



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

METODOS ANALITICOS EN EL ANALISIS DE ESTEROIDES

TRABAJO MONOGRAFICO DE ACTUALIZACION

QUE PARA OBTENER EL TITULO
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

PRESENTA

JAHIR BAUTISTA GONZALEZ



MEXICO, D. F.



**EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA**

JUNIO 2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Jurado asignado:

Presidente Prof. Pedro Villanueva González

Vocal: Prof. Consuelo Ayala Mondragón

Secretario Prof. Elba Rojas Escudero

1er. Suplente Prof. Jose Manuel Morales Hernández

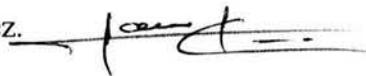
2º. Suplente Prof. María de Lourdes Cervantes Ayala

Sitio donde se desarrollo el tema: Laboratorio 224, Departamento de Química Orgánica,
División de estudios de Posgrado.

Nombre de la Asesora: M. en C. Elba Rojas Escudero.



Nombre del sustentante: Jahir Bautista González.



“Gracias Dios por la perseverancia y paciencia que me hiciste tener para la culminación de una de mis metas”

Dedico este trabajo a:

Mis Padres, El Dr. Luis Bautista Cruz y a la Sra. Carmen González González por todo el apoyo que me brindaron.

Papá, felicidades en este tu 60 aniversario de experimentar vida.

Mamá, gracias por todo tu apoyo y comprensión.

A Sarahí por ser una pequeña luz en mi camino.

A mis hermanos, Julián, Javier, Luis, Roy, Giovanni y Yasmín. Espero que sigamos siendo ejemplo de dedicación y perseverancia los unos a los otros.

A Neftalí donde quiera que te encuentres.

A mis primos Christyan, Jessica y mi tía Mago, por su apoyo incondicional.

Quiero agradecer a mi asesora, la M. en C. Elba Rojas Escudero por sus consejos, su paciencia, dedicación y enseñanza que me brindó durante el desarrollo de este trabajo.

Agradezco también a la Q. Patricia Elizalde Galván por sus consejos y enseñanza que en su debido momento me ofreció.

En general doy gracias a todos mis profesores, todos ellos diferentes en personalidad, y que aprendí lo mejor de cada uno.

Quiero compartir este logro con todos mis amigos y compañeros de la Facultad de Química.

LISTA DE ABREVIATURAS

AIF: Análisis por Inyección de Flujo
CCECM: Cromatografía Capilar Electrocinética Micelar
CCF: Cromatografía en Capa Fina
CCFAE: Cromatografía en Capa Fina de Alta Eficiencia
CECME: Cromatografía Electrocinética de Microemulsión.
CG: Cromatografía de Gases
CGC: Cromatografía de Gases Capilar
CG-EM: Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas
CL: Cromatografía de Líquidos
CLAE: Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia
CLAE-EM: Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia-Espectrometría de Masas
CLAE-EM-EM: Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia-Espectrometría de Masas-
Espectrometría de Masas
CLAE-FN: Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia Fase Normal
CLAE-FR: Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia Fase Reversa
CLAR: Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
CL-EM: Cromatografía de Líquidos –Espectrometría de Masas
DCE: Detector de Captura de Electrones
DIF: Detector de Ionización de Flama
EC: Electroforesis Capilar
ECC: Electro cromatografía Capilar
EFS: Extracción en Fase Sólida
ELISA: Enzyme Linked Inmunosorbed Assay
EM: Espectrometría de Masas
EMTV: Espectrometría de Masas de Tiempo de Vuelo
FAB/LSIMS: Fast Atom Bombardement / Liquid Secondary Ion Mass Spectrometry
FDA: Food and Drugs Administration
FE: Flujo Electrosmótico
FIA: Fluoro inmunoanálisis
FID: Flame Ionization Detector
FR: Fase Reversa
HPLC: High Performance Liquid Chromatography
HPTLC: High Performance Thin Layer Chromatography
IR-TF: Infrarrojo-Transformada de Fourier

MAR: Materiales de Acceso Restringido

NDP: Nitrogen-Phosphore Detector

PIM: Polímeros de Impresión Molecular

RIA: Radioinmunoanálisis

RMN-C: Resonancia Magnética Nuclear de Carbono

RMN-H: Resonancia Magnética Nuclear de Protones

SIM: Selected Ion Monitoring

SPE: Solid Phase Extraction

TLC: Thin Layer Chromatography

UV: Ultravioleta

CONTENIDO

| | Página |
|---|--------|
| Introducción | 1 |
| Objetivos | 3 |
| I. Antecedentes | |
| a) Importancia de analizar esteroides | 4 |
| b) Biosíntesis de esteroides | 8 |
| c) Pretratamiento de la muestra | 12 |
| II. Métodos Inmunoquímicos | |
| a) Empleo de anticuerpos monoclonales y policlonales | 23 |
| b) Compuestos de marcaje radioactivo | 23 |
| b.1) Técnica de Radioinmunoanálisis (RIA) | 24 |
| c) Marcadores no radioactivos | 24 |
| c.1) Técnica de análisis sobre inmunosorbente unido a enzimas (ELISA) | 25 |
| c.2) Técnica de Fluoroinmunoanálisis (FIA) | 26 |
| III. Métodos Espectroscópicos | |
| a) Espectroscopia de absorción Ultravioleta | 28 |
| b) Espectroscopia de absorción Infrarroja | 28 |
| c) Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear | 29 |
| d) Espectrometría de Masas | 29 |
| IV. Métodos Cromatográficos | |
| a) Cromatografía en papel | 30 |
| b) Cromatografía en columna | 31 |
| c) Cromatografía en capa fina | 33 |
| d) Cromatografía electroforética | 35 |
| e) Cromatografía gas-capilar | 40 |
| f) Cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE o CLAR) | 44 |
| g) Cromatografía de gases-Espectrometría de Masas (CG-EM) | 54 |
| h) Cromatografía de líquidos-Espectrometría de Masas (CL-EM) | 66 |
| V. Otros métodos | |
| a) Polarografía | 73 |
| b) Análisis por Inyección de Flujo (AIF) | 73 |
| Conclusiones | 75 |
| Bibliografía | 78 |

Introducción

Los esteroides son moléculas con una amplia variedad de funciones en los organismos del reino animal y vegetal, controlando múltiples procesos vitales. Es por eso que en la actualidad ha surgido la necesidad de estudiar cualitativamente y cuantitativamente a los esteroides en diferentes tipos de muestras biológicas.

Así, podemos encontrar que se utilizan como promotores del crecimiento en plantas y animales, por lo que esta función es aprovechada para fines incorrectos que podría a la vez ser peligrosa, como el abuso de hormonas por parte de los atletas para aumentar su desempeño físico, y en animales para acelerar su crecimiento y aumentar su masa corporal. También se utilizan como principios activos de diferentes preparados farmacéuticos para el tratamiento y prevención de diversas enfermedades provocadas por deficiencia o exceso de algún esteroide en particular.

La identificación y cuantificación de esteroides es de principal importancia en pruebas “*antidoping*”, diagnóstico de enfermedades, investigación y síntesis de nuevos fármacos anticancerígenos, anticonceptivos, antivirales y antimicrobianos, monitoreo ambiental, control de calidad en la industria farmacéutica y la industria alimenticia. Recientemente se han descubierto nuevos esteroides en diferentes especies de peces, esponjas marinas, insectos y plantas.

Todo lo anterior ha impulsado el desarrollo de técnicas para la extracción, purificación, separación, identificación y cuantificación de esteroides, aplicando lo más avanzado de la tecnología, lo que indica que existe un marcado interés en la investigación de estas moléculas, interés que surgió desde hace más de 50 años, y que hasta la fecha continúa.

Este trabajo proporciona información obtenida de una revisión bibliográfica del año de 1995 al 2003, en cuanto a los diferentes métodos existentes para la extracción, separación, identificación y cuantificación de los esteroides. Así, encontramos que los más utilizados son los métodos inmunoquímicos, métodos espectrométricos y métodos cromatográficos. Y otros que son menos empleados, como son los métodos por polarografía y los análisis por inyección de flujo.

Se considera a los métodos cromatográficos en sus diferentes modalidades (CCF, CLAE, CLAE-EM, CG, CG-EM y cromatografía electroforética) como las técnicas más utilizadas para este propósito, y es aquí donde la ciencia y tecnología han hecho esfuerzos considerables para mejorar

cada vez los métodos existentes y desarrollar otros, aplicando varias técnicas a la vez. Todo esto con el fin de obtener métodos que sean más precisos, exactos y sensibles. Se proporciona información de nuevos aditamentos acoplados a sistemas cromatográficos y combinación de técnicas que proporcionan la rapidez, exactitud y sensibilidad requeridas para la determinación de esteroides, debido a que estas moléculas por lo general se encuentran en cantidades a nivel de trazas.

También se presenta información en cuanto a procedimientos para el tratamiento de las muestras debido a que las múltiples matrices en las que se encuentran los esteroides es uno de los principales problemas que se han tenido que resolver en el análisis de estos compuestos. Esto se ha logrado utilizando nuevas estrategias para extraer estas moléculas de su matriz biológica como puede ser plasma, sangre, orina, saliva, uñas, cabello, aguas residuales, lodos, polvos ambientales, extractos de tejidos, extractos de plantas, alimentos, bebidas y preparados farmacéuticos.

Objetivos

- **Objetivo general.** Llevar a cabo una revisión bibliográfica sobre los métodos analíticos en la determinación de esteroides.
- **Objetivo particular.** Presentar la información de los métodos más utilizados para el análisis cualitativo y cuantitativo de esteroides. Métodos Cromatográficos, Espectrofotométricos, Inmunológicos, y otros menos utilizados como son Polarografía y Análisis por inyección de flujo.

I) Antecedentes

a) IMPORTANCIA DE ANALIZAR ESTEROIDES.

La importancia de analizar esteroides hormonales se manifiesta por los siguientes puntos:

En la investigación clínica la determinación de esteroides hormonales es importante para el control del sistema endócrino, sistema neuronal (neuroesteroides) y sistema inmune. Es necesario profundizar y ampliar los conocimientos que ya se poseen sobre los procesos de biosíntesis y metabolismo de estas hormonas, y sobre los mecanismos que regulan su producción en condiciones normales y patológicas.

Por ejemplo, se ha encontrado relación directa del contenido de ciertos esteroides sexuales en quistes de mama con el riesgo de generar cáncer mamario. Los esteroides encontrados fueron la 16α -hidroxiestrone y la 4-hidroxiestrone, de los que se han encontrado evidencias que son carcinógenos. También se encontró que se sintetizan *in situ* y se retienen en el quiste a concentraciones relativamente altas. [1]

Otro resultado que se obtuvo fue que el incremento de la hidroxilación del estradiol en el átomo de carbono número 2 protege contra transformaciones carcinogénicas, y la hidroxilación en el átomo de carbono número 16 y en posición α incrementa la síntesis desordenada de ADN y la proliferación celular. Por lo tanto se demostró que la relación (2-hidroxiestrone/ 16α -hidroxiestrone) es inversamente proporcional al riesgo de padecer cáncer cervical y mamario. [2]

En el campo de diagnóstico, las determinaciones de esteroides generalmente tienen la finalidad de valorar cuantitativamente la actividad y funcionalidad de las glándulas, órganos y tejidos implicados en la producción de esteroides hormonales. Gran parte de las alteraciones fisiológicas se debe a la hipersecreción o hiposecreción de uno o más esteroides, y en algunos casos los resultados obtenidos en muestras biológicas son útiles para localizar la naturaleza de las lesiones bioquímicas que son responsables de disfunciones endócrinas.

Existen compuestos como los ácidos biliares, que requieren métodos analíticos sensibles y precisos para identificar ciertos metabolitos y dar un diagnóstico preciso. Los ácidos biliares son los principales metabolitos del colesterol y sufren glucuronidación y sulfatación antes de ser excretados en la orina. La glucuronidación convierte sustancias lipofílicas en sustancias solubles en agua, por lo tanto se ha considerado un importante mecanismo de eliminación de sustancias tóxicas. Sin embargo estudios recientes han sugerido que los compuestos acilglucuronidos de los ácidos biliares forman uniones covalentes a las proteínas después de la glucuronidación, formando aductos que pueden causar reacciones de hipersensibilidad e incrementar el riesgo de muerte en pacientes con

padecimientos hepatobiliares por defecto de la enzima glucuronosiltransferasa hepática. [3]

Actualmente el empleo de hormonas esteroidales por parte de los atletas para aumentar su rendimiento físico se ha convertido en un problema, pues no sólo hay implicaciones de ética deportiva, sino también de salud, debido a que pueden ocasionar daños irreversibles en los deportistas. El principal problema radica en establecer los límites adecuados por parte de las organizaciones deportivas, pues los compuestos que se buscan en los atletas, se sintetizan endógenamente o se obtienen normalmente en la dieta.

Por otro lado, las pruebas “*antidoping*” se han realizado también en caballos de carreras para detectar la administración ilegal de esteroides en estos animales. [4]

En algunos países, incluyendo México, las hormonas esteroidales se han empleado en animales de granja que posteriormente se destinan al consumo humano, lo cual se hace sin el debido control y tiene consecuencias en la salud de la población que consume carne de animales que fueron tratados con hormonas. El problema con el empleo de hormonas como promotores de crecimiento es que no se han tomado precauciones y no se han hecho los suficientes estudios para poder administrar estos compuestos con la finalidad de que los niveles de esteroides encontrados en los diferentes tejidos cumplan con las especificaciones de la FDA (Food Drug Administration), pues al administrarlas correctamente en los animales se puede asegurar que no habrá riesgos para la población que consume estos alimentos. [5]

En el campo terapéutico este tipo de análisis tiene por objeto cuantificar los efectos de determinados tratamientos hormonales sobre la actividad de ciertas glándulas o tejidos que están implicados de una forma directa o indirecta en la esteroidogénesis.

En la actualidad existen diversas formas farmacéuticas que contienen uno o más esteroides, los cuales tienen por objeto proporcionar métodos de anticoncepción basado en progestágenos, administrar andrógenos con fines terapéuticos, agentes calcémicos etc.

La progesterona y los progestágenos son hormonas esenciales en el control de la menopausia en mujeres cuando reciben terapia de reemplazo con estrógenos para proteger al endometrio y tejido mamario, pero se deben tomar las debidas precauciones para evitar efectos colaterales, pues a determinadas dosis la terapia de reemplazo puede incrementar el riesgo de contraer cáncer de mama, debido a que la progesterona nativa y exógena aumentan la proliferación epitelial de tejido mamario. [6,7]

Las mujeres con síndrome postmenopáusico sufren entre otras cosas de insomnio y desordenes respiratorios relacionados al sueño, lo cual se puede mejorar con un tratamiento de estrógenos y progestágenos. [8]

Se ha encontrado evidencia de que las hormonas esteroidales pueden emplearse como protección

en la enfermedad de Alzheimer y otros tipos de enfermedades neurocognitivas y sus formas más avanzadas de demencia, las cuales privan tanto a mujeres como a hombres de su independencia y calidad de vida. El estradiol y el colesterol bloquean los cambios de concentración de calcio intracelular en células neuronales de pacientes con Alzheimer, provocados por la proteína β -amiloidea característica de esta enfermedad. [9] También se sabe que los niveles de testosterona total en suero disminuye en los hombres que padecen Alzheimer, lo cual hace pensar que una terapia de reemplazo con testosterona podría disminuir los efectos de esta enfermedad. [10] En pacientes con el **síndrome de Klinefelter**¹ también se han empleado terapias de reemplazo con testosterona. [11]

La determinación de cortisol se ha llevado a cabo por diversos métodos, debido a que es el principal esteroide glucocorticoide secretado por las glándulas adrenales, posee actividad antiinflamatoria, interviene en procesos que afectan la presión sanguínea y en el metabolismo de proteínas y carbohidratos. Por lo tanto la determinación de sus concentraciones proporciona información en el diagnóstico de alteraciones adrenales como la enfermedad de Addison que se refiere a una insuficiencia adrenal crónica y el síndrome de Cushing que se refiere a una sobreproducción adrenal. [12]

En los últimos años se han descubierto nuevas clases de esteroides provenientes de especies marinas, por ejemplo: se han aislado aminosteroides de tejidos de tiburón *Squalas acanthias*, uno de estos aminosteroides es la “escualamina” cuyo nombre químico es sulfato de 3β -N-1-(N(3-(4-aminobutil))-1,3diaminopropano)-7 α -hidroxi-5 α -colestano-24R-il; otro aminosteroides es el MSI-1436, que es estructuralmente idéntico a la escualamina excepto por un grupo poliamina en el carbono 3. Todos los aminosteroides aislados tienen actividad antimicrobiana, pero estudios más recientes han demostrado que poseen actividad **antiangiogénica**², y por lo tanto pueden tener utilidad en la quimioterapia de tumores malignos. [13]

Se han encontrado otros esteroides, los estonolionidos I y II, aislados del coral suave *Clavularia viridis*. Estos compuestos poseen propiedades antiinflamatorias y estructuralmente tienen una lactona en la posición 7 y un esqueleto 1,10-secoergostano. De esta especie de coral se han aislado los esteroides denominados estoloniferones que estructuralmente poseen una enona conjugada y un epóxido. Otros esteroides que se descubrieron se nombraron yonasteroides que son 9, de los cuales 3 tienen átomos de cloro en su estructura y tienen actividad antiinflamatoria. [14,15] De otra especie de coral, la *Isis Hippuris*, se aislaron esteroides altamente oxigenados denominados

¹ Se trata de una anomalía genética de diferenciación sexual en pacientes varones, donde, en vez de dos cromosomas XY, estos pacientes presentan tres cromosomas XXY.

² Antiangiogénico. Inhibidor de la formación de vasos sanguíneos. *Angio* = vaso

Hippurins, cuya actividad todavía se está estudiando, así como los esteroides polihidroxilados aislados de otra especie de coral proveniente de República Dominicana, la *Plexaurella grisea* los cuales mostraron actividad citotóxica contra ciertas líneas de células tumorales. [16,17]

También se han encontrado esteroides de estructuras muy complejas en ciertas especies de esponjas marinas. Estos esteroides han llamado la atención por su actividad biológica y posible empleo en productos farmacéuticos, por ejemplo, el herbasterol es **ictiotóxico**³; el xestobergsterol y contignasterol son potentes inhibidores de la liberación de histamina; la mayoría de los derivados oxidados del colesterol han mostrado tener actividad citotóxica *in vitro* sobre ciertas líneas de células cancerosas. Los recientes descubrimientos de las propiedades antivirales de los polihidroxiesteroides sulfatados han aumentado el interés sobre estos compuestos. [18].

Por otro lado se han encontrado los llamados “brassinosteroides”, que son fitohormonas esteroidales relacionados con la promoción del crecimiento en plantas, de los cuales se ha sintetizado y evaluado la actividad biológica de compuestos análogos que promueven el crecimiento de plantas cuando se aplican en bajas concentraciones. [19,20,21]

Se han buscado nuevas moléculas esteroidales que puedan emplearse como principios activos de un medicamento, tales moléculas varían en su actividad terapéutica, pues se han buscado antiinflamatorios [22], anticonceptivos, análogos de vitamina D₃ y anabólicos, con el fin de evitar efectos indeseables o para tener un efecto mayor y más rápido. En el caso de la vitamina D₃ se han hecho esfuerzos por sintetizar análogos, no solo por su actividad calcémica, sino también por que se ha encontrado que tiene potencia antiproliferativa celular y se puede emplear para el tratamiento o prevención de cáncer de próstata. [23,24]

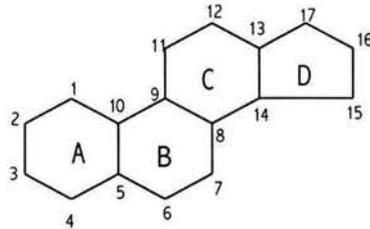
En estudios recientes, se ha encontrado que los esteroides son parte de un grupo de compuestos denominados compuestos de alteraciones endócrinas que se han encontrado en muestras de aguas, lodos y suelo y se ha demostrado que producen daños irreversibles a la fauna donde se han detectado. Por ejemplo en las aguas contaminadas con estos compuestos se encontraron varias especies acuáticas con malformaciones congénitas. [25,26].

Por todo lo anterior, se puede decir que los esteroides son de los compuestos más importantes que se encuentran en la naturaleza, y que su importancia como contaminantes del medio ambiente, en diagnósticos clínicos, en pruebas “*antidoping*”, promotores de crecimiento, agentes terapéuticos etc. ha demandado el desarrollo de métodos analíticos que tengan la suficiente sensibilidad y especificidad para su evaluación en los diferentes tipos de muestras ambientales, biológicas y farmacéuticas.

³ Ictiotóxico. Tóxico para los peces. *Ichthús* = pez

b) BIOSÍNTESIS DE ESTEROIDES. [27]

Los esteroides son moléculas cuya estructura se basa en un sistema tetracíclico que se designan de izquierda a derecha como A, B, C y D. Los átomos de carbono se enumeran iniciando en el anillo A.



El origen biosintético de los esteroides comienza con una reacción entre dos moléculas de acetilcoenzima A (acetilCoA), para formar una molécula de acetoacetilCo-A, la cual sufre una serie de reacciones hasta formar la unidad *isopreno*. Figura 1.

