

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA

DETERMINACION DE TESTOSTERONA EN ORINA
POR CROMATOGRAFIA DE GAS-LIQUIDO

125 T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A N

CONSUELO GARNICA ROSALES
CECILIA PAREDES PAREDES



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.

LAS Tesis

ABO 1974

FECHA 1974

PRSC Mt. 105 123



QUIMICA

JURADO ASIGNADO
ORIGINALMENTE -
SEGUN EL TEMA.

PRIDENTE: GUADALUPE VELEZ PRATT.
VOCAL: DEA CORONADO PERDOMO.
SECRETARIO: MARIA ELENA BUSTAMANTE C.
1er. SUPLENTE: ELVIRA DE JESUS BETANCOURT J.
2do. SUPLENTE: GDPE. LETICIA CARRAZCO R.

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:
LABORATORIO CLINICO DEL C.H. 20 DE NOVIEMBRE

NOMBRE COMPLETO Y FIRMA DE LOS SUSTENTANTES:

CONSUELO GARNICA ROSALES

CECILIA PAREDES PAREDES

NOMBRE COMPLETO Y FIRMA DEL ASESOR DEL TEMA:

Q.F.B. DEA CORONADO PERDOMO

NOMBRE COMPLETO Y FIRMA DEL SUPERVISOR TECNICO:

Dr. MIGUEL ANGEL GUILLEN GONZALEZ.

I N D I C E

- I.- INTRODUCCION
- II.- GENERALIDADES
- III.- MATERIAL Y METODOS
- IV.- DISCUSION Y CONCLUSIONES
- V.- RESUMEN
- IV.- BIBLIOGRAFIA

INTRODUCCION

Desde que se aisló la testosterona de la orina humana, se han reportado diferentes métodos para la cuantificación de esta hormona, ya que su determinación es de gran ayuda en la evaluación clínica de los estados hiperandrogénicos e hipoandrogénicos.

A pesar de que se han desarrollado una gran variedad de métodos para la valoración de testosterona, estos presentan diversos inconvenientes. Por lo que pensamos que sería de gran utilidad para la determinación de los valores de testosterona, el establecimiento de un método relativamente sencillo, reproducible y rápido en la valoración diaria de esta hormona.

Es por esto que en nuestro estudio empleamos la cromatografía de gas-líquido, que resulta ser una técnica más específica y tiene la ventaja de que al usar una muestra biológica previamente purificada, permite una separación del esteroide de otros compuestos semejantes.

GENERALIDADES

QUIMICA, BIOSINTESIS, CATABOLISMO Y ACCION BIOLÓGICA
DE LA TESTOSTERONA

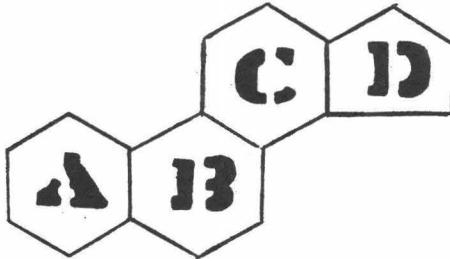
QUIMICA.- Todas las hormonas esteroides poseen un núcleo ciclopentano-perhidrofenantreno (estreno).

La fórmula dada para el colesterol, tiene un núcleo que es fundamental de las hormonas esteroides, posee tres anillos hexagonales del fenantreno (A,B,C) unidos a un cuarto anillo pentagonal, el ciclopentano (D). En la figura número uno, puede verse el sistema que se utiliza para la numeración de los átomos de carbono.

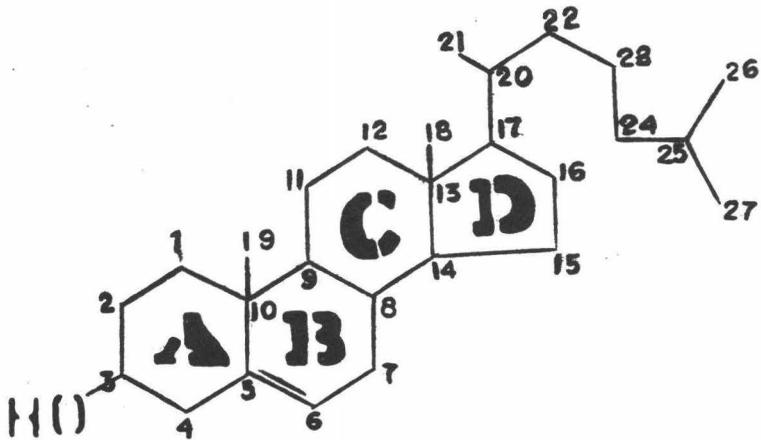
Son característicos los dos grupos metilo (CH_3) - en los átomos del C-10 y C-13 que poseen todas las hormonas esteroides, con excepción de los estrógenos.

Los andrógenos pertenecen al grupo de los esteroides con 19 átomos de carbono o androstano. La testosterona (fig. 2), es la hormona sexual masculina natural - más potente, se caracteriza por un grupo 3 ceto, una doble ligadura en los carbonos 4:5 y un grupo hidroxilo en la posición 17.

BIOSINTESIS.- La biosíntesis se efectúa a partir del acetato activo (Acetil CoA) o del colesterol en las células de Leydig, capa reticular de la corteza suprarrenal y en el ovario. La vía implica la síntesis inicial del colesterol, el cual después de una serie de

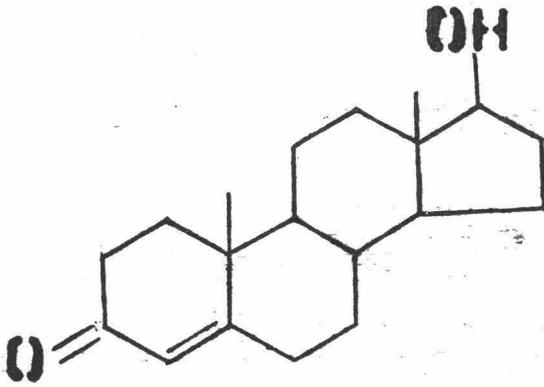


CICLO. PENTANO
 PERHIDROFENANTRENO



COLESTEROLO.

Fig. 1



TESTOSTERONA

Fig. 2

oxidaciones en C-20 y 22, es convertido finalmente por la acción de la 20, 22 desmolasa en Δ^5 pregnenolona, siendo este el esteroide del cual derivan todas las demás hormonas esteroides. La Δ^5 pregnenolona se convierte a progesterona por la acción de las enzimas 3 β -hidroxi-deshidrogenasa y la Δ^5 -isomerasa, estas enzimas transforman el grupo 3 β -hidroxi de la Δ^5 -pregnenolona a un grupo ceto en el C-3 y transforman la doble ligadura entre los C-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 α -hidroxiprogesterona; por otro lado la Δ^5 pregnenolona es transformada a 17 α -hidroxipregnenolona, que se convierte por medio de una deshidrogenasa a 17 α -hidroxiprogesterona. La 17 α -hidroxipregnenolona por medio de una desmolasa da origen a la dehidroepiandrosterona que por acción de la Δ^5 -isomerasa da lugar a la androstendiona, que también se deriva de la 17 α -hidroxiprogesterona por medio de una desmolasa. La androstendiona por acción de la 17 β -hidroxilasa se transforma a testosterona (fig. 3).

Actualmente se ha visto que los tejidos efectores tienen una enzima que es la 3 α o β reductasa que efectúa la reducción directa de la testosterona a 3 α , 17 β -androstendiol que es un metabolito activo; en estos tejidos existe otra enzima la 4:5 reductasa que transforma a este compuesto en α o β -androstandioles, algunos autores los consideran inactivos.

SECRECION.- La tasa de secreción de la testosterona -

BIOSINTESIS DE LA TESTOSTERONA

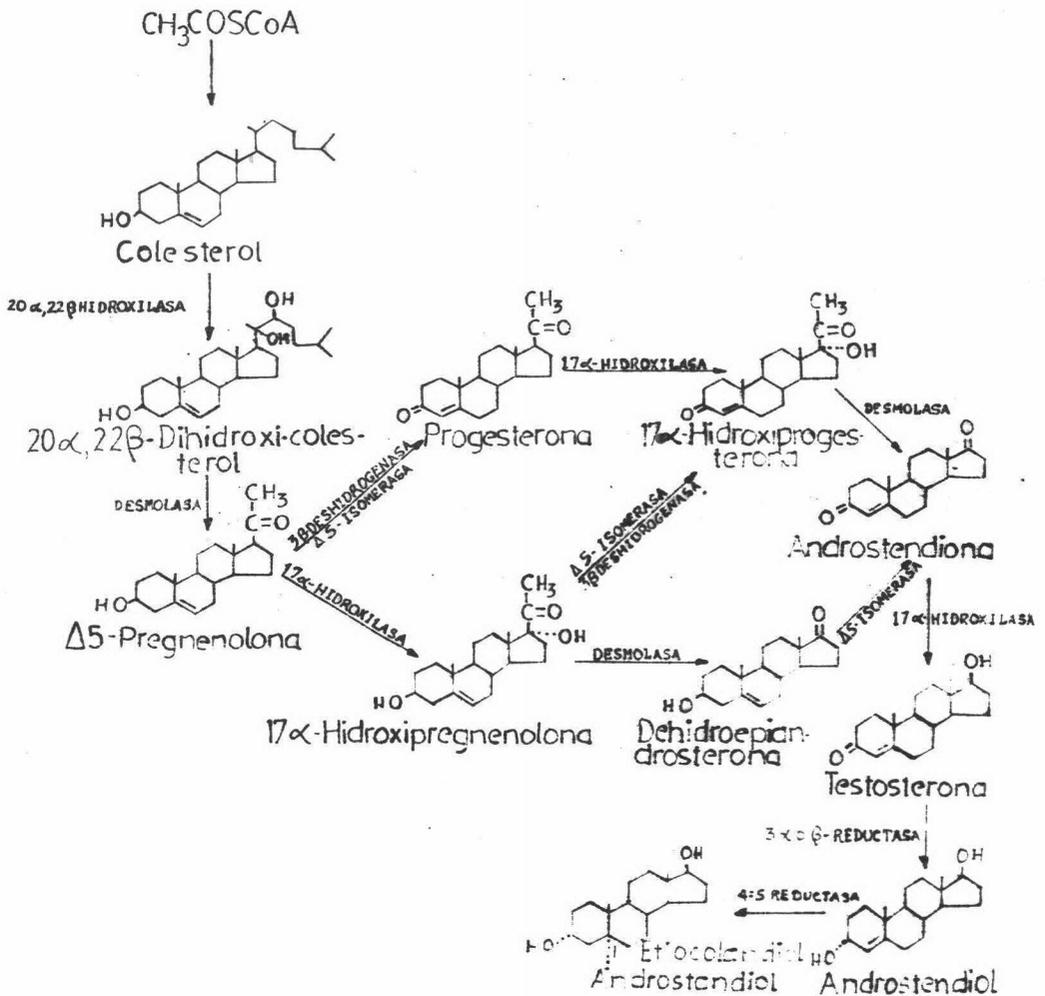


FIG. 3

por los testículos es de 4-9 mg/día en el hombre normal. Pequeñas cantidades de testosterona también son secretadas en la mujer, probablemente por el ovario, pero también posiblemente por las glándulas adrenales.

