los sulfatos provenientes de la circulación fetal y utilizan los esteroides libres para su biosíntesis. El proceso enzimático de aromatización es relativamente desconocido. Meyer(29) reporta que la 19 hidroxí androstenediona es un precursor más eficiente de estrona que la androstenediona. Esto fué confirmado por otros investigadores. Longchamp et al., (21) sugieren que la 19 hidroxí androstenediona puede ser un compuesto intermediario en la aromatización de la androstenediona. Estos esteroides fueron aislados e identificados por medio de incubación de los microsomas placentarios.

Estudios hechos por Hollander(14) indican que la 19 hidroxilación no es un camino metabólico obligatorio para la aromatización de androstenediona a estrona. Este concepto de síntesis de estrógenos y su metabolismo se muestra en la fig.No.5. Estos estudios enfatizaron





SUPRARRENALES



OVARIO

RIÑÓN

ELIMINACION EN ORINA

CIRCULACION

TEJIDOS DEL ORGANISMO

LIBRES

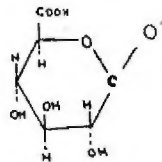
UNION A PRO-  
TEINAS SERICAS

HIGADO

CIRCULACION

REABSORCION

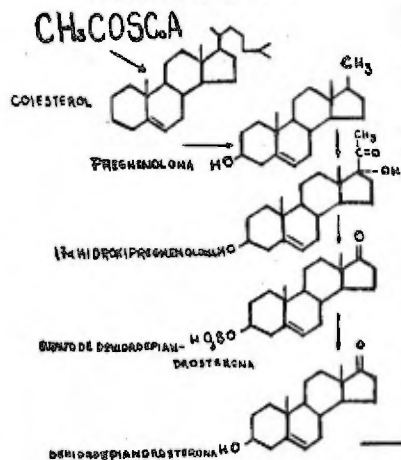
INTESTINO



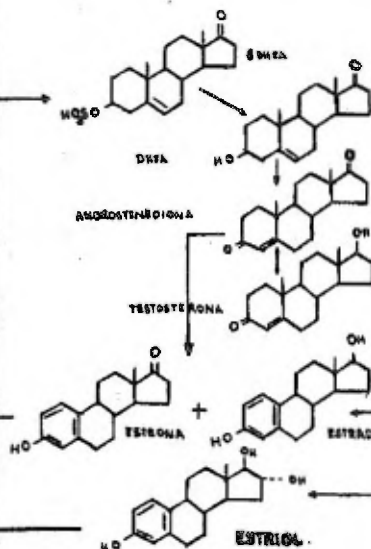
$\beta$ -GLUCURUNIDATO DE ESTRIDIOL



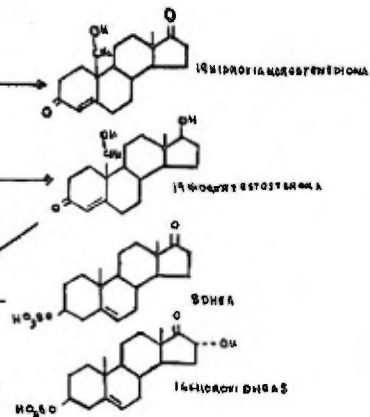
# MADRE



# PLACENTA



# FETO



HIGADO  
↓  
ORINA

CONJUGADOS DE ESTRIONA,  
ESTRONA y ESTRADIOL.

la importancia de considerar a la placenta y al feto como una unidad para biosíntesis y metabolismo de estrógenos.

El feto elabora numerosas formas de esteroides 3 beta hidroxí delta 5, que son en su mayor parte sulfatados en el organismo. La dehidroepiandrosterona y su sulfato tienen un papel importante en la biosíntesis de estrógenos. La capacidad del feto de hidroxilar esteroides en C-19 y C-16, que son aromatizados a estriol en la placenta, sugiere una fuente adicional para la gran cantidad de estriol excretado en la orina materna.

Metabolismo.— Los glucocorticoides se unen específicamente a una alfa 2 globulina (globulina transportadora de esteroide, GTE o transcortina). La hormona unida a esa globulina es esencialmente inactiva pero es razonable el postulado de que pueden ser una forma de "reserva" y están en equilibrio con los esteroides libres.

Una combinación reversible acaece entre la seralbúmina y muchos esteroides. Esto explica su baja concentración en la orina y al mismo tiempo el hecho de que prolonguen sus vidas medias. Esto es significativo, ya que la concentración de estas uniones proteicas se incrementa durante el embarazo.

Como ya mencionamos anteriormente los esteroides se conjugan con sulfato o glucuronidato, lo cual es un factor que puede explicar la rápida excreción de dichos compuestos en la orina.

Los esteroides siguen tres diferentes caminos en el hígado. — Ciertas partes de los núcleos esteroides pueden modificarse enzimáticamente. Los grupos carbonilos 3 y 20 pueden ser reducidos a hidroxilos y dobles enlaces en el anillo A el cual se satura.

La progesterona es inactivada por el hígado para formar pregnan diol. Los grupos hidroxilos de C-17 son oxidados a cetonas o 17 ceto esteroides. Finalmente se efectúa la 2-metoxilación de los estrógenos para formar un estrógeno que puede ser más potente que la sustancia original. Por otro mecanismo, los esteroides que tienen grupos hidroxilos pueden ser conjugados en el C-3 del anillo A; aunque

también se presenta alguna conjugación en C-17 o C-16, funcionando así, el hígado, como un órgano de excrección activa.

La circulación enterohepática de los esteroides es similar a la de la bilirrubina. Los esteroides son secretados en la bilis, ciertos conjugados son reabsorbidos por el intestino y vuelven al hígado repitiéndose el ciclo. El riñón excreta los conjugados solubles en agua, aunque también puede excretarse pequeñas cantidades de esteroides libres e no conjugados. Parte del estriol no se une a las proteínas y siempre se encuentra en equilibrio con el unido a proteínas, siendo el estriol libre el biológicamente activo(32) y es esterificado por el hígado materno con sulfatos y/o glucuronidatos, según las reacciones que se representan en la fig. No.6(44), haciéndolo inactivo y fácilmente excretable por la bilis y/o el riñón.

#### MÉTODOS EMPLEADOS EN LA DETERMINACION DE ESTRIOLO DURANTE EL EMBARAZO.

Los métodos pueden dividirse en cinco grupos:

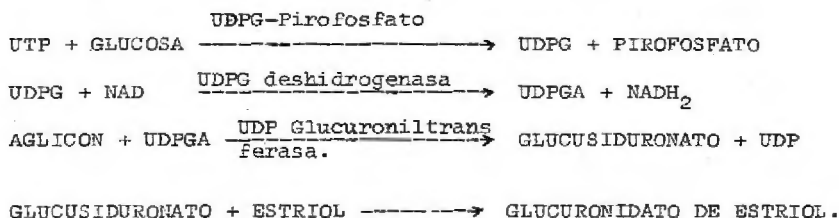
- a) Métodos que implican la reacción de Kober.
- b) Métodos por cromatografía de gases.
- c) Métodos isotópicos.
- d) Radio Inmunoensayo.

e) Se conocen otros métodos que son accesibles como son los métodos de Preedy y Aitken(34), que están basados en fluorometría, lo mismo que los de Schrepfer y Nicholas(42), siendo estas técnicas muy laboriosas y poco practicables.

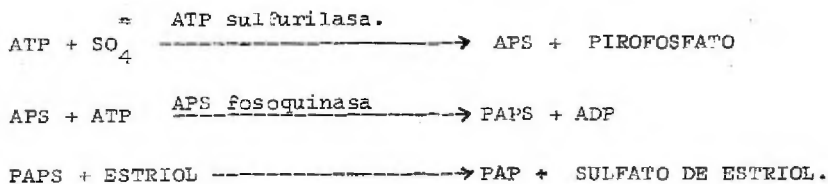
#### Métodos en los que se emplea la reacción de Kober.

El método de Roy y Brown(38): en este método la determinación de estrógenos se hace en sangre total, es considerado por sus autores como razonablemente satisfactorio en término de su especificidad, respecto a la sensibilidad el mínimo de confianza es de -- 0.15 gammas para estandiol, 0.3 de estrona y 0.3 gammas de estriol en 100 ml, de sangre. Este procedimiento fué modificado por Roy -

REACCIONES DE CONJUGACION DE ESTRIOLO CON GLUCURONIDATOS  
Y/O SULFATOS.