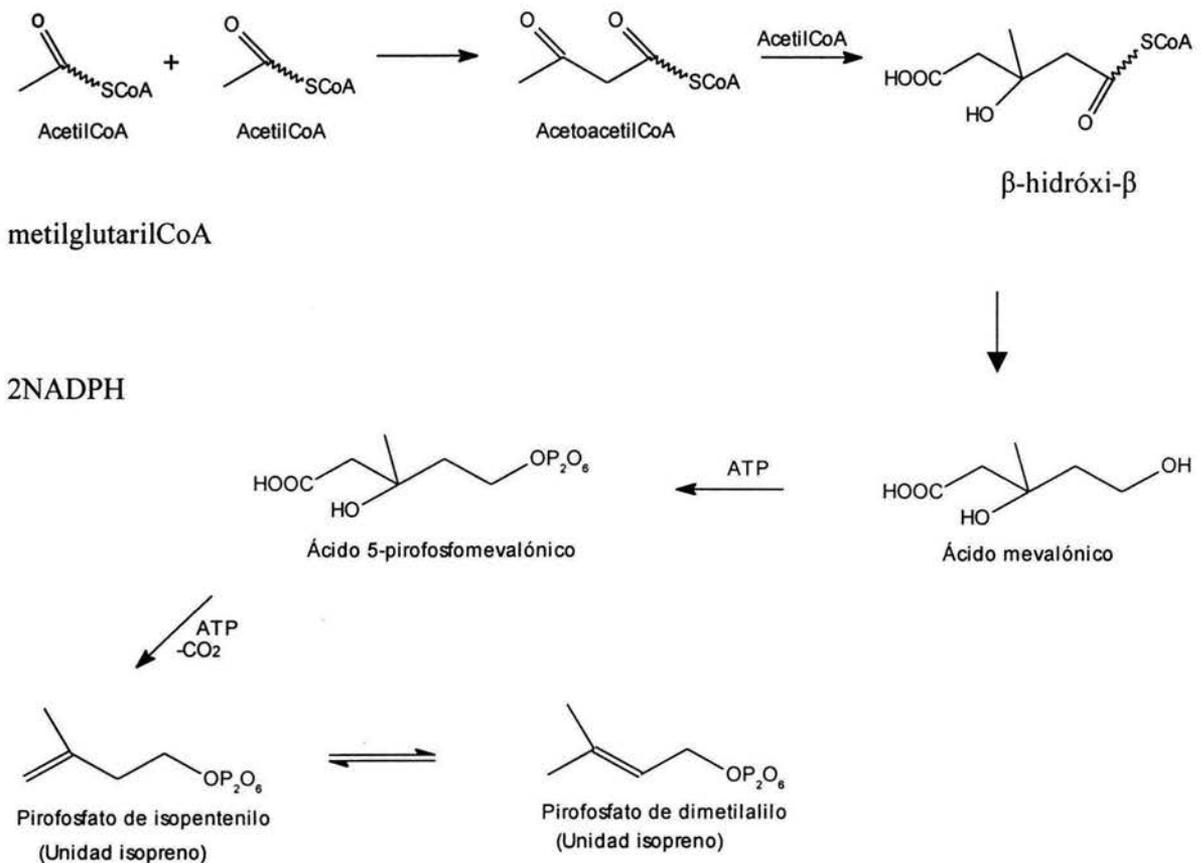


Figura 1. Síntesis de la unidad isopreno a partir de AcetilCoA.

Una serie de reacciones entre unidades isopreno se llevan a cabo para formar el escualeno, un hexaeno de 30 átomos de carbono, que es el precursor de triterpenos y esteroides. Figura 2.

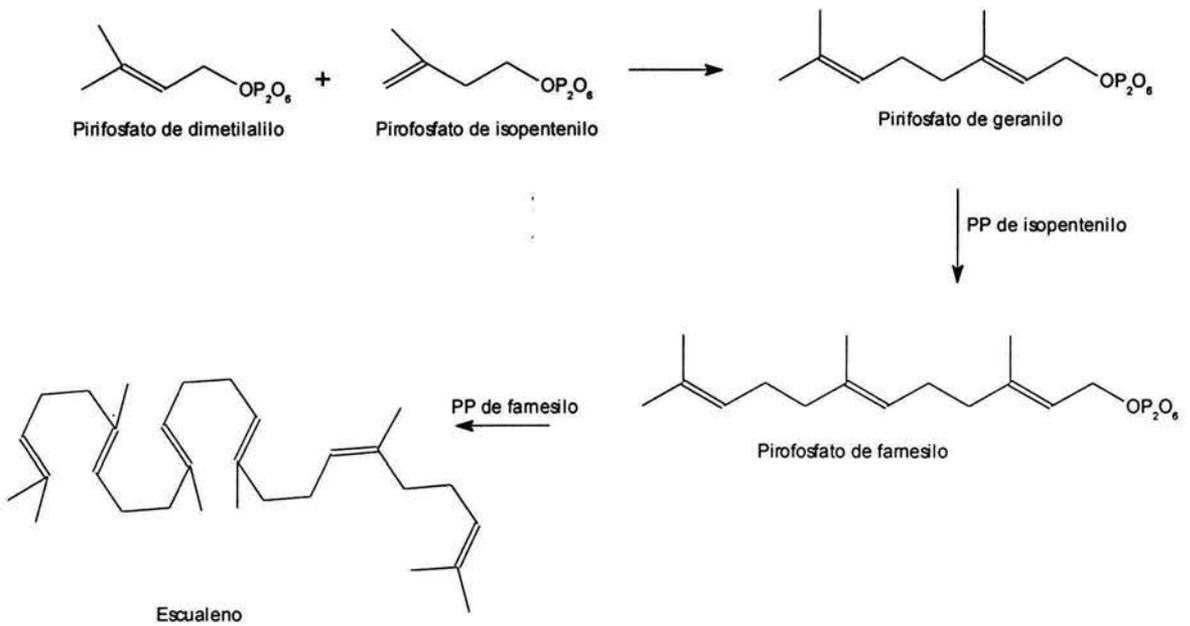


Figura 2. Síntesis del escualeno a partir de unidades isopreno.

El escualeno sufre una serie de reacciones para formar una estructura de tres anillos de 6 átomos de carbono y un anillo de 5 átomos de carbono. Figura 3.

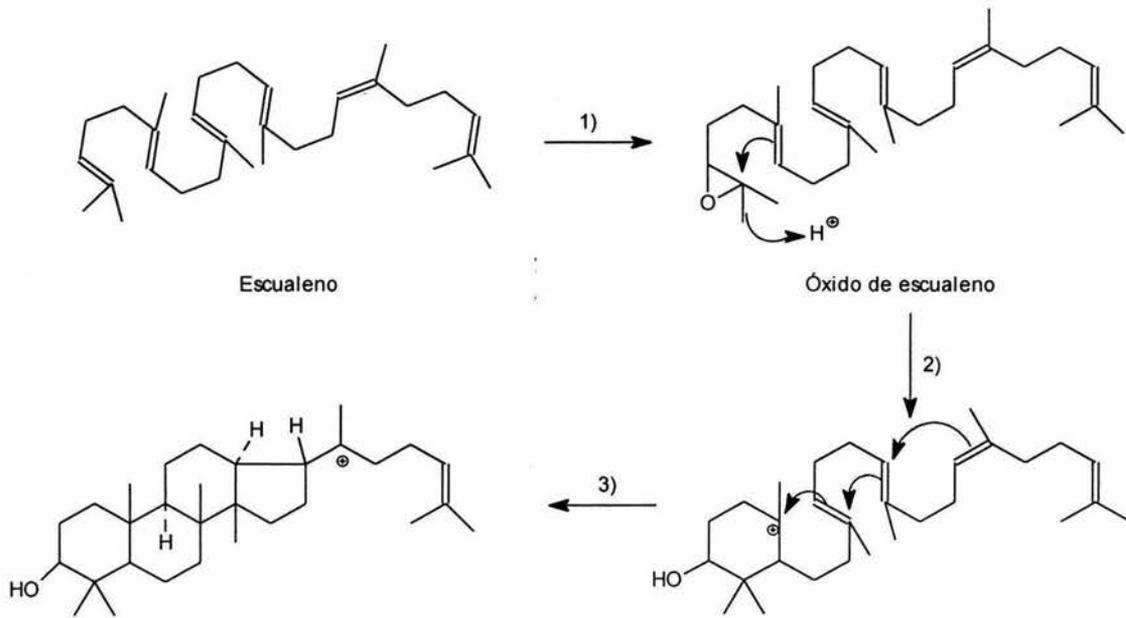


Figura 3. Reacciones del escualeno: 1) Epoxidación selectiva catalizada por la escualeno oxidasa, 2) Protonación 3) Reacciones cíclicas para la formación de un carbocatión.

Por último se llevan a cabo una serie de transposiciones para formar el lanosterol, el cual se biotransforma en colesterol, que a su vez se transforma en otros esteroides. Figura 4.

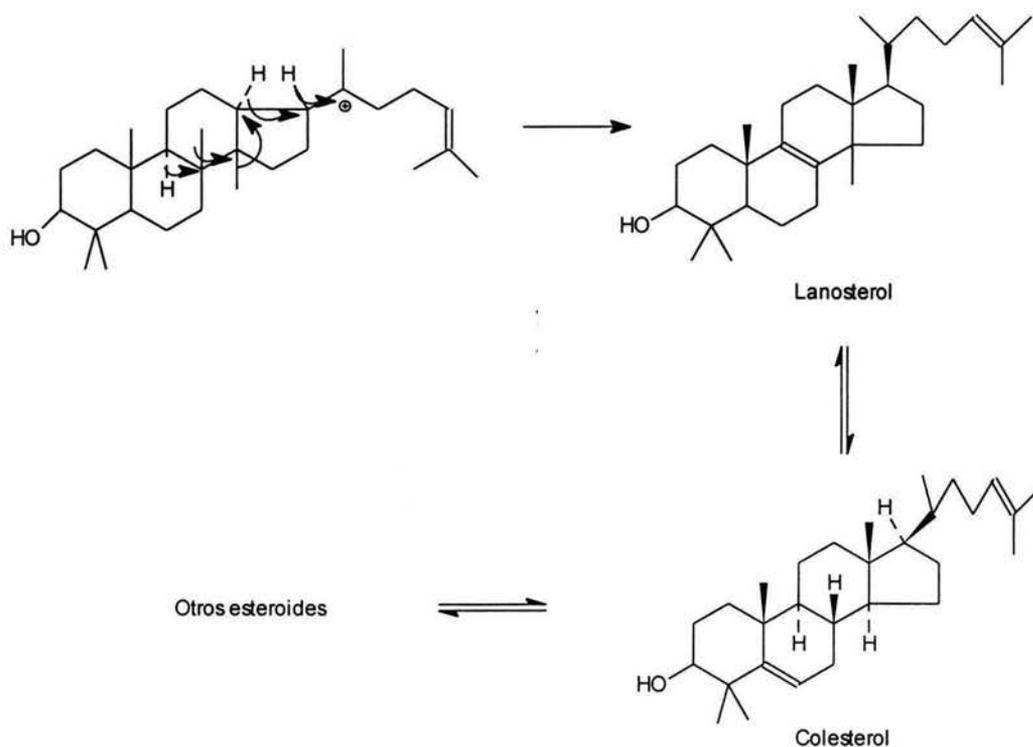


Figura 4. Reacciones de transposición en la biosíntesis de colesterol.

Los métodos para la determinación de esteroides deben incluir un pretratamiento (en caso de ser necesario) de la muestra, que sea rápido y sencillo. Los sistemas de detección deben ser específicos, debido a que estos analitos se encuentran en bajos niveles de concentración en las muestras biológicas, lo cual ha sido el principal problema de los métodos analíticos en la determinación de esteroides.

c) PRETRATAMIENTO DE LA MUESTRA

Proteínas en muestras biológicas. Cuando se trabaja con muestras biológicas es posible el uso de sustancias que compiten con la unión de esteroides a las proteínas. Por ejemplo, la dihidrotestosterona (DHT) y el cortisol se utilizan para determinar las concentraciones reales de esteroides.

El estradiol, la estrona, la testosterona y la androstandiona presentes en suero, se unen principalmente a la albúmina y globulina de enlace a hormonas sexuales. La dihidrotestosterona al tener mayor afinidad por estas proteínas se une competitivamente y libera los esteroides. La progesterona, la 17-hidroxiprogesterona (17-OHP) y la 20-hidroxiprogesterona (20-OHP), presentes en suero se unen principalmente a la albúmina y a la globulina de enlace a corticosteroides. El cortisol tiene mayor afinidad por estas proteínas y cuando se une competitivamente libera los corticosteroides. [28]

Otro detalle que hay que tener presente cuando se analizan esteroides en sangre es que algunas hormonas como cortisol, dehidroepiandrosterona y estradiol están sujetas a ritmos circadianos, y por lo tanto, para obtener datos que sean comparables entre sí, hay que analizar muestras tomadas a la misma hora del día. [29,30]

Influencia del pH. Se ha investigado la influencia de diferentes valores de pH sobre el recobro de glucocorticoides y esteroides sexuales utilizando columnas de extracción en fase sólida (EFS). Los esteroides tuvieron un recobro similar a pH ácido y neutro; pero cuando el pH se incrementó a valores cercanos a 14 los esteroides sexuales se separaron efectivamente de los glucocorticoides. [31]

Para separar a los diferentes tipos de esteroides en fracciones mediante extracciones, se deben tomar en cuenta sus características fisicoquímicas. Los esteroides consisten de una estructura nucleofílica de ciclopentanoperhidrofenantreno, el cual está modificado por su periferia o sobre la cadena lateral por la adición de grupos hidrofílicos (principalmente grupos hidroxilo, oxo y ácidos carboxílicos). Durante el metabolismo, los esteroides se vuelven más hidrofílicos mediante reacciones de **conjugación**⁴ con el ácido glucurónico ó ácido sulfúrico. A pesar de la adición de estos grupos polares, la esencial no polaridad de los esteroides permite que tengan varios grados de solubilidad en disolventes orgánicos y puedan así ser extraídos de medios acuosos por un disolvente o mezcla

⁴ Son reacciones de esterificación que tienen la finalidad de transformar moléculas hidrofóbicas a moléculas hidrofílicas y de esta manera poder ser eliminados del organismo a través de la orina.

de disolventes de polaridad adecuada. [28]

Consideraciones durante la extracción de esteroides. Las hormonas esteroidales secretadas “*in vivo*” son llevadas en el torrente sanguíneo unidas a proteínas plasmáticas, específicamente a globulinas de enlace, por ejemplo: globulinas de enlace a cortisol, globulinas de enlace a hormonas sexuales, o a la albúmina. Las globulinas de enlace usualmente tienen alta afinidad de enlace para esteroides particulares, pero baja capacidad; mientras que la albúmina tiene baja afinidad pero alta capacidad para una amplia variedad de esteroides.

Algunos esteroides como el colesterol, pueden ser incorporados como una parte integral de la estructura de las lipoproteínas plasmáticas y estas lipoproteínas pueden formar parte de la estructura de células y tejidos, de los cuales, los esteroides necesitarían ser extraídos. La vitamina D aunque es acarreada en el plasma por globulinas de enlace específicas, también puede ser incorporada a lipoproteínas.

Por lo tanto, la presencia de estas proteínas de enlace y su interacción con los esteroides de interés es una importante consideración cuando decidamos desarrollar un método para el análisis de un esteroide en particular. Para desarrollar un método de análisis, debemos considerar la posibilidad de que el método evite el paso de extracción, pues sería más simple, pero se debe tomar en cuenta la especificidad de la cuantificación final. La pérdida de analito durante el pretratamiento se observa al momento de cuantificar.

Para asegurar la pérdida debido a extracciones y procedimiento de purificación, se emplea el método del *estándar interno*⁵. El estándar interno, después de adicionarlo a la matriz debe estar distribuido del mismo modo que el analito (por ejemplo unido a alguna proteína). Esto se logra incubando a 37°C por algún tiempo con agitación suave. Los esteroides son compuestos hidrofóbicos que no se disuelven significativamente en agua, por eso se adicionan a la matriz, disueltos en etanol, metanol u otro disolvente polar miscible en agua. El volumen empleado de estos disolventes debe ser el más pequeño posible en comparación al volumen de la muestra, esto con el fin de evitar desnaturalización de alguna proteína. Algunas veces los esteroides se adicionan a contenedores de vidrio, se evapora el disolvente y se adiciona otro disolvente. Esto no es recomendable, debido a que los esteroides se adsorben en la superficie del vidrio y después no se disuelven en la matriz (otro disolvente), aun si el vidrio ha sido desactivado previamente con reactivos sibilantes, por ejemplo, dimetildiclorosilano o trimetildiclorosilano. Además algunos

⁵ Es una sustancia pura que debe ser análogo al analito de interés, no debe reaccionar con los componentes de la muestra, no debe estar contenido en la muestra y se adiciona en concentración constante a la muestra.

esteroides se pueden destruir con el calor, principalmente cuando el material ha sido tratado con ácido crómico. El estándar interno debe ser indistinguible del analito durante el proceso de extracción, pero distinguible en la etapa de cuantificación. El estándar interno además de asegurar el recobro, cuando está en grandes cantidades, previene o minimiza las pérdidas de los esteroides cuando se encuentran en bajas concentraciones y se adsorben en el vidrio. Se puede usar como estándar interno un análogo del analito, por ejemplo, en la medición de la testosterona por cromatografía gas-líquido se puede emplear Δ^1 testosterona o la 19-nortestosterona, debido a que ninguno de estos esteroides se encuentran en la naturaleza y sus características fisicoquímicas son similares y pueden ser separadas por esta técnica. [28]

Se han desarrollado diversos métodos de extracción para el pretratamiento de la muestra. Algunos ejemplos son el empleo de cartuchos de extracción en fase sólida y microextracción en fase sólida, donde el material de empaque puede ser sílica gel con fase químicamente unida (C_4 , C_8 , C_{18} , grupos fenilo, etc.). Recientemente se han desarrollado sistemas donde se emplea materiales de acceso restringido (MAR) (ver *Extracción en fase sólida*), adsorbentes de inmovilización y polímeros de impresión molecular (PIM) empacados en estos cartuchos, los cuales han agilizado el proceso de análisis. Estos procesos pueden ir acoplados directamente al sistema de CLAE o CG. [25]

Extracción en fase sólida (EFS ó SPE *Sólid Phase Extraction*) [32]. La extracción en fase sólida (EFS) data desde principios de los años 70's cuando se emplearon columnas empacadas con resinas para extraer contaminantes orgánicos de muestras de agua. A finales de los años 80's y principios de los 90's se expandió el desarrollo de la EFS, y ahora existen varias compañías que venden equipos, manuales y accesorios para EFS.

La EFS tiene la finalidad de extraer o adsorber solutos de una fase líquida a una fase sólida. La fase sólida consiste de pequeñas partículas porosas de sílice a las que se les une por medios químicos una fase orgánica o polímeros orgánicos como el poliestireno. La extracción puede llevarse a cabo revolviendo las partículas de fase sólida con la muestra líquida, pero es más común empacar las partículas sólidas de sílice como una fase estacionaria dentro de pequeños tubos que funcionan como "minicolumnas", y se hace pasar la muestra líquida a través del tubo.

La adsorción en fase sólida no está limitada a solutos en muestras líquidas, ya que se pueden hacer pasar muestras gaseosas a través de la pequeña columna empacada para extraer vapores orgánicos u otras sustancias presentes en la muestra.

Después de que los analitos han sido adsorbidos por las partículas sólidas, se pueden eluir empleando un disolvente apropiado. Por ejemplo, la mayoría de los analitos orgánicos se pueden eluir con cantidades muy pequeñas de un disolvente orgánico como la acetona, el acetonitrilo o el

metanol. También se pueden eluir por un calentamiento en una corriente suave de un gas acarreador inerte.

Algunos de los conceptos de la extracción líquido-líquido (L-L) se aplican a la EFS, donde el objetivo es transferir los solutos deseados de una fase líquida a otra, y ambas fases son inmiscibles. El proceso se lleva a cabo en embudos de separación mediante agitación vigorosa para formar una emulsión temporal que consiste de pequeñas gotas esféricas del líquido extractivo suspendidas en la fase acuosa. El área de contacto interfacial entre las dos fases debe ser grande para promover una rápida transferencia de masas de los solutos deseados de una fase a otra. Después de esto, la emulsión se rompe, las fases se separan y se forman dos fases inmiscibles. En general el proceso es tedioso debido al tiempo que tarda en formarse la interfase entre las dos fases utilizadas.

En EFS en lugar de una emulsión líquida temporal, el material extractivo en la muestra acuosa es una suspensión de partículas sólidas de 10-50 μm de diámetro, con un área superficial de 200-800 m^2/g , por lo que habrá una rápida transferencia de masa. Aunque el proceso se puede hacer mezclando las partículas sólidas con la muestra líquida, es más común el empleo de “minicolumnas” empacadas con las partículas sólidas (fase estacionaria). La muestra líquida pasa a través de la “minicolumna”, se logra un rápido equilibrio, y los analitos tienden a ser adsorbidos al comienzo de la columna, donde hay múltiples equilibrios debido a que los solutos se encuentran continuamente con partículas frescas, esto no se logra cuando las partículas sólidas no se encuentran empacadas en una minicolumna.

Después de adsorber los solutos en la fase estacionaria, se deben eluir para su determinación final, y esto dependerá de los analitos y la fase estacionaria que se estén empleando. Los compuestos orgánicos pueden ser eluidos con pequeños volúmenes de un disolvente orgánico.

Los múltiples equilibrios que existen durante el proceso de EFS se pueden expresar en términos de factores de capacidad también llamados factores de retención (k) de los analitos en la muestra:

$$k = \text{cantidad de analito en la fase sólida} / \text{cantidad de analito en la fase líquida}$$

Cuando la fase líquida fluye a través de la columna empacada a una velocidad de flujo lineal de u (cm/s), la velocidad de movimiento de la banda de un analito a través de la columna es $u/(1 + k)$. Por lo tanto, cuando k es grande, casi no hay movimiento de la banda del analito. Pero conforme k disminuye, la velocidad del movimiento de la banda del analito se acerca a la velocidad de flujo del disolvente.