CATABOLISMO.- La aplicación de métodos isotópicos - han revelado la complejidad del metabolismo degradativo de los andrógenos en el cuerpo, ruta catabólica "17-oxo" (Fig. 4). Después de la infusión de androstendiona C^{14} o testosterona C^{14} , casi todo el material radiactivo aparece en la orina dentro de las 48 horas, la mayor parte está en forma de metabolitos saturados, androsterona y etiolanolona, los cuales se conjugan con el ácido sulfúrico o glucurónico. Aproximadamente el 10% del material radiactivo es recuperado de la bilis y de esta cantidad cerca de la mitad es reabsorbida en el intestino.

Además de la ruta "17-oxo", hay una segunda vía que es la "17-hidroxil" donde se efectúa la reducción directa de la testosterona a 5α y 5β -androstan- 3α - 17β diol - que puede ser cerca del 30% del metabolismo total de la testosterona. Los androstandioles sufren oxidación a androsterona y etiolanolona. Los androstandioles urinarios pueden derivarse directamente de sulfato de dehidroepiandrosterona sin conversión previa a testosterona, siguiendo la ruta "17-oxo".

Una tercera ruta metabólica vista propiamente como biosíntesis de estrógenos circulantes, es la conversión de androstendiona y testosterona a estrona y estradiol respectivamente. Esta transformación ha sido demostrada

en la mujer castrada-adrenalectomizada después de la inyección intramuscular de testosterona, pero no podría demostrarse siguiendo la administración oral de la hormona en el hombre. Ha sido calculado que en los hombres adultos cerca del 1.8% de androstendiona circulante es convertida a estrona y 0.5% de testosterona plasmática a estradiol; en la mujer están en proporción de 0.8% y 0.2% respectivamente.

Una pequeña cantidad de androstendiona o testosterona puede sufrir una hidroxilación en el C-1, C-6 o C-16 en el hígado y ser excretada en la orina en esta forma. Aunque las cantidades normalmente formadas son pequeñas, pueden incrementarse grandemente por la administración de varias drogas (barbituratos, dilantin, fenilbutazona) o insecticidas halogenados. Existe en la actualidad la duda de si la testosterona o la androstendiona es convertida directamente a epitestosterona en el cuerpo, ya que una elección en la excreción de testosterona urinaria se observa después de la administración de grandes cantidades de epitestosterona e inversamente a la administración de testosterona aumenta la epitestosterona urinaria. La epitestosterona contribuye a la producción de androstandioles urinarios, algunos de los cuales son convertidos posteriormente a androsterona y eticolanolona.

El sulfato de dehidroepiandrosterona puede convertirse en el cuerpo a dehidroepiandrosterona libre, luego a androstendiona, la cual es metabolizada posteriormente siguiendo la ruta "17-oxo". El glucalonidato de dehidroepi

androsterona se eleva por esta vía.

La testosterona se conjuga con el ácido glucurónico y ácido sulfúrico formando glucuronidatos y sulfatos de testosterona que se elimina por la orina; la excreción - en forma de sulfato es muy pequeña, por lo que la testosterona es medida en forma de glucuronidato.

La testosterona puede ser también convertida en androstendiol que puede ser excretado sin cambio alguno en la orina o puede ser reducido formando androstandiol y etiocolandiol.

CONJUGACION.- Hasta hace poco tiempo se creía que - la conjugación de metabolitos androgénicos con ácido glucurónico o sulfúrico, principalmente en el hígado, representaba un estado final en el metabolismo de estos esteroides antes de excretarse en la orina. Es conocido que ciertos esteroides, principalmente dehidroepiandrosterona, son secretados en forma esterificada por un metabo--lismo único como el éster, por lo tanto el sulfato de dehidroepiandrosterona no es transformado a androstendiona o testosterona hasta que se ha hidrolizado a esteroide - libre; el esteroide esterificado parece ser altamente suceptible a una hidroxilación en posición 16, bajo protección metabólica, presumiblemente a causa de una excre--ción retardada.

Cerca del 5% de testosterona plasmática libre es -- convertida a glucuronidato de testosterona en la circulación, pero desde androstendiona puede convertirse en el mismo producto en el hígado, este conjugado no es un me-

tabolito único de la testosterona plasmática. Cerca del 20% del glucuronidato de testosterona así formado es excretado como tal; aparentemente desde la hidrólisis del glucuronidato esto no ocurre, el conjugado remanente sufre un metabolismo directo a los glucuronidatos de los metabolitos 5B-etiolandiol y androstanolona. Aunque - el sulfato de testosterona es formado in vitro por el adrenal y testículos y ha sido aislado de la orina, la - producción normal diaria de este conjugado es extremadamente pequeña. Después de la inyección intravenosa de - sulfato de testosterona, solo el 3.5% del material ini-cial es recuperado de la orina y el destino del remanente se desconoce.

EXCRECION.- La excreción de los glucuronidatos androgénicos es rápida, aproximadamente en proporción de filtración glomerular; los esteres sulfatos son excretados mucho más despacio, el sulfato de etiolanolona se pone de manifiesto más rápido y el sulfato de dehidroepiandrosterona más despacio. Estas diferencias parecen estar relacionadas al grado de enlace proteico - en la sangre y la mecanismo de excreción renal, los -- glucuronidatos esteroides son probablemente filtrados a través de los glomérulos y los sulfatos son secretados por el túbulo renal. Andrógenos no esterificados como la testosterona y dehidroepiandrosterona después de la infusión, son rápidamente liberados de la co--rriente sanguínea aunque esto probablemente refleja un metabolismo hepático rápido de los esteroides más que

excreción. Metabolitos androgénicos no esterificados tales como androsterona y etiocolanolona, presentes en plasma en pequeñas cantidades pueden ser conjugados en parte con ácido glucurónico en el riñón.

ACCION.- La testosterona y otros andrógenos producen y mantienen los caracteres sexuales secundarios masculinos y ejercen un efecto anabólico proteico, importante promotor del crecimiento. Los extensos cambios en la distribución del pelo, en la configuración del cuerpo y en el tamaño de los órganos genitales que se desarrollan en los niños en la pubertad, así como los caracteres sexuales secundarios masculinos se resumen en el cuadro No. 1.

CAMBIOS CORPORALES EN JOVENES PUBERES
(CARACTERES SEXUALES SECUNDARIOS)

ORGANOS GENITALES EXTERNOS:

El pene crece en longitud y grosor. El excroto se pigmenta y se vuelve rugoso.

ORGANOS GENITALES INTERNOS:

Las vesículas seminales se agrandan y secretan, y comienzan a formar fructosa. La próstata y las glándulas bulbouretrales también se agrandan.

VOZ:

La laringe se agranda, las cuerdas vocales crecen en longitud y grosor y la voz se torna más profunda.

CRECIMIENTO DEL PELO:

Aparece la barba. La línea del pelo retrocede anterolateralmente. El pelo púbico crece con una configuración masculina (triángulo con el ápex hacia arriba). Aparece el pelo en las axilas, en el pecho y alrededor del ano; el vello del cuerpo aumenta en general.

ACTITUD MENTAL:

Más agresiva y activa. Aparece el interés por el sexo opuesto.

CONFORMACION DEL CUERPO:

Los hombros se ensanchan, la musculatura se agranda.

PIEL:

La secreción de las glándulas sebáceas aumenta y se engruesa (predisponiendo al acné)

GENERALIDADES SOBRE CROMATOGRAFIA

Definición: La cromatografía es un método físico para la separación de componentes en una mezcla, e implica un amplio rango de métodos basados en su distribución entre una fase fija y una móvil.

La cromatografía puede ser de adsorción y de absorción:

Cromatografía de adsorción: En ésta la fase estacionaria es un sólido como la alúmina, gel de sílice u otros, la fase móvil puede ser un gas o más corrientemente un líquido. La separación tiene lugar cuando uno de los dos componentes de la mezcla es más intensamente adsorbido que el otro por el sólido, el grado de separación depende de la superficie adsorbente de que se disponga, se presenta en: cromatografía de gas-sólido, cromatografía en columna, cromatografía en capa fina. (Diagrama No. 1).

Cromatografía de absorción: Está basada en la separación de una mezcla de sustancias mediante el repartido existente entre la fase móvil que puede ser un gas o un líquido y la fase estacionaria que es un líquido, frecuentemente agua, mantenido en un soporte sólido inerte. Cuando la distribución es entre líquido y gas es una cromatografía gas-líquido; entre líquido-líquido: cromatografía en columna, papel y capa fina.

En el presente trabajo se empleó la cromatografía de absorción: gas-líquido, de papel y placa fina.

CROMATOGRAFIA GAS-LIQUIDO.- 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.

El método consiste en inyectar la sustancia volátil en una columna que contiene un sólido inerte que sirve como soporte al líquido absorbente. La base para la separación de los componentes de la sustancia volátil estriba -- en la diferencia de coeficiente de partición de los compones al ser eluidos por un gas inerte tal como el nitrógeno, hidrógeno, dióxido de carbono, argón o helio, a través de la columna. El gas acarreador transporta la sustancia volátil inyectada en la columna, donde los componen--tes sufren una partición en el líquido de absorción y se separan; al pasar una fracción por el detector adecuado, manda éste una señal al aparato de registro, quien a su -- vez transforma esta señal en una gráfica, en la que cada pico obtenido representa un compuesto.

PARTES BASICAS DE UN CROMATOGRFAO DE GAS (Fig. 5).

1.- Cilindro de gas acarreador.- Los gases que se emplean en esta cromatografía pueden adquirirse en estado puro, -- envasados a presión. Deben tener las siguientes caracte--rísticas: inertes para evitar la interacción con la muestra o el solvente, de fácil obtención en estado puro, poco difusible, adecuado para el detector empleado y sobre todo barato.

2.- Reguladores de flujo.- La velocidad de flujo del gas

portador a través del aparato se controla por medio de una válvula especial y se mide con un aparato conocido con el nombre de medidor de caudal. Hay de 3 tipos: rotámetro, medidor de caudal capilar y el de burbuja, el de más fácil manejo es el rotámetro o flotador.

3.- Puerto de inyección con horno.- Generalmente es una T que por un lado permite la entrada del gas transportador; por otro se inyecta la muestra y el último es la coluna en sí. Consta también de un horno cuya temperatura se controla con un termostato y al mismo tiempo está conectado a un pirómetro que se encuentra en el interior.

4.- Columna.- Puede ser de diferentes 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.

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.