La formación de glucuronidatos es por lo tanto una reacción de transferencia en la cual el UDPGA no es un cofactor, pero, es un donador glucuronil. La glucuronil transferasa se ha encontrado en los microsomas del hígado. El estriol puede unirse al glucuronidato en los carbonos 16 ó 17.



APS = ADENOSIN 5 FOSFOSULFATO  
 PAPS = ADENOSIN 3' FOSFATO 5' FOSFOSULFATO  
 PAP = ADENOSIN 3', 5' DIFOSFATO.

El sulfato se une con los grupos fenólicos del Estriol.

en 1962(37), quien incorporó la reacción fluorescente de Ittrich 1958(17), en la técnica original y hace la determinación final por fluorometría, siendo de exactitud comparable a la del método original mientras que la sensibilidad aumenta aproximadamente 10 veces más, lo cual hace posible aplicar la técnica a muestras de -- sangre de mujeres no embarazadas.

Método de Nachtigall et al., (31).- Este método determina solamente estríol y se recomienda usarlo para investigaciones en la segunda mitad del embarazo. Esta técnica incluye: a) hidrólisis ácida, b) extracción éterea, c) purificación con hexano, benceno y éter d) reacción de Kober, e) extracción del complejo colorido de Kober con p-nitrofenol y f) determinación por fluorometría.

#### Métodos por cromatografía de gases.

Estos procedimientos pueden usarse en mujeres embarazadas, como el método de Touchstone et al., (43), Ratanasopa et al., (48) y en no embarazadas como los de Attal et al., (3), Wotiz et al., (46), -- Attal y Eik-Nes(2).

Attal et al., determinan soloamente estrona, Attal y Eik-Nes miden estradiol, Wotiz et al., estiman estrona, estradiol y estríol. En la técnica de Wotiz se adicionan estrógenos marcados al plasma previa precipitación de proteínas. Se efectúa una hidrólisis enzimática, extrayéndose los estrógenos con acetato de etilo; partición benceno-éter de petróleo, cromatografía con alúmina y finalmente determinación por cromatografía de gases. La recuperación es aproximadamente de 100%.

Touchstone, mide esteroides libres y esterificados aisladamente, la exactitud y precisión son satisfactorias, pero es un método muy laborioso.

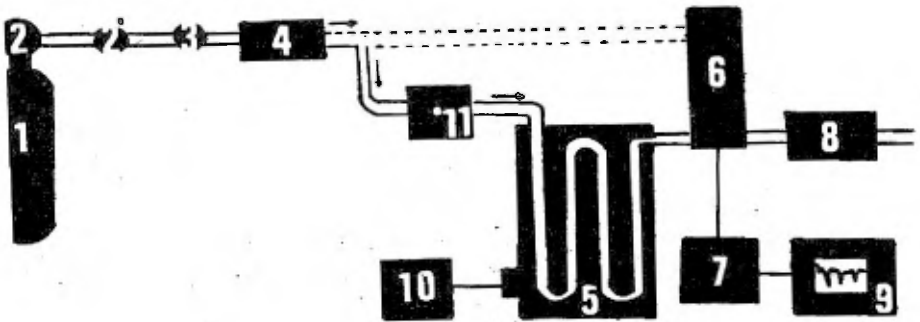
Ratanasopa mide estríol solamente en plasma de mujeres embarazadas. Se usa un patrón interno, hidrólisis ácida, extracción fenólica, cromatografía en placa fina y cromatografía de gases de derivados trimetilsililados.

Métodos isotópicos.- Como el de Svendsen(38), que mide estrona y estradiol, pero no estriol.

Radio Inmunoensayo.- La integración de técnicas radioquímicas con técnicas inmunológicas ofrece un alto grado de sensibilidad y da una buena especificidad, lo cual permitió a Yalow y Berson(47) desarrollar el primer procedimiento de Radio Inmunoensayo para insulina en plasma humano. Por medio de este método se pueden medir sustancias fisiológicas en el rango de nanogramos a picogramos/ml. esto es muy importante cuando se determinan niveles de sustancias tales como los péptidos y hormonas esteroides.

El fundamento de esta metodología es la reacción entre un antígeno y un anti-cuerpo, reaccionando este con el antígeno para el cual es específico y, generalmente, no existe una reacción cruzada con antígenos similares, si los anticuerpos son específicamente, preparados para estriol, no darán reacción cruzada con otros estrógenos, tal como estradiol y estrona. El antisuero que contiene el anticuerpo se mezcla con una cantidad conocida de estriol radiactivo y la muestra que contiene el estriol por medir. El anticuerpo reacciona con ambos, (estriol radiactivo y el no marcado), formando un complejo antígeno-anticuerpo. La mezcla se incuba por un tiempo apropiado y así el complejo se formará como una mezcla de equilibrio.

# CROMATOGRAFO DE GASES.



- |                           |                                  |
|---------------------------|----------------------------------|
| 1.- CILINDRO DE GAS       | 6.- DETECTOR                     |
| 2, 2'.- REGULADORES       | 7.- AMPLIFICADOR                 |
| 3.- TUBOS DE SECADO       | 8.- COLECTOR DE MUESTRAS         |
| 4.- MEDIDOR DE FLUJO      | 9.- REGISTRADOR CON CROMATOGRAMA |
| 5.- COLUMNA EMPACADA      | 10.- TERMOSTATO.                 |
| 11.- PUERTO DE INYECCION. |                                  |



## II.- CROMATOGRAFIA DE GAS-LIQUIDO. ASPECTOS GENERALES.

Definición.- La cromatografía de gas-líquido es una técnica para separar mezclas de sustancias volátiles a la temperatura empleada que interaccionan con una fase líquida y son eluidas por una fase gaseosa, por lo que la separación dependerá del punto de ebullición - del compuesto por analizar, de la fuerza y tiempo de interacción con la fase líquida y de la velocidad del gas portador(5). La cromatografía de gases se ha desarrollado rápidamente desde que Martin y James(27) describieron sus primeros experimentos en 1952. El primer experimento realizado por estos autores fué la separación de mezclas de ácidos grasos en una columna conteniendo aceite de silicón sobre tierra diatomácea. Posteriormente en 1954 Ray(36) introduce el cata rómetro como detector, haciendo así de la cromatografía de gas una técnica general. Por primera vez en 1959 Eglemton et al., obtienen cromatogramas de separación de esteroides.

Cromatógrafo de gases.- Esta integrado fundamentalmente por:

a).- Fuente de gas: Se encuentra disponible en estado puro en cilindros de acero a baja presión. La elección del gas transportador depende de la naturaleza de la muestra y del tipo de detector empleado. Los más usados son hidrógeno, helio, argón y nitrógeno.

b).- Reguladores de flujo: Utilizados para controlar el flujo - del gas portador que en cualquier cromatógrafo depende considerablemente del detector empleado.

El gas de un cilindro se mide con una válvula reductora de dos - pasos equipada (con un tubo capilar fino o una simple válvula de aguja. La velocidad de flujo del gas portador se controla por medio de medidores de flotador de flujo capilar o de flujo de burbuja de jabón, con este último se obtiene una exactitud de 0.1% que es mayor que con los anteriores.

c).- Puerto de inyección con horno: Es el lugar por donde se introduce la muestra para que sea arrastrada por el gas portador. Generalmente el puerto de inyección es una T, que por un lado permite la

entrada del gas de transporte, por otro se inyecta y el último es la columna en sí. Consta, también, de un horno cuya temperatura se controla con un termostato, al mismo tiempo esta conectado a un pirómetro que se encuentra en el interior. La temperatura en este sitio debe ser mayor que el punto de ebullición de los compuestos por determinar, para que sean rápidamente vaporizados y puedan entrar en la columna. La aplicación de la muestra se hace por medio de una microjeringa calibrada en microlitros.

d).- Columna: Existen diversos tipos, las hay de vidrio, plástico y metales como: cobre, cupro-níquel y acero inoxidable. Para la separación de esteroides la columna más conveniente es la de vidrio ya que las de acero inoxidable o las de cobre pueden dañar o fijar las moléculas durante el proceso y las columnas de plástico tienden a disolverse en solventes orgánicos.

Las columnas utilizadas en cromatografía pueden ser:

De adsorción en las que los agentes adsorbentes más usados son alúmina, carbón activado, sílica-gel y mallas moleculares; estas columnas trabajan eficientemente a temperatura ambiente.

De partición empacadas con un soporte inerte granulado recubierta por una fase líquida no volátil. Los soportes más utilizados son: celita, diatomáceas, ladrillo refractario molido y con menos frecuencia cuentas de vidrio; deben tener determinadas características como son: gran área de superficie entre 1 y 20  $M^2/g$ , estructura porosa, diámetro uniforme y de consistencia firme.