El factor de capacidad de un analito depende de la composición del disolvente o de la fase móvil, pues k se hará más pequeño conforme se aumenta la proporción del disolvente orgánico.

En cromatografía de líquidos los solutos se separan basándose en sus diferentes velocidades de migración a través de la columna, ajustando la fase móvil de tal forma que se logre una k entre 1 y 10. En EFS los factores de capacidad son muy altos.

En EFS todos los analitos son retenidos como una banda aguda sobre la fase sólida y son eluidos en grupo, sin embargo en ocasiones es posible separar los analitos en dos o más grupos mediante una selección cuidadosa de la fase estacionaria y las condiciones de elusión. Por ejemplo, los compuestos neutros y las bases orgánicas protonadas son retenidos sobre una resina porosa que tiene unida una baja concentración de grupos sulfonato. Los compuestos neutros son entonces eluidos con un disolvente orgánico, pero las bases protonadas solo se pueden eluir con un disolvente orgánico que contenga una base que remueva los protones del analito alcalino.

La extracción en fase sólida tiene las siguientes ventajas:

- a) El proceso es rápido y de fácil manipulación, por lo tanto, se puede automatizar fácilmente.
- b) Las cantidades de disolventes orgánicos que se requieren son muy pequeñas, lo cual es importante por cuestiones ambientales. La EPA (Environmental Protection Agency) está trabajando en sustituir la extracción líquido-líquido por la EFS.
- c) Sólo se requiere una razonable diferencia en adsorción para separar dos solutos.
- d) Se pueden concentrar las muestras a volúmenes menores.

La extracción en fase sólida se lleva a cabo en cuatro pasos:

Acondicionamiento. La fase estacionaria se hace compatible con la muestra líquida empleando disolventes que permitan el contacto superficial entre las fases. Por ejemplo, una fase sólida con ODS (octadecil silano o C_{18}) se puede acondicionar adicionando n-hexano. En su forma seca, las cadenas de C_{18} están enrolladas, y al adicionar n-hexano se desenrollan. Enseguida se adiciona metanol para desplazar el n-hexano y llenar los poros, por último se lava con un poco de agua y se logra el acondicionamiento deseado. En una adsorción de sustancias hidrofóbicas en medio acuoso, debe haber contacto entre la fase no polar de la fase estacionaria con la muestra acuosa que es polar. Sin un pretratamiento, el líquido polar fluiría a través de pequeños canales de la fase sólida sin hacer contacto con la misma.

Adsorción. Con ayuda de vacío ligero, la muestra líquida pasa a través de la columna empacada. La velocidad de flujo dependerá de las dimensiones de la columna y del tamaño de partícula de la fase estacionaria. Un factor que influye en la velocidad de flujo y transferencia de masa es el tamaño de partícula, por ejemplo, 10 mm de longitud de empaque de partículas son adecuadas en partículas de 10 μm de diámetro para lograr una buena transferencia de masa, y una longitud de 50 mm es la

adecuada para partículas de 50-100 μm de diámetro.

Lavado. Una cuidadosa selección del disolvente para el lavado permite remover materiales coadsorbidos de la muestra. Por ejemplo, el agua debería disolver iones inorgánicos de la fase estacionaria, pero podría no ser suficiente para remover otros componentes débilmente adsorbidos, en tales casos, el agua con un 5 a 20 % de disolvente orgánico, podría ser un adecuado disolvente de lavado. Pero el porcentaje de disolvente orgánico no debe ser muy alto, pues podría eluir parcialmente los analitos de interés.

Elución. En este paso los analitos son removidos de la fase estacionaria a una fase líquida adecuada para el análisis. Por lo regular se emplea un disolvente orgánico, aunque a veces es posible la desorción por un proceso térmico con la ayuda de una corriente de gas (principio empleado en CGL).

Debido a que la columna se encuentra llena de agua después de la adsorción, la desorción con un disolvente orgánico producirá un efluente que contiene tanto la fase orgánica como la fase acuosa, por lo tanto, primero se remueve el agua tanto como sea posible para evitar que el eluato esté muy diluido aplicando un ligero vacío por unos cuantos minutos ó haciendo pasar aire o nitrógeno a través de la columna.

Después se adiciona lentamente el disolvente para extraer los analitos de la fase sólida. Lo más importante de este proceso es seleccionar adecuadamente los disolventes y usar el mínimo de volumen.

El disolvente debe ser compatible con el método analítico. Cuando se emplea un método por CG, el disolvente para eluir debe tener un bajo punto de ebullición para que su banda de elución no interfiera con las de los analitos. El disolvente debe estar libre de impurezas que puedan interferir en la determinación, debe ser barato y no tóxico. Los disolventes orgánicos más empleados son metanol, acetonitrilo, acetona, cloruro de metileno y acetato de etilo.

Para completar el proceso de análisis es necesario un paso más, que es la introducción de una cantidad del eluato a un Cromatógrafo de gases o de líquidos para la separación y medición de los analitos individuales de la muestra.

La EFS se lleva a cabo en pequeños cartuchos donde se empaca la fase estacionaria y son muy útiles en la limpieza y purificación de la muestra cuando se va a realizar un análisis por CG o CL. Existen muchos ejemplos donde se utilizan estos cartuchos en el análisis de esteroides.

El análisis de esteroides en muestras complejas es difícil debido a la existencia de impurezas que tienen polaridades similares a la de los esteroides que se quieren determinar, además de que se encuentran en concentraciones mayores que los analitos de interés. Estas impurezas interfieren en los análisis por CG-EM, por lo que son necesarios procedimientos de purificación que no lleve consigo pérdidas significantes de analito. Se han purificado esteroides extraídos de muestras de sangre, hígado y heces fecales empleando varios cartuchos “Sep-Pak” C18 para obtener mayores porcentajes en los recobros. [33]

Otro tipo de fase estacionaria que se utilizó con éxito fue el carbón negro grafitizado empacado en cartuchos Carbograph 4® para extraer esteroides de muestras de agua y lodo, durante el monitoreo de estrógenos naturales y sintéticos en muestras de lodos activados de plantas de tratamiento de aguas negras y de muestras de agua obtenidas del río Tiber en Italia. [34]

Además de la EFS, existe la microextracción en fase sólida (MEFS), la cual se ha utilizado para aislar y concentrar hormonas esteroides de muestras ambientales acuosas. [35]

Para obtener mejores resultados, se han utilizado varios cartuchos con la misma o diferente fase estacionaria (C18, NH₂ o CN).

Debido a que el número de muestras a analizar en muchas ocasiones es grande, fue necesario desarrollar métodos analíticos completamente automatizados para introducir un gran número de muestras. Un ejemplo fue el desarrollo de EFS-CLAE con detección de arreglo de diodos ó EM en el análisis de estrógenos y progestágenos en muestras ambientales de aguas residuales. [35]

Otro tipo de fase estacionaria más selectiva que se ha empacado en cartuchos de EFS, en discos e incluso en columnas cromatográficas ordinarias para CLAE se compone de *polímeros de impresión molecular* (PIM), los cuales son monómeros de 4-vinilpiridina y dimetacrilato de etileno que se polimerizan, toman la forma de la molécula de interés y la reconocen estructuralmente. Es así como se sintetizó PIM para determinar 17β-estradiol y neuroesteroides de muestras biológicas que son reconocidos estructuralmente de forma específica por estos polímeros discriminando a moléculas como la testosterona y la corticosterona. [35,36]

El uso de *materiales de acceso restringido* (MAR) empacados en cartuchos para EFS y columnas cromatográficas, fue otra interesante alternativa de limpieza y preconcentración de esteroides, debido a que no fue necesario el pretratamiento de la muestra y permite la inyección directa a la columna. Los MAR son adsorbentes bifuncionales que combinan los mecanismos de exclusión por tamaño (diámetro de poro pequeño) y retención en fase reversa (fase enlazada químicamente). El término “acceso restringido” expresa el acceso limitado de los analitos. Los esteroides al ser analitos de bajo peso molecular penetran por los poros e interactúan con la fase químicamente unida que pueden ser hidrocarburos para fase reversa, moléculas de afinidad o mecanismos de formación

de pares de iones. Utilizando estos materiales de empaque en precolumnas de la marca Merck® se han determinado esteroides de muestras de sedimentos, muestras biológicas con altas concentraciones de proteínas y alimentos mediante un sistema de doble columna “column switching”. [35,36]

El uso de extracción por inmunoafinidad acoplado a CL-EM se ha aplicado en el análisis de β -estradiol y estrona en aguas de desecho. Este tipo de inmunosorbente remueve compuestos de la matriz que producen ruido isobárico que de otro modo podría causar severa supresión de la ionización de los estrógenos por la técnica de electroespray provocando bajos límites de detección. [36]

Existen en la actualidad diferentes métodos analíticos para determinar esteroides:

➤ **Métodos Inmunoquímicos.**

- **Empleo de anticuerpos monoclonales y policlonales**
- **Compuestos de marcaje radioactivo.**
Técnica de Radioinmunoanálisis (RIA).
- **Compuestos de marcaje no radioactivo.**
Técnica de Análisis sobre inmunosorbente unido a enzimas (ELISA)
Técnica de Fluoroimmunoanálisis (FIA)

➤ **Métodos Espectroscópicos.**

- **Espectroscopia de absorción Ultravioleta (UV).**
- **Espectroscopia de absorción Infrarroja (IR).**
- **Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN).**
- **Espectrometría de Masas (EM).**

➤ **Métodos Cromatográficos.**

- **Cromatografía en papel.**
- **Cromatografía en columna.**
- **Cromatografía en capa fina (CCF o TLC).**
- **Cromatografía electroforética.**
- **Cromatografía gas-líquido (CGL).**
- **Cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE, CLAR o HPLC)**
- **Cromatografía de gases-Espectrometría de masas (CG-EM).**
- **Cromatografía de líquidos-Espectrometría de masas (CL-EM ó CLAE-EM).**

➤ **Otros métodos.**

- **Polarografía.**
- **Inyección de flujo.**

II) MÉTODOS INMUNOQUÍMICOS.

Antes de 1970 existían pocos métodos apropiados para la determinación de concentraciones nanomolar (10^{-9} mol/L) y pico molar (10^{-12} mol/L) de hormonas esteroidales en fluidos biológicos. A principios de los años 70's hubo varios reportes de valoraciones de enlace competitivo empleando proteínas de enlace específico incluyendo proteínas séricas de enlace específicos, así como receptores específicos. Sin embargo fue la introducción del *inmunoensayo* que proporcionó la herramienta analítica adecuada.

Desde su introducción en los años 50's, el inmunoensayo se convirtió en la herramienta analítica principal en diagnóstico clínico. La metodología se basa principalmente en la especificidad química de una reacción inmunológica y la gran sensibilidad en la detección de antígenos y anticuerpos marcados, los cuales permiten una cuantificación rápida, exacta y precisa de analitos a concentraciones muy bajas en muestras complejas.

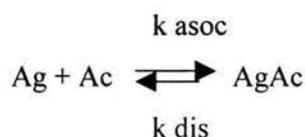
Por definición, un inmunoensayo es un procedimiento para determinar la concentración de un analito, usando las propiedades únicas de un *anticuerpo*.

El desarrollo del *radioinmunoanálisis* (RIA) ha sido el principal avance. Con algunas variaciones de este método se han determinado *haptenos* y proteínas.

Ekins fue el primero en reportar una determinación para tiroxinas empleando una proteína plasmática como reactivo de enlace específico, además de introducir el término de “reactivo limitante” y “análisis de saturación” para indicar que la concentración de proteína enlazante es insuficiente para unirse a todo el analito (marcado o no marcado). El porcentaje de radioactividad contenida en la fracción enlazada al anticuerpo o proteína fue inversamente relacionada a la concentración del analito (sin marcar) en la muestra o el estándar. Estableciéndose que:

- a) El enlace de anticuerpo y antígeno obedece las leyes de la estequiometría.
- b) Los anticuerpos tienen sitios de enlaces idénticos e independientes.
- c) Los antígenos tienen sitios reactivos idénticos.

La reacción de equilibrio se puede expresar en la siguiente forma:



donde:

k_{asoc} = Constante de velocidad de reacción de asociación.

k_{dis} = Constante de velocidad de reacción de disociación.

Ag = Antígeno sin unir.

Ac = Sitio de enlace del anticuerpo.

AgAc = Complejo antígeno- anticuerpo.

Un *antígeno* es una molécula que es capaz de estimular la producción de anticuerpos en un sistema biológico.

Un *anticuerpo* es una proteína sérica perteneciente a la familia de las inmunoglobulinas (Ig) de las que hay cinco clases: IgG, IgM, IgA, IgD, e IgE. La molécula está compuesta por un par de cadenas pesadas (440-450 aminoácidos) y un par de cadenas ligeras (210-220 aminoácidos). Las regiones variables de la inmunoglobulina comprenden aproximadamente 110 unidades de aminoácidos de ambas cadenas que se combinan a través de interacciones no covalentes para producir sitios de reconocimiento del antígeno. La superficie de una proteína antigénica está cubierta con sitios de reconocimiento del anticuerpo espacialmente separados llamados *epitopos*. Han sido estimados entre 5 y 10 aminoácidos en grupos que constituyen un epitopo.

Un *antisuero policlonal* es producido por la inmunización con un antígeno complejo y tendrá una gran variedad de inmunoglobulinas derivadas de muchas células B secretoras de anticuerpos en el animal huésped.

Un *antisuero monoclonal* contiene una sola clase de anticuerpos.

Los esteroides y otros analitos de bajo peso molecular (<1000 kDa) no tienen el tamaño suficiente para provocar una respuesta antigénica que se pueda medir, sin embargo, cuando se unen a moléculas acarreadoras como la albúmina de suero bovino o la tiroglobulina bovina (que son las que más se utilizan), se vuelven inmunogénicas. Estas moléculas pequeñas se denominan *haptenos* y el antisuero policlonal que se obtiene por la inmunización de animales con complejos hapteno-proteína contiene anticuerpos (inmunoglobulinas) que reconozcan al hapteno. La unión hapteno-proteína acarreadora es generalmente un enlace peptídico entre un grupo carboxilo del hapteno y un grupo amino libre de la proteína. Si el hapteno (en este caso un esteroide) no contiene grupos carboxilo, es necesario formar derivados que lo contengan. [37]

a) Empleo de anticuerpos monoclonales y policlonales.

Se han realizado estudios donde se emplean anticuerpos monoclonales, por ejemplo para determinar receptores de α -estrógenos en la detección de tumores de mama en humanos. Se demostró que la presencia de receptores para α -estrógenos indica el desarrollo de cáncer mamario, por lo tanto la determinación de estos receptores se ha empleado como un factor de pronóstico en el manejo de cáncer de mama. El anticuerpo que se utilizó es un anti-receptor de estrógeno denominado EVG-F9, que reconoce un epítipo localizado entre los aminoácidos 140-154 de los receptores de α -estrógenos y no reaccionan con los receptores de β -estrógenos, además de que su límite de detección se encuentra en el intervalo de femtomoles (10^{-15} mol/L). [38]

Por medio de inmunoensayos se han analizado los principales esteroides en fluidos biológicos, incluso algunos esteroides como los secosteroides y la vitamina D y sus metabolitos que no se habían podido analizar por inmunoensayos debido a que no había anticuerpos con suficiente afinidad y especificidad.

Los anticuerpos policlonales se han utilizado para determinar seocalcitol, un homólogo de la hormona natural 25-dihidroxitamina D3 que se ha empleado recientemente como un potente anticancerígeno. El análogo mostró ser de 50 a 200 veces más potente que la hormona natural para inhibir la proliferación celular, aunque fue sólo un 50% efectivo como agente calcémico. La evaluación del seocalcitol estimuló el desarrollo de un inmunoensayo empleando anticuerpos policlonales altamente específicos que pudieran eliminar el problema de reacciones cruzadas con metabolitos naturales de la vitamina D3, especialmente la 25-hidroxitamina D3 que es el principal metabolito circulante en el organismo. [39]

Otro ejemplo del empleo de anticuerpos policlonales es la determinación de cortisona y hormona liberadora de corticotropina en tejidos cerebrales y de amígdalas. Los anticuerpos se fijaron en electrodos de platino y se emplearon como inmunosensores en tubos de microdiálisis, para después determinar cuanto esteroide de las muestras biológicas se unió a los anticuerpos fijados en los electrodos. [40]

b) Compuestos de marcaje radioactivo.

Radioisótopos emisores de partículas β y γ . El tritio ha sido el más empleado en inmunoensayos de esteroides por ser el más disponible en compuestos esteroideos. Actualmente se ha empleado el isótopo 125 del yodo (^{125}I) que tiene ventajas sobre el tritio, por ejemplo, tiene actividad específica más alta, es más económico, proporciona valoraciones más robustas, sus emisiones γ se pueden contar sin el uso de liquido de centelleo o viales de conteo que son costosos y es más fácil controlar

el término de la reacción. Además existen en el mercado conjuntos de reactivos con marcadores que contienen yodo para la determinación de esteroides.

b.1) Técnica de Radioinmunoanálisis (RIA). Los Radioinmunoanálisis son inmunoensayos que emplean anticuerpos con marcaje radioactivo.

Durante el desarrollo del inmunoanálisis se ha tratado de emplear métodos menos laboriosos donde la determinación de esteroides sea directa, por ejemplo, la determinación de aldosterona en plasma se realizaba por métodos donde la muestra se sometía a un pretratamiento mediante extracciones con diclorometano. Después se desarrolló un método directo donde la extracción no fue necesaria, obteniéndose un método con la misma sensibilidad y especificidad, además de que los costos y productos de desecho disminuyeron. [41]

c) Marcadores no radioactivos.

El principal impedimento con radioisótopos es su tiempo de vida media y su lisis radioactiva que reduce potencialmente la sensibilidad de la valoración. Además de los potenciales riesgos a la salud y los problemas de legislación en cuanto al uso y disposición de desechos radioactivos, disolventes y fotofluorescentes necesarios para el líquido centelleante de conteo. Por lo que se han propuesto métodos alternativos para la medición de esteroides en fluidos biológicos, como los que utilizan enzimas, quimioluminóforos y fluoróforos.

Las enzimas han probado ser marcadores sensibles y versátiles en los inmunoensayos. La sensibilidad se debe a la amplificación de la señal por incubación prolongada y transformación catalítica. La versatilidad se debe a la variedad de sustratos y puntos de terminación de la valoración.

Los factores que afectan a la selección de una enzima son: El número de transformaciones de la enzima, la pureza de la preparación de la enzima, la sensibilidad, la facilidad y la rapidez de detección del producto, la ausencia de factores de interferencia en la muestra, la presencia de grupos potencialmente reactivos por acoplamiento, la estabilidad de la enzima y su conjugado, la disponibilidad y el costo. Las enzimas que más se han empleado son la peroxidasa extraída de la planta denominada “cola de caballo”, la fosfatasa alcalina obtenida de mucosa intestinal, la β -O-galactosidasa de *Escherichia coli*, la glucosa oxidasa de *Aspergillus Níger*, la ureasa penicilinasas de *Neisseria gonorrhoeae* y la luciferasa.

Existen algunas dificultades en el uso de enzimas para inmunoensayos, por ejemplo, la síntesis de antígeno marcado es difícil de controlar y la determinación del punto final es más compleja y tardada que en un análisis por RIA.

c.1) Técnica de Análisis sobre inmutosorbente unido a enzimas (ELISA). Los análisis por ELISA se llevan a cabo utilizando enzimas, y se han tratado de mejorar en sensibilidad y reproducibilidad, por ejemplo, se han desarrollado estos métodos para determinar 2-hidroxiestrone y 16 α -estrone, metabolitos de esteroides que se encuentran en niveles muy bajos y donde la relación (2/16 α) se demostró que es inversamente proporcional al riesgo de cáncer cervical y de mama. La importancia de este método es que la determinación de los metabolitos se puede llevar a cabo en pacientes posmenopáusicas, pues en esta etapa los niveles de metabolitos de esteroides son más bajos. [42]

Se han determinado esteroides mediante combinaciones de métodos, entre los cuales se encuentran los inmunoanálisis. Por ejemplo, para estudiar la supresión de la actividad de la androsterona administrando preparados farmacéuticos que contienen anabólicos, primero se cuantificaron los andrógenos por CLAE con detección UV y por inmunoensayo enzimático. Posteriormente se confirmó las identidades de los esteroides por CG-EM. [43]

Para determinar el efecto de la geometría y el estado de ionización del grupo carboximetil oxima sobre la afinidad de testosterona a anticuerpos, se llevó a cabo la purificación de los isómeros geométricos de la testosterona 3-(O-carboximetiloxima) y sus derivados de histamina mediante la técnica de CLAE en fase reversa. Después mediante un inmunoensayo enzimático competitivo para testosterona, se determinaron sus características de enlace a anticuerpos. [44]

Los compuestos quimioluminiscentes también se han empleado en la técnica de ELISA. En la quimioluminiscencia la excitación es realizada por una reacción química, por lo regular una reacción de oxidación irreversible. Esta reacción puede ser mediada por enzimas en un sistema biológico donde el proceso se llama bioluminiscencia. Si la reacción química es iniciada por un aumento en la temperatura de los reactantes, entonces el proceso se denomina termoquimioluminiscencia. Si la reacción química es iniciada por una carga eléctrica aplicada a los reactantes, el proceso se denomina electroquimioluminiscencia.

Muchos compuestos orgánicos son quimioluminiscentes después de la oxidación por ejemplo las hidrazidas cíclicas como el 6-amino-2,3-dihidroftalazina-1,4-diona comúnmente llamada *isoluminol*, así como sus derivados aminonaftil hidrazidas. También se emplean ésteres de acridinio y acridanos, dioxetanos y ésteres activos de oxalato. Los derivados de *isoluminol* han sido empleados para monitorear inmunoensayos en fase sólida que fueron desarrollados para determinar esteroides en plasma y orina.