5.- Detector.- Tiene la propiedad de enviar señales eléctricas cuando el gas de acarreo transporta una sustancia o deja de emitirlas en caso contrario. Debe ser altamente sensible (respuesta a todo tipo de compuesto) insensible a los cambios de fluido y temperatura y barato. La temperatura del detector debe ser mayor que la de la coluna para evitar la condensación de los compuestos y --

permitir que sean desalojados del aparato. El detector - empleado en nuestro estudio, es el de ionización de flama de hidrógeno que 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 del gas portador) se adicionan al gas transportador para producir una flama, que produce iones negativos y positivos, bióxido de carbono, agua y electrones. La suma de electrones más la suma de iones negativos 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 ventajas sobre los detectores de argón en el análisis de soluciones acuosas. (Fig. 6).

6.- Amplificador.- 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 amplificador para ser registradas.

7.- 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 la cual se activa por el impulso eléctrico del amplificador. Así el cromatograma se obtiene como una serie de picos sobre el papel .

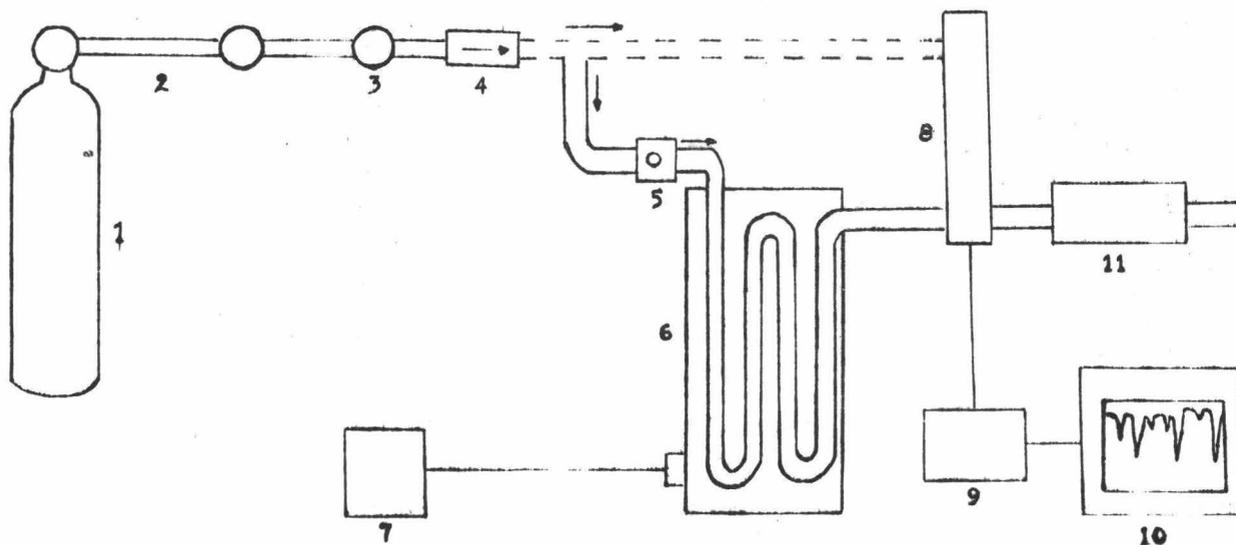
CROMATOGRAFIA EN PAPEL.- La cromatografía en papel es una de las técnicas más simples y de las más antiguas.

Tiras de papel filtro se usan como soporte de una fase acuosa estacionaria, mientras que una orgánica volátil se desplaza hacia abajo (técnica descendente). A medida que el disolvente se desplaza a lo largo del papel los componentes de la muestra se extienden y separan en zonas en función de sus diferentes adsorciones sobre las fibras de celulosa. La relación de las distancias de corrimiento de los compuestos con el corrimiento del frente del solvente, desde el punto donde se colocó la gota en el extremo superior del papel, se llama R_f la cual es una constante importante para identificar diferentes sustancias. Los componentes separados pueden identificarse sobre el papel mediante reactivos capaces de originar productos coloreados con los componentes de la muestra; si se desea puede cortarse el papel en trozos de tal forma que cada uno de estos contenga un solo componente para un análisis posterior.

CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA.— Esta técnica se ha convertido en uno de los medios más útiles para la separación, identificación y ensayo de muchas sustancias, especialmente materiales bioquímicos, productos naturales, preparaciones farmacéuticas y es una técnica muy adecuada para los análisis clínicos. Comparada con la cromatografía en papel, la cromatografía en capa fina proporciona separaciones más rápidas y más completas, y necesita una cantidad de muestra en disolución mucho más pequeña. Puede alcanzarse con este método una exactitud de 3-5%. Es una cromatografía de adsorción, en la que el material adsorbente se haya extendido uniformemente en forma de capa

fina sobre una placa de vidrio o de alúmina. Los adsorbentes comúnmente empleados son gel de sílice, óxido de aluminio y celulosa. La mezcla a separar se aplica mediante una micropipeta cerca del extremo de la placa, de manera que no exceda de 1 mm el punto de aplicación, las placas se colocan verticalmente en una cámara de vidrio que contiene un solvente adecuado. En 5 a 30 minutos se produce la separación por el solvente que asciende a través de la capa delgada, los componentes de la mezcla se mueven en forma distinta dependiendo de la adsorción de cada uno de estos sobre el adsorbente o debido a una distribución entre el solvente móvil y el agua incluida en el adsorbente. Se saca la lámina del tanque, se seca y se detectan las manchas rociándola con reactivos o colorantes de acuerdo al tipo de sustancias en el adsorbente.

CROMATOGRAFO DE GASES



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

Fig. 5.

Detector de Ionización de Flama.

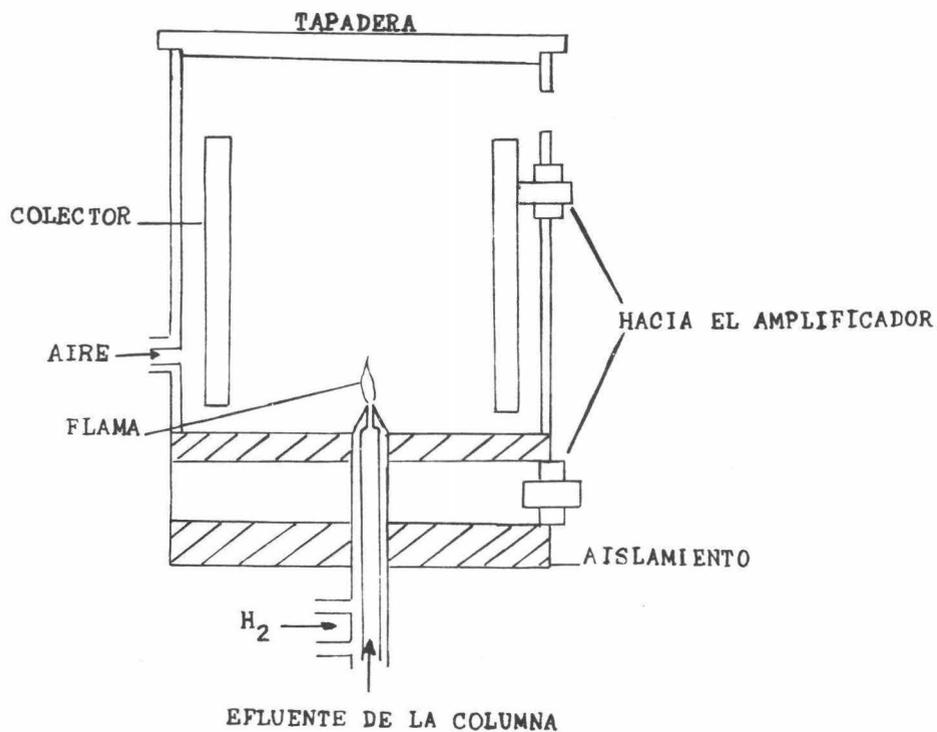


Fig. 6

HISTORIA DE LA DETERMINACION DE TESTOSTERONA POR CROMATOGRAFIA GAS-LIQUIDO

El primer método empleado para la determinación de testosterona fué el de Futterweit y col., (11) en 1963. Ibayashi y col., (14) en 1964 hicieron pequeñas modificaciones, en ese año Brooks (4) analizó separadamente glucuronidatos de testosterona y epitestosterona en la misma muestra de orina; a su vez Sandberg y col., (18) separaron la epitestosterona de la testosterona por gradiente de elución y cromatografía de gas. En años posteriores se hicieron otras modificaciones por varios autores, una de las más recientes es la de Charransol y col., (7) en 1970 determinaron androstandiol y testosterona en orina de hombres normales.

METODO DE FUTTERWEIT Y MODIFICACIONES HECHAS POR LOS AUTORES MENCIONADOS (11, 14, 4, 18, 7)

Hidrólisis:

Futterweit hidroliza una muestra de orina colectada en 24 horas, ajusta el pH a 5 con ácido sulfúrico al 50%, mantiene estable el pH con amortiguador de acetatos 0.1 M adiciona B-glucuronidasa e incuba a 37^o C durante 96 horas.

Ibayashi y Sandberg hidrolizan la muestra siguiendo el método de Futterweit.

Brooks, le adiciona testosterona C¹⁴ como única modificación.

Charransol hidroliza una muestra de orina colectada en 24 horas ajustando el pH a 5 con ácido acético y lo -

mantiene con amortiguador de acetatos, le adiciona 5000 -- cpm de testosterona C¹⁴ y aproximadamente 10 000 cpm de androstandiol, adiciona después 1000 U/ml de B-glucuronidasa. Incuba la muestra a 37^oC durante 24 horas, después de este período adiciona 500 U/ml de B-glucuronidasa e incuba otras 24 horas.

Extracción:

Para la extracción Futterweit emplea éter, lava el extracto con hidróxido de sodio 2 N y agua; evapora a sequedad.

Ibayashi extrae con éter, lava con hidróxido de sodio 2 N y agua al igual que Futterweit.

Brooks y Sandberg extraen con éter, el primero lava -- con hidróxido de sodio 0.1 N y evapora a sequedad; Sandberg cromatografía el extracto en una columna de Florisil.

Charransol emplea el cloruro de metileno, lava con carbonato de sodio al 10% y agua, evapora a sequedad.

Separación de Girard:

Futterweit agrega al extracto 1 ml de metanol al 80%, 1 ml de ácido acético y 20 mg de Reactivo T de Girard, deja reposar toda la noche. Para la reacción con 50 ml de agua fría, neutraliza con hidróxido de sodio 1 N, lava con diclorometano y agua. Hidroliza con ácido clorhídrico y deja reposar de 2-3 horas. Extrae con diclorometano y lava -- con agua; evapora a sequedad.

Ibayashi, Brooks y Sandberg no emplean esta separación.

Charransol al extracto purificado de cloruro de metileno le agrega 25 ml de alcohol etílico, 2.5 ml de ácido acé-

tico y 300 mg de Reactivo T de Girard, incuba toda la noche a 37°C. Para la reacción con agua destilada fría, ajusta el pH con hidróxido de sodio 10 N a neutralidad; extrae los hidroxisteroides con éter y lava el extracto con carbonato de sodio al 10% y con agua destilada, evapora a sequedad. Hidroliza la fracción acuosa que contiene los cetoesteroides ajustando el pH a 1 con ácido clorhídrico y deja reposar por dos horas a temperatura ambiente. Extrae los cetoesteroides con éter, lava con carbonato de sodio al 10% y con agua destilada; evapora a sequedad.