Las sustancias que más similitud presentan respecto a estos requisitos son las tierras de diatomeas, las más recomendadas son Chromosorb G, Chromosorb W, Chromosorb P, etc. (Tabla 1).

Existen muchas otras como las de teflón, vidrio, metal, hidrocarburos, arena, vidrio molido, etc.

Estos soportes no son totalmente inertes, por lo que se tratan con sustancias que se combinan con sus grupos funcionales, principalmente los grupos hidroxilo, esto se lleva a cabo con dimetilcilo-

Clase	Naturaleza	Area M/gr.	pH
Cromosorb G	Flujo calcinado de diatomitas.	0.5	8.5
Cromosorb W	Flujo de Carbonato de Sodio calcinado de las diatomitas a 900C.	1.0	8.5
Cromosorb P	Calcificación de diatomeas y un enlace a 900 C.	4.0	6.5

TABLA I.

rosilano y hexametildisilano(23). Si es necesario pueden hacerse alcalinas o ácidas dependiendo de la fase líquida que las cubrirá y de los compuestos a determinar. El tamaño de la partícula varía entre 60 y 80 mallas, para columnas de diámetro interno de 4 mm y entre 100 y 200 mallas para diámetros mayores.

Fases líquidas empleadas en el análisis de esteroides.- Para seleccionar una fase líquida se debe tener en cuenta: la temperatura a la que opera la columna, que no difiere mucho del punto de ebullición de los componentes más volátiles de la mezcla que va a analizarse; la fase líquida no debe ser sumamente viscosa a la temperatura de operación, ni debe tener una presión de vapor considerable. Con el fin de evitar la pérdida por volatilización del líquido de la columna la presión de vapor no debe exceder de cerca de 0.01 a 0.1 mm de Hg, finalmente debe ser químicamente inerte a los componentes por determinar.

Las fases recomendables para esteroides son: STPA, XE-60, QF-1, SE-30, NPGS (Tabla 2).

Estos compuestos son sólidos a temperatura ambiente y solubles en solventes adecuados de tal manera que al ponerse en contacto con el soporte y evaporarse, lo cubren totalmente volviendo a ser líquido a la temperatura de trabajo.

La columna se encuentra dentro de un horno con termostato y pirómetro que controla una temperatura fija o programada, la elección de la misma dependerá del punto de ebullición de los compuestos por determinar.

e).- Detector: Los detectores tienen la propiedad de enviar señales eléctricas cuando el gas de acarreo transporta una sustancia o deja de emitirlos en caso contrario, algunas veces son insensibles a una u otra sustancia como por ejemplo el aire y el agua como es el caso del detector de captura de electrones. La temperatura del detector debe ser mayor que la de la columna para evitar la condensación de los compuestos y permitir que sean desalojados del aparato.

FASE LIQUIDA	TEMPERATURA MAXIMA RECOMENDADA °C	POLARIDAD	SOLVENTE
STPA (fase para análisis de esteroides).	255	Polar	Acetona
XE-60 (goma de silicona nitrilo).	275	Intermedia.	Clorofor <u>o</u> mo, cloru <u>r</u> ro de me <u>t</u> ileno.
QF-1 (fluoruro de silicona).	250	Intermedia	Clorofor <u>o</u> mo, cloru <u>r</u> ro de me <u>t</u> ileno.
SE-30 (silicona - desgranada).	300	No polar	Clorofor <u>o</u> mo calien <u>te</u> , cloru <u>r</u> ro de me <u>t</u> ileno ca <u>l</u> iente.
NPGS (neopentil glicolsuccinato).	240	Intermedia.	Clorofor <u>o</u> mo y clo <u>r</u> uro de metileno.

TABLA II.

Son de gran importancia en la separación cromatográfica; uno de los detectores más simples es el nitrómetro de Janak(18), que es un detector de tipo integral. Estos detectores fueron seguidos de la aplicación del catarómetro de Phillips y Ray(detector de conductividad térmica)(35), y más recientemente por los detectores de argón y de ionización de flama de Lovelock y Mc. William(22).

f).- Amplificador o electrómetro; En los detectores se producen pequeñas señales eléctricas dadas por los electrones cuando la sustancia por analizar llega a ellos; estas señales son débiles y pasan a un electrómetro o amplificador antes de ser registradas.

g).- Registrador: Consta de dos partes básicas: una tira de papel que se mueve a una velocidad la cual se regula con un selector y una plumilla móvil con señal de entrada de 1 MV la cual se activa por el impulso eléctrico del amplificador. Así el cromatograma se obtiene como una serie de picos sobre el papel.

#### Características de eficiencia de las columnas.

El diseño y las condiciones de operación de la columna están directamente relacionadas con el ancho del pico del cromatograma. En 1956 Keulemans(19) describió el alto equivalente a un plato teórico (AEPT) aplicando la ecuación de Van Deemeter a la cromatografía de gas. Esta ecuación se refiere al largo de la columna necesaria para obtener un equilibrio en la distribución del compuesto a determinar entre la fase móvil(gas) y la fase estacionaria(líquido). De la eficiencia de la columna y fase líquida depende la eficiencia de la cromatografía. Las curvas de elución de la columna que van a dar como resultado el ancho del pico del cromatograma está en relación con: la difusión del gas en remolino o reflujo, difusión molecular, resistencia a la transferencia de masa(gas o líquido).

Así la eficiencia de la columna se mide por medio del cálculo del número de platos teóricos utilizando la siguiente ecuación:

$$N = 16(x/y)^2$$

donde: N = Número de platos teóricos.

x = distancia desde el punto de inyección hasta el vértice del pico.

y = ancho del pico a la altura de la línea base.

La eficiencia de la columna depende a su vez de parámetros como:

- a) El diámetro interno de la columna, debiendo tenerse en cuenta la relación que existe entre este y el diámetro del tubo.
- b) La longitud de la columna que dependerá del número de platos requeridos.
- c) El gas portador cuya densidad afecta en forma inversamente proporcional la difusibilidad de los solutos.
- d) La temperatura, ya que las constantes de equilibrio aumentan con una disminución de la misma.
- e) El tiempo de retención es mayor a temperaturas bajas.
- f) La velocidad del gas está en relación indirecta con el tiempo de análisis.
- g) El tamaño y forma de la partícula.
- h) La cantidad de la muestra inyectada que puede separarse efectivamente por la columna, varía con el tipo y diámetro de la misma.

#### Detector de Ionización de Flama de Hidrógeno:

El detector empleado en nuestro estudio es el de ionización de flama de hidrógeno que en 1958 Mc.William y Dewar(30), Harley, Nel y Pretorius(30) diseñaron basándose en la ionización de los compuestos orgánicos por medio de una flama de hidrógeno/oxígeno en combustión.

Este detector opera de la siguiente manera: cuando el gas portador y la muestra emergen de la columna, hidrógeno y aire(10, partes de aire por una parte de gas portador; partes iguales de hidrógeno y gas portador) se adicionan al gas transportador para producir una flama, que produce iones negativos y positivos (cuya concentración ha sido establecida entre  $10^{10}$  y  $10^{12}$  iones/ml), bióxido de carbono, agua y electrones. La suma de electrones más la suma de iones nega-

tivos produce un cambio de potencial, el cual es registrado.

El detector es sensible a todos los compuestos orgánicos excepto al ácido fórmico e insensible a todos los compuestos inorgánicos. No es afectado adversamente por el agua ni por halógenos, teniendo por ello ventaja sobre los detectores de argón en el análisis de soluciones acuosas.

#### ANÁLISIS CUALITATIVO Y CUANTITATIVO POR CROMATOGRAFIA DE GAS.

Análisis cualitativo.~ Los parámetros que se emplean más frecuentemente para identificar cualitativamente una sustancia son: Los tiempos de retención, relativo de retención y de retención corregido.

El tiempo de retención es el tiempo que transcurre desde el momento de la inyección hasta el vértice del pico a determinar y depende de: las condiciones de la columna, tipo de soporte, tamaño de las partículas, temperatura de la columna, velocidad de flujo de gas tipo de gas portador, caída de la presión del gas. Bajo determinadas condiciones y con una columna cromatográfica adecuada, cada componente de una mezcla tiene un tiempo de retención característico.

Tiempo de retención corregido: Es el tiempo que transcurre desde el inicio del registro del solvente en que se suspendió la muestra hasta el vértice del pico a determinar, esta corrección se efectúa para eliminar el volumen inerte del instrumento.