Se han desarrollado métodos por ELISA para determinar estriol-3-sulfato, donde la actividad

enzimática se mide empleando isoluminol, el cual es un compuesto quimiolumincente. Para esta determinación se utilizó un *punte heterólogo* (dos haptenos) ya que un inmunoensayo enzimático con puente homólogo (un hapteno) es menos sensible que un RIA debido a que el anticuerpo obtenido presenta afinidad por el esteroide que se quiere determinar y por el puente que está unido a la proteína acarreadora, y cuando usamos un sistema de puente heterólogo (2 haptenos) la especificidad tiende a incrementar. El estriol-3-sulfato se ha encontrado a altas concentraciones en tejido de tumor mamario en ratas de laboratorio. Estos métodos por ELISA que emplean quimiolumincentes han tratado de sustituir a los métodos por RIA por las razones mencionadas anteriormente. [45]

FLUORÓFOROS. La fluorescencia y la fosforescencia son procesos de emisión basados en la excitación de átomos o moléculas por absorción de un haz de radiación electromagnética. La especie excitada regresa después al estado basal, dando su exceso de energía en forma de fotones. La fluorescencia es un fenómeno mucho más rápido que la fosforescencia, y por lo general se extingue en fracciones de segundos después de la excitación. La emisión fosforescente puede durar minutos e incluso horas después de la excitación.

La fluorescencia es uno de los posibles mecanismos por los que una molécula regresa al estado basal después de haber sido excitada por absorción de radiación. Así, todas las moléculas absorbentes podrían ser fluorescentes, pero no lo son porque su estructura permite caminos no radiantes por los que puede tener lugar la relajación de forma más rápida que la emisión fluorescente.

c.2) Técnica de fluoroinmunoanálisis (FIA). En base a compuestos fluorescentes se han desarrollado los fluoroinmunoanálisis. La biotina es uno de los compuestos útiles en los FIA. Pero cuando se trató de formar conjugados esteroide-biotina los reactivos que se emplearon comercialmente no fueron lo suficientemente nucleofílicos para una acilación del hapteno (en este caso un esteroide) además, los conjugados fueron difíciles de aislar y caracterizar. La síntesis de nuevos compuestos fluorados como el trifluoroacetato de biotinilaminopropilamonio, un nuevo reactivo nucleofílico para biotinilación, ha permitido el desarrollo de un FIA para determinar la 17 α -hidroxiprogesterona en plasma, empleando la 17 α -hidroxiprogesterona biotinilada como compuesto trazador. Este método resultó ser más sensible y económico que un método por RIA. [46]

Los autores del estudio anterior desarrollaron un FIA para determinar 4-androstano-3,17-diona en plasma y suero, debido a que la mayoría de los inmunoanálisis que existían para este metabolito

empleaban un trazador radioactivo. El nuevo método resultó ser más económico y preciso además de que se disminuyen los desechos radioactivos. El metabolito se determina con mucha frecuencia, pues aunque no actúa directamente con la fisiología, es producido en las glándulas adrenales, gónadas y tejido periférico, se sintetiza a partir de la dehidroepiandrosterona, de la 17-hidroxiprogesterona, y 11-deoxicortisol; es por eso que se le busca en estados patológicos de tipo endocrino. [47]

Otro ejemplo interesante de FIA es el que se realizó para determinar hormona luteinizante (HL) y hormona folículo estimulante (HFE) en hombres que se sometieron a un tratamiento hormonal de anticoncepción. El propósito fue comprender la importancia de suprimir la hormona gonadotropina para lograr una supresión óptima de conteo de espermatozoides, y se encontró que el tratamiento sí disminuye los niveles de las hormonas en estudio. [48]

Se ha desarrollado un método denominado inmunoensayo enzimático por electroforesis capilar, con detección electroquímica para la determinación de cortisol. Este método ofreció varias ventajas sobre otros inmunoensayos convencionales. La detección electroquímica permitió obtener límites de detección en niveles de atomotes (10^{-18} mol/L). El método mostró tener mayor selectividad y la utilización de pocas cantidades de reactivos. Al incluir separaciones por electroforesis capilar se omitieron varios pasos de lavado. Se pudo reducir el tiempo de incubación. Por último, se determinaron varios componentes a la vez en una sola columna capilar. [49]

Otro interesante método en la determinación de esteroides es el que involucra la técnica de inyección de flujo y el inmunoensayo que será discutido en la parte que corresponde a OTROS MÉTODOS.

III) MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS.

a) Espectroscopia de absorción ultravioleta (UV). La espectroscopia de absorción ultravioleta es desde los años 40's, una herramienta de rutina que ha permitido la fácil caracterización y cuantificación de esteroides con sistemas insaturados conjugados principalmente los esteroides del tipo "4-en-3-ona" y los trienos de la vitamina D. Los métodos UV siguen siendo uno de los más útiles para el análisis de muestras que contienen este tipo de esteroides. Se han desarrollado otros métodos basándose en la absorción ultravioleta, tales como las mediciones por *fluorescencia* y *dicroísmo circular*⁶. Con respecto al dicroísmo circular se ha reportado un estudio donde se determina el dicroísmo circular de isómeros de oximas de progestagenos (levonorgestrel, acetato de levonorgestrel y noretisterona), andrógenos (metiltestosterona, fenil propionato de testosterona) y anabólicos (fenil propionato de nortestosterona) después de haber reaccionado con hidroxilamina. El monitoreo de la reacción se llevó a cabo por CLAE-FN. [50]

El dicroísmo circular se ha empleado para caracterizar esteroides sintetizados mediante reacciones microbianas (reacciones de hidrogenación por parte de *Clostridium paraputrificum*, *Rhodotorula glutinis*, *Mycobacterium smegmatis* y reacciones de aromatización por parte de *Nocardia sp*). [51]

b) Espectroscopia de absorción infrarroja (IR). La espectroscopia de absorción infrarroja, también ha traído grandes beneficios desde los años 50's por revelar los grupos funcionales en una molécula esteroide y por la comparación del espectro de una muestra con el espectro de una sustancia de referencia, ayudando así a la identificación de esteroides individuales. A pesar de que no se necesitan procedimientos para formar derivados, la espectroscopia de IR sólo identifica grupos funcionales y poca información se podría obtener acerca de la estructura de un nuevo esteroide.

Existen métodos por CLAE en donde la espectroscopia de IR es el medio de detección, un ejemplo es un análisis reportado para determinar colesterol en grasas animales y aceites de pescado por CLAE-FR donde el sistema de detección fue la espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (IRTF). [52]

Se ha desarrollado un método denominado *espectroscopia de reflectancia en el infrarrojo cercano* (ERIRC) que ha mostrado ser una herramienta analítica rápida y adecuada en el aseguramiento y control de la calidad en la industria farmacéutica. Este método se aplicó en la cuantificación de succinato de hidrocortisona sódica en materias primas y productos terminados. [53]

⁶ El dicroísmo circular es un método analítico que aprovecha la característica de un analito de mostrar diferentes colores en diferentes direcciones de la luz transmitida.

c) Espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN). Se ha empleado para fines de identificación y elucidación estructural reconociendo ciertas características estructurales relacionadas con sus átomos de hidrógeno. Se han empleado métodos donde la RMN de protones (RMN-¹H) es una herramienta muy útil como medio de detección en CLAE. Estos métodos tienen como finalidad monitorear compuestos con estructura muy similar, por ejemplo, estereoisómeros de los metabolitos de los esteroides. [50]

La RMN-¹H y RMN-¹³C (relacionado a los átomos de C¹³) se han utilizado en la elucidación estructural durante la síntesis de los derivados de la 5 α -hidroxitestosterona y la testosterona. [54]

También se han sintetizado derivados del colesterol cuya estructura química se ha tenido que elucidar mediante RMN-¹H y RMN-¹³C, después de haber sido separados por CLAE empleando columnas semipreparativas de ión plata. Los iones Ag⁺ forman complejos con los dobles enlaces de los esteroides. [55]

Dentro de los sistemas de detección empleados en CLAE, se están desarrollando sistemas que emplean Resonancia magnética nuclear de protones (RMN-¹H) para la detección de ciertos analitos ya sea de manera individual o en conjunto con otros sistemas de detección como son espectrometría de masas (EM), detectores de Ultravioleta (UV) y detectores de Infrarrojo (IR). [53]

Un método para la determinación de oligosacáridos, implica el análisis por CLAE empleando como sistemas de detección la RMN-¹H y la Espectrometría de masas (EM), además de un novedoso método de extracción por dispersión en una matriz de fase sólida, que combina la homogenización de la muestra y extracción de los analitos deseados en un solo paso partiendo de la materia prima intacta. [56]

d) Espectrometría de masas (EM). La Espectrometría de masas es una técnica que mide las masas relativas de moléculas al convertirlas en iones.

La detección por Espectrometría de masas acoplado a técnicas de separación como CLAE y CG, ha sido hasta el momento de las más empleadas en la determinación de trazas de esteroides en diferentes matrices biológicas (plasma, orina, suero) y productos farmacéuticos.

La EM con ionización por electroespray se ha empleado como medio de detección en la técnica de electroforesis capilar junto con detección con arreglo de diodos, para la identificación de glicoalcaloides esteroidales los cuales son empleados como materias primas en la síntesis de drogas esteroidales de interés farmacéutico. Estos compuestos fueron extraídos de plantas del género *Solanum* (Solanaceae). [57]

IV) MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS.

Los primeros datos cromatográficos empezaron con los experimentos de Michael Tswett y David Talbot Day en los inicios de 1900. Estos experimentos jugaron un papel muy importante en el progreso del campo de los esteroides, y permitió que la Cromatografía fuera una de las herramientas más importantes para los químicos e investigadores analíticos involucrados en el aislamiento, identificación y cuantificación de estas moléculas.

La Cromatografía de adsorción en columna fue el primer método cromatográfico disponible para los investigadores de esteroides, hasta que Martín y Synge introdujeron en 1941 la Cromatografía de partición y la Cromatografía en papel. Así comenzó el desarrollo de los sistemas de columnas de partición y la Cromatografía en papel de estos compuestos.

Una publicación en 1952 por James y Martín, acerca de una técnica de partición gas-líquido y de un aparato relativamente simple, dio inicio a que la Cromatografía de gases se convirtiera en una disciplina práctica.

La Cromatografía en capa fina, concebida por Ismailov y Shraiber en 1938, no fue una técnica de uso general, sino hasta los años 50's cuando se dio a conocer principalmente por los trabajos de Stahl. Este método de separación encontró amplio uso en la investigación de esteroides, más que la Cromatografía de gases.

Otra técnica útil fue la Cromatografía de filtración en gel, debido a que Porta y Flodin introdujeron los dextrans cruzados como lecho molecular.

La Cromatografía de intercambio iónico comenzó con la síntesis de resinas de intercambio iónico en 1935 por Adams y Holmes. Este tipo de Cromatografía y la Electrocromatografía han encontrado poco uso en el campo de los esteroides debido a que la mayoría de estos compuestos no son ionizados [28].

A continuación se mencionan las técnicas cromatográficas más empleadas en el análisis de esteroides.

a) Cromatografía en papel. Los sistemas de Cromatografía en papel, tanto en fase normal como en fase reversa, son rara vez usados en la actualidad. Estas separaciones han sido utilizadas para la purificación de esteroides radiomarcados antes de ser empleados en alguna determinación. También pueden utilizarse para la purificación de un esteroide antes de su cuantificación. La testosterona es uno de los esteroides que ha sido purificado por cromatografía en papel antes de su cuantificación por un inmunoensayo. Los que llevaron a cabo ese estudio recomendaron usar la cromatografía en

papel para la separación de metabolitos de la vitamina D. Este método consume demasiado tiempo y además tiene interferencias de sustancias no específicas que son eluidas junto con el compuesto de interés, produciendo resultados confusos. A pesar de que se puede hacer un cuidadoso lavado previo del papel, este método cromatográfico es poco recomendable en la separación de esteroides.

b) Cromatografía en columna.

Esta técnica, como su nombre lo dice, relaciona la separación de esteroides sobre un material empacado dentro de una columna (usualmente de vidrio, pero algunas veces de plástico inerte) la cual puede ser de cualquier diámetro y /o longitud. La base de la separación puede ser *Cromatografía de partición*, donde los esteroides de interés son separados por sus solubilidades relativas en una fase móvil (por lo regular un disolvente orgánico) y una fase estacionaria (por lo regular un disolvente hidrofílico). Esta es la comúnmente llamada Cromatografía en fase normal. Los disolventes pueden ser invertidos y la fase hidrofílica puede ser usada como fase móvil, en este caso el sistema se convierte en Cromatografía de fase reversa. En esta técnica la fase estacionaria es mezclada con un soporte inerte, la cual es usualmente celita que es una *tierra de diatomea*⁷, la cual ha sido lavada y tamizada, y la mezcla ha sido cuidadosamente empacada dentro de la columna y se permitirá el paso de la fase móvil por gravedad. Las proporciones de los disolventes que componen la fase móvil pueden permanecer constantes (elución isocrática) o puede variar (gradiente de elución). Un método alternativo es empacar la columna con un material adsorbente y los esteroides pueden ser separados por adsorción selectiva a este material, siendo eluidos de la columna con disolventes de polaridad creciente. Los adsorbentes empleados son Florisil (silicato de magnesio), óxido de aluminio y sílice.

Cromatografía de exclusión: Una forma de Cromatografía en columna que todavía se emplea es la Cromatografía por exclusión de tamaño o filtración en gel, que utiliza como fase estacionaria Sephadex (dextranos cruzados), y ha encontrado considerable aplicación en la separación de conjugados de esteroides (sulfatos y glucurónidos). El Sephadex fue originalmente diseñado para usarse con compuestos hidrofílicos en disolventes acuosos polares, pero actualmente están disponibles como Sephadex modificados, como el LH-20 y el Lipidex para filtración en gel de compuestos hidrofóbicos, como los esteroides. El Sephadex LH-20 se ha empleado en un sistema cromatográfico multicolumna para la separación de pregnenolona y 17-hidroxipregnenolona después de ser extraídos con cloruro de metileno de muestras de plasma. Este método incluye un

⁷ Tierra de diatomea. Depósito sedimentario silíceo blando, fino, poroso, amarillo, gris claro o blanco compuesto principalmente de los esqueletos microscópicos de las diatomeas, que son algas microscópicas unicelulares con exoesqueleto de silicio simétrico.

radioinmunoanálisis para la cuantificación de los esteroides, y tiene la ventaja de que no hay reacciones cruzadas. La pregnenolona y la 17-hidroxipregnenolona se han estudiado ampliamente para determinar deficiencias enzimáticas en pacientes pediátricos y adolescentes con crecimiento acelerado, y en mujeres adultas con ovarios policísticos, acné o amenorrea [58].

La cromatografía con Sephadex LH20 se ha empleado en sistemas *en línea* con radioinmunoanálisis (RIA), para determinar la relación cortisol/cortisona y su relación con la hipertensión en pacientes con la enfermedad de Cushing y en la purificación de metabolitos de estrona y estradiol en fluidos de quiste de mama. [59].

También para la determinación de 18-hidroxi-11-desoxicorticosterona y 18-hidroxicorticosterona para diagnosticar la deficiencia de aldosterona sintasa, una enzima involucrada en la síntesis de aldosterona, que es el principal mineralocorticoide de las glándulas adrenales humanas y que es sintetizada a partir de la 11-desoxicortisona. [60]

El Lipidex 5000 también se ha utilizado como un medio para purificar esteroides trimetilsilil éteres formados por incubación con trimetilsililimidazol, el reactivo en exceso se retiene en el Lipidex mientras que el derivado es eluido con hexano. El Sephadex puede también ser modificado para producir Sephadex sustituido con dietilaminoetil que actúa como una columna de intercambio iónico, pero que conserva la propiedad de exclusión por tamaño. Los esteroides urinarios se pueden fraccionar en esteroides libres, glucuronidos y sulfatados después de una extracción con cartuchos de EFS C₁₈ usando columnas de DEAE-Sephadex A25 sustituyendo a la extracción líquido-líquido. El Lipidex 5000 se ha utilizado para aislar metabolitos de la dehidroepiandrosterona (7- α -hidroxidehidroepiandrosterona) en tejido adiposo de mama. Posteriormente se identificó mediante las técnicas de CLAE y CG-EM. [61]

Cromatografía de afinidad. Este tipo de cromatografía en columna se ha empleado para determinar receptores de esteroides, donde los esteroides son fijados en la columna para cromatografía de afinidad, tal es el caso de la unión de conjugados de progesterona y 17 β -estradiol para determinar los receptores de estos esteroides en extractos de tejido cerebral de ratón [62].

A partir de extractos de *Saccharomyces cerevisiae* se ha purificado el receptor α de estrógenos, el cual fue clonado en esta levadura. La purificación se llevó a cabo usando Cromatografía de afinidad con heparina y Cromatografía de afinidad con hemisuccinato de 17 β -estradiol inmovilizado. La cromatografía de afinidad a la heparina fue útil para separar las proteínas del extracto. [63]

Cromatografía de ión plata (Ag^+). Se ha empleado para separar compuestos que contienen dobles enlaces, por ejemplo los esteroides. Este tipo de Cromatografía se basa en la capacidad de los compuestos de plata para formar complejos polares reversibles con los dobles enlaces, llevando a cabo la separación según el número de dobles enlaces y de la configuración (cis ó trans). Esta técnica se ha adaptado a la Cromatografía en capa fina CCF, Cromatografía líquida de alta eficiencia CLAE, Extracción en fase sólida EFS y Cromatografía en columna de baja presión. Sin embargo en este último caso existía la dificultad de obtener un empaque homogéneo, por lo que se han obtenido métodos para la preparación de un empaque adecuado. Un método consiste en homogenizar la sílica gel activada en un pequeño volumen de disolución acuosa de nitrato de plata. Se vierte a la columna una disolución de hexano con 2% de etanol absoluto hasta una altura de 5 cm aproximadamente y se deja escurrir por las paredes de la columna la sílica gel previamente preparada con nitrato de plata con la ayuda de porciones de líquido de elución. Se adiciona en la columna, la cantidad equivalente a 0.5 cm de altura de sulfato de sodio anhidro. Por último se deja fluir el exceso de eluyente y se cubre la columna con papel aluminio para proteger el empaque de la luz. Este método se empleó para separar esteroides en aceite de oliva. [50,64]

c) Cromatografía en capa fina.

Si en lugar de empacar una columna con el material adsorbente, se cubre una placa con este material y la colocamos dentro de un recipiente abierto, el cual contiene la mezcla de disolventes como fase móvil, se lleva a cabo el proceso de Cromatografía en capa fina CCF (*Thin layer chromatography* TLC). Las placas pueden ser compradas o preparadas en el laboratorio. La CCF de esteroides es todavía ampliamente utilizada y el material adsorbente es por lo regular gel de sílice, aunque el óxido de aluminio se ha empleado para separar andrógenos C-19.

La Cromatografía en capa fina tiene la ventaja de que se puede procesar un número grande de muestras en una sola elución cromatográfica. La dificultad de este método es la necesidad de identificar las bandas o áreas sobre las placas que correspondan al esteroide de interés. Los esteroides que absorben en el UV, se pueden visualizar con luz UV, ya que el material adsorbente contiene un compuesto fluorescente (GF 254) que aumenta la absorbancia de los esteroides en el espectro UV. Con estas placas cromatográficas de gel de sílice GF 254 se ha llevado a cabo la determinación de cortisol en pastas emulsificables y lociones. La mezcla de disolventes que sirvió como fase móvil fue 1,2-dicloroetano: etanol (5:1 v/v) [65].

Los esteroides que no absorben en la región de luz UV, se pueden visualizar rociándolos con una disolución reveladora y después aplicando calor. Una ventaja adicional de la CCF, es que los esteroides radioactivos pueden ser identificados con película de rayos-X.

El empleo de la CCF puede en algunos casos sustituir al método por CLAE para ahorrar tiempo y dinero, por ejemplo, se han separado esteroides C-19 provenientes del metabolismo de la dehidroepiandrosterona y androstendiona en tejidos de mamíferos, donde las placas fueron acondicionadas con una solución de nitrato de plata, y la fase móvil fue tolueno/acetona/cloroformo (8:2:5 v/v). El método se podría aplicar a la separación de esteroides en muestras de plasma, orina, fluido amniótico y cultivos celulares. [66]

Estudios recientes han mostrado la influencia de la temperatura sobre la retención y separación del colesterol y ácidos biliares donde se ha utilizado la CCF en fase reversa. La fase móvil utilizada fue una mezcla de metanol/agua en diferentes proporciones, las eluciones se llevaron a cabo en una cámara de elución en ambiente de vapor a diferentes temperaturas (5°C a 60°C). [67]

Para facilitar este tipo de estudios, se ha desarrollado una cámara de elución donde se puede controlar la temperatura (desde -20°C hasta 60°C) en separaciones por CCF y Cromatografía en capa fina de alta eficiencia (CCFAE), de la cual se ha probado su efectividad analizando estrógenos naturales. [68]

Se determinaron **ecdisteroides**⁸ en plantas por un proceso de CCF de dos dimensiones, donde primero se realizó una elución vertical con un sistema de disolventes y después una elución horizontal sobre la misma placa con un sistema diferente de disolventes. Dependiendo de la polaridad de los analitos se puede utilizar fase normal (FN) o fase reversa (FR), por ejemplo, para ecdisteroides neutros se utilizaron cromatoplasmas de gel de sílice en fase normal y para ecdisteroides polares se utilizaron cromatoplasmas de octadecilsilano. En la primera elución la fase móvil estaba libre de agua y en la segunda elución se usaron pequeñas cantidades de agua en la fase móvil. [69]

La CCF se ha empleado junto con otras técnicas analíticas, por ejemplo CLAE en la separación y purificación de β -anómeros de glucurónidos de ácidos biliares. La identificación estructural de estos compuestos se llevó a cabo mediante la técnica de RMN-¹H. [70]

Los isoflavonoides son otro tipo de esteroides aislados de la soya y semilla de soya por CCF, que ejercen un efecto protector contra agentes carcinógenos (inhiben el crecimiento y proliferación de varias líneas celulares derivadas de varios carcinomas de próstata, mamas, colon y células sanguíneas). Estudios realizados por CCF, CLAE y RIA revelaron que la cerveza contiene significantes cantidades de isoflavonoides. [71]

Diversos estudios de interacciones entre esteroides y polímeros de β -ciclodextrinas solubles en agua se han realizado empleando la CCF-fase reversa por ser un método rápido y sencillo. De esta

⁸ Ecdisteroides. Hormonas esteroidales secretadas por la glándula protorácica de los insectos. Actúa sobre la epidermis, regulando el proceso de muda de los insectos.

manera se logra obtener información acerca del mecanismo de formación de los complejos de inclusión entre las ciclodextrinas y los analitos. Se ha demostrado que los complejos de inclusión esteroides-ciclodextrinas mejoran el desempeño de las formulaciones intravenosas, prolongan la absorción pulmonar, incrementan la estabilidad de la molécula huésped, aumentan la concentración de droga en la sangre y mejoran la biodisponibilidad del fármaco [72].