Purificación de testosterona:

Futterweit aplica el extracto así como un estandar de testosterona sobre una placa de sílica gel G, emplea un sistema: benceno:acetato de etilo (3:2) revela con lámpara de luz ultravioleta y extrae con acetona triplemente destilada.

Ibayashi cromatografía el extracto en placas de vidrio con kieselgel HF₂₅₄ en el sistema benceno:acetato de etilo (3:1), eluye el acetato de testosterona y lleva una parte a centelleo y el resto a cromatografía de gas.

Brooks cromatografía en placa de sílica gel en el sistema benceno:acetato de etilo (3:2), eluye la testosterona, la acetila y lleva a cromatografía de placa en el sistema benceno:acetato de etilo (3:1); lleva una alícuota a centelleo.

Sandberg cromatografía la fracción de testosterona purificada en gradiente de elución y toma una alícuota para contador de centelleo.

En el método de Charransol, los cetoesteroides extraídos contienen cantidades de microgramos de testosterona, pa

ra una buena separación introduce dos pasos de purificación: cromatografía en papel y en placa fina. En la cromatografía en papel emplea el sistema de Zaffaroni "Hexano-Benceno" -- (1:1), revela el cromatograma con luz ultravioleta, corta el área correspondiente a la testosterona y eluye con acetato de etilo, agita 3 veces; evapora a sequedad. Disuelve en agua y extrae con éter, evapora a sequedad, transfiere el extracto a una placa de capa fina, utiliza el sistema hexano: acetato de etilo (1:1) revela el cromatograma con luz ultravioleta, el área correspondiente a la testosterona la raspa y eluye con acetato de etilo, evapora y adiciona acetato de etilo, toma 2 alícuotas para analizarlas en un espectrómetro de centelleo para la estimación de las pérdidas de testosterona durante el procedimiento.

Cromatografía de gas:

Futterweit forma acetatos, evapora, suspende en acetona e inyecta al cromatógrafo.

Ibayashi y Brooks llevan la muestra al cromatógrafo en forma de acetatos al igual que Futterweit.

Sandberg forma trimetil sililados.

Charransol forma trimetil sililados, evapora el exceso de reactivo bajo corriente de nitrógeno y le adiciona disulfuro de carbono, inyecta la mezcla en el cromatógrafo.

EXCRECION.- En el cuadro No. 2 se muestra el rango de excreción de testosterona en hombres y mujeres según los autores antes mencionados (11, 14, 4, 18, 7).

CRITERIO DE CONFIABILIDAD DE LOS METODOS.

RECUPERACIÓN: (Cuadro No. 3).

Futterweit hizo determinaciones por duplicado y el ran-

go de recuperación que obtuvo después de eluir el extracto de testosterona de la placa fina fué de 55-80%.

Ibayashi hizo las determinaciones por duplicado y la recuperación que obtuvo fué de 54.8 ± 0.49 (D.S.)

La recuperación obtenida por Brooks fué de 39-66%.

Sandberg procesó muestras de orina de mujeres agregando las cantidades conocidas de testosterona (10-200 ug) y el rango de recuperación fué de 81-120%.

Charransol analizó 29 muestras y el promedio de sus resultados fué de $56 \pm 6\%$ (D.S.)

SENSIBILIDAD: (Cuadro No. 4)

Por el método de Futterweit el más bajo límite de sensibilidad para medir la testosterona es de 2 ug/24 horas de un volumen de orina?

Ibayashi no puede detectar por su método menos de 5 ug de testosterona en orina de 24 horas, esta sensibilidad es la misma para los métodos de Brooks y Sandberg.

Por el método de Charransol cerca de 5 ug de androstan-diol y testosterona pueden ser medidos exactamente en orina de 24 horas y 0.02 ug de ambos esteroides pueden ser detectados en un detector de ionización de flama.

REPRODUCIBILIDAD: (Cuadro No. 5)

Futterweit analizó 8 muestras de orina de un hombre -- adulto y el resultado indicaba que la testosterona era determinada con un error de $\pm 7\%$.

Los resultados de los análisis de 8 muestras por el método de Ibayashi, indicaron que la testosterona era determinada con un error de $\pm 8\%$.

Brooks analizó varias muestras adicionándoles 0.4 a 0.6

ug de testosterona y el error fué de 10%.

Sandberg tuvo un error de medida de 9%.

Charransol hace lo siguiente: el volumen de una orina - de hombre normal colectada en 24 horas es dividida en 10 partes y solamente 6 son analizadas. Las concentraciones de androstandiol y testosterona son determinadas en cada muestra. El valor obtenido fué de 93 ug/24 horas para androstandiol y 37 ug/24 horas para testosterona.

CUADRO No. 2

RANGO DE EXCRECION DE TESTOSTERONA EN ADULTOS NORMALES
(ug/24 horas)

TECNICAS	HOMBRES	MUJERES
Futterweit y col., (1964)	38-332	2-8
Ibayashi y col., (1964)	19-200	5
Brooks (1964)	30-120	7-18
Sandberg y col., (1964)	20-180	-
Charransol y col., (1971)	52 ⁺ -26	-

CUADRO No. 3

TECNICAS	RECUPERACION
Futterweit y col.	55-80%
Ibayashi y col.	54.8 ⁺ 0.49
Brooks	39-66
Sandberg y col.	81-120
Charransol y col.	56 ⁺ 6

CUADRO No. 4

TECNICAS	SENSIBILIDAD
Futterweit y col.	2-4 ug/24 hrs.
Ibayashi y col.	5 ug/24 hrs.
Brooks	5 ug/24 hrs.
Sandberg y col.	5 ug/24 hrs.
Charransol y col.	0.02ug/24 hrs.

CUADRO No. 5

TECNICAS	REPRODUCIBILIDAD
Futterweit y col.	7%
Ibayashi y col.	8%
Brooks	10%
Sandberg y col.	9%
Charransol y col.	$37\text{ug}/24\text{h}^{+2.4}$

MATERIAL Y METODOS

El objetivo de nuestro trabajo fué determinar la testosterona por el método de Futterweit modificado por nosotros, y al mismo tiempo comprobar la confiabilidad del método de acuerdo a las modificaciones hechas.

MATERIAL BIOLÓGICO.- Fué orina de 24 horas obtenida de 93 pacientes seleccionados de acuerdo a las siguientes características: datos clínicos de haber alcanzado la pubertad, que fueran sanos, con actividad androgénica cuando la edad así lo permitía, con prueba de función hepática y renal normales. Estos pacientes fueron divididos de acuerdo a los siguientes grupos por edades:

Grupo 1.....	16 a 25 años
Grupo 2.....	26 a 35 años
Grupo 3.....	36 a 45 años
Grupo 4.....	46 a 55 años
Grupo 5.....	56 a 65 años
Grupo 6.....	66 a 75 años
Grupo 7.....	76 a 85 años

y analizados estadísticamente cada grupo, obteniendo la media, desviación estandar y comparando cada uno contra los demás por la T de Student.

ESPECIFICIDAD.- La especificidad del método fué demostrada procesando ocho muestras de orina de un niño de 7 años clínicamente sano.

Se investigó también procesando por el método de Futterweit, ocho muestras de orina colectada en 24 horas - de un hombre normal, llevándolas por duplicado de la si-

guiente manera:

Futterweit + Cromatografía de placa (Sílica gel G).

Futterweit + Cromatografía de papel.

Futterweit + C. de placa (Alúmina T) + C. de papel.

Futterweit + C. de placa (Sílica gel) + C. de papel.

Procediendo posteriormente a inyectar en el cromatógrafo de gas.

Con el fin de comprobar la separación de la testosterona de otros andrógenos que pudieran interferir en su determinación, se corrieron ocho estandares en cromatografía de placa (Sílica gel G, Sílica gel, Alúmina T) y cromatografía de papel. Los estandares usados fueron los siguientes:

Testosterona

Androsterona

Epiandrosterona

Dehidroepiandrosterona

Etiocolanolona

Dehidro-isoandrosterona

11B-hidroxi etiocolanolona

11B-hidroxiandrosterona

Los sistemas de solventes usados fueron los siguientes:

Placa de Sílica gel..Metanol:Metilal:Tolueno (1.5:10:88.5)
y Metanol:Tolueno (7:93).

Placa de Sílica gel G..Acetato de etilo:Benceno (40:60)

Alúmina T.....Acetona:Benceno (12.5:100)

Papel.....Sistema de Zaffaroni: Hexano:Benceno (1:1) (fase móvil) y formamida (fase fija).

REPRODUCIBILIDAD.- Se hicieron determinaciones por duplicado de 12 muestras de orinas de hombres normales.

SENSIBILIDAD.- Se inyectaron al cromatógrafo cantidades crecientes de estandar de testosterona desde 10 a 300 nanogramos.

RECUPERACION.- 40 muestras de orina fueron procesadas por el método de Futterweit adicionándoles a cada una 0.1 ml de testosterona H^3 y llevadas al contador de centelleo.

MÉTODOS

DETERMINACION DE TESTOSTERONA EN ORINA POR CROMATOGRAFIA GAS-LIQUIDO

(Método de Futterweit)

1.- FUNDAMENTO.- El método consiste en la extracción de los esteroides de la orina por medio de un solvente adecuado previa hidrólisis con una enzima que deja libre los esteroides ya que estos se encuentran en forma de sales (glucuronidatos y sulfatos).

Después de la extracción se procede a la purificación del extracto etereo con un álcali para eliminar los esteroides de tipo aromático. Una vez hecha esta purificación, se somete el extracto a la formación de derivados de Girard, el reactivo se une a los grupos cetónicos en posición beta, formando las hidrazonas correspondientes que son compuestos solubles en agua. Siguiendo a esto una posterior hidrólisis en medio ácido para recuperar los esteroides en forma libre y llevarlos a placa fina para el aislamiento y purificación de testos

terona.

Una vez aislada la testosterona de la placa fina, se forman acetatos para hacerla volátil y no se adhiera a la columna, se suspende en un solvente adecuado para someterlo a la cromatografía de gas-líquido y por cuantificación de las áreas de los picos en los cromatogramas, relacionándolos con el porcentaje de recuperación en centelleo líquido, obtenemos los valores de la testosterona en ug/vol. total de orina en 24 horas.

2.- MATERIAL:

Anillo de fierro.

Columna de vidrio para cromatógrafo de gas en espiral (de 3 pies de longitud y 4 mm de diámetro interno).

Embudos de separación de 250 ml.

Embudos de filtración.

Frascos vial estandar para centelleo.

Jeringa Hamilton de 25 ul.

Matraces erlenmeyer de 125 y 250 ml.

Matraces aforados de 5, 25, 100 y 1000 ml.

Micropipetas.

Papel Whatman No. 1.