Tiempo relativo de retención: Nos da la relación que existe entre el tiempo de retención del compuesto por determinar y el tiempo de retención de una sustancia que se toma como norma. Tiene la ventaja de que independientemente de alguna variación en las condiciones de la columna siempre es el mismo, y solo depende de la fase líquida y de la longitud de la columna.

Cuando se analizan series homólogas, el tiempo de retención será directamente proporcional a alguna de las características de esta serie, por ejemplo, número de átomos de carbono, grupos sustituyentes, etc.



Análisis cuantitativo.- La precisión cuantitativa con que pueden analizarse las muestras es uno de los factores que han contribuido al rápido desarrollo de la cromatografía.

Existen numerosos métodos para relacionar un pico obtenido en el cromatograma con la concentración de la muestra, los más utilizados son: medición del área de los picos, triangulación, planimetría, cortando y pesando el papel correspondiente al pico, integradores - automáticos, integradores digitales electrónicos, etc.

Altura del picos.- Es un método más rápido que el de medida de las áreas. El ancho y altura de los picos depende frecuentemente de la cantidad de la muestra y del volumen que se inyecta de la misma. Este método se usa generalmente si las muestras son menores de 10 - microgramos para columnas capilares. La altura del pico se mide usualmente en mm, siendo esta la distancia de la línea base al máximo del pico.

Planimetría.- El pico se traza manualmente con un planímetro que es un instrumento mecánico que traza el perímetro del pico, permitiendo posteriormente calcular el área. Es una técnica poco precisa en comparación con otros métodos.

Triangulación.- Cuando el pico es simétrico se multiplica su altura por su base a la mitad de la altura, cuando no son simétricos se mide la base a la altura de un 15% y lo ancho del pico al 85% de la altura, sumando estas dos medidas se multiplica por la altura del pico. Es una técnica rápida y simple.

Integrador automático.- Está formado por un disco integrador y una plumilla unida a éste. La plumilla integradora traza líneas que representan el área del pico. Este método es preciso y rápido.

Integrador digital electrónico.- Mide la magnitud de la señal cromatográfica a una velocidad proporcional al área del pico. Es un aparato sensible y preciso.

Al compararse las precisiones en la medida del área con estos instrumentos se vió que el de mayor precisión es el digital, después el integrador de disco, la triangulación y por último el método de

pesado. Todos estos métodos están afectados por algunas causas de error como son: inyección de la muestra, adsorción o descomposición de la misma en el cromatógrafo, funcionamiento del detector, capacidad del registrador, técnicas de integración y cálculos.

#### CALIBRACION DEL APARATO.

Calibración absoluta.- Es aquella en la cual se traza una gráfica con las áreas de los picos que se obtienen al inyectar cantidades conocidas de una sustancia pura; esta gráfica debe ser lineal y pasar por el origen. Se inyecta una cantidad desconocida de la misma sustancia, el área del pico se mide y por medio de la curva de calibración podemos conocer la cantidad de muestra presente. Tiene la desventaja de que las condiciones del aparato no son reproducibles día a día con exactitud.

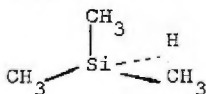
Calibración interna.- Este método es conocido también como calibración indirecta o relativa, para ello, se cromatografían pesos conocidos de un patrón de la sustancia problema y de la sustancia que se utilizará como patrón interno, medimos el área de los picos y graficamos la relación de áreas contra la concentración del patrón de la sustancia problema. Las características que debe reunir un compuesto para emplearse como patrón interno son: que tenga buena resolución con respecto a otros picos, que se eluya cerca de los picos que nos interesan, que tenga estructura parecida a la sustancia problema y que se emplee, además, en una concentración aproximada a la sustancia desconocida.

FORMACION DE DERIVADOS.- Los compuestos libres, al ser analizados por cromatografía de gas, sufren adsorción y ruptura, produciendo en el cromatograma un pico que se inscribe rápidamente y una fase de desenso muy prolongada, también existe una falta de linealidad al graficar cantidades crecientes de una sustancia, esto es, debido a la adsorción del compuesto, a la fase líquida o a la columna que no es uniforme .

Para analizar esteroides por medio de cromatografía de gas-líquido es necesario formar derivados de estos, ya que los derivados

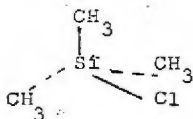
Formados son más volátiles; además la adsorción a la columna cromatográfica, se mejora la separación y los análisis cuantitativos alcanzan mayor linealidad(13).

Los derivados más usados en el análisis de esteroides son los trimetilsililados. La sililación es la introducción de un grupo silil que sustituye a un hidrógeno activo en una molécula. Excepcionalmente se sustituye por el componente metálico de una sal; los agentes sililantes son derivados del trimetilsilano.

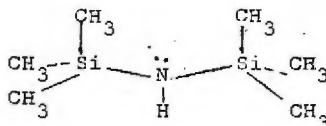


Trimetilsilano.

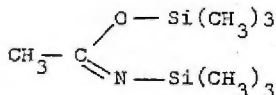
Los más comúnmente empleados son el trimetilclorosilano, hexametildisilizano y la N,O,bis(trimetilsilil)acetamida.



Trimetilclorosilano  
( TMCS ).



Hexametildisilizano  
( HMDS ).



N,O,bis(trimetilsilil)  
acetamida(BSA).

En muchos casos donde el derivado es altamente alcalino, pueden prepararse los trimetilsililados correspondientes. La sustitución del hidrógeno activo por el grupo silil reduce la polaridad de los compuestos y disminuye la posibilidad de que se formen puentes de hidrógeno, consecuentemente donde existe un fuerte puente de hidrógeno en el compuesto principal, el derivado sililado será más volátil.

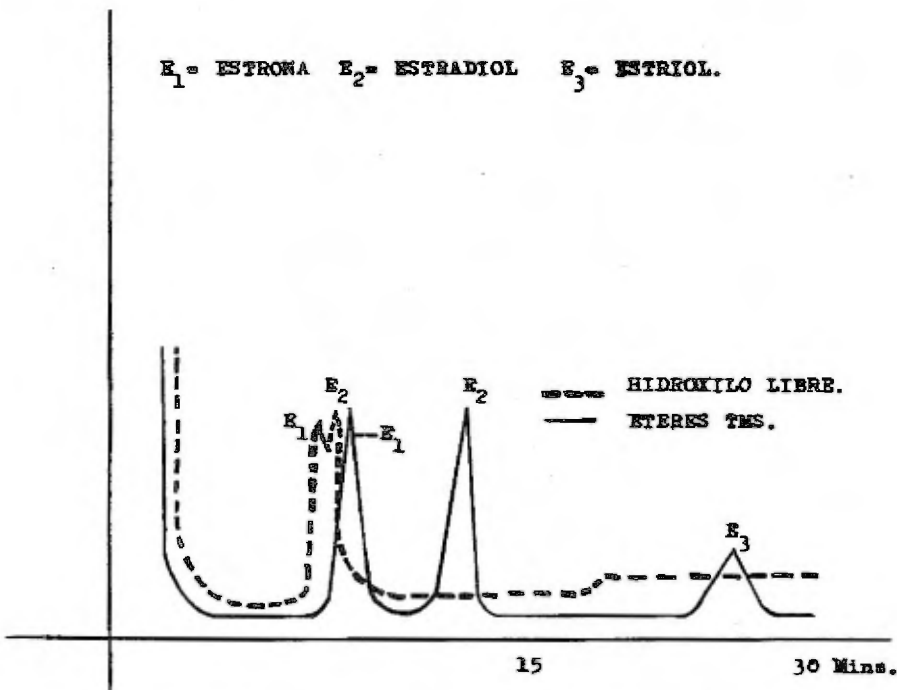
til. Las ventajas de volatilidad y estabilidad que se imparten a los compuestos hacen que el proceso, de sililación sea un buen método para la purificación de la fase gaseosa y su análisis.

El compuesto sililado puede ser rápidamente hidrolizado para recuperar la sustancia original. Una de las desventajas de la sililación es la necesidad de trabajar en condiciones anhidras y la alta sensibilidad de algunos de los productos para hidratarse, muchos compuestos con grupos hidroxilo o amino ordinariamente se consideran no volátiles o inestables de 200 a 300°C, pero pueden ser sucesivamente cromatografiados después de la sililación. Su utilización incrementa frecuentemente la exactitud del análisis por cromatografía de gas, mejorando la resolución y la simetría del pico o disminuyendo la adsorción del compuesto en la columna.