Por medio de CCF se pueden identificar subproductos provenientes del metabolismo de esteroides en ciertos tejidos, por ejemplo, en tejido de endometrio humano se ha evaluado el metabolismo de la progesterona y el efecto de la interleucina IB sobre el metabolismo de estrógenos. [73,74]

Por medio de CCF en combinación con otros métodos se pueden identificar esteroides, por ejemplo, se han identificado 7α -hidroxi-DHEA (dehidrohepiandrosterona) y 7β -hidroxi-DHEA en extractos de hígado de ratón, empleando CCF y CG-EM [75].

La disponibilidad de micropartículas de sílice ha introducido la *cromatografía en capa fina de alta eficiencia* CCFAE (*High Performance Thin Layer Chromatography* HPTLC) lo cual incrementa su poder de resolución. Se han separado metabolitos hidroxilados de progesterona del hongo *Aspergillus fumigatus* usando Kieselgel 60 F254 Merck®, eluyendo con acetato de etilo/eter de petróleo (65:35 v/v). También se separaron estrógenos del catecol, eluyendo con benceno/heptano/acetato de etilo (5:2:3 v/v) o cloroformo/ acetato de etilo (3:1 v/v). La técnica de CCFAE se ha empleado en combinación con otros métodos como son CLAE y CG en pruebas “*antidoping*” para la búsqueda de drogas en orina de caballos de carreras. El procedimiento consistió en una extracción alcalina y posterior análisis por CCFAE y (CG). Después se realizó una extracción ácida seguida de un análisis por CCFAE y CLAE. [4]

d) Cromatografía electroforética.

Existen técnicas de separación que se derivan de la *electroforesis capilar* (EC), que se han aplicado al análisis de esteroides y que representan interesantes alternativas a las técnicas cromatográficas, pues ofrecen rapidez y bajos costos de análisis al disminuir el consumo de disolventes, la cantidad de muestra y los tiempos de análisis.

Las separaciones en EC se basan en la generación de un **flujo electroosmótico**⁹ (FE) a lo largo de un capilar de sílice fundida, utilizando disoluciones amortiguadoras, que por lo regular son disoluciones de boratos, en el cual se encuentra disuelto un electrolito de fondo que genera moléculas con carga positiva sobre la superficie de sílice fundida, y que dan origen al FE cuando

⁹ Fenómeno producido por el flujo neto de cationes hacia el cátodo. Este flujo arrastra a moléculas con carga positiva, moléculas neutras y moléculas con carga negativa hacia el cátodo donde se encuentra el detector. Se puede invertir la dirección del FE cuando la superficie del capilar de sílice se vuelve positiva por la adición de surfactantes catiónicos.

son dirigidas hacia el cátodo por la aplicación de un campo eléctrico. Dos parámetros importantes que se toman en cuenta para la separación son el tamaño de la molécula y el número de cargas positivas y negativas. En electroforesis capilar el orden de elución es: primero los cationes, después compuestos neutros y por último los aniones, siempre y cuando el FE se dirija hacia el cátodo, pues si el FE se dirige hacia el ánodo el orden de elución se invierte.

Un aspecto importante en EC es que no se pueden detectar compuestos neutros de manera individual, sino que son arrastrados en conjunto por el FE a lo largo del capilar hacia el detector que se encuentra del lado del cátodo. Debido a que la mayoría de las drogas son bases, se emplean disoluciones amortiguadoras de pH ácido para que las moléculas se ionicen y queden con carga positiva. Para las moléculas ácidas se emplean disoluciones amortiguadoras alcalinas acuosas, que generan moléculas cargadas negativamente, las cuales son forzadas por el flujo electroosmótico a migrar al detector a pesar de que tratan de migrar en la dirección opuesta hacia el ánodo.

En la electroforesis capilar no acuosa se utilizan disolventes orgánicos, mejorando así la solubilidad de compuestos hidrofóbicos como los esteroides, y en algunos casos reducen la velocidad de degradación de compuestos químicamente inestables.

Las técnicas que se derivan de la EC son la *Cromatografía capilar electrocinética micelar (CCECM)*, la *Electrocromatografía capilar (ECC)* y la *Cromatografía electrocinética de microemulsión (CECME)*, las cuales han mostrado tener una gran capacidad de separación. [76]

La *cromatografía capilar electrocinética micelar (CCECM)* se desarrolló por la necesidad de analizar compuestos neutros de manera individual y compuestos con una relación tamaño-carga muy similar, cosa que no se puede hacer con la electroforesis capilar. La CCECM se basa en la diferencia de partición de los analitos entre una fase de micelas y una fase acuosa. Se lleva a cabo empleando disoluciones amortiguadoras de pH alcalinos adicionados de dodecil sulfato de sodio (SDS) en concentración mayor a su concentración micelar crítica, formando así micelas cargadas negativamente. En este método el FE se dirige hacia el cátodo y las micelas hacia el ánodo, pero el FE es de tal magnitud que el movimiento neto es hacia el cátodo. En ausencia de las micelas todas las moléculas neutras llegarían al detector al mismo tiempo. Las micelas tardan más tiempo en llegar al detector porque tienden a migrar hacia el ánodo. Si una molécula neutra alcanza el equilibrio entre la disolución de fondo y el interior de las micelas, su tiempo de migración estará entre el tiempo que se tarda la molécula en llegar al detector en ausencia de micelas y el tiempo que tarda en llegar la micela al detector. Por lo tanto, entre más tiempo pasa la molécula dentro de la micela mayor será su tiempo de migración. A las micelas dentro del capilar se les denomina fases pseudoestacionarias, y por eso, este método se considera un método cromatográfico. [77,78]

Una desventaja de este método es que la alta concentración de surfactantes hace incompatible la detección con espectrometría de masas. La partición de los solutos neutros depende de la hidrofobicidad de los analitos a determinar. Las micelas con cargas negativas intentan migrar en contra del flujo electroosmótico, por lo tanto los compuestos hidrofóbicos son retenidos en la micela y posteriormente son detectados. Los solutos ionizados también migran electroforéticamente debido a su carga, por lo que en el CCECM se pueden determinar mezclas de solutos neutros y cargados. Cuando los componentes altamente hidrofóbicos son muy retenidos por la micela, la resolución es baja. Este problema se soluciona empleando disolventes orgánicos (como metanol) adicionados en la disolución amortiguadora. Pero existe el problema de evaporación del disolvente orgánico, por lo que también se han empleado ciclodextrinas adicionadas a la disolución amortiguadora en lugar de disolventes orgánicos. [76]

La CCECM ha sido útil en el análisis de drogas ilícitas, entre las que se encuentran los esteroides anabólicos y sus correspondientes ésteres. [78]

Una desventaja que tenía la CCECM era que, debido a las pequeñas dimensiones del capilar y poca capacidad de volumen de la muestra, tenía baja sensibilidad por concentración al ser detectados los analitos por detectores de UV. Para vencer este problema se han desarrollado dos técnicas para concentrar la muestra mediante sistemas conectados en línea. Estas técnicas son la *acumulación o apilamiento de la muestra* y el *efecto de ampliación*.

En *acumulación o apilamiento de la muestra* la disolución de la muestra tiene una fuerza iónica menor, su conductividad es menor y su resistencia es mayor que la del electrolito de fondo. El campo eléctrico a través de la muestra inyectada en el capilar es mucho mayor que el campo eléctrico en el electrolito de fondo, por lo tanto, los iones migran muy rápido dentro de la zona de muestra porque el campo eléctrico es muy grande. Cuando los iones llegan al límite de la zona su velocidad de migración disminuye porque el campo eléctrico es menor fuera de la zona de muestra. Este proceso de apilamiento continúa hasta que la mayoría de las moléculas neutras y cargadas se agrupan en bandas dentro de la zona de la muestra. Con un fuerte flujo electroosmótico se logró incrementar la concentración al menos 10 veces, pero cuando se suprimió el flujo electroosmótico la concentración se incrementó hasta 100 veces. [77]

La técnica de *efecto de ampliación* se define como el enriquecimiento y acumulación de analitos en la micela que penetra en la zona de muestra. La muestra se prepara en una matriz con conductividad similar a la de la disolución de fondo, pero sin micelas, y es introducida en el capilar. Si se combinan las dos técnicas y se suprime el flujo electroosmótico se obtienen mejores resultados. El FE se suprime con SDS, pero sólo se pueden concentrar analitos neutros y catiónicos. El empleo de surfactantes catiónicos (como el bromuro de cetiltrimetilamonio) permite concentrar analitos

aniónicos. [77]

En un estudio realizado para la determinación de los esteroides cortisona, hidrocortisona y testosterona, para suprimir el FE se empleó un capilar con las paredes recubiertas de poliacrilamida en presencia de surfactantes catiónicos. Se evaluaron las dos técnicas de concentración de la muestra y se logró un aumento de 60 veces en la respuesta por la técnica de acumulación de la muestra y un aumento de 600 veces en la técnica por efecto de ampliación. [77]

En otro estudio llevado a cabo por CCECM, se empleó la técnica de efecto de ampliación y una mezcla de surfactantes, uno aniónico que fue el dodecil sulfato de sodio (SDS) y un **zwiterión**¹⁰, lo que genera una micela más grande que las formadas individualmente por cada uno de los surfactantes y con una carga negativa superficial menor, por lo que la partición de los esteroides hidrofóbicos aumentó considerablemente. La respuesta de los esteroides aumentó hasta 370 veces. [79]

La *electrocromatografía capilar* (ECC) es particularmente útil en la separación de esteroides neutros. Los analitos cargados son difíciles de analizar por este método. Las separaciones resultan de los efectos combinados de electroforesis y cromatografía de partición dentro de un capilar de sílice fundida, que se empaca con fase estacionaria del mismo modo que en CLAE, normalmente se emplea sílice-C₁₈ de 1.5 a 3 µm. La fase móvil pasa a través de la columna por electroósmosis en lugar de aplicar presión como en CLAE.

Cuando se analizan ácidos estos tienden a migrar en contra del flujo electroosmótico reducido y pueden no ser detectados. Este problema se soluciona trabajando a un pH ácido para que los analitos estén neutros.

Se han empleado dos métodos para detectar esteroides neutros y esteroides polares en orina de mujeres embarazadas. Uno es ECC con detección por Espectrometría de masas (EM) y otro es ECC con detección de fluorescencia inducida por láser (FIL). En ambos casos se emplea una columna capilar **monolítica macroporosa**¹¹, de carácter hidrofóbica, la cual se fabrica con una tecnología de gel de poliacrílico. Esta columna tiene ventajas en cuanto a que no permite que se adhieran impurezas en las paredes de la columna y no hay formación de burbujas. Es por eso que se puede emplear la detección por EM. [80]

En el método de ECC-FIL se lleva a cabo una reacción precolumna para formar derivados fluorados mediante FIL para cetoesteroides dansilados con dansilhidracina. Los límites de detección de los

¹⁰ Un Zwiterión es una molécula que tiene en un extremo una carga positiva y en otro extremo una carga negativa, es decir, actúa como catión o como anión.

¹¹ Significa que la columna esta construida de una sola pieza y que posee poros relativamente grandes en su interior.

cetoesteroides por ECC-FIL estuvieron en los niveles de atomoles, mientras que mediante el método de ECC-EM, el límite de detección fue del orden de 10^{-15} mol/L) en femtomoles. [80]

En otro estudio de esteroides de interés farmacéutico mediante la ECC, se evaluó una columna de poliestireno-divinilbenceno (PE-DVB) de fase reversa. Se encontró que el flujo electroosmótico se mantiene casi constante en un intervalo de pH 2 a 10, lo que es una ventaja sobre columnas capilares empacadas con sílice- C_{18} , que son las que comúnmente se utilizan. Normalmente en una ECC que emplea una columna capilar empacada con C_{18} , el flujo electroosmótico se incrementa cuando hay un incremento de la concentración de la disolución amortiguadora o del potencial aplicado, lo que aumenta la hidrofobicidad del analito, por lo tanto aumenta su partición con la fase estacionaria y su tiempo de migración. Con una columna PE-DVB de fase reversa, ocurre el efecto inverso. [81]

En un proceso de intercambio iónico, cuando están presentes estos sitios sobre el copolímero de PE-DVB, el FE se incrementa conforme se incrementa la capacidad de intercambio, reduciendo así la partición del analito con la fase estacionaria, la retención y el tiempo de migración. [81]

La *Cromatografía electrocinética de microemulsión (CECME)* se emplea por lo general para compuestos neutros por lo que se ha empleado para separar esteroides insolubles en agua. La técnica involucra la partición del soluto con gotas de aceite en movimiento. Las gotas de microemulsión se forman mezclando agua con un disolvente orgánico como heptano u octano. Se adiciona dodecil sulfato de sodio (SDS) a concentraciones relativamente altas para estabilizar la microemulsión, además de que recubren las gotas de aceite proporcionándoles una carga negativa, por lo cual intentan oponerse al flujo electroosmótico. El flujo electroosmótico se establece con el empleo de disoluciones amortiguadoras de fosfatos o boratos. Los compuestos hidrofóbicos llevan a cabo una mejor partición dentro de las gotas de aceite, por lo tanto tienen mayor retención que los compuestos solubles en agua. El tiempo de migración de los esteroides es directamente proporcional a su hidrofobicidad.

Se ha demostrado que la CECME tiene mayor capacidad de separación que la CECM y la ECC. Una ventaja importante de la CECME es que los disolventes empleados en la microemulsión son relativamente no volátiles, además de que su absorbancia en la región UV es baja y se puede analizar a longitudes de onda cercanas a 200 nm. [76]

e) Cromatografía gas-capilar (CGC). En el análisis de esteroides, la Cromatografía de gases fue por muchos años el procedimiento de separación con el más grande poder de resolución, y se llevaba a cabo usando columnas empacadas. Actualmente se emplean columnas capilares, cuyo diámetro interno es menor que en las columnas empacadas. Los análisis se llevan a cabo mediante un proceso de partición donde los esteroides se encuentran en fase de vapor y son separados por su solubilidad relativa en la fase estacionaria, que es un compuesto termoestable. La cromatografía gas-líquido se lleva a cabo a altas temperaturas, por lo regular a más de 200°C por el relativamente alto peso molecular de los esteroides y sus derivados. A estas temperaturas, la fase estacionaria es un líquido. El esteroide en forma de vapor, una vez introducido a la columna, es eluido a través del sistema por la fase móvil que es un gas. En el análisis de esteroides la fase móvil mas utilizada es el gas helio, pues al ser menos denso que el nitrógeno se obtienen mejores resultados en la separación, pero el costo se incrementa.

Fase estacionaria: Originalmente las columnas eran de 0.4 cm de diámetro, enrolladas y sililadas por tratamiento con dimetildiclorosilano, empacadas con la fase estacionaria que estaba sobre un soporte inerte de celita (tierra de diatomea) previamente lavada con ácido y tamizada. Si el soporte no era completamente inerte había una forma de pico muy pobre ó pérdida del esteroide. Las columnas capilares que se utilizan actualmente, tienen la fase estacionaria recubriendo las paredes internas de la columna que tienen aproximadamente 0.2 mm de diámetro interno. El espesor del recubrimiento (aproximadamente de 0.1 μm) afecta la capacidad de la columna, entre mayor sea el espesor, mayor será la cantidad de muestra por analizar. Los silanoles y los puentes de siloxano que se encuentran sobre la superficie de sílica se condensan con alcoholes para formar ésteres de silicón. Los polímeros de siloxanos sustituidos pueden ser modificados químicamente dando como resultado fases estacionarias selectivas, por ejemplo, grupos ciano (CN) útiles para la separación de cetoesteroides.

La fase estacionaria no selectiva más común que se utilizaba era una SE-30 de tendencia no polar, la cual ha sido sustituida por la OV-1 o la OV-101. Existe un fenómeno que consiste en la elución de la fase estacionaria de la columna y se conoce como “sangrado” de la columna. Este fenómeno se ha logrado evitar con el uso de fases estacionarias químicamente unidas.

Las columnas capilares tienen longitudes que van desde 30 m hasta 100 m, con lo que se tiene un análisis de alta resolución, esto ha reducido la necesidad de emplear más de una fase estacionaria, y para la mayoría de las aplicaciones puede ser efectiva una columna químicamente unida con fase polar. Un ejemplo es la columna Carbowax 20M[®] que todavía se puede adquirir. Sin embargo, la marca comercial J&W scientific[®] presenta esta misma fase estacionaria químicamente unida

teniendo menos fenómeno de “sangrado”. Esta columna DB WAX® soporta temperaturas mas elevadas, lo que da por resultado mejores separaciones.

Una aplicación de estas columnas ha sido en la industria del papel para la determinación de esteroides y otros compuestos que se depositan sobre la pulpa de madera y el papel durante el proceso de fabricación. Los esteroides y los otros compuestos en conjunto ocasionaban problemas en la maquinaria y contaminaban las aguas residuales, pero el principal problema era la obtención de papel de mala calidad, produciendo pérdidas a esta industria. Por lo tanto, fue necesario la identificación y determinación estructural de estas impurezas por CG-capilar junto con CG-EM, y así poder tomar las precauciones necesarias durante el proceso de producción. En este análisis se utilizó una columna capilar corta de sílice fundida DB-5HT J&W® (5 m X 0.25 mm d.i. y 0.1 µm de espesor de película) que soporta altas temperaturas. Se utilizó gas helio como fase móvil y condiciones de temperatura programada. Para CG-EM se empleó la misma columna pero de 15 m de longitud. [82]

La formación de derivados en cromatografía de gases. Los grupos hidroxilo pueden formar diferentes tipos de derivados, pero por lo regular se forman derivados de éteres. Con el uso de dimetildiclorosilano, trimetilclorosilano, trimetilsilil-aminas, trimetilsilil-amidas, trimetilsilil-ésteres, bistrimetilsililacetamida (BSA), N,O-bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA) y N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida (MSTFA) se forman derivados trimetilsililados sobre la mayoría de los grupos hidroxilo de los esteroides. También se han utilizado el trimetildiosilano (TMIS) y el trimetilsililimidazol (TMSIM) como catalizadores. Una mezcla comercialmente disponible es el TMSI-S que está compuesto de BSTFA, TMCS y TMIS. Con el BSA o BSTFA se forman derivados de los grupos que no están estéricamente ocultos, mientras que con el trimetilsililimidazol (TMSIM) reaccionan los grupos hidroxilo que se encuentran estéricamente ocultos, por ejemplo los hidroxilos de la 25-hidroxivitamina D o los 17 α -hidroxilo en los corticosteroides.

El sistema de inyección más aplicable para derivados de esteroides es la inyección sin divisor de flujo “splitless” con trampa en frío “cold-trapping”, este sistema permite inyectar un volumen grande de muestra, aproximadamente 2 mL, que se vaporiza en un inserto removible de vidrio y los componentes más pesados se condensan en la parte inicial de la columna que es mantenida a una temperatura cercana a la ambiente “cold-trapping”. Después mediante una temperatura programada, los solutos se evaporan de nuevo, alcanzan su temperatura de volatilización y son separados a su debido tiempo. Los andrógenos y estrógenos pueden ser analizados por CG capilar sin la previa formación de los derivados, debido a que son estables y lo suficientemente volátiles a la

temperatura de análisis, pero los grupos hidroxilos de estas moléculas se adsorben durante el proceso de la cromatografía, y tienen tiempos de retención muy grandes. Los esteroides C-21 con cadena lateral 17-hidroxycorticosteroide, sufren ruptura de tal cadena para dar 17-oxo esteroides, y los metabolitos de la vitamina D sufren reacciones de ciclación del anillo B dando isómeros *piro* e *isopiro*. Para mejorar la resolución y evitar rupturas de cadenas laterales en ocasiones es necesario llevar a cabo la formación de derivados antes del proceso cromatográfico. [28,57]

Un ejemplo de la formación de los derivados silil éter halogenados es la determinación de dihidroxiandrosterona en plasma por CGC con detección de **captura de electrones** después de la formación de iodometildimetilsilil éteres. Este sistema de detección no es recomendable debido a que pueden contaminar el detector.