Pipetas de 5, 10 y 25 ml.

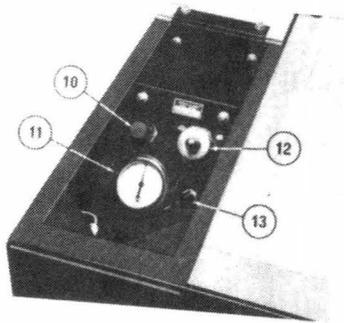
Pipetas Pasteur.

Placas de vidrio (para cromatografía de placa fina).

Probetas de 25, 50, 100 y 250 ml.

Soporte universal.

Termómetro.

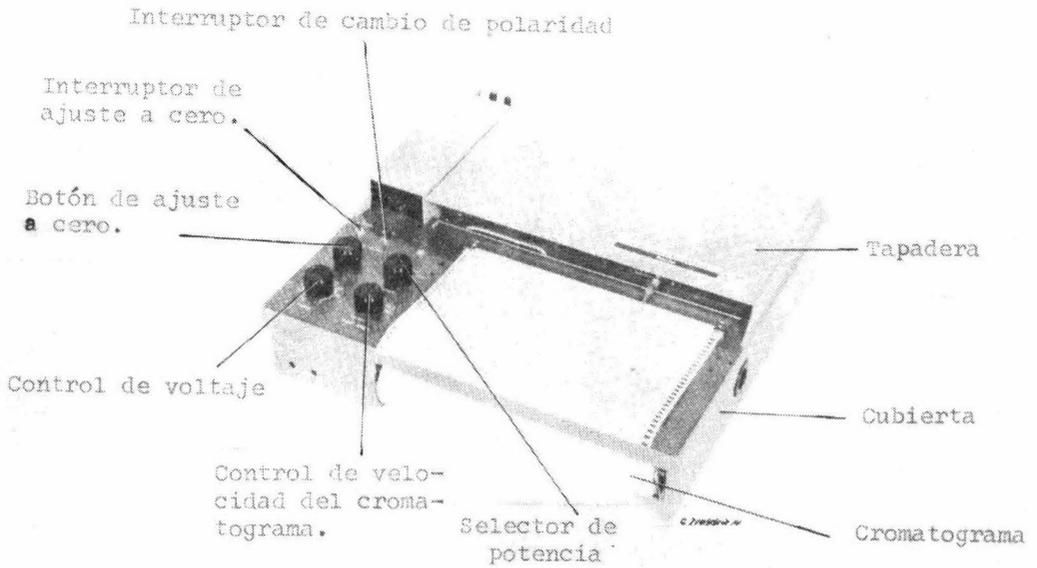


DETALLES QUE MUESTRAN LOS CONTROLES
BAJO LA CUBIERTA DEL GAS ACARREADOR
(3) CON UN CONTROL ACCESORIO DE PRE
SION DEL GAS ACARREADOR.

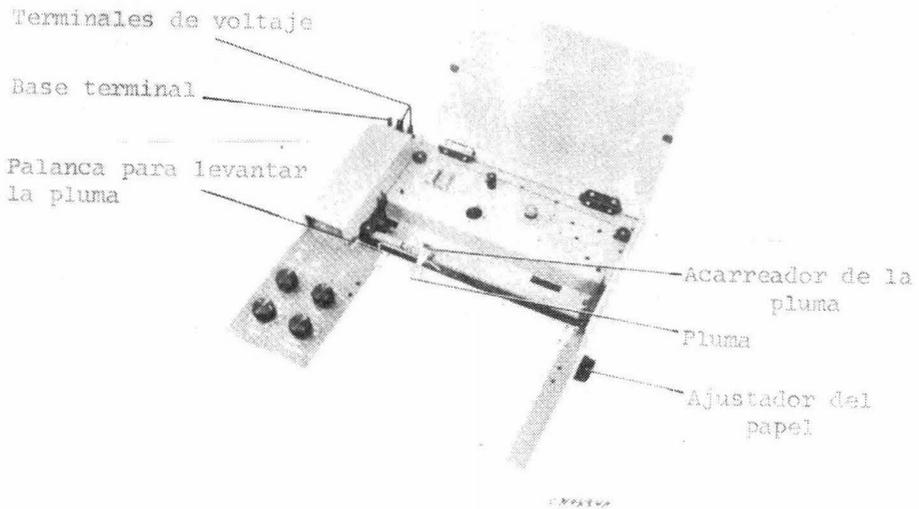


- 1.- Control de flujo. Columna A
- 2.- Control de flujo. Columna B
- 3.- Tapadera del control del gas acarreador.
- 4.- Canal del Inyector B.
- 5.- Canal del Inyector A.
- 6.- Tapadera del Horno.
- 7.- Canal del Detector de Flama A.
- 8.- Canal del Detector de flama B.
- 9.- Tablero frontal.
- 10.- Control auxiliar del gas.
- 11.- Calibrador de presión del gas.
- 12.- Regulador de presión del gas - acarreador.
- 13.- Control de paso para la columna A.
- 14.- Detector de Ionización de flama (Cubierta).

CUBIERTAS, CONTROLES E INDICADORES NO MARCADOS EN LOS TABLEROS DEL
MODELO 900



VISTA EXTERNA DEL REGISTRADOR MODELO 56



CONSTRUCCION INTERNA DEL REGISTRADOR MODELO 56

Tubos de centrifuga de 15 y 50 ml.

Vasos de precipitado de 10, 100 y 250 ml.

3.- EQUIPO:

Balanza analítica.

Baño María a 40-50°C.

Bomba de vacío.

Contador de centelleo (Packard Tri-Carb Modelo 3375).

Cromatógrafo de gas (Perkin Elmer 900).

Estufa a 37°C.

Lámpara ultravioleta.

Registrador (Perkin Elmer 56).

4.- REACTIVOS:

Acetato de etilo.

Acetona.

Acido acético glacial.

Acido clorhídrico.

Acido sulfúrico.

Alcohol etílico.

Alcohol metílico.

Benceno.

Cloroformo.

Cromosorb (WA. de malla 80/100).

Diclorometano.

Dimetilclorosilano.

Eter.

Formamida.

Hexano.

Hidróxido de potasio.

Hidróxido de sodio.
Ketodase (B-glucuronidasa).
Metilal. (Formaldehido dimetil acetal).
OV225 (Ciano propil metil fenil metil silicón).
POPOP (1,4-Bis(2(5-feniloxazolil)benceno)).
PPO (2,5-difeniloxazol).
Reactivo T de Girard.
Sílica gel.
Sílica gel G.
Testosterona H³.
Tolueno.

5.- PREPARACION DE LOS REACTIVOS:

- a) Acido sulfúrico al 50%.
Acido sulfúrico conc.....50 ml.
Agua destilada c.b.p.....100 ml.
- b) Acido acético 1 N.
Acido acético glacial.....57.6 ml.
Agua destilada c.b.p.....1000 ml.
- c) Acetato de sodio al 15%.
Acetato de sodio.....15 g.
Agua destilada c.b.p.....100 ml.
- d) Alcohol metílico al 80%.
Alcohol metílico.....80 ml.
Agua destilada c.b.p.....100 ml.
- e) Hidróxido de sodio 1 N.
Hidróxido de sodio.....40 g.
Agua destilada c.b.p.....1000 ml.
- f) Hidróxido de sodio 2 N.
Hidróxido de sodio.....80 g.
Agua destilada c.b.p.....1000 ml.
- g) Líquido centelleante.

POPOP.....50 mg.
PPO..... 4 g.
Tolueno destilado c.b.p. 1000 ml.
Disolver por separado en tolueno el POPOP y PPO

h) Reactivo T de Girard.

Reactivo T de Girard.....20 mg.
Alcohol metílico al 80%..... 1 ml.
Acido acético glacial..... 1 ml.
Reposar toda la noche.

i) Solución amortiguadora de acetatos pH 5.

Acetato de sodio al 15%.....150 ml.
Acido acético 1 N.....105 ml.

j) Solución patrón de testosterona H³.

La solución patrón de TH³ contiene 30000 cpm/0.1 ml. Diluir 1:10 con etanol redestilado para tener 3000 cpm/0.1 ml.

k) Preparación de placas.

Sílica gel G..... 25 g.
Agua destilada..... 50 ml.
Calibrar el grueso a 0.25 mm. Disolver la sílica gel G en agua, verterla dentro del canal preparado con el equipo y correr la placa rápidamente. Dejar secar y llevar la placa a activar por 2 horas a 120° C.

l) Preparación de la columna OV225 al 3%.

OV225.....150 mg.
Cromosorb..... 5 g.
Cloroformo..... 10 ml.
Disolver el OV225 en 10 ml de cloroformo y mezclarlo con el cromosorb. Agitar suavemente durante 30 minutos, evaporar a sequedad.
Lavado de la columna.-Llenar la columna con acetona y remover con vacío; llenar con hidróxido de potasio al 1%, reposar durante 5 minutos, remover el hidróxido de potasio y lavar con agua destilada. Lavar tres veces con metanol y una vez con tolueno. Preparar una solución de dimetil clorosilano al 15% con tolueno. Llenar la columna con esta solución y reposar durante 5 minutos.

tos. Secar lavando dos veces con tolueno. Lavar después con metanol; dejar en el horno la columna durante 30 minutos a 80°C. Enfriarla y llevarla con el sistema adecuado.

m) Solución de dimetilclorosilano al 15%.

Dimetilclorosilano..... 5 g.
Tolueno c.b.p.....100 ml.

n) Hidróxido de potasio al 1%.

Hidróxido de potasio..... 1 g.
Agua destilada c.b.p.....100 ml.

6.- PROCEDIMIENTO:

1.- Hidrólisis.

1.1- A 100 ml de orina ajustar el pH a 5 con ácido sulfúrico al 50%, agregar 5 ml de una solución amortiguadora de acetatos 0.1 M, para mantener estable el pH.

1.2- Adicionar 12 ml de B-glucuronidasa, ya que la testosterona en orina se encuentra en forma de sales (glucuronidatos y sulfatos) - solubles en agua.

1.3- Incubar a 37°C durante 96 horas.

2.- Extracción.

2.1- Agregar 250 ml de éter dividido en tres porciones con lo cual se extraen la testosterona libre y otros esteroides.

2.2- Lavar tres veces con 15 ml de hidróxido de sodio 2 N para precipitar los estrógenos.

2.3- Lavar tres veces con 7.5 ml de agua destilada para eliminar el residuo alcalino.

2.4- Evaporar a sequedad bajo corriente de nitrógeno y a una temperatura de 40-50°C.

3.- Separación de Girard.

3.1- Agregar 20 mg de Reactivo T de Girard, 1 ml de alcohol metílico al 80% y 1 ml de ácido acético glacial. Con objeto de aislar los esteroides en estado puro. El reactivo se combina con las sustancias cetónicas incluso con los 17-cetoesteroides, formando las respectivas hidrazonas -- con un grupo polar que las hace solubles en agua. Reposar toda la noche.