En 1960 Vanden Heuvel, Sweeley y E.C. Horning (23), separaron esteroides por cromatografía de gas usando éteres de esteroides trimetil sililados. La aplicación para análisis de los estrógenos y sus metabolitos está dada por Lukkainen et al., (23), seguidos por Aldercreutz y Lukkainen (1).

Se ha recomendado el uso de trimetilsilil derivados para determinación de estriol ya que el fuerte coileo cuando éste se encuentra en estado libre, está casi ausente en el derivado TMS, los tiempos de retención en fases selectivas son cortos y se mejora la resolución. (Fig.No.7).

$E_1$  = ESTRONA     $E_2$  = ESTRADIOL     $E_3$  = ESTRIOL.



Condiciones de la columna: 1% JXR sobre malla Gas Chromb. P.100; 6 pies x 4 mm., de columna de vidrio; - 210°C; 16 psi.

Figura No.7.

### III.- MATERIAL Y METODOS.

#### a.- REACTIVOS.

Alcohol etílico absoluto 99.5°(Merck),Acido sulfúrico Q.P. - (Merck),Bicarbonato de Sodio,Q.P.(Baker),Carbonato de Sodio anhidro Q.P.(Baker),Cristales de Colesterol(Harleco), Cristales de Estríol, (Searle),Eter etílico redestilado(Baker),Hidróxido de Sodio Q.P. — (Monterrey),Sulfato de Sodio anhidro,Q.P.(Baker),BSA(N,O,bis(trimetil silil)acetamida)(PIERCE Chemical).

#### b.- SOLUCIONES.

Amortiguador de Carbonatos de pH 10.4 - Se preparan 1000 ml de solución de bicarbonato de sodio al 8%, a la cual se le agragan 150 - ml de hidróxido de sodio al 8%,finalmente se ajusta el pH a 10.4

Solución Patrón de Estríol.- Se pesan 200 mg de cristales de es triol(previamente colocados en un desecador), se disuelven con alcohol etílico en un matraz aforado de 100 ml aforando posteriormente a la marca. Esta solución contiene 200 000 gammas/100 mililitros.

Solución de Trabajo.- De la solución anterior se toma 1 ml colocandose en un matraz volumétrico y aforando con alcohol etílico redestilado a 100 ml esta solución tiene una concentración de 20 gammas/ml.

Solución Patrón de Colesterol.- Se pesan 20 mg de cristales de - colesterol deshidratado previamente en un desecador,se ponen en un matraz volumétrico de 100 ml agregando alcohol etílico redestilado para disolver los cristales y se afora finalmente a la marca.Esta solución contiene 200 gammas/ml.

Solución de Trabajo.- De la solución patrón de colesterol se toma 1 ml colocandolo en un matraz volumétrico de 100 ml aforando con alcohol etílico redestilado a la marca. Esta solución tiene 2 gammas/ml.

#### c.- PURIFICACION DE SOLVENTES.

El éter etílico se lavó con una solución de sulfato ferroso acidificado(15% en agua).Se usaron 100 ml por cada 1000 ml de éter,posteriormente se lavó con 100 ml de agua y se redestiló descartando los primeros y últimos 100 ml.

#### d.- EQUIPO.

Aparato de destilación.- Consta de un matraz de bola de fondo plano, con boca esmerilada 24/40, columna de Vigreux con salida y entrada esmerilada 24/40, punta con entrada para termómetro con dos salidas esmeriladas 24/40, matraces Erlenmeyer de 50 ml, tubos cónicos de centrifuga de 15 y 50 ml de boca esmerilada y tapón, pipetas serológicas de 1.0, 5.0, 10.0 y 25.0 ml, jeringa de vidrio de 5 ml, cánula de Wintrobe, Vortex, Super Mixer, Cat.No. 19973 W Curtin Scientific Co. Houston Texas, U.S.A., jeringas Hamilton No. 701 N graduadas en décimas y capacidad total de 10 microlitros, autoclave.

La vidriería se lavó con detergente, mezcla crómica y agua destilada secandola en horno a 120°C.

Cromatógrafo de gases.- Se empleó un modelo Varian-Aerograph serie 1800 equipado con: 2 detectores de ionización de flama de hidrógeno, 2 columnas de acero de 6 pies de longitud por 1/8 de pulgada de diámetro interno, empacadas con Chromosorb W y silicona degranada (SE-30) al 3% como fase líquida. Los registros cromatográficos se hicieron en un registrador Varian-Aerograph Modelo No. A 4272A con señal de entrada de 1 MV. y velocidad de registro variable.

#### e.-METODO.

Hidrólisis.- A 5 ml de plasma se le agregan 5 ml de agua destilada y 1.5 ml de  $H_2SO_4$  al 50%, se agita y se lleva a 120°C en autoclave durante 60 minutos.

Extracción.- Hidrolizada la muestra se deja enfriar a temperatura ambiente, procediendo a filtrarla a través de pa el Whatman No. 41. El filtrado se transfiere a un tubo cónico de 50 ml adicionándole 20 ml de éter etílico agitándose en Vortex durante 30", posteriormente se centrifuga a 2000 r. .m. durante 15 minutos eliminando la fase acuosa por medio de una cánula de Wintrobe adaptada a una jeringa de vidrio.

Purificación.- Se agregan al extracto etero 2 ml de amortiguador de carbonatos de pH 10.4, se agita en Vortex durante 15", eliminando —

después la fase acuosa, para adicionar 1 ml de bicarbonato de sodio al 8%, se agita y nuevamente se elimina la fase acuosa. Finalmente - se lava dos veces con 2 ml de agua destilada desechando la fase acuosa y eliminando el agua residual con  $\pm$  0.5 g de sulfato de sodio anhidro. Una vez eliminada el agua, se toma una alícuota de 15 ml del extracto etéreo que se colocan en un tubo de centrifuga de 15 ml, adicionándole al mismo tiempo 1 ml de la solución de colesterol que contiene 2 gammas/ml se evapora a sequedad bajo una corriente de nitrógeno en Baño María de 30 a 35°C.

Formación de derivados.- La producción de derivados TMS (trimetilsililados) se efectuó por un procedimiento rápido en frío con la adición de 15 microlitros de BSA al extracto etéreo seco, correspondiente a cada una de las muestras, procediendo a inyectar de 1 a 1.5 microlitros después de 10 a 20 minutos.

Cromatografía de Gas-Líquido.- Las condiciones de operación del cromatógrafo fueron las siguientes:

inyector 275, columna 265 y detector 300°C respectivamente. Se empleo nitrógeno como gas transportador a un flujo de 30 ml por minuto, a una presión de 34 lbs/M<sup>2</sup>, hidrógeno a 40 y aire a 400 ml/minuto. El electrómetro operó a una sensibilidad de  $2 \times 10^{-10}$ .

Los cromatogramas en el registrador se obtuvieron a una velocidad de 10 mm/minuto.

Curva de calibración interna.- Se realizó trabajando con diferentes concentraciones de una solución de estriol. Se utilizaron ocho tubos cónicos de 15 ml en los que se colocaron respectivamente 0.05, - 0.10, 0.20, 0.50, 1.00, 2.00, 5.00 y 10.00 gammas de estriol se adicionaron también a todos los tubos 2 gammas de colesterol, evaporando a sequedad para formar finalmente los trimetilsilil derivados. Graficando los valores obtenidos.

SENSIBILIDAD.- Este término fué definido como: el resultado más pequeño que tiene límites de confiabilidad para  $p=0.05$  no incluyendo el cero.



Con objeto de establecer la sensibilidad de nuestro método se procedió a inyectar en el cromatógrafo cantidades decrecientes de 2.0 a 0.3 microlitros de una alícuota de plasma de mujer clínicamente sana en el último trimestre del embarazo. Estableciendo la sensibilidad del cromatógrafo en  $2 \times 10^{-10}$ .

ESPECIFICIDAD.- En métodos químicos es la determinación de una entidad química por exclusión de otros. Mientras que en determinaciones biológicas el término se refiere a la determinación de una actividad fisiológica para la exclusión de otras.

La especificidad de nuestro método se investigó al procesar 10 alícuotas de plasma de un individuo prepúber del sexo masculino, clínicamente sano, en los cuales previamente se demostró ausencia de estriol libre, agregando posteriormente una determinada cantidad de patrón de estriol puro, a dichas muestras.

EXACTITUD.- Este término puede definirse como el grado de conformidad con que se acepta un resultado analítico, comparando éste con una solución patrón. La exactitud de un método cuantitativo puede estudiarse por medio de experimentos de recuperación o por adición de compuestos radiactivos; o bien las determinaciones pueden hacerse antes y después de adicionar cantidades conocidas de la sustancia que se investiga.