La selección del derivado va a depender del método de cuantificación. El uso de derivados éteres terciarios butildimetilsililados para CG-EM en análisis cuantitativo es muy común, debido a que estos derivados dan espectros de masas sin una fragmentación extensiva. Los hidroxilos vecinos pueden formar derivados de ésteres cíclicos de alquil boronato, y la formación de estos derivados con esteroides desconocidos ofrece información acerca de la estructura del esteroide. Los grupos oxo pueden formar oximas, que son compuestos formados usando clorhidrato de metoxiamina en piridina. Se deben formar derivados de esteroides ácidos que contienen en su estructura grupos carboxilo antes de ser analizados por CGL, empleándose por lo regular metil ésteres. Se pueden usar también mezclas de ésteres tales como la formación de ésteres cíclicos de boronato para grupos hidroxilos vecinales y formación subsecuente de trimetilsilil éter sobre los demás grupos hidroxilo. Este método ha sido usado en metabolitos de la vitamina D. La selección de los derivados depende del tipo de CG que se va a emplear y del detector. [57]

Sistemas de detección: La detección de los esteroides por CGC se lleva a cabo por uno de los tres principales, el más común es la detección por ionización de flama el cual responde a todos los esteroides con diferentes factores de respuesta, los esteroides que contienen átomos de nitrógeno pueden ser determinados con un detector de nitrógeno-fósforo (*nitrogen-phospore detector* NPD). Para la mayoría de los esteroides que no contienen nitrógeno, con este sistema de detección se requiere la formación de los derivados que contengan nitrógeno, por ejemplo metiloximas.

El tercer sistema de detección es el de captura de electrones (DCE), el cual es extremadamente sensible y detecta esteroides que contienen grupos halógenos, y si el esteroide no contiene halógenos, se forman los respectivos derivados.

Una aplicación de la CGC ha sido la determinación de ácidos biliares e intermediarios en tejido hepático. Durante la biosíntesis de los ácidos biliares a partir del colesterol, los ácidos biliares C27 son precursores de los ácidos biliares C24, llevándose a cabo un paso de degradación de la cadena lateral por ruptura oxidativa (β -oxidación), la cual depende de la posición de los grupos hidroxilo. Se encontró que los ácidos 5β -colestano-26-*o*-ico monohidroxilados no sufrieron transformación a ácidos biliares, mientras que los compuestos di, tri y tetra-hidroxilados si se transformaron a ácidos biliares e intermediarios. La detección se llevó a cabo con un detector de ionización de flama, helio como fase móvil, y una columna capilar de sílice fundida enlazada con metil silicona (Hulbon HR-IT 25 m X 0.25 mm d.i.). Las estructuras químicas de los esteroides se determinaron por CG con detección por espectrometría de masas (CG-EM) formando derivados metil éster éteres dimetiletilsililados (Me-DMES) en las mismas condiciones cromatográficas. [83]

Se han determinado los principales metabolitos de la dehidroepiandrosterona (DHEA) cuando se administra como terapia de reemplazo hormonal. La determinación se llevó a cabo por CGC en muestras de orina de hombres con los niveles bajos de DHEA y en mujeres saludables. En ambos géneros se encontraron concentraciones elevadas de DHEA y de sus metabolitos (androsterona y etiolanolona). Se utilizó una columna capilar OV-101 (35 m X 0.22 mm d.i. y 0.1 μ m de espesor de película), se utilizó helio como fase móvil en condiciones de temperatura programada (temperatura del inyector 350°C, temperatura del detector 300°C, incremento de 190°C a 290°C (2°C/min). [84]

Se desarrolló un método por CGC para la determinación de siete esteroides presentes en bulbos de especies de *Fritillaria* (Lilaceae) comúnmente llamada *Beimu*, una hierba muy utilizada como **antitusivo**¹² y **expectorante**¹³ en la medicina tradicional china. Debido a que las cantidades de estos esteroides pueden variar, los efectos clínicos también. El método se emplea como control de calidad para el análisis cualitativo y cuantitativo de estos compuestos. Se trató de desarrollar métodos por CLAE, pero los compuestos no absorben luz en la región del UV. Otra alternativa era un método por CGC con formación de derivados precolumna, sin embargo, si se utiliza una columna Supelco SAC-5 no era necesaria la formación de los derivados precolumna. Se utilizó un detector de ionización de flama, una columna Supelco SAC-5 (30 m X 0.25 mm d.i. x 0.25 μ m de espesor de película), nitrógeno como fase móvil, temperatura del horno 295°C, temperatura del inyector y del detector 310°C. [85]

¹² Agente que ayuda a controlar la tos.

¹³ Agente que ayuda a eliminar las flemas.

f) Cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE).

Por sus siglas en inglés *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) se ha convertido en una importante técnica cromatográfica para esteroides.

Las ventajas que presenta son:

- No requiere altas temperaturas.
- El material eluido puede ser recuperado al final de la columna para procedimientos analíticos posteriores en cromatografía preparativa.
- La resolución lograda es superior a la que se obtiene por CCF y cromatografía en papel.
- Ofrece potencia y versatilidad en separar esteroides conjugados.
- Se pueden emplear detectores de UV, Índice de refracción, Electroquímicos, Resonancia magnética nuclear (RMN), Espectrometría de masas (EM) y combinaciones de éstos.
- Se pueden llevar a cabo reacciones precolumna o postcolumna para formar derivados que incrementan la respuesta.

Sin embargo también presenta desventajas como son:

Existen otros métodos que actualmente intentan sustituir a los análisis por CLAE debido a que utilizan menos cantidades de muestra y de fase móvil, además de que proporcionan mayor sensibilidad, eficiencia y velocidad de análisis. Estos métodos que se basan en Electroforesis y Cromatografía de partición, son variantes de la electroforesis capilar: CECME, CECM, y ECC. Por ejemplo, se ha demostrado que la ECC es capaz de producir separaciones de mayor eficiencia y rapidez que en CLAE, debido a que el flujo electroosmótico en ECC es más favorecedor que el flujo ejercido por presión en CLAE, también porque en ECC los procesos de inyección, separación y detección se llevan a cabo en el mismo capilar, eliminando así efectos extracolumna de los análisis por CLAE. Cabe señalar que uno de estos métodos (CECM) tiene la desventaja de que no es compatible con EM por el alto contenido de surfactantes. [86]

A continuación se mencionan ciertos aspectos importantes que deben considerarse durante el análisis de esteroides, para poder obtener mejores resultados. También se presentan interesantes aplicaciones de CLAE en el análisis de estos analitos.

Fases estacionarias: Los factores importantes en la separación de esteroides por CLAE son las características químicas de la fase estacionaria y de la fase móvil. La separación se puede efectuar por adsorción en fase normal, fase reversa, intercambio iónico y fase reversa con formación de

pares de iones.

En la actualidad son muy usadas las columnas de fase reversa (FR) que producen de 60,000 a 80,000 platos teóricos por metro, las cuales producen excelente resolución, picos agudos y buenos límites de detección. Las fases estacionarias de estas columnas están hechas basándose en sílice tipo A siendo la que tradicionalmente se emplea, pero en la actualidad existen columnas empacadas con sílice tipo B, que son casi libres de metales, de alta pureza y tiene menor concentración de grupos silanoles libres en su superficie, además de que la fase estacionaria que se encuentra químicamente unida es más estable, es decir puede resistir la hidrólisis en ciertas condiciones. [87,88]

Otra buena opción es la existencia de columnas que tienen un grupo polar inmerso cerca de la base de la cadena del hidrocarburo, este grupo polar va a generar una superficie donde los grupos silanoles no interactúan con los analitos, mejorando la selectividad y la forma de los picos. [87,88]

Los silanoles libres (que no reaccionaron con las moléculas de hidrocarburo lineal u otras moléculas) juegan un papel importante debido a que se disocian cuando la fase móvil esta por debajo de pH 2 y se forman cargas negativas en la superficie que actúan como intercambiadores catiónicos débiles. Este fenómeno es mayor en presencia de residuos metálicos, los cuales estabilizan a los silanoles y los vuelven más ácidos. Por lo tanto los analitos con carga positiva se retienen más tiempo y las bandas de elución presentan **coleo**¹⁴. Algunos empaques de las columnas con aproximadamente 5% de silanoles libres son químicamente reactivos con esteroides debido a la formación de enlaces de hidrógeno intramolecular, esto libera la parte ácida del esteroide y explica el porque la aldosterona y los esteroides 18-hidroxilados son susceptibles de reaccionar con ciertas fases estacionarias, afectando la calidad de la cromatografía. [87]

Ciertos ácidos que se unen a los silanoles libres de fases estacionarias pueden hacer que se formen puentes entre anillos de esteroides C-18 y se conviertan esteroides C-20 o C-21. En presencia de metanol se pueden formar metil etil cetales, todo esto va a producir picos adicionales durante un análisis, y estos productos van a tener tiempos de retención extensos en una elución por gradiente, lo cual sería confuso en la interpretación de un estudio metabólico. [87]

Las fases estacionarias más utilizadas en el análisis de esteroides son las de micropartículas de sílica modificadas químicamente con hidrocarburos lineales de diferente tamaño, por ejemplo C₂, C₄, C₈, C₁₈ (que son cadenas de 2, 4, 8 y 18 átomos de carbono respectivamente) y grupos fenilo.

La selectividad puede variar poco con el cambio de longitud de la cadena del hidrocarburo, pero varía significativamente cuando hay cambio en la estructura de la fase unida, por ejemplo de una

¹⁴ Deformación del pico por interacciones inesperadas entre los analitos y la fase estacionaria.

cadena lineal a un grupo fenilo.

Un riesgo que se corre con las columnas de FR es que los compuestos no polares se pueden acumular en la fase estacionaria y disminuir la eficiencia de la misma, esto se puede prevenir usando pequeñas precolumnas que contienen la misma ó diferente fase estacionaria.

Las longitudes de las columnas varían de 5 cm a 30 cm de longitud y de 1 mm a 5 mm de diámetro interno (d.i.). Cuando se lleva a cabo el desarrollo de métodos para determinar esteroides se recomienda el empleo de una columna con fase estacionaria C_8 o C_{18} de 15.0 cm de longitud X 4.6 mm de d.i. con un tamaño de partícula de $5\mu\text{m}$, ó una de 7.5 cm de longitud X 4.6 mm de d.i. con un tamaño de partícula de $3.5\mu\text{m}$. Con ambas columnas se obtienen los mismos resultados si se utilizan las mismas condiciones de proporción de la fase móvil, flujo y temperatura. [88]

En la separación de corticosteroides y estrógenos se han empleado columnas con fase estacionaria de grupos ciano y grupos amino. También se ha logrado la separación de estrógenos por intercambio iónico.

El empleo de columnas Narrow-bore (2 mm d.i.) y Microbore (microcalibre < 1mm d.i.) permite incrementar la sensibilidad disminuyendo el pico de elución, pero dependiendo del volumen de la muestra se puede alterar la forma de los picos y la resolución. Además de que puede requerir demandas innecesarias en el sistema, por ejemplo minimizar las tuberías extracolumna y cambiar el tamaño de la celda del detector. [88]

El problema en la separación de los esteroides está en su amplio intervalo de polaridades y la tendencia de los esteroides de polaridades similares a eluir en grupos.

El tamaño de poro de la partícula, el volumen específico de poro y el área superficial específica afectan la retención. El tamaño de partícula afecta la eficiencia y la permeabilidad de la columna; pero las propiedades químicas de la fase estacionaria controlan la selectividad. Por lo tanto una selección cuidadosa de la fase estacionaria puede proporcionar un sistema de alta selectividad, y esto depende de la densidad de fase unida, los silanoles residuales y residuos metálicos. [87]

Los polímeros sintéticos son más inertes que la sílica, pero tienen inconvenientes: sufren deformación por la presión que ejerce la fase móvil, cambian su volumen al absorber ciertos disolventes y su transferencia de masa es ideal sólo para macromoléculas.

Fase móvil: Una mezcla adecuada de disolventes se puede lograr probando primero en CCF. Las **eluciones isocráticas** ¹⁵ se pueden mejorar mediante **gradientes de elución** ¹⁶. Otros factores que pueden mejorar un sistema cromatográfico son: el pH, modificadores orgánicos, formadores de

¹⁵ La proporción de la fase móvil se mantiene constante durante el análisis.

¹⁶ La proporción de la fase móvil cambia constantemente durante el análisis.

pares iónicos y la temperatura. Los gradientes de metanol-agua llevan a cabo la separación de los principales corticosteroides. El dioxano se ha utilizado para la separación de esteroides polares, y el acetonitrilo en la separación de andrógenos. Se puede mejorar la forma del pico, la resolución y la reproducibilidad de los análisis si se mantiene el sistema a temperaturas controladas por encima de la temperatura ambiente, por ejemplo 45-60°C, debido a que se disminuye la viscosidad de la fase móvil. Si se trabaja a temperatura ambiente, el cuarto de trabajo debe tener un sistema que controle la temperatura para lograr tiempos de retención reproducibles. La dificultad de seleccionar la columna adecuada para un determinado compuesto se ha facilitado con la selección de tres o cuatro disolventes en la fase móvil.

Agentes que se pueden adicionar a la fase móvil.

Las sales de nitrato de plata se han empleado con buenos resultados en la separación de estrógenos, pero tienen el inconveniente de que pueden deteriorar el acero de la columna o las tuberías extracolumna por la producción de plata metálica en la fase estacionaria. Esto se puede evitar lavando el sistema con agua-metanol (1:1 v/v), o con un tratamiento más drástico con ácido nítrico diluido. De no resolverse el problema se tienen que cambiar las tuberías.

En CLAE- Ag^+ se emplean columnas intercambiadoras de cationes, se preparan de tal manera que el ion plata es la fase estacionaria. Así se han separado esteroides sintetizados y marcados con tritio en la posición 3 α para poder realizar estudios del metabolismo de esteroides insaturados que están implicados en el síndrome Smith-Lemli-Opitz, que es un desorden genético de desarrollo debido a un defecto en la conversión enzimática del 7-dehidrocolesterol a colesterol. Los iones plata tienen la característica de reaccionar con los dobles enlaces y formar complejos analito- Ag^+ . [89]

Otros compuestos que se pueden adicionar a la fase móvil para mejorar las separaciones son los surfactantes usados en la Cromatografía micelar, por ejemplo, el dodecil sulfato de sodio (surfactante aniónico) y el bromuro de cetiltrimetilamonio (surfactante catiónico). Se ha reportado el uso de la Cromatografía micelar aplicado a muestras de orina sin pretratamiento, donde los esteroides hidrocortisona, corticosterona, nortisterona, testosterona, acetato de medroprogesterona y progesterona fueron separados por CLAE-FR usando una fase móvil micelar y detección UV a 245 nm. La fase móvil consistió de SDS 0.05M y 1-butanol al 9% a pH 6. En este estudio se encontró que la retención de los solutos era dependiente de la composición de la fase móvil. [90]

Las bajas concentraciones de esteroides (trazas) en muestras biológicas y ambientales han obligado al desarrollo de métodos para concentrar la muestra. Para este propósito se han utilizado las

disoluciones micelares acuosas de octal- β -D-tiogluósido (OTG) para concentrar la muestra antes del análisis por CLAE, aumentando así la sensibilidad. Estas disoluciones micelares concentran los esteroides hidrofóbicos en pequeños volúmenes de fase rica en surfactantes, y los componentes hidrofílicos de la matriz permanecen en la fase acuosa. Este surfactante alquilglucósido (OTG) tiene la ventaja de que absorbe poca luz UV a 254 nm por lo que no interfiere con la detección de los analitos. [91]

La versatilidad de la cromatografía líquida micelar se debe a la variedad de interacciones entre los solutos, la fase estacionaria, la fase acuosa y las micelas. Las disoluciones micelares puras son generalmente útiles como fases móviles y en ocasiones se les puede adicionar disolvente orgánico como etanol para disminuir los tiempos de análisis y aumentar la eficiencia. Las fases micelares son estables por largo tiempo, son inflamables y su toxicidad es reducida. Los surfactantes que más se emplean son el SDS (aniónico), bromuro de cetiltrimetilamonio (catiónico) y el Brij-35 (no iónico). Los modificadores orgánicos mas empleados son acetonitrilo, 1-butanol y 1-pentanol. [92]

Por lo regular es necesario llevar a cabo un gradiente de elución después de la extracción de los esteroides en fluidos biológicos, pues se reducen los tiempos de análisis, optimizan la separación y mejoran la forma de los picos. La hidroxitestosterona se ha determinado por un método de fase reversa con una columna C18 (10 cm X 4.6 mm) empleando un gradiente de elución. La composición inicial de la fase móvil fué tetrahidrofurano/acetonitrilo/agua (10:10:80 v/v) alcanzando en 10 minutos la composición (14:14:72 v/v), manteniéndose así durante 5 minutos. [93]

La separación de ácidos biliares por CLAE se puede lograr por fase normal o fase reversa. En fase normal, se adiciona un ácido orgánico a la fase móvil, y los ácidos biliares son eluidos de acuerdo al número decreciente de grupos hidroxilo sobre el núcleo esteroideal. Las columnas con octadecilsilano ODS (C18) para fase reversa han sido las más utilizadas para determinar ácidos biliares. [94]

La retención de los ácidos biliares depende del pH de la fase móvil. En cuanto a los ácidos biliares conjugados, que son polares, se pueden separar con una columna de intercambio iónico, aunque se ha reportado análisis por fase reversa y extracción en fase sólida (EFS). Este método se comparó con un análisis que se llevó a cabo por electroforesis capilar, resultando ambos métodos adecuados para determinar ácidos biliares conjugados en muestras biológicas. [95]

Entre los analitos que se han determinado por CLAE se encuentran el colesterol y sus productos de oxidación. En la literatura se ha reportado la determinación de estos analitos mediante un método

por fase normal empleando una columna de grupos ciano (CN) de 25 cm de longitud, 4.6 mm de d.i. y tamaño de partícula de 5µm. La fase móvil fué una mezcla de n-hexano/etanol anhidro (97:3 v/v) a un flujo de 0.8 mL/min. La detección se llevó a cabo por dos sistemas diferentes, por UV a 210 nm y por dispersión de luz. [96]

Se ha reportado un método más simple para determinar colesterol en yema de huevo, empleando una columna Zorbax® C18 de 15cm X 4.6 mm, con un tamaño de partícula de 5µm, y una fase móvil de acetonitrilo/2-propanol (4:1 v/v) a un flujo de 0.6 ml/min. [97]

En la industria farmacéutica la determinación de los esteroides se lleva a cabo por fase reversa empleando columnas de octadecilsilano (ODS) como primera opción, así se han reportado determinaciones de testosterona, estradiol y acetato de noretindrona en parches transdérmicos de liberación controlada [98,99], benzoato de estradiol en soluciones inyectables [100] y dietilestilbestrol en ungüentos [101]. En todos los casos la detección fué espectrofotométrica y la fase móvil utilizada fué metanol/agua en diferentes proporciones para cada determinación.

Es de gran interés el uso de **las ciclodextrinas**¹⁷ como agentes en la fase móvil, por su capacidad de formar complejos de inclusión. La adición de ciclodextrinas ha mejorado la separación de algunos esteroides (corticosteroides C-21, ácidos biliares y estrógenos) mediante la modificación de la retención. Los factores primarios en la formación de complejos ciclodextrina-analito son las fuerzas de Van der Waals, las interacciones hidrofóbicas y los enlaces de hidrógeno.

Por lo general, en CLAE-FR, la retención de los solutos es inversamente proporcional a la temperatura. La dependencia de los logaritmos de los factores de retención (ln k) sobre la temperatura se conocen como curvas de Van't Hoff. Cuando el mecanismo de retención es el mismo en todo el intervalo de temperaturas en que se está llevando a cabo el estudio, se produce una línea recta en las gráficas de ln k contra 1/T. Sin embargo, cualquier proceso reversible que altere la entalpía o la entropía del mecanismo de adsorción dará como resultado curvas no-lineales. Estos procesos reversibles pueden ser cambios en la conformación de los analitos, interacciones de los analitos con la fase móvil y la fase estacionaria por medio de múltiples tipos de enlaces. Por eso, cuando se adiciona un agente de inclusión a la fase móvil, se llevan a cabo múltiples tipos de interacciones entre solutos y modificador así como entre modificador y fase estacionaria, por lo que el efecto de la temperatura sobre la retención se vuelve complejo. Se ha demostrado que las curvas de Van't Hoff de esteroides son no-lineales en un amplio intervalo de temperaturas cuando la fase móvil es modificada con β-ciclodextrina. [102]

¹⁷ Las ciclodextrinas son oligosacáridos cuyo interior es relativamente hidrofóbico, debido a que sus grupos hidroxilo se encuentran hacia afuera de la molécula y se emplean como selectores quirales para mejorar la separación de estereoisómeros.