3.2- Transferir el extracto a un embudo de separación con cinco porciones de 10 ml de agua helada.

3.3- Neutralizar con 15 ml de hidróxido de sodio 1 N.

3.4- Lavar con 5 porciones de 10 ml de diclorometano frío, sin desechar la solución acuosa; para separar los compuestos insolubles en agua y las breas.

3.5- Lavar el diclorometano con 5 ml de agua (de sechar el diclorometano) y adicionar los 5 ml de agua a la solución acuosa.

3.6- Agregar 2 ml de ácido clorhídrico conc. para ajustar a pH de 1. Reposar de 2-3 horas a temperatura ambiente. Esta hidrólisis se hace con el fin de dejar libre la testosterona y otros esteroides cetónicos.

3.7- Extraer 5 veces con 20 ml de diclorometano. Lavar 2 veces con 10 ml de agua destilada.

3.8- Evaporar a sequedad bajo corriente de nitrógeno y a una temperatura de 40-50°C.

4.- Purificación.

4.1- Suspender con 20 ul de acetona. Aplicar sobre una placa de sílica gel G el extracto, correr junto con este una solución patrón de testosterona.

4.2- Colocar la placa dentro de una cámara saturada con un sistema benceno:acetato de etilo (3:2).

4.3- Revelar con luz ultravioleta.

4.4- Raspar y eluir con acetona triplemente destilada.

5.- Cromatografía de gas-líquido.

5.1- Formar acetatos con 0.1 ml de anhídrido acético y 0.2 ml de piridina. Dejar reposar toda la noche. Evaporar a sequedad.

5.2- Suspender en 20 ul de acetona, inyectar al cromatógrafo 1 ul junto con un estándar interno de estriol, en un tipo de columna SE30 de una temperatura de 240-245°C y a una temperatura de inyección de 310-325°C.

METODO DE FUTTERWEIT MODIFICADO

Procedimiento: Los pasos 1.1 y 1.2 son los mismos que en la técnica original.

1.2.1.- Agregar 0.1 ml de testosterona H³.

Los pasos 1.3, 2.1, 2.2, 2.3 y 2.4 son iguales.

2.4.1.- Suspender con 30 ml de éter y lavar bien las paredes del matraz. Pasar a un tubo cónico. Evaporar a sequedad.

Seguir la separación de Girard (3.1, 3.2, 3.3, 3.4, - 3.5, 3.6, 3.7 y 3.8).

3.8.1.- Transferir con 15 ml de éter frío a un tubo cónico (lavar bien las paredes).

3.8.2.- Evaporar a sequedad, bajo corriente de nitrógeno y a una temperatura de 40-50°C.

4.1.- Suspender el extracto con 3 gotas de benceno y 3 gotas de metanol con una pipeta Pasteur (lavar bien las paredes del tubo).

4.2.- Aplicar sobre una placa de sílica gel G en una sola mancha (3 veces), aplicar también una solución patrón de testosterona.

El paso 4.3 es el mismo.

4.4.- Extraer con vacío y eluir con 10 ml de metanol.

4.5.- Evaporar bajo corriente de nitrógeno y a una temperatura de 40-50°C.

4.6.- Suspender con 1 ml de metanol y tomar una alícuota de 0.1 ml, pasar a un frasco vial. Evaporar a sequedad.

4.7.- Agregar 15 ml de líquido centelleante y llevar a Contador de centelleo.

5.1.- Evaporar el remanente y formar acetatos igual que en la técnica original (pasos 5.1 y 5.2). Condiciones del cromatógrafo: columna OV225 al 3% y a una temperatura de 255°C, temperatura del inyector 300°C y temperatura del detector 300°C.

R E S U L T A D O S

TABLA No. 1

DETERMINACION DE TESTOSTERONA EN SUJETOS MASCULINOS
(GRUPO 1)

No. de Pacientes	Edad	ug/24 horas
1	16	68.0
2	16	59.0
3	16	64.6
4	16	70.6
5	16	112.0
6	17	58.0
7	17	44.0
8	17	64.0
9	18	189.0
10	18	78.2
11	19	43.0
12	19	61.0
13	19	45.0
14	20	19.0
15	20	109.0
16	21	36.0
17	23	33.0
18	23	70.0
19	23	29.0
20	24	12.0
21	24	103.0
22	24	77.0
23	24	54.0
24	24	34.0
25	24	64.0
26	25	77.0
27	25	71.0
28	25	78.0

TABLA No. 2

DETERMINACION DE TESTOSTERONA EN SUJETOS MASCULINOS
(GRUPO 2)

No. de Pacientes	Edad	ug/24 horas
1	26	44
2	26	54
3	26	41
4	27	54
5	27	35
6	27	121
7	28	48
8	29	52
9	32	98
10	32	40
11	32	87
12	33	26
13	35	34

TABLA No. 3

DETERMINACION DE TESTOSTERONA EN SUJETOS MASCULINOS
(GRUPO 3)

No. de Pacientes	Edad	ug/24 horas
1	36	39
2	39	45
3	40	15
4	40	65
5	42	85
6	43	36
7	44	34
8	44	17
9	44	54
10	45	46
11	45	24

TABLA No. 4

DETERMINACION DE TESTOSTERONA EN SUJETOS MASCULINOS
(GRUPO 4)

No. de Pacientes	Edad	ug/24 horas
1	46	43.0
2	48	47.0
3	49	13.5
4	52	55.0
5	53	40.0
6	54	20.0
7	54	8.5
8	55	23.0

TABLA No. 5

DETERMINACION DE TESTOSTERONA EN SUJETOS MASCULINOS
(GRUPO 5)

No. de Pacientes	Edad	ug/24 horas
1	56	33.0
2	57	12.0
3	57	7.5
4	58	16.0
5	60	23.0
6	60	34.0
7	60	14.0
8	62	26.0
9	62	17.0
10	63	16.0
11	63	30.0
12	64	20.0
13	65	18.0
14	65	10.0

TABLA No. 6

DETERMINACION DE TESTOSTERONA EN SUJETOS MASCULINOS
(GRUPO 6)

No. de Pacientes	Edad	ug/24 horas
1	66	8
2	67	15
3	67	32
4	68	7
5	68	28
6	68	26
7	70	12
8	70	10
9	72	8
10	73	3
11	75	10

TABLA No. 7

DETERMINACION DE TESTOSTERONA EN SUJETOS MASCULINOS
(GRUPO 7)

No. de Pacientes	Edad	ug/24 horas
1	76	26
2	77	25
3	77	22
4	80	27
5	83	13
6	84	6
7	85	13
8	85	11

. TABLA No. 8

MICROGRAMOS DE TESTOSTERONA EN 24 HORAS			
EDAD EN AÑOS	MEDIA D. E.*	P**	
16 - 25	65.2 ± 30.8		
26 - 35	56.5 ± 27.3		P < 0.25
36 - 45	41.8 ± 20.0		P < 0.25
46 - 55	31.2 ± 16.0		P < 0.01
56 - 65	19.7 ± 8.4		P < 0.25
66 - 75	19.8 ± 16.7		P < 0.40
76 - 85	23.6 ± 11.4		P < 0.30

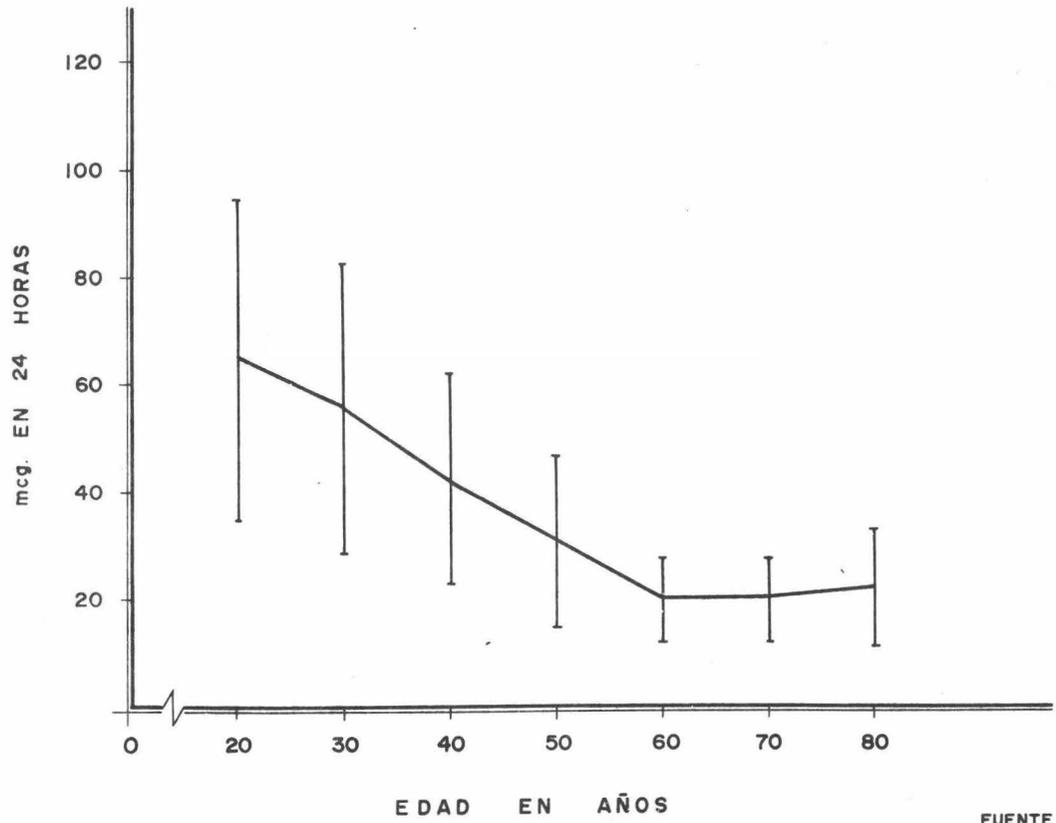
* D.E. = DESVIACION ESTANDAR

** P. = PROBABILIDAD DE LA PRUEBA DE "t" DE STUDENT.

FUENTE:

C.H. 20 DE NOVIEMBRE
ISSSTE

TESTOSTERONA URINARIA



FUENTE: C.H. 20 DE NOVIEMBRE
ISSSTE

TABLA No. 9

CROMATOGRAFIA EN PLACA FINA

ESTANDAR	ST.	1		2		Rf		MEDIA Rf
		F.SOLV.	ST.	F.SOLV.	ST.	1	2	
11BHE	2.6	16	2.9	19.35	0.162	0.149	0.156	
11BHA	5.0	16	4.6	19.35	0.312	0.237	0.275	
TEST	6.0	16	5.5	19.35	0.375	0.286	0.330	
ETIO	6.5	16	6.7	19.35	0.406	0.346	0.376	
EPI	7.1	16	7.1	19.35	0.408	0.369	0.404	
DHEA	7.5	16	8.1	19.35	0.468	0.418	0.443	
AND	8.0	16	8.1	19.35	0.503	0.421	0.462	
DHIA	8.2	16	8.0	19.35	0.512	0.413	0.462	

silica gel

2 sistemas: Metilal:Metanol:Tolueno y Metanol:Tolueno

TABLA No. 10

CROMATOGRAFIA EN PLACA FINA

ESTANDAR	ST.	1		2		Rf		MEDIA Rf
		F.SOLV.	ST.	F.SOLV.	ST.	1	2	
11BHE	3.0	17.4	3.0	16.4	0.172	0.182	0.177	
11BHA	4.2	17.4	4.4	16.3	0.241	0.269	0.255	
TEST	5.2	17.4	6.0	16.5	0.298	0.463	0.330	
ETIO	6.2	17.4	6.4	16.2	0.356	0.395	0.375	
EPI	7.0	17.4	7.4	16.5	0.402	0.448	0.425	
DHEA	8.0	17.4	7.8	16.0	0.459	0.487	0.473	
AND	8.0	17.4	8.2	16.5	0.459	0.496	0.477	
DHIA	8.2	17.4	8.3	15.8	0.471	0.528	0.499	

Sílica gel G

Sistema: Acetato de etilo:Benceno

TABLA No. 11

CROMATOGRAFIA EN PLACA FINA

ESTANDAR	ST.	1	ST.	2	Rf		MEDIA
		F.SOLV.		F.SOLV.	1	2	Rf
11BHE	0.9	15.3	0.7	14.9	0.058	0.046	0.052
11BHA	2.2	15.3	2.1	14.9	0.143	0.140	0.141
ETIO	3.0	15.1	3.0	15.2	0.198	0.197	0.197
TEST	4.0	14.9	4.1	14.8	0.268	0.283	0.275
AND	4.3	15.2	4.4	14.8	0.282	0.297	0.289
EPI	4.7	15.3	5.0	14.9	0.307	0.335	0.321
DHEA	5.0	15.0	5.2	15.4	0.333	0.337	0.335
DHIA	5.1	14.7	5.2	15.3	0.346	0.339	0.342

Alúmina T

Sistema: Acetona:Benceno

TABLA No. 12

CROMATOGRAFIA EN PAPEL

ESTANDAR	1		2		3		Rf			MEDIA Rf
	ST.	F.SOLV.	ST.	F.SOLV.	ST.	F.SOLV.	1	2	3	
11BHE	0.8	38.4	0.6	37.3	0.6	37.2	0.020	0.016	0.016	0.017
11BHA	0.9	37.4	0.9	36.5	1.0	36.0	0.024	0.024	0.027	0.025
TEST	5.5	36.0	6.0	38.0	6.4	35.5	0.152	0.157	0.180	0.103
DHIA	14.5	38.2	13.3	36.3	13.5	36.2	0.379	0.366	0.372	0.372
DHEA	15.1	37.6	13.4	36.4	13.9	35.9	0.401	0.368	0.387	0.385
EPI	14.8	36.7	13.6	37.5	14.9	36.5	0.394	0.362	0.408	0.388
ETIO	16.5	37.8	14.8	37.2	16.5	37.0	0.436	0.397	0.445	0.426
AND	19.8	37.5	19.3	36.8	19.6	36.6	0.528	0.532	0.535	0.531

Sistema de Zaffaroni: Fase móvil: Hexano:Benceno, Fase Fija: Formamida

.TABLA No. 13
REPRODUCIBILIDAD

No.	ug/24 hrs.	d*	No.	ug/24 hrs.	d*
1.	72.2	2.7	13	9.7	2.3
2	69.5		14	7.4	
3	35.3		15	28.4	
4	33.1	2.2	16	25.5	2.9
5.	55.7		17	12.8	
6	53.0	2.7	18	12.4	0.4
7	41.9		19	27.6	
8	38.0	3.9	20	22.7	4.9
9	38.8		21	11.7	
10	33.5	5.3	22	9.4	2.3
11	103.8		23	17.0	
12	102.2	1.6	24	13.5	3.5

d* = Diferencia entre los ensayos por duplicado.

CALCULOS:

$$\text{Fórmula } \sigma = \sqrt{\frac{\sum d^2}{2N}}$$

$$\sum d^2 = 120.49$$

$$2N = 24$$

$$= \sqrt{\frac{120.49}{24}} = \sqrt{5.02} = \pm 2.24$$

TABLA No. 14

No.	RECUPERACION %	No.	RECUPERACION %
1	37.71	21	49.36
2	37.97	22	42.44
3	48.92	23	39.90
4	39.88	24	40.40
5	46.09	25	51.90
6	47.96	26	40.91
7	48.04	27	45.37
8	59.61	28	37.97
9	50.41	29	39.38
10	37.70	30	58.58
11	70.20	31	40.26
12	48.26	32	68.54
13	52.90	33	70.84
14	47.70	34	52.33
15	38.42	35	40.12
16	38.94	36	53.85
17	40.75	37	46.94
18	37.75	38	47.41
19	52.74	39	47.92
20	49.05	40	41.57

CALCULOS

Fórmula:

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

σ = Desviación estandar

$$\sum X^2 = 92043.01 \div 40 = 2301.07$$

$$(\sum \bar{X})^2 = 1886.99 \div 40 = (47.17)^2 = 2225$$

$$\sqrt{76.07} = \pm 8.7$$

$$\text{RECUPERACION} = 47.17 \pm 8.7$$

Con un rango entre 37-70%

$$E_s = \sqrt{\frac{(\bar{X} - X)^2}{N(N-1)}} = \sqrt{\frac{5270}{1560}} = \sqrt{3.37} = \pm 1.83$$

$$E_s = \text{ERROR ESTANDAR} = \pm 1.83$$

$$CV = \frac{\sigma}{N} \times 100 = \frac{8.7}{40} \times 100 = 21.75$$

$$CV = \text{COEFICIENTE DE VARIABILIDAD} = 21.75$$

En la determinación de testosterona en grupos de su jetos masculinos de diferentes edades de acuerdo a las tablas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8, se exponen los resultados obtenidos de testosterona urinaria en las diferentes décadas estudiadas, la desviación estandar y los resultados de la prueba T de Student al comparar cada década con las demás, con la probabilidad de diferencia o similitud.

Los valores más altos se obtuvieron en la primera década estudiada, pero no fueron diferentes de la segunda y tercera década en estudio, ya que P varió entre 0.2 y 0.25 por lo que estas tres décadas se comportaron como un grupo de la misma manera al comparar la cuarta, quinta, sexta y séptima década del estudio entre sí, mostraron ser semejantes, ya que P varió entre 0.1 y 0.4. Al comparar las tres primeras individualmente o por grupo, contra las cuatro últimas, exhibieron ser diferentes ya que P varió entre 0.01 a 0.005.

En la gráfica 1 se muestra la curva de medias obtenidas en las diferentes décadas con su desviación estandar y se puede observar la disminución progresiva desde la primera década estudiada hasta los 60 años a partir de donde permanece constante.

En la gráfica 2 se muestran los resultados individuales de la testosterona urinaria, en ella se puede apreciar la gran dispersión que existe de sujeto a sujeto aún de la misma edad, a pesar de esto la línea de regresión es significativa, $Y = 67.3 + (-1.28 X)$ y $r = -0.76$.

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

ESPECIFICIDAD.- La especificidad fué probada con orina de un niño de 7 años, en donde el cromatograma obtenido no mostró pico de elución en el tiempo de retención característico para testosterona. Al ser analizadas mues--tras de orina de un sujeto adulto normal, el resultado obtenido fué un pico con el mismo tiempo de retención del -estandar.

En las tablas No. 9, 10, 11 y 12, se muestra que la testosterona se separa totalmente de otros andrógenos, -tanto en cromatografía en papel como en cromatografía en capa fina.

REPRODUCIBILIDAD.- Los resultados de 12 determinaciones por duplicado en orinas de sujetos adultos indicaron que la testosterona era determinada con un error de ± 2.2 como se representa en la tabla No. 13.

SENSIBILIDAD.- El límite más bajo de sensibilidad para la medida de testosterona fué de 2 ug en un volumen de orina de 24 horas.

RECUPERACION.- En la tabla No. 14, se indican los resultados obtenidos en porciéto siendo el promedio de recuperación de 47.14% y una desviación estandar de ± 8.7 .

RESOLUCION DE LOS CROMATOGRAMAS

Fórmula:

$$\frac{\text{Distancia de Retención del St. de Testosterona}}{\text{Distancia de Retención del St. de Estriol}} = \frac{\text{Distancia Relativa de Retención}}{\text{Retención}}$$

Dist. de Retención del St. de Test. = 3.85 cm.

Dist. de Retención del St. de Estriol = 8.35 cm.

Sustituyendo:

$$\frac{3.85}{8.35} = 0.46$$

D.R.R. x D.R. del St. interno (Estriol) = Dist. de Ret. de la Testosterona.

$$0.46 \times 8.0 = 3.6 \text{ cm.}$$

Aplicando el método de triangulación se sacan las áreas de los siguientes picos: testosterona y estandar interno (estriol).

$$A = \frac{1}{2} B H \quad \begin{array}{l} B = \text{base} \\ H = \text{altura} \end{array}$$

Area de la testosterona = 136

Area del St. interno = 214

Para obtener la concentración del problema se sigue la siguiente fórmula:

$$\frac{A (\text{problema})}{A (\text{St. interno})} \times \text{Conc. St.} \times \frac{\text{Vol. total}}{\text{Alícuota}} = \text{Conc. del problema.}$$