Marrían(26), que un método puede considerarse satisfactorio desde el punto de vista cuantitativo, si la recuperación del esteroide puro adicionado es de 75% o más.

La exactitud la valoramos al agregar una cantidad conocida (2 microgramos) de estriol puro a 10 muestras de plasma de individuos prepúberes clínicamente sanos en los que previamente demostramos la ausencia de estriol libre. Calculando la concentración de estriol y el % de recuperación en cada una de las muestras.

PRECISION.- La precisión es el grado de reproducibilidad de un determinado número de análisis y puede medirse por su varianza o desviación estándar; o bien repitiendo el análisis de la misma muestra

Marrian propone como una precisión aceptable para métodos de análisis de esteroides una desviación estándar de  $\pm 10\%$ .

La precisión la investigamos al procesar 10 alícuotas de una mezcla de plasmas de mujeres embarazadas, de 34 a 36 semanas clínicamente sanas analizándose estadísticamente los valores obtenidos.

DETERMINACION DE ESTRIOLO EN PLASMA DE MUJERES EMBARAZADAS.- Se efectuaron 50 determinaciones por duplicado, en plasma de mujeres embarazadas clínicamente sanas, con 34 a 36 semanas de embarazo normal; procesando dichas muestras con el método experimental.

#### IV.- RESULTADOS.

Al estudiar el grado de confiabilidad del método propuesto se obtuvieron los siguientes resultados:

**ESPECIFICIDAD.-** El método es específico como lo demuestra el experimento hecho con este fin, en el cual se observó que las alícuotas de plasma de un individuo prepúber del sexo masculino y clínicamente sano no apareció en los cromatogramas correspondientes ningún pico con tiempo de retención similar al observado en un cromatograma de patrón de estriol y que además al agregar a dichas alícuotas cantidades conocidas de estriol puro; este apareció en los cromatogramas con su tiempo de retención característico.

**SENSIBILIDAD.-** La cantidad mínima posible de medir al inyectar en el cromatógrafo cantidades decrecientes de 2.0 a 0.3 microli-  
tros de una alícuota de plasma procesada según el método descrito fué de 0.001 microgramos (1 nanogramo).

**EXACTITUD.-** La recuperación obtenida en las 10 muestras analizadas se representa en la tabla número 3; siendo el promedio de recuperación de 82.90%.

**PRECISION.-** La reproducibilidad del método al procesar 10 alícuotas de una mezcla de plasma de mujeres embarazadas de 34 a 36 semanas, clínicamente sanas, se representa en la Tabla No.4. Siendo la media aritmética de 33.16 y la desviación estándar de  $\pm$  11.51%.

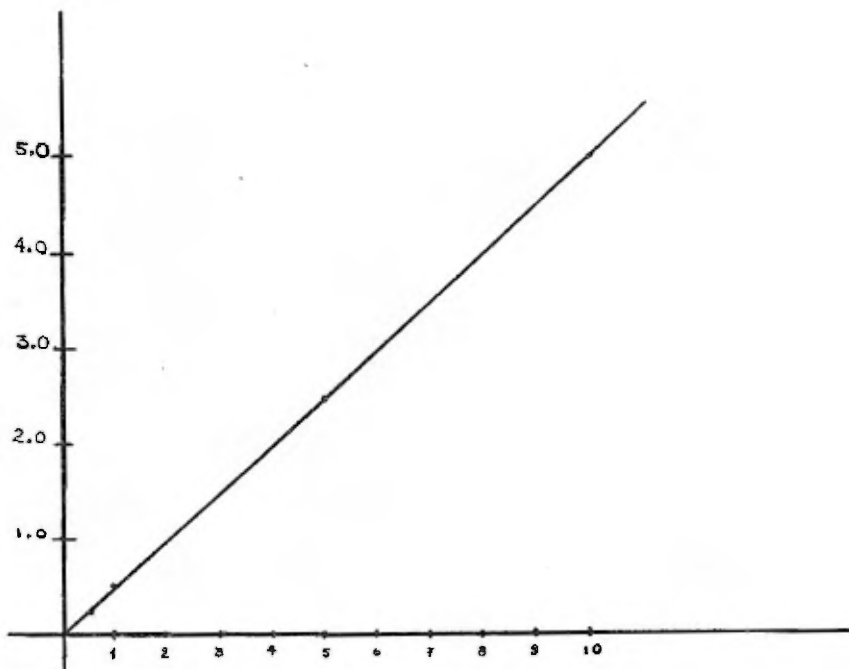
**CURVA DE CALIBRACION INTERNA.-** Graficamos el cociente obtenido de dividir el área de estriol/área de colesterol contra el cociente de la división del peso del estriol/peso del colesterol. Gráfica No.1.

**PRACTICABILIDAD.-** Al procesar 50 muestras por duplicado, de plasma de mujeres embarazadas, de 34 a 36 semanas clínicamente sanas, se encontraron valores comprendidos entre el rango de 8.3 a 33.3 microgramos de estriol/100 ml de plasma.

No. Muestra	Cantidad Agregada*	Cantidad Recuperada*	%Recuperación
1	2.00	1.43	71.50
2	2.00	1.90	95.00
3	2.00	2.00	100.00
4	2.00	1.62	81.00
5	2.00	1.55	77.50
6	2.00	1.68	84.00
7	2.00	1.62	81.00
8	2.00	1.80	90.00
9	2.00	1.56	78.00
10	2.00	1.42	71.00

\* = microgramos de Estriol puro.

TABLA No. 3.



CURVA DE CALIBRACION INTERNA ESTRIOL-COLESTEROL.

Gráfica No.1.

N	X	X-X	(X-X) <sup>2</sup>
1	28.60	-4.56	20.73
2	38.00	+4.84	23.42
3	40.00	+6.84	46.78
4	28.40	-4.73	22.65
5	31.00	-2.16	4.66
6	32.40	-0.76	0.57
7	32.40	-0.76	0.57
8	36.00	+2.84	8.06
9	31.20	-1.96	3.84
10	33.60	+0.44	0.19

$$\bar{X} = 33.16$$

$$\sigma = \sqrt{\frac{(X-X)^2}{N-1}}$$

$$\sigma^{\circ} = \frac{\sigma}{\bar{X}} \cdot 100$$

$$\sigma = \sqrt{\frac{131.53}{9}} = \pm 3.82$$

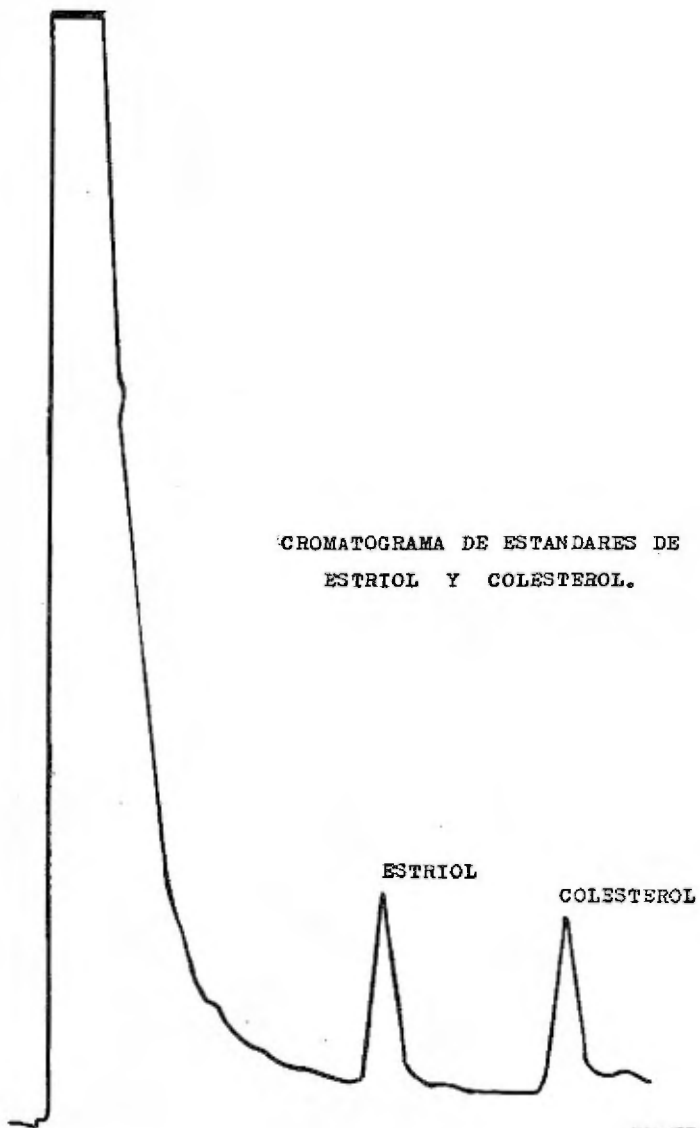
$$\sigma^{\circ} = \frac{3.82}{33.16} \times 100 = \pm 11.51\%$$