Se ha llevado a cabo la determinación del estriol urinario por CLAE-FR con detección de arreglo de diodos para asegurar la función feto-placentaria durante el embarazo. Sin embargo, se presentaron problemas para determinar simultáneamente varios estrógenos debido a que tienen estructuras y polaridades similares. Por lo que se utilizó una fase móvil de acetonitrilo/agua (30% v/v) sin modificar y otra fase móvil modificada por la adición de β -ciclodextrinas a una concentración de 12 mM, para observar el efecto de este agente de inclusión sobre la separación de los esteroides, donde la temperatura fue el factor crítico. Los esteroides que se escogieron para el estudio fueron el estriol, el estetrol, el 17β -estradiol, el 17α -estradiol, la estrona, la equilina, la 17α -hidroxiprogesterona y la 20α -hidroxiprogesterona. Se observó que, en una fase móvil sin β -ciclodextrina cuando se disminuye la temperatura se incrementa la retención de los esteroides y el orden de elución no cambia, pero cuando se utiliza una fase móvil adicionada con β -ciclodextrina la retención de todos los esteroides decrece rápidamente a temperaturas menores de 40°C . Por lo tanto, la retención de los esteroides investigados esta fuertemente influenciada por la temperatura cuando la fase móvil es modificada con β -ciclodextrina. La conducta de los solutos en presencia de las β -ciclodextrinas se puede explicar considerando que al disminuir la temperatura se incrementa la capacidad de complejación de las β -ciclodextrinas y también porque la retención de las ciclodextrinas es considerablemente más baja que la retención de los esteroides estudiados y el mecanismo de retención predominante es la formación de complejos analito- β -ciclodextrina en la fase móvil. A bajas temperaturas la acción del agente de inclusión es más efectiva debido a los altos valores de las constantes de enlace de los complejos formados y a las marcadas diferencias en la retención de las β -ciclodextrinas y los solutos sin complejar. [102]

En otro reporte realizado por los autores del trabajo anterior [102], se estudiaron los efectos de la adición de ciclodextrinas a una fase móvil compuesta de acetonitrilo/agua (3:7), utilizando columnas de ODS con diferentes cargas de carbón. Los resultados revelaron que la retención de los esteroides fue significativamente reducida sobre la columna con la carga de carbón más baja, lo que indica tiempos de análisis más cortos. Estas observaciones sugieren que la fase estacionaria influye sobre la formación de los complejos. [103]

Los estrógenos se han clasificado dentro de un grupo de compuestos denominados *compuestos de alteraciones endocrinas* y se han buscado principalmente en muestras ambientales como son aguas de desecho, lodos activados y sedimentos, por sus efectos indeseables en especies acuáticas. Un procedimiento que se basa en una EFS acoplado a un sistema de CLAE-FR y detección por arreglo de diodos, permitió el monitoreo de estrógenos y progestágenos que se emplean en la elaboración de píldoras anticonceptivas, pues estos esteroides, cuando son eliminados por la orina llegan a las

aguas de desechos. Este método es completamente automatizado y presenta ventajas sobre los procedimientos biológicos. [104]

Los métodos por CLAE se pueden acoplar también con inmunoanálisis, por ejemplo, uno de estos métodos (CLAE-RIA) se ha usado para separar extractos de varias especies de espárragos (*Asparagus*) y determinar el contenido de fitoecdisteroides, que son compuestos análogos a los ecdisteroides de los insectos. Estos fitoecdisteroides se cree que protegen a los vegetales de ser fagocitados por insectos depredadores, interfiriendo con su sistema endocrino, por lo tanto, se pueden emplear para el control de plagas, ya sea microbianas o invertebrados. [105]

Estos fitoecdisteroides se han encontrado también en el género *Silene* (Caryophyllaceae). Los fitoecdisteroides se aislaron e identificaron por CLAE-FR y CLAE-FN. La cuantificación se llevó a cabo por la comparación de las áreas de los picos de los ecdisteroides con el área obtenida del pico de la 20-hidroxiecdisona, que es el fitoecdisteroide más abundante en la especie *Silene*. Este estudio proporciona información de importancia quimiotaxonómica para la clasificación de la especie *Silene*. [106]

Los métodos de CLAE que emplean columnas a base de sílice y disolventes orgánicos como fase móvil, podrían ser reemplazados por métodos donde se emplean columnas a base de Zirconio que proporcionan mayor desempeño y fases móviles de agua supercalentada que disminuyen el uso de disolventes orgánicos contaminantes y emisores de vapores. Este método se ha usado para determinar testosterona y compuestos relacionados. La columna a base de Zirconio esta recubierta con polibutadieno como fase estacionaria. El agua a altas temperaturas en CLAE incrementa la velocidad de transferencia de masa disminuyendo así el ancho de pico. También disminuye la viscosidad lo que contribuye a incrementar la difusión y permite trabajar a velocidades de flujo más altas, disminuyendo así los tiempos de análisis. Las columnas de sílice se disuelven más rápido a temperaturas elevadas, en cambio las columnas de Zirconio soportan fácilmente estas condiciones. [107]

Otra variante en cuanto a la fase móvil es reemplazar ciertos disolventes tóxicos como el n-hexano por otros menos tóxicos y más selectivos, por ejemplo el disolvente fluorado etoxinonafluorobutano que se ha empleado con cantidades variables de metanol en la determinación de esteroides en CLAE-FN. El etoxinonafluorobutano es miscible con todos los modificadores polares comunes (trietilamina y ácido trifluoroacético) que se adicionan para mejorar la forma de los picos de elución y la eficiencia de la columna. [108]

Se desarrolló un método por CLAE para analizar esteroides empleando como fase móvil un **fluido supercrítico**¹⁸. Se evaluaron parámetros que influyen en la seguridad y la eficiencia de este tipo de cromatografía, lo que es muy importante en el desarrollo farmacéutico de nuevos medicamentos. Con la cromatografía de fluidos supercríticos se pueden disminuir los tiempos de análisis y aumentar la eficiencia de la columna, debido a que el coeficiente de difusión del soluto es más grande en fluidos supercríticos que en líquidos. El sistema es un cromatógrafo de líquidos modificado para operar en condiciones de fluido supercrítico, en este caso se utiliza como fase móvil CO₂, aunque se pueden utilizar otros gases como NH₃ y H₂O. [109]

Inyección de la muestra: En esta parte es recomendable disolver los extractos en la fase móvil, cuando es difícil su disolución se adiciona una matriz macromolecular adecuada como el polietilenglicol. Los equipos con septa de caucho puede provocar que los disolventes lo desgasten y se produzca suciedad, lo que puede producir deformación de los picos eluidos.

Sistemas de detección: Las cetonas α,β -insaturadas en el anillo A de los esteroides que se encuentran en la naturaleza, absorben a 240 nm y tienen un coeficiente de extinción molar de 12000-20000 unidades. Los grupos carbonilo aislados absorben a una longitud de onda máxima de 280 nm (+/- 5 nm) y su coeficiente de extinción molar es de 17-175 unidades. Los estrógenos naturales tienen una absorción a 280 nm debido al anillo A que es aromático. Aunque los esteroides pueden absorber por debajo de 200 nm, en la práctica es difícil lograr una clara señal que sea distinguible del **ruido**¹⁹ sin una reducción en la sensibilidad principalmente cuando se usan gradientes de elución. Se ha descrito un método llamado fotodetección indirecta para los esteroides que no absorben en el UV, usando una columna de β -ciclodextrinas inmovilizadas y fase móvil metanol/agua (65:35 v/v) adicionado de testosterona como sonda o prueba. La detección de esteroides también se ha hecho con detectores de índice de refracción, de fluorescencia y electroquímicos. Cuando se emplea un detector de índice de refracción no se puede emplear un gradiente de elución debido a que el índice de refracción está en función de la proporción de la fase móvil, sin tener una línea base estable durante el análisis. La mayoría de los metabolitos de esteroides urinarios no tienen absorción natural en el UV, por lo tanto ha sido necesario la formación de derivados. También hay detectores que miden la radiactividad de compuestos marcados, pero el corto tiempo de residencia de la muestra en la cámara de conteo limita la

¹⁸ Fluido supercrítico. Es el estado físico de una sustancia, cuando se le calienta por arriba de su temperatura crítica. En esta temperatura, una sustancia ya no puede condensarse más a su estado líquido por la aplicación de presión.

¹⁹ Ruido. Información ajena e indeseada porque degrada la exactitud y la precisión de un análisis. Son variaciones aleatorias de la señal de salida de un instrumento.

sensibilidad.

Análisis cualitativo: Una banda de elución se identifica con un compuesto de referencia analizado de la misma forma que la muestra, obteniéndose coincidencia en los tiempos de retención, pero no siempre es posible reconocer la homogeneidad por simple inspección, en este contexto un detector de arreglo de fotodiodos permite la inspección del pico para asegurar su homogeneidad. En ocasiones la muestra se analiza con otra columna de polaridad diferente o un sistema diferente de gradiente de elución.

Análisis cuantitativo: La altura o área de una banda de elución se mide manualmente o por medio de un integrador y la respuesta del analito se compara con la respuesta obtenida de un estándar de referencia adecuado. La concentración de un determinado esteroide es determinada mediante una curva de calibración.

En un sistema cromatográfico, cuando se usan las mismas condiciones, los tiempos de retención (t_r) y los índices de retención (I_r) son reproducibles bajo condiciones sin cambio. Pero si se hacen cambios en las condiciones cromatográficas (marca de columna, temperatura, gradiente de elución) se afecta la reproducibilidad de los tiempos de retención más que los índices de retención. Los I_r a diferencia de otros parámetros de retención, son más precisos debido a que se determinan por interpolación entre los factores de retención o tiempos de retención de una serie de compuestos empleados como estándares de índice de retención. La incorporación de estos compuestos en análisis por CLAE elimina la influencia de ligeros cambios en las condiciones cromatográficas y se incrementa la confiabilidad de los resultados. Las 2-alcanonas y las 1-(4-(2,3-dihidroxiopropioxi)-fenil))-1-alcanonas se han utilizado como estándares de índice de retención para la identificación de esteroides en CLAE fase reversa con detección de arreglo de diodos en eluciones isocráticas y por gradiente de elución. [110]

Mediante una separación por CLAE y detección UV, se determinó el efecto de ciertos metales sobre una reacción denominada reacción de Heyns que se lleva a cabo entre 16α -hidroxiestrona y proteínas nucleares. Se encontró que el Pt^{4+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} y Mn^{2+} suprimen la formación de esta reacción y que metales como Fe^{2+} , Y Gd^{3+} y Er^{3+} incrementan ligeramente esta reacción. Lo relevante de este estudio radica en que cuando se enlaza la 16α -hidroxiestrona a las proteínas nucleares se llevan a cabo procesos de transformación celular *in vivo* generando posibles eventos

oncogénicos²⁰. [111]

Se han encontrado nuevos compuestos iónicos que contienen un anión esteroidal y un catión alcaloidal. Estos compuestos se aislaron de extractos de la estrella de mar *Lethasterias nanimensis chelifera* mediante CLAE-FR utilizando una columna Zorbax ODS y una YMC-Pack ODS, empleando como fase móvil una disolución con 35% y 40% de etanol. Las estructuras químicas de estos compuestos se determinaron con EM y RMN-C¹³. Aunque no se ha estudiado todavía la actividad biológica, se podrían utilizar como agentes terapéuticos. [112]

g) Cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM).

ESPECTROMETRÍA DE MASAS. La espectrometría de masas es una técnica que se basa en ionizar moléculas en estado gaseoso (obteniéndose por lo general carbocationes) luego se aceleran mediante un campo eléctrico para después ser separados en un analizador de acuerdo a sus masas. Estos iones que han sido separados chocan con un detector, obteniéndose lo que se llama un *Espectro de masas*, que es una representación gráfica de la abundancia relativa de cada ión obtenido en la fuente de iones durante la fragmentación de la molécula analizada, en el eje de las abcisas se obtiene la masa del ión en unidades de masa atómica dividida entre la carga del ión (m/z). La mayoría de los iones producidos tienen una sola carga, de modo que m/z es equivalente a la masa del ión en unidades de masa atómica. Estos espectros de masas ayudan a la identificación de compuestos, ya que dos moléculas de compuestos diferentes nunca pueden ionizarse y fragmentarse exactamente de la misma manera. En un espectro de masas al pico de mayor intensidad se le llama “pico base” y se le asigna un valor arbitrario de 100, los otros picos se reportan como un porcentaje del “pico base”. El aspecto de los espectros de masas puede ser diferente para un mismo compuesto si la fuente de ionización es diferente.

En CG-EM el eluato del cromatógrafo pasa directamente a un Espectrómetro de masas que registra la corriente total de todos los iones de un amplio intervalo seleccionado de masas.

En la técnica existe cierto grado de fragmentación de las moléculas ionizadas, ya sea espontánea o inducida, y la determinación de estos fragmentos de iones proporciona evidencia estructural.

De modo alternativo la EM puede ser más interpretativa, ya que se puede correlacionar el espectro obtenido con la estructura de la molécula, basándose en la deducción de subestructuras moleculares mediante la observación de modos característicos de fragmentación de la molécula.

²⁰ Oncogénico. Relacionado a la producción de células tumorales.

Se pueden correlacionar las intensidades de las señales asociadas a las moléculas ionizadas y fragmentadas, proporcionando información cualitativa y cuantitativa.

Lo esencial de la instrumentación de la EM se considera en tres categorías:

- Introducción y ionización de la muestra
- Separación de iones
- Detección de iones y manejo de datos.

Ionización de la muestra en fase gaseosa [113]: Las fuentes de ionización pertenecen a dos categorías principales, *fuentes de fase gaseosa* y *fuentes de desorción*. En las fuentes de fase gaseosa, primero se volatiliza la muestra y luego se ioniza, a estas pertenecen la ionización por impacto de electrones, la ionización química y la ionización por campo. En las fuentes de desorción, la muestra en estado sólido o líquido, se transforma directamente en iones gaseosos y tienen la ventaja de que se aplica a muestras no volátiles y térmicamente inestables. En el análisis de esteroides, las fuentes que más se han utilizado son la ionización por impacto de electrones y la ionización química.

La mayoría de los esteroides neutros (no conjugados) se pueden pasar al estado gaseoso después de una modificación química adecuada (formación de derivados). En la técnica de CG-EM se combina la separación y cuantificación por CG y la caracterización por EM, haciendo posible la identificación de compuestos individuales que son difíciles de analizar. Por ejemplo, los estereoisómeros del androstano-3,17-dioles no se distinguen por EM, pero cuando se combina con CG se distinguen fácilmente. Se han desarrollado muchos métodos de formación de derivados para optimizar la técnica.

Las primeras combinaciones de CG-EM requirieron de un dispositivo o separador que removía la mayoría del gas antes de introducir la muestra al alto vacío del espectrómetro de masas. El empleo de columnas capilares abiertas y las mejoras en la tecnología de vacío han permitido el acoplamiento directo de la columna de CG a la fuente de ionización del EM.

Ionización por impacto electrónico (IE).

Las fuentes de ionización se clasifican también en fuentes duras y fuentes blandas o suaves. La ionización por impacto de electrones se considera una fuente dura porque proporciona energía suficiente a las moléculas, de tal manera que quedan en un estado altamente excitado y la relajación posterior implica la ruptura de enlaces produciendo la fragmentación de la molécula en iones con

una relación masa/carga menor que la del ion molecular²¹. En ésta técnica la muestra se somete a una temperatura suficientemente elevada para producir un vapor molecular, el cual se ioniza bombardeando las moléculas con un haz de electrones de elevada energía. Después de la colisión, los productos primarios son iones de una sola carga positiva que se forman cuando los electrones de elevada energía se acercan lo suficiente a las moléculas de analito como para causar la pérdida de un electrón por repulsión electrostática.

La reacción primaria es:



Donde M es la molécula del analito y M^{+*} es llamado el ión molecular que generalmente sufre descomposición por la pérdida de radicales para producir fragmentos de iones. De la ionización por impacto electrónico se obtienen iones positivos de diversas masas que son menores (y en ocasiones mayores) que la del ion molecular. Estos complejos espectros de masas son útiles para la identificación de compuestos, pues como se menciona antes, el espectro de masas de un compuesto tiene un patrón de fragmentación único.

En ocasiones aparecen picos que corresponden a masas mayores que la del ion molecular, por ejemplo (M+1)^{+*}, (M+2)^{+*}, etc. y se atribuyen a dos fenómenos: Uno, se debe a los iones que tienen la misma fórmula química pero diferentes composiciones isotópicas, y el tamaño de los diferentes picos depende de la abundancia natural relativa de los isótopos. Dos, cuando un ión colisiona con otra molécula se pueden llevar a cabo transferencias de átomos, produciendo picos que corresponden a masas mayores que la del ion molecular. Sin embargo, a presiones normales de la muestra, la única reacción importante es en la que por medio de colisiones se transfiere un átomo de hidrógeno al ion molecular para dar un ion molecular protonado (M+1)^{+*}. Esta Transferencia es de *segundo orden* y la cantidad de producto depende de la concentración del reaccionante. Por lo tanto la altura de un pico (M+1)^{+*} debido a esta reacción aumenta rápidamente al aumentar la presión de la muestra, **así es posible la detección de esta reacción**²². [113]

Ionización química (IQ). En este tipo de ionización se involucra la transferencia de menor energía, por lo que se considera una ionización suave donde la fuente de ionización se mantiene a una

²¹ El ion molecular es la molécula ionizada que no ha sufrido fragmentación. Para determinadas moléculas, la fragmentación es tan efectiva, que en los espectros de masas no hay pico perteneciente al ion molecular.

²² En ocasiones, la incorporación de un átomo del isótopo de ¹³C, ²H o algún otro isótopo, genera un pico (M+1)^{+*} que se puede distinguir del pico (M+1)^{+*} producido por la transferencia de un átomo de hidrógeno al ion molecular por colisión.

presión parcial alta de un gas reactivo (como pueden ser metano, isobutano o amonio) que es ionizado por impacto electrónico.

Las reacciones electrón-molécula generan un plasma (gas ionizado) que consiste de moléculas del tipo $C_nH_{(2n-1)}^{+}$.

Por ejemplo para el isobutano que es uno de los gases más empleados:



La ionización de las moléculas del analito M se logra por reacción con los iones de gas reactivo $(CH_3)_3C^{+}$ que tiene la fórmula molecular $C_4H_9^{+}$



Las bajas energías internas de moléculas protonadas (iones cuasimoleculares) resulta en poca fragmentación, por lo tanto hay una alta probabilidad de observar una señal que se puede correlacionar directamente a la masa molecular. La relativamente alta abundancia de moléculas protonadas en IQ, no necesariamente indicará una alta sensibilidad de detección. La más eficiente generación de iones negativos también se logra usando una fuente de ionización a alta presión y se le denomina *ionización química negativa (IQN)*, pero en la mayoría de los casos, la ionización es por captura de electrones por medio de reacciones ión-molécula. La eficiencia de la captura de electrones depende de las propiedades del analito, por eso se seleccionan derivados fluorados para analizar trazas de esteroides por CG-EM. [113]

Para la **separación de los iones** se emplean dispositivos denominados *analizadores* [113,114]. Un analizador muestrea iones provenientes de una fuente de iones, los resuelve y los separa. Posteriormente son detectados.

El objetivo de los analizadores es determinar la masa de un ión y la relación masa/carga (m/z) cuando los iones se encuentran en fase gaseosa. Los analizadores deben operar al vacío, debido a

que los gradientes de presión y temperatura afectan el movimiento de los iones. Así, los iones se moverán de la fuente de iones al detector influenciados solo por campos eléctricos o magnéticos.

En el análisis de esteroides los analizadores que más se emplean son :

- Cuadrupolos de filtro de masas.
- Cuadrupolos de trampa de iones.
- Instrumentos con sectores magnéticos.
- Analizadores de tiempo de vuelo.

Cuadrupolo de filtro de masas: Las trayectorias de los iones son determinadas por un conjunto de fuerzas dependientes de tiempo.

Consiste de un arreglo colineal de cuatro electrodos cilíndricos. Se establece un campo eléctrico por acoplamiento de pares de electrodos de cargas opuestas y por aplicación de potenciales de radiofrecuencia (RF) y corriente directa (CD) entre los pares de electrodos.

La relación de potenciales de RF a CD se mantiene constante pero su magnitud se va incrementando de manera lineal para establecer trayectorias estables para iones conforme se va incrementando su valor de m/z . Los demás iones adoptan trayectorias inestables y se pierden al colisionar con los cilindros. La resolución de masas con estos instrumentos se determina con la relación de potenciales de CD a RF.

Cuadrupolo de trampa de iones: Es un análogo tridimensional del cuadrupolo de filtro de masas. Consiste de un electrodo central en forma de anillo y dos electrodos en forma de cubiertas terminales. Los iones que son atrapados tienen un amplio intervalo de valores de m/z , y cuando se va a obtener el espectro de masas se inducen trayectorias inestables para iones con valores crecientes de m/z al aumentar el potencial de campo de la trampa. Los iones son lanzados de la trampa a través de perforaciones en uno de los electrodos de cubierta terminal y son detectados externamente. La resolución aumenta cuando se emplea gas helio, el cual aparentemente concentra los iones en el centro de la trampa de iones. Es compatible con la introducción de gas utilizado como fase móvil en CG. [113, 114]

Instrumentos con sectores magnéticos: Es un analizador de tipo estático en el cual los iones están sujetos a fuerzas constantes.

Analizador de tiempo de vuelo (CG-TV): Se han reportado pocos análisis de esteroides empleando este analizador. En este instrumento los iones son acelerados en forma de pulsos fuera de la fuente

de iones y se determina su tiempo de vuelo al llegar al detector. El tiempo t que tarda en atravesar una distancia l se relaciona con el potencial de aceleración V permitiendo calcular la relación m/z .

$$Vq = m^2/2t^2$$

Se puede mejorar la resolución incorporando un *reflectrón* (espejo de iones) para compensar las pequeñas diferencias en energía cinética de iones que tienen la misma relación m/z .

Resolución en espectrometría de masas. La resolución proporciona una medición cuantitativa de la capacidad del instrumento de distinguir iones cercanamente separados en masa. Los espectrómetros con sectores magnéticos proporcionan una resolución uniforme a través de los intervalos de masa. En contraste, los espectrómetros con cuadrupolos de masa producen espectros con ancho de picos uniformes y por lo tanto se incrementa la resolución con la masa. [114]

Modo SIM: Un espectrómetro de masas utilizado como detector en determinaciones cromatográficas puede medir la corriente iónica total de todos los iones que llegan al detector, o puede ser selectivo midiendo la corriente iónica de una masa determinada y se denomina *monitoreo de un ion seleccionado* o SIM (selected ion monitoring). La relación señal/ruido cuando se registran los resultados por SIM es mejor que la relación señal/ruido de la detección de la corriente iónica total en la determinación del analito en bajas concentraciones, por ejemplo a nivel de trazas. Los espectros de masas de la medición de la corriente iónica total resultan con todos los picos de las señales detectadas. En los espectros de masas obtenidos por SIM sólo se observan los picos con la relación masa/carga seleccionada.

Una detección en modo SIM es más sensible pero más tardado en componentes trazas, empleando instrumentos de cuadrupolos bidimensionales. Cuando una especie iónica simple es detectada, el analizador está estático y varias especies pueden ser detectadas recirculando el proceso.

El modo SIM es muy empleado para análisis cuantitativos y precisos de esteroides usando análogos de isótopos estables marcados como estándares internos. Durante un análisis SIM por CG-EM la detección es rápidamente alternada entre el analito y el estándar interno.

La Cromatografía de gases se aplicó al análisis de esteroides por primera vez en 1960 por Vandenhuevel y colaboradores. Después, Ryhage combinó este método con espectrometría de masas en 1964, desarrollando el separador molecular, el cual removía el gas acarreador y

concentraba selectivamente los analitos por análisis de espectrometría de masas de impacto electrónico (IE). Los esteroides fueron entre los primeros compuestos analizados por los primeros equipos de CG-EM que se comercializaron.

Muchas de las antiguas técnicas químicas necesarias para llevar a cabo la CG-EM, no han cambiado hasta ahora; por ejemplo, desde 1968 se empleaban éteres de metiloxima trimetilsililados para analizar esteroides en orina después de su desconjugación. La diferencia es que se empleaban columnas empacadas y ahora son columnas capilares de sílica fundida. El amplio uso de CG-EM se debe a su alta resolución y a la facilidad con que se puede acoplar la EM a la CG, pues en la mayoría de los casos la salida de la columna termina cerca del área de ionización.

A continuación se mencionan algunos ejemplos de la aplicación de CG-EM en el análisis de esteroides.

Debido a la baja volatilidad de algunos esteroides ha sido necesario el desarrollo de métodos para formar derivados para mejorar la forma de las bandas de elución, la resolución y la sensibilidad. Los esteroides hidroxilados, antes de ser introducidos al sistema cromatográfico son transformados a derivados volátiles, como son derivados de éteres trimetilsililados y dimetiletilsililados. Recientemente se ha estudiado el comportamiento cromatográfico de compuestos ter-hidroxilados por CG y CG-EM, debido a que la mayoría de los esteroides analizados contienen grupos hidroxilo primarios y secundarios. Los ecdisteroides son de los pocos esteroides que contienen grupos ter-hidroxilos. La reactividad de la trialkilación depende no sólo de los reactivos y condiciones de reacción, sino también de factores estéricos de los grupos hidroxilo terciarios. [115]

Usando estándares internos marcados con deuterio y con el método de **dilución de isótopo estable**²³ se ha podido determinar la velocidad de producción de cortisol. Métodos anteriores se basaban en la infusión de esteroides radiomarcados (**dilución de isótopo radioactivo**) pero tenían el riesgo de una exposición a radiación ionizante, además de que los esteroides radiomarcados se podían unir a receptores intracelulares que transducen señales por unirse a elementos de respuesta del ADN. Los análogos de isótopos estables se pueden distinguir de los que se encuentran en la naturaleza, por lo tanto al administrar infusiones de cortisol marcado con deuterio, se altera la proporción isotópica natural del cortisol y se puede determinar su velocidad de producción cuantificando las isoformas del cortisol. Mediante EFS de las muestras y la formación de los

²³ Adición controlada de una variante isotópica de un analito como un estándar interno y que permite una cuantificación exacta y precisa. Junto con la dilución de isótopo radioactivo, son los métodos más selectivos de que disponen los químicos.

derivados de fluoroacilo se determinó la velocidad de producción de cortisol por CG-EM en el modo SIM de ión negativo. Este método produce una sensibilidad de 50 a 100 veces mayor que la espectrometría de masas de ión positivo permitiendo el análisis en pequeñas muestras de suero aún en presencia de altas concentraciones de contaminantes lipofílicos. [116]

La medición de la secreción de cortisol por el método de isótopo estable se llevó a cabo mediante la administración de cortisol marcado con ^{13}C . [117]

Se han desarrollado otros métodos donde se emplea la ionización química negativa y la formación de derivados fluorados, por ejemplo, para determinar los estrógenos estrona, estradiol, estriol y etinilestradiol en orina empleando hidrólisis enzimática de las muestras, extracciones con éter y determinación de los derivados pentafluorobenzolil que han demostrado ser superiores a los derivados de trifluoroacetilo, heptafluorobutilo, pentadecafluorooctanoilo, y perfluorotolilo. [118]

La CG-EM con dilución de isótopo estable, ha sido el método más específico en la determinación de esteroides que indican la deficiencia de enzimas en el diagnóstico de desordenes endocrinos. Por ejemplo, la determinación de 17α -hidroxipregmolona indica la deficiencia de la enzima 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa que afecta la biosíntesis de cortisol, y ocasiona ambigüedad sexual en neonatos. Por otro lado, la determinación de 11-desoxicortisol indica deficiencia de la enzima 11β -hidroxilasa que también ocasiona defectos en la síntesis de cortisol provocando hiperplasia adrenal congénita que se caracteriza por hiperandrogenismo y en algunos casos por hipertensión arterial. En ambos casos se utilizó como estándar interno un análogo del esteroide a determinar marcado con deuterio, el cual se pone en equilibrio con la muestra de plasma, se separan por EFS y se purifican con columnas pequeñas de Sephadex LH-20. Se formaron derivados de heptafluorobutiratos y se analizaron en el modo SIM. Se utilizó una columna de sílica fundida OV-1 (25 m X 0.2 mm de d.i. y 0.1 μm de espesor de película) y helio como gas acarreador. [119,120]

Desarrollar métodos de rutina por CG-EM para determinar esteroides en plasma ha sido un mayor reto que para determinar esteroides en orina. Esto se debe a que en plasma hay mayor cantidad de ácidos grasos y los niveles de esteroides son de 10-1000 pg/mL. En el caso de la determinación de la 17α -hidroxipregmolona se ha empleado el método de CG-EM con dilución de isótopo estable. [119,120]

En el campo de análisis "*antidoping*" se han estado haciendo esfuerzos por desarrollar métodos que determinen los bajos niveles de esteroides de abuso, tanto en animales como en humanos.

Al determinar la relación de excreción de (testosterona /epitestosterona) por CG-EM se ha demostrado que puede producir falsos negativos. Un método más confiable denominado CG-C-EM-PI (Cromatografía de gases-Combustión-Espectrometría de masas con proporción de isótopo) demostró que la testosterona sintética tiene diferente contenido de ^{13}C que la testosterona endógena, debido a que los materiales de elaboración tienen diferente contenido de ^{13}C . Se tomaron muestras de orina de cinco individuos antes y después de la administración de enantato de testosterona (ET), los valores de $\delta^{13}\text{C}^{\circ}/00$ (δ = diferencia de la proporción de isótopo de carbono entre una muestra y un estándar internacional) para los **androstanoedios** ²⁴ fueron disminuyendo después de la administración de ET, demostrando que hubo ingesta de testosterona sintética. Como estándar interno se empleó pregnanediol debido a que su valor de $\delta^{13}\text{C}^{\circ}/00$ no cambia con la administración de testosterona sintética. En esta técnica existe una interfase entre el espectrómetro de masas y el cromatógrafo de gases que consiste de un hornillo de combustión relleno de alambres de cobre. En el sistema cromatográfico se empleó una columna DB17 (50% fenil metil siloxano) que es de mediana polaridad debido a que con una DB1 que es de polaridad baja no hubo resolución de dos compuestos epímeros. La ionización en el espectrómetro de masas fue por impacto electrónico. [121,122]

El mismo método se ha empleado para controlar el abuso de andrógenos en animales. [123]

Otro compuesto prohibido por el comité olímpico internacional (COI) y que se ha analizado por CG-EM es la dehidroepiandrosterona (DHEA), que se consigue fácilmente en preparados farmacéuticos utilizados como terapia de reemplazo en hombres adultos cuando los niveles de andrógenos disminuyen con la edad. Se ha demostrado que la DHEA es una prehormona que se biotransforma a potentes andrógenos y estrógenos que ejercen efectos favorables en el organismo como son estimulación de protección inmune y cardiovascular, inhibición de carcinogénesis, disminución de grasa corporal, aumento de masa muscular. La DHEA se administró a siete sujetos, las muestras de orina se tomaron antes y después de la administración. En el sistema cromatográfico se empleó helio como gas acarreador, una columna capilar de sílica fundida HP-1 (metil silicon de 17m X 0.22 mm de d.i. y 0.11 μm de espesor de fase estacionaria) para separar los conjugados de ácido glucurónico con temperatura programada. Se utilizó otra columna de 25m para separar los conjugados totales. En el analizador de cuadrupolo del espectrómetro de masas la ionización fue por impacto electrónico y el modo de detección por SIM. [124]

²⁴ Principales metabolitos de la testosterona.

Existen procedimientos más elaborados que combinan dos técnicas en línea por ejemplo la CG-C(combustión)-EMRI/CG-P (pirólisis)-EMRI para determinar la absorción y síntesis de colesterol en humanos. [125]

Un estudio realizado para determinar nueve andrógenos en orina por CG-EM, se reportó el empleo de una columna capilar metálica de acero inoxidable que soporta temperaturas mayores a las habituales. Este tipo de columnas tiene varias ventajas, permiten trabajar con temperaturas elevadas, mejorando la separación y la forma de elución de los picos; se pueden analizar los derivados de andrógenos directamente sin la necesidad de hidrolizar los conjugados de ácido glucurónico; se distinguen compuestos isoméricos con suficiente resolución; en una sola elución se pueden determinar todos los andrógenos principales presentes en la muestra. En este estudio, además de la columna capilar de acero inoxidable MXT-1 (30m X 0.28 mm d.i. X 0.25 μ m de espesor de película de la fase estacionaria con enlaces cruzados de dimetil polisiloxanos), la ionización fue por impacto electrónico y el tratamiento de los datos se realizó en el modo SIM siendo la detección más selectiva. La temperatura del horno de la columna fue inicialmente de 300°C durante 4 minutos, y se aumento en 2°C/min hasta 322°C durante 5 minutos. Temperatura de inyector 330°C. Después de ser extraídos por EFS, se formaron derivados de metil-trimetilsilil éteres de los andrógenos conjugados con MSTFA/TMCS (100:1 v/v) a 60°C durante 15 min. Posteriormente los derivados se introdujeron en el equipo de CG-EM para su determinación. [126]

Otro interesante estudio es el que se realizó para distinguir los metabolitos de nandrolona de origen endógeno de los de origen exógeno por CG-EM. Los metabolitos 19-norandrosterona y 19-noreticolanolona se sintetizan naturalmente en el organismo y llegan a alcanzar los niveles que se establecen como límite por el Comité Olímpico Internacional (COI), que son 2 ng/mL. El estudio consistió en determinar los metabolitos en su forma libre, en su forma de conjugados glucurónicos y en su forma de conjugados sulfatados. La determinación se realizó a jugadores de futbol con altas concentraciones naturales de estos metabolitos y a voluntarios a los que se les administró 5 μ g de nandrolona. De un volumen de 10 mL de orina se extrajeron los metabolitos en su forma libre, conjugados glucurónicos y conjugados sulfatados. Se empleó una cantidad de 6 ng de Noreticolanolona marcada con tres átomos de deuterio (19-NE-d3) como estándar interno en cada extracción. Las tres fracciones fueron purificadas en un cartucho de EFS de sílica y con una columna semipreparativa de CLAE. A cada uno de los tres residuos finales se les adicionó MSTFA-TMIS-DTT (1000:5:5 v/v/m) y se calentó a 60°C por 40 min para formar los derivados que posteriormente se analizaron en un CG-EM equipado con un analizador de cuadrupolo. La

ionización se llevó a cabo por impacto electrónico y el monitoreo fue por SIM. Los resultados demostraron que la 19-norandrosterona (19-NA) endógena no se detecta en su forma libre; como glucurónido la detección es muy pequeña; y como conjugado sulfatado la detección es de un 30%. En cambio la 19-NA exógena se excreta en su forma de glucurónido en un 100%. La 19-noreticolanolona (19-NE) endógena se detectó en su forma de glucurónido en un 84% y como sulfato en un 15%. La 19-NE exógena se detectó como glucurónido en un 97%. No hubo detección de la forma libre ni del conjugado sulfatado.

Con los resultados mencionados se puede emplear el método para discriminar los metabolitos de la nandrolona de origen endógeno de los de origen exógeno, siendo de utilidad en pruebas “antidoping”. [127]

Para detectar indirectamente undecanoato de testosterona (UT) se observan cambios en un perfil de esteroides después de su administración. Directamente se detecta al compuesto sin cambio en plasma. Utilizando CG-EM y CG-EM-EM²⁵ se determinó un aumento en la concentración del glucurónido de testosterona, que parece ser la señal más característica de la ingesta de UT. Estos estudios son un reto, debido a que algunos individuos muestran una fisiología más elevada que otros y producen relaciones mayores que las establecidas por el COI y el caso contrario es el de individuos que después de haber ingerido el esteroide, no muestran una relación mayor a la establecida [128]. La androstenediona es otro esteroide de abuso para aumentar el desempeño deportivo e incrementa la relación T/E (testosterona/epitestosterona) por arriba de los límites establecidos por el COI [129].

Los esteroides presentes en una especie de árbol denominado *Tabernaemontana hilariana* de la familia Apocynaceae, se han determinado por CCF, CG con detección de ionización de flama y una variante de la CG-EM que es la CGAR-EM (CG de alta resolución-EM). Esta variante emplea un detector de masa selectiva con ionización de impacto electrónico acoplado a un CG con una columna capilar de sílica fundida LM-S (15 m X 0.2 mm de d.i. y 0.2 µm de espesor de película), empleándose helio como gas acarreador. Estas plantas se han empleado en medicina tradicional en Brasil por sus propiedades antiparasitarias, alucinógenicas y antimicrobianas. Los esteroides se aislaron de extractos etanólicos de raíz, corteza, frutas verdes, frutas maduras y semillas del árbol. [130]

²⁵ Cromatografía de gases-Espectrometría de masas-Espectrometría de masas. En esta técnica se pueden emplear en línea dos analizadores de espectrometría de masas iguales o diferentes.

Otras variantes de CG-EM son la Pirolisis-CG-EM y la Pirolisis-metilación-CG-EM que se han empleado en la determinación de esteroides en depósitos orgánicos que se acumulan durante el proceso de blanqueado de la pulpa de la madera de *Eucalyptus globulus* en la industria del papel. La pirolisis es útil para analizar materiales vegetales. [131]

Entre los esteroides que más se buscan utilizando la técnica de CG-EM para diagnosticar enfermedades están el colesterol y el 7-dehidrocolesterol (7-DHC). En el síndrome de Smith-Lemli-Opitz (SSLO) hay deficiencia en la concentración de colesterol y un aumento en las concentraciones de 7-DHC, debido a la deficiencia de la enzima 7-dehidrocolesterol-7-reductasa que cataliza el paso final de la transformación del colesterol. Las concentraciones de 7-DHC se pueden determinar en fluido amniótico y células de vello coriónico, pero son métodos invasivos. La utilización de la CG-EM es una alternativa como método no invasivo, pues se determinan los niveles de 7-DHC en orina de mujeres embarazadas y niños con SSLO. El diagnóstico de SSLO es importante debido a que el colesterol además de tener ciertas funciones metabólicas, es precursor de todas las hormonas esteroidales. [132,133]

El consumo de carne contaminada con esteroides anabólicos ha sido un problema de salud pública. Estos esteroides se encuentran en niveles de ng/kg de tejido animal, por lo que se han desarrollado métodos por CG-EM para la detección de trazas de estos esteroides en muestras de tejido renal, muscular, orina, heces fecales y cabello de los animales. La determinación de estos esteroides se llevaban a cabo por inmunoanálisis, pero tienen el inconveniente de que detectan un solo compuesto a la vez, en cambio los métodos por CG-EM con analizador de trampa de iones detectan una amplia variedad de compuestos en un solo análisis [134]. Uno de los esteroides empleados como promotor del crecimiento es la β -trembolona que ha sido difícil analizar por CG-EM, por lo que se desarrolló un método por CG-EM-EM altamente sensible para su cuantificación. Para el estanozolol que es otro esteroide promotor del crecimiento y prohibido por la comisión médica del COI, se han desarrollado métodos de CG-EM-EM para su cuantificación, mejorando su detección por formación de derivados trimetilsililados con MSTFA-NH₄I durante 20 min a 60°C después de su aislamiento de la matriz biológica en la que se encuentra (MSTFA=N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida). [135,136]

Los productos del metabolismo microbiano (*Bacillus*) de la pregnenolona fueron identificados por CG-EM. Los bacilos se aislaron de la flora del intestino de un escarabajo acuático (*Agabus affinis*). [137]

El esteroide acetónido de triamcinolona (ATA) como derivado de acetato tiene las características inherentes para ser detectado por captura de electrones bajo condiciones de EM y ionización química negativa con gas metano. Esto se ha utilizado para desarrollar una técnica por CG-EM altamente sensible y selectiva para medir los niveles de ATA en fluido bronqueo alveolar después de su inhalación en pacientes con asma para determinar un patrón de deposición y estudios cinéticos *in vivo*. Otros métodos indirectos que se utilizan no proporcionan exactitud en los patrones de deposición del esteroide en tejido pulmonar. Un análogo del ATA marcado con siete átomos de deuterio se empleó como estándar interno. [138]

El desarrollo de un método por CG-EM para determinar epímeros (7α y 7β) de la 7-hidroxihiopandrosterona (7-OH-DHEA) tiene importancia en el diagnóstico de la **enfermedad de Alzheimer**²⁶ y cáncer de mama, debido a que estos esteroides se han encontrado en niveles altos en pacientes con Alzheimer, así como actividad de la 7-hidroxilasa en tejido neoplásico de mama. La determinación de estos compuestos se llevó a cabo en suero y en saliva de pacientes masculinos y femeninos. El método sustituye a métodos por RIA que no ofrecían resultados confiables. En el análisis se utilizó una columna capilar de polaridad media (50% fenilsiloxano de fase estacionaria) de 15m X 0.25 mm y 0.15 μ m de espesor de película. La ionización se llevó a cabo por impacto electrónico. Los esteroides se determinaron como los derivados de éteres-TMS. [139]

Un interesante estudio para mejorar la crianza de elefantes asiáticos en cautiverio consistió en la determinación de la 5α -androst-2-en-17-ona y el 5α -androst-2-en-17 β -ol por un método que involucra la microextracción en fase sólida y la CG-EM. El objetivo del estudio fue determinar estos analitos en muestras diarias de orina y pronosticar las mejores condiciones de *estro*²⁷ en el útero y se lleve a cabo la fecundación del óvulo. La ventaja del método es que es un método no invasivo. [140]

h) Cromatografía de líquidos-espectrometría de masas (CL-EM). En CG-EM los esteroides se pueden transformar en sustancias volátiles y permanecer térmicamente estables por formación de derivados, pero esto sugiere un paso adicional en el procedimiento analítico, y algunos tipos de esteroides como conjugados glucurónicos o sulfatados no se analizan fácilmente por estos métodos.

²⁶ Proceso atrófico cerebral que se caracteriza por una fase de comienzo (déficit de memoria, desorientación espacial, dificultad para realizar movimientos) y una fase de estado (demencia masiva, trastornos de la orientación tiempo-espacial y trastornos psicóticos).

²⁷ Etapa en la que el endometrio se encuentra con los niveles adecuados de estrógenos para asegurar el desarrollo de un óvulo fecundado.

En CLAE los análisis se realizan a temperatura ambiente y los compuestos polares y esteroides conjugados pueden ser analizados sin degradación.

Cuando se empezó a desarrollar la técnica de CLAE-EM, el principal problema fue la evaporación de la muestra para introducirla al Espectrómetro de masas. Una primera técnica para remover la fase móvil fue el “*moving belt*” que recibía el eluato de la columna, lo secaba y transportaba los analitos secos a un sistema de vacío. Este sistema pronto fue desplazado por la interface de “*termoespray*” desarrollado en 1983. Después se desarrollaron las interfaces de “*electrospray*” y el sistema *FAB/LSIMS*²⁸ que son los sistemas de ionización más empleados en CLAE-EM. La técnica de *termoespray* y la de *haz de partícula* ofrecían poca información estructural y poca sensibilidad. El desarrollo de Ionización a Presión Atmosférica (IPA) venció estas limitaciones. Los métodos de ionización a presión atmosférica (ionización por *electrospray* y ionización química a presión atmosférica) combinados con una nueva generación de espectrómetros de masas (cuadrupolo simple, cuadrupolo triple, trampa de iones) han hecho más versátiles los métodos por CLAE-EM y CLAE-EM-EM. [113,114]

Ionización de la muestra en fase condensada. [114]

1) El sistema de ionización por “*Termoespray*” es un método adecuado para introducir un líquido en un espectrómetro de masas; se emplea cuando se han usado separaciones por CLAE en fase normal (principalmente cuando la ionización es mediante *operación sobre filamento*) y puede ser usado en un *modo bifásico* donde la muestra es introducida directamente al espectrómetro de masas o en *modo CLAE* donde la muestra es separada en una columna antes de introducirse al Espectrómetro de masas.

La técnica consiste en el calentamiento eléctrico de un capilar por donde pasa el líquido, el que es nebulizado formando finas gotas (denominado *spray*) por el calentamiento eléctrico del capilar. Las gotas llegan a una fuente de ionización y se vaporizan. Una porción de este vapor y los iones producidos en la fuente de iones escapan a un sistema de vacío del analizador a través de un cono de muestreo, bombeando el remanente de vapor hacia afuera. La formación de los iones es por desorción de