Conc. del St. = 3 ug

Vol. total = 1540ml

Alícuota = 100ml

Sustituyendo:

$$\frac{136}{214} \times 3 \times \frac{1540}{100} = 29.12$$

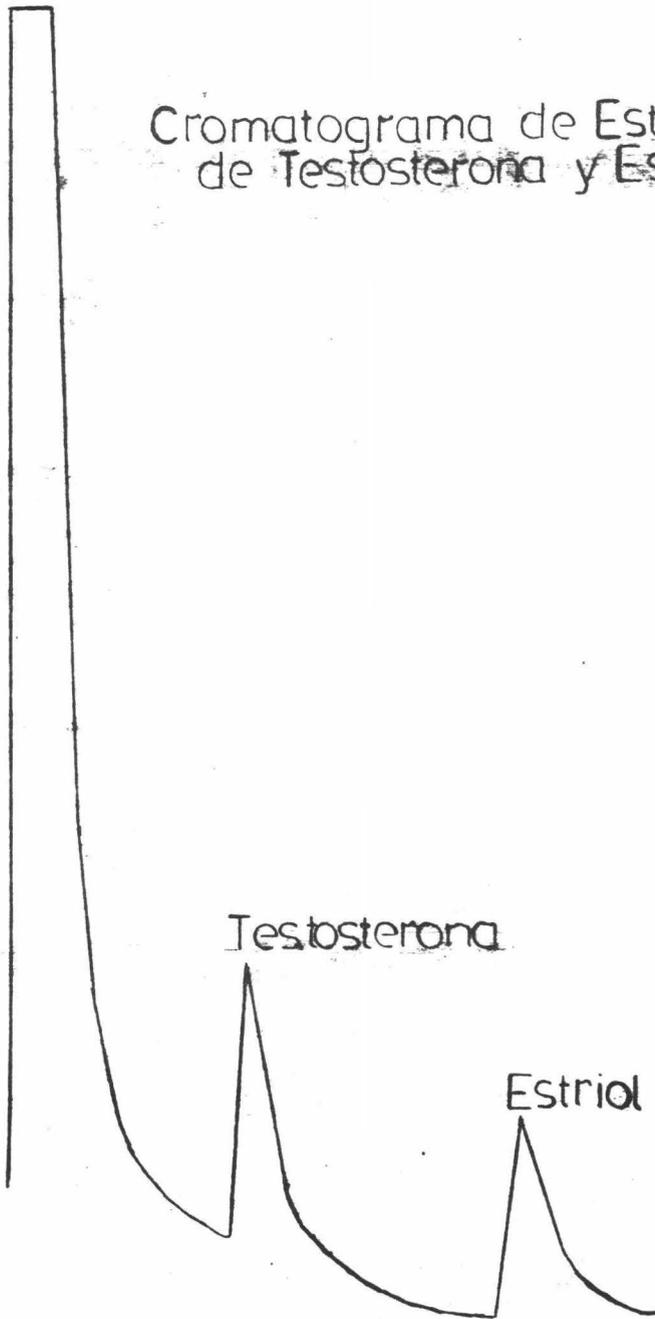
Relacionando la concentración obtenida de la testosterona con el porciento de recuperación tenemos:

$$29.12 - 50\%$$

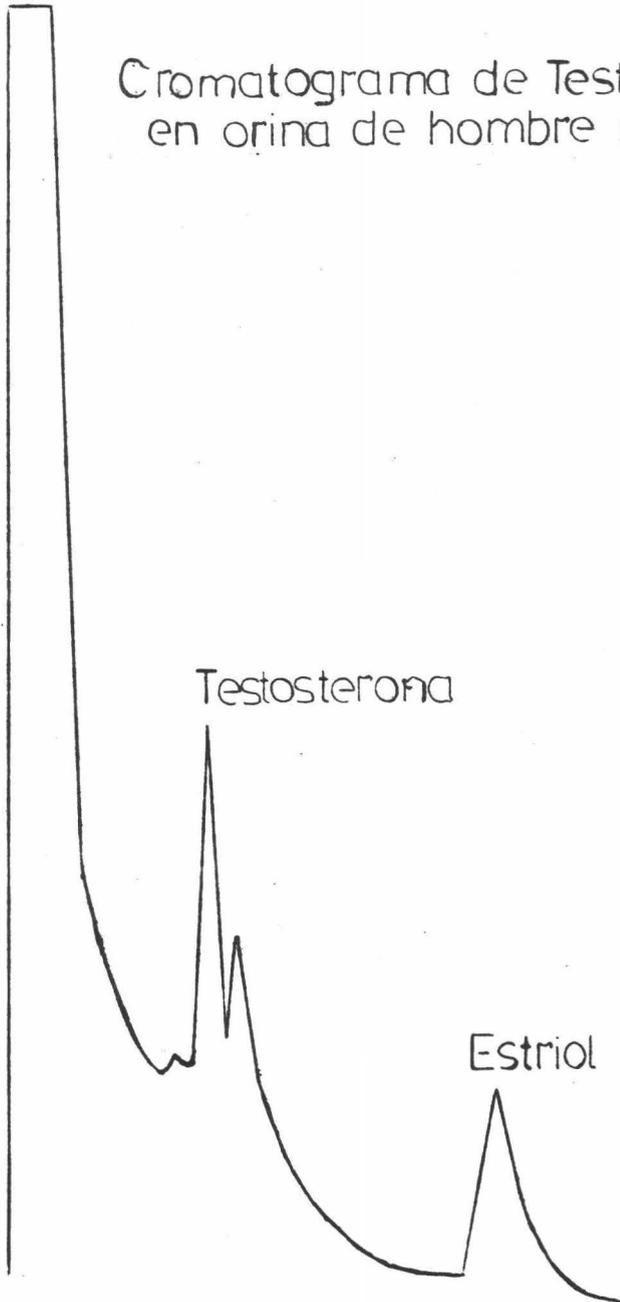
$$x - 100$$

x = 58 ug de testosterona en volumen de 24 horas.

Cromatograma de Estándares
de Testosterona y Estriol



Cromatograma de Testosterona
en orina de hombre normal.



DISCUSION Y CONCLUSIONES

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Todo método aplicable tanto a la práctica rutinaria o de investigación debe cumplir con los requisitos de - confiabilidad conociendo su especificidad, sensibilidad, recuperación y reproducibilidad.

Se hizo el estudio de un método analítico para la - determinación de testosterona en orina humana y se plantearon diferentes experimentos con objeto de establecer la confiabilidad del método propuesto.

La especificidad del método está demostrada al no - encontrar testosterona en la orina de un sujeto prepúber del sexo masculino y no haber obtenido ningún pico con - un tiempo de retención similar al que presentaría un estandar de testosterona bajo las mismas condiciones analí - ticas. Se comprobó que la cromatografía de papel y capa fina separan perfectamente la testosterona de otros an - drógenos que pueden interferir en su determinación, así al analizar ocho muestras de orina de un hombre normal, - combinando estas técnicas de separación con diferentes - medios de soporte y sistemas de solventes, al ser inyec - tados en el cromatógrafo en forma acetilada, aparecía un pico con un tiempo de retención igual al estandar de ace - tato de testosterona.

Por lo que respecta a la sensibilidad esta es acep - table como lo demuestra el hecho de poder medir cantida - des de 20 nanogramos.

La recuperación de nuestro método se estableció en - tre un rango de 37 a 70% siendo esta aceptable al ser com - parada con la obtenida por Futterweit.

El método es reproducible ya que se obtuvo un error de ± 2.2 .

Desde el punto de vista clínico se conoce que la actividad androgénica disminuye después de la cuarta o quinta década de la vida, es por esto que ha sido de interés desde el inicio de las determinaciones hormonales conocer los cambios que suceden conforme se avanza hacia la senectud; la testosterona disminuye significativamente después de los 45 años. La gran dispersión obtenida en la testosterona en relación a la edad fué semejante a otras obtenidas por otros autores en la orina o en sangre como testosterona libre o total por diferentes métodos: cromatografía de gas o doble dilución isotópica.

Por lo anteriormente expuesto y por los datos obtenidos podemos pensar que el método reúne las cualidades de confiabilidad, dadas por la especificidad, sensibilidad, recuperación y reproducibilidad.

RESUMEN

1.- Se tratan generalidades sobre:

- a) Química de la Testosterona
- b) Biosíntesis
- c) Catabolismo
- d) Acción biológica
- e) Cromatografía: gas, papel y capa fina.

Al mismo tiempo se revisan otros métodos empleados para su determinación.

2.- Se hace una descripción de la técnica original de Fu tterweit y la modificación hecha por nosotros.

3.- Se da una serie de resultados obtenidos en las diferentes décadas de los grupos estudiados, de acuerdo a las tablas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8, se reportan los valores de excreción dados en $\mu\text{g}/24$ horas, se hace un análisis estadístico obteniendo la media y desviación estandar, una comparación de cada grupo contra los demás por medio de la T de Student. Se grafican las medias con su desviación estandar y los resultados individuales de la testosterona urinaria.

4.- De acuerdo a las tablas 9, 10, 11, 12, 13 y 14, damos la especificidad, reproducibilidad, recuperación del método.

5.- Se hace una breve discusión sobre la confiabilidad del método y los resultados obtenidos.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Abbott D y Andrews R.S.: An introduction to chromatography. 2d. Ed., Ongmans, Green and Co. LTD. London, 1970
- 2.- Bacharach G.: Hormones in blood. 2d. Ed. Academic Press, London-New York. 1967.
- 3.- Bradlow F., Dobriner y Gallagher. 1954. J. Biol. Chem. 206, 863
- 4.- Brooks R.V.: A method for the simultaneous estimation of testosterone and epitestosterone in urine. Steroids 4, 117. (1964).
- 5.- Camacho A.M. y Migeon C.J.: Isolation, identification and quantitation of testosterone in the urine of normal adults and impatients with endocrine disorders. J.Clin. Endocr. 23, 301 (1963).
- 6.- Conn E.E. y Stumpf P.K.: Outlines of Biochemistry. 2d. Ed. Wiley, New York, 1966. Traducción de la primera edición en inglés de 1963: Bioquímica fundamental,. Limusa-Wiley, México, 1965.
- 7.- Charransol G., Bobas F., Mason, Guillemant S. y - Mauvais-Jarvis P.: Gas-Chromatographic determination of androstanediol and testosterone in the urine of normal adults. J. Chromatographic. Sept. 23 (1971).
- 8.- Eik-Nes K.B. y Horning E.C.: Gas phase choromato—graphy of Steroids. Ed. Springer-Verlag. New York Inc. 1968.
- 9.- Fieser F.L. y Fieser Mary: Química Orgánica. 2a. -

Ed. Editorial Grijalbo S.A. México, D.F. 1960.

10.- Futterweit W., Mc Niven N.L., Narcus L, Lantos G., Drosdowsky y Dorfman R.I.: Gas chromatography determination of testosterone in human urine. Steroids 1, 628 (1963).

11.- Futterweit E., Siegel G.L., Freeman R., Griboff S. I., Drodowsky M., Gibree N., Dorfman B.I., Soffer.: Gas chromatography of steroids in biological fluids. M.B. - Lipsett Ed. New York.

12.- Harper H.A., PhD: Review of physiological chemistry. Lange medical publications. Los Altos California. (1969).

13.- Hermann J.A., Irving H., Rosenthal I., Suttle J.F.: Separation methods in analytical chemistry. 2d. Ed. Interscience publishers a division of John Wiley & Sons. - New York, London, Sydney. December (1966).

14.- Ibayashi H., Nakamura M., Murakawa S., Uchikawa T., Tanioka T., and Nakao K.: The determination of urinary - testosterone using thin-layer chromatography and gas chromatography. Steroids. 3, 559 (1964).

15.- Mc. Nair H.M., y Bonelli B.J.: Basic gas chromatography. Lithographed by consolidated printers, Berkeley, California. (1969).

16.- Neher R.: Steroid chromatography. Elsevier Publishing Company. Amsterdam, London, New York. (1964).

17.- Orten J.M. PhD, Neuhans Otto W.: Biochemistry. 8d.Ed. The C.V. Mosby Company. Saint Louis. (1970).

18.- Sandberg D.H., Ahmad N., Cleveland W.W. y Sarvard K.: Measurement of urinary testosterone by gas-liquid chromatography. Steroids 4, 557, (1964).

19.- Willard H.H., Merritt Lyne L., Dean John A.: Métodos instrumentales de análisis. 4a. Ed. Compañía editorial continental S.A. (1965).