$$\sigma^2 = 14.62$$

$$\sigma = 3.82$$

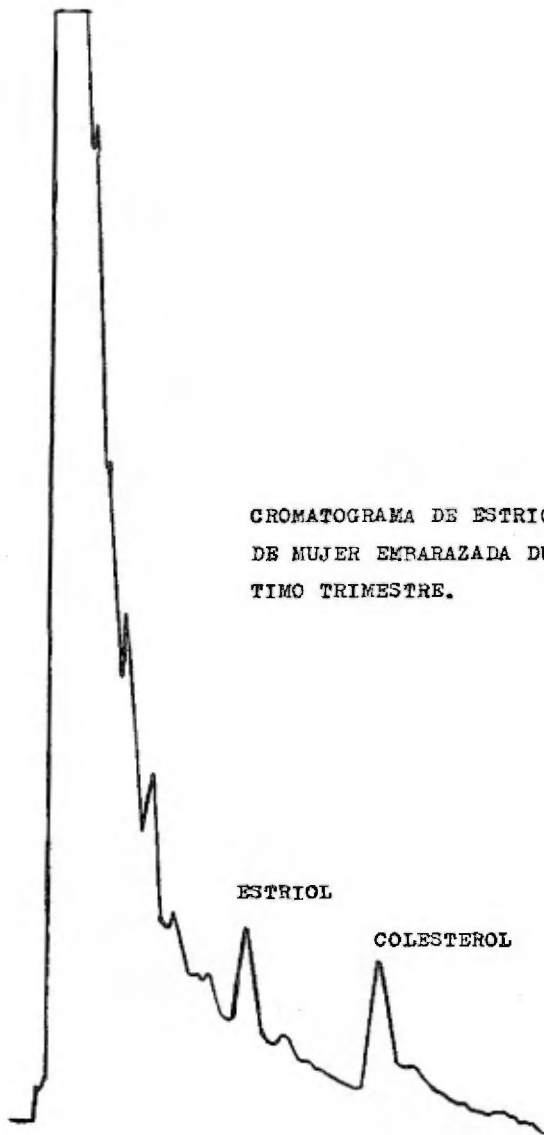
$$\sigma^{\circ} = 11.51$$

X=microgramos de estriol/100 ml de plasma.



CROMATOGRAMA DE ESTANDARES DE  
ESTRIOL Y COLESTEROL.

GRAFICA No. 2.



CROMATOGRAMA DE ESTRIOL DE PLASMA  
DE MUJER EMPARAZADA DURANTE EL U  
TIMO TRIMESTRE.

GRAFICA No. 3.



## V.- DISCUSION Y CONCLUSIONES.

En la actualidad es un hecho aceptado que la creación de nueva metodología aplicable tanto a la práctica rutinaria como a la empleada en estudios académicos o de investigación, debe cumplir con los requisitos conocidos de confiabilidad, especificidad, sensibilidad, exactitud y precisión. Aunque no en forma obligada, es también importante considerar el grado de practicabilidad de tales métodos tanto más importante si éstos han de aplicarse al análisis rutinario de un gran número de muestras, como ocurre en el Laboratorio Clínico. Este aspecto de la practicabilidad puede ser un poco menos estricto cuando se trata de metodología que ha de aplicarse a estudios no rutinarios como son aquellos que tienen por objeto un estudio académico o de investigación. Con esto en mente se inició el estudio de un método analítico para determinación de estriol en plasma humano y se plantearon diferentes experimentos con objeto de establecer la confiabilidad del método propuesto. Así podemos concluir: que el método es específico, como lo demuestra el experimento realizado para ello, en el que al demostrar la ausencia de estriol libre en varias alícuotas de plasma de un individuo prepúber del sexo masculino y no haber obtenido ningún pico con un tiempo de retención similar al observado cuando se analiza un patrón de estriol bajo las mismas condiciones analíticas y que en tales muestras se aprecia el pico correspondiente al estriol al ser agregado a las mismas. Indudablemente se pudo además proceder a plantear otro tipo de experimentos con objeto de aportar más evidencia sobre la especificidad establecida, como habría sido el caracterizar químicamente el derivado TMS de estriol simultáneamente al análisis por cromatografía de gas con un espectrómetro de masas.

Por lo que respecta a la sensibilidad, esta es aceptable como lo demuestra el hecho de poder medir cantidades de 0.001 microgramos, estableciendo la sensibilidad del cromatógrafo en  $2 \times 10^{-10}$ ; pudiendo ser esta mayor, aumentando la sensibilidad del cromatógrafo aun-

que de esta manera pudiera aparecer ruido de fondo; sin embargo, — empleando otro tipo de detección como el detector de captura de electrones podría aumentarse ésta de 5 a 10 veces más. El rango de sensibilidad establecido en este método es útil para medir las cantidades presentes durante el último trimestre del embarazo en donde las cifras mínimas reportadas están alrededor de dos a tres microgramos/100 ml de plasma, o sea de 0.10 a 0.30 microgramos por 5 ml que es la alícuota de plasma por nosotros utilizada, alícuota — que una vez seca se suspende en 15 microlitros de N,O,bis(trimetil silil) acetamida(BSA), para proceder a inyectar al cromatógrafo — 2 microlitros de la muestra para medir un mínimo de 0.0132 a 0.040 microgramos. Podemos concluir además que el rango de sensibilidad habla indirectamente de la efectividad de las condiciones analíticas del cromatógrafo de gas, por lo que respecta a la eficiencia de la columna SE-30 al 3% y a la respuesta del detector a los derivados TMS de estriol.

La exactitud del método puede considerarse satisfactoria desde el punto de vista cuantitativo, ya que en las muestras analizadas para su determinación se obtuvo una recuperación en promedio — del 82.90%, que es superior a la exactitud establecida cuando se trabaja con un esteroide puro.

Al determinar la precisión encontramos una desviación estándar relativa de  $\pm$  11.51%, por lo que podríamos concluir que es un método poco preciso, pero no en lo que respecta a la cromatografía de gas sino al método de purificación empleado, ya que el error que puede presentarse en la sililación e inyección de la muestra se atenúa al usar la curva de calibración interna. Consideramos que el empleo de estriol marcado mejoraría tanto la exactitud como la precisión de nuestro método ya que permitiría corregir la recuperación individualmente en cada una de las muestras.

La practicabilidad del empleo de la cromatografía de gas en la determinación de estriol en plasma de mujeres embarazadas, está en

el hecho del corto tiempo que se emplea en su ejecución ,lo cual — permite la obtención de un resultado rápido cuando así se requiera. Haciendo así de nuestro método un medio útil para determinar el índice de la viabilidad feto-placentaria tanto en el embarazo normal como en el patológico. El contar con una técnica confiable en plasma, permite darle aplicación en otro tipo de estudios académicos que como por ejemplo sería la investigación de las variaciones circadianas de estriol durante el embarazo.

Finalmente podemos concluir que los métodos de cromatografía de gas son un claro ejemplo de un medio por el cual la separación de — componentes de una mezcla y estimación de un compuesto determinado — pueden efectuarse en una simple operación; es por ello que este tipo de metodología ha aportado un sin número de conocimientos a la Química y Medicina en particular, y que si bien en el campo de la investigación químico clínica, altamente especializada pudiera ser relegada a un segundo plano por metodología que reúne en grado extremo los requisitos de confiabilidad como es el Radio Inmunoensayo, su importancia dentro de un laboratorio de rutina bien equipado, en donde — no es sencilla la ejecución de técnicas altamente sofisticadas, la cromatografía de gas guarda preponderancia gracias a sus atributos — de confiabilidad y versatilidad.

## VI.- RESUMEN.

Se realizó una revisión de conocimientos teórico-prácticos sobre cromatografía de gas-líquido al igual que se estudiaron los antecedentes históricos, estructura, biosíntesis y metabolismo del estriol durante el embarazo normal.

Trabajando experimentalmente se efectuó una hidrólisis y extracción para estriol plasmático semejante a la realizada por otros autores aplicando finalmente en la fase cuantitativa la cromatografía de gas, empleando para ello un cromatógrafo Varian-Aerograph serie — 1800, equipado con dos detectores de ionización de flama de hidrógeno.

Se estableció el grado de confiabilidad de nuestro método al analizarlo por los parámetros de especificidad, sensibilidad, exactitud y precisión. Estudiando además las cifras normales de estriol en plasma, en un grupo de mujeres, clínicamente sanas, en el último trimestre del embarazo; con objeto de la posible aplicación futura al análisis rutinario de estriol durante el embarazo patológico al emplearlo como un índice de la función feto-placentaria durante este mismo.

## VII.- BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Adlercreutz, H. and Lukkainen, T.: In gas chromatography of steroids in Biological Fluids. M.B.Lipsett. Ed, Plenum Press. N.Y. 1965.
- 2.- Attal, J. and Eik-Nes, K.B.: Measurement of Estradiol by gas-liquid chromatography. *Analyt. Biochem.* 26, 398, 1968.
- 3.- Attal, J., Hendeles, S.M. and Eik-Nes, K.B.: Determination of free estrone in blood plasma by gas phase chromatography with electron capture detection. *Analyt. Biochem.* 20, 394, 1967.
- 4.- Beal, D.: The isolation of alfa-oestradiol and oestrone from horse testis. *Biochem. JOUR.* 134, 129, 1940.
- 5.- Brooks, C.J. and Azkiewicz, J.A.: Gas chromatography Hormones in Blood. Edit. C.H. Gray, Vol 2, 1967.
- 6.- Brown, J.B.: The relationship between urinary oestrogens and produced in the body. *Jour. Endocr.* 16, 202, 1957.
- 7.- Brown, J.S.L.: The isolation of oestriol from the tissues placenta ries. *Proc. Calif. acad. Med.* 1, 38, 1931.
- 8.- Cassmer, O.: Hormone Production of teh isolate human placenta. *Acta - Endocr. K.B.H. Suppl.* 45, 1959.
- 9.- Dicsfalusy, E.: Endocrine functions of tbe human placenta (feto). *Unit. Fed. Proc.* 23, 791, 1964.
- 10.- Diczfalusy, E.: Endocrine functions of the human placenta. *Vit. and Hormones.* 19, 229, 1961.
- 11.- Doisy, E.A., Veler, C.D. and Thayer, J.A.: Isolation of oestrone from urine pregnant woman. *Am. Jour. Physiol.* 90, 329, 1929.
- 12.- Fishman, J., and Brown, J.B.: Citado por DICZFALUSY ref. 9.
- 13.- Hammerstrand, K. and Bonelli, E.J.: Derivative forantion in gas chromatography. *Varian Aerograph.* 1968.
- 14.- Hollander, M.C.: Citado por DICZFALUSY ref. 9.
- 15.- Huffman, M.N., Mac Corquodale, D.W., Thayer, S.A., Doisy, e.A., Smith, G. V. and Smith, O.W.: The isolation of alfa-dydrotheelin from human pregnancy urine. *Jour. Biol. Chem.* 134, 591, 1940.

- 16.- Huffman, M.N., Thayer, S.A., Doisy, E.A.: The isolation of alfa dihydrotheelin from human placenta, Jour. Biol. Chem. 133, 567, 1940.
- 17.- Ittrich, G.; Eine Methode Zur Chemischen Bestimmung Von Oestrogens Hormone in Blut, Milch und Colostrum. Hoppe Seylers, Physiol. Chem. 320, 103, 1960.
- 18.- Janak, L.G. Vapour PHASE Chromatography. Ed. Desty, Publ. Butterworths 1953.
- 19.- Keulemans and Kwantes. Vapour Phase Chromatography. Ed. Desty. Publ. Butterworths 1955.
- 20.- Levin, L.: The isolation of alfa-estradiol from the urine stallion. Jour. Biol. Chem. 158, 725, 1945.
- 21.- Longchamp, L.M. et al.: Citado por DICZFALUSY ref 10.
- 22.- Lovelock, J.E.A.: Sensitive detector for gas chromatography. Jour. of Chromatography. 1.35, 1958.
- 23.- Lukkainen, T.W., Vander Heuvel, J.A., Haahti, E.O. and Horning, E.C.: GAS CHROMATOGRAPHY BEHAVIOURS OF TRIMETILSYLIL ETHERS OF STEROID. Biochem. Biophys. Acta. 57, 599, 1961.
- 24.- Mac Corquodale, D.W., Thayer, S.A. and Doisy, E.A.: The isolation of alfa-estradiol from the liquid follicular. Procs. Soc. Exp. Biol. Med. 32, 1182, 1935.
- 25.- Mahcusso, S., Dell Acava, S., Eriksson, G., Wiquist, N. and Miczfaluzsy, E.: Aromatization of androstenedione and testosterone by the human fetus. Steroids. 5, 183, 1965.
- 26.- Marrian, G.F.: In proceeding of third International Congress in Biochemistry. Bruselas. 205, 1965.
- 27.- Martin, K.M., and James, G.L.: The separation of fatty acids by gas Chromatography. Analyst. 77, 915, 1952.
- 28.- Marrian, G.F.: The chemistry of Estrin, and Improved Method of Preparation and the isolation of active crystalline material. Bioch. J. 24, 435, 1930.
- 29.- Meyer, S.M. and Cols.: Citado por DICZFALUSY ref. 9?
- 30.- Mc. William, S.P. and Dewar, L.C.: Gas Chromatography. Ed. Desty. Publ. Butterworths. 1965.
- 31.- Nachtigall, L., Bassett, M., Hogsander, O., Slagle, and Levitz, M.: A

- rapid method for the assays of plasma estriol in pregnancy. Jour. Clin. Endoc. Med. 26.941, 1966.
- 32.- O'Donnell, O.J. and Freedy, J.R.K.: The oestrogen, hormones in blood. Edit. Gray. Vol. 2, 1967.
- 33.- Pearlman, W.H. Rakoff, A.E. Cantarrow, A. and Paschkis, K.E.: THE isolation of estrone from the bile of pregnant cows. Jour. Biol. Chem. 170.173, 1947.
- 34.- Freedy, K.R.J. and Arkton, H.E.: Column partition chromatography of estrone, 17 beta estradiol and estriol in phenolic extracts of urine: Fluorescence characteristics of interfering material. J. Biol. Chem. 236, 5, 1997, 1961.
- 35.- Phillips, G. and Ray, E.: Application to the conductivity Thermic Detector to Chromatography. Discussion Faraday Society. 7, 241, 1949.
- 36.- Ray, E.P.: The utility of catarometer for gas chromatography. J. Appl. Chem. 4, 21, 82, 1954.
- 37.- Roy, J.E.: Application of Ittrich Extraction procedure to the fluorometric measurement of estrogen in blood. J. Endoc. 25, 361, 1962.
- 38.- Roy E.J., and Brown J.B: A method for the estimation of oestriol oestrone, and oestradiol 17 beta in the blood of the pregnant woman and of the foetus. J. Endoc. 21, 9, 1960.
39. & Roy, E.J. and Brow, J.B: Citado por DICZFZLUXY ref. 7
- 40.- Ryan, K.J.: Hormones of the placenta. Am. J. Obstet. Gynec. 84, 1692, 1962.
- 41.- Stark et al: Citado por Diczfalusy ref. 7.
- 42.- Schrepfer, M.D. and Nicholas, H.J.: Chemical determination of plasma estrógens. Am. J. Obstet. Gynec. 92.755, 1965.
- 43.- Touchstone, J.C.: Gas chromatography of estriol in pregnancy urine. Gas Chromatography of steroids in biological fluid. Ed. Mortimer B. Lipaett. Plenum Press. N.Y. 1965.
- 44.- Watkins, O.: Free conjugated estrogens in blood and urine before and during parturition in human pregnancy. Acta. Endoc. Sup. 1. 104. 51, 1956.
- 45.- Westerfield, W.W., Mac Corquodale, D.W. Thayer, S.A. and Doisy E.A.: The isolation of theelin from human placenta. J. Biol. Chem. 126, 195, 1938.

- 46.- Wotiz, H.H. and Chatteraj, S.C.: Gas chromatography and its role in the versatile analysis of estrogens. Gas Chromatography of steroids in Biological Fluids. Ed. Mortimer, B. Lipsett. Plenum Press. 1965.
- 47.- Yalow, R.S., Berson, S.A.: Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. J. Clin. Investigations. 39:1157, 1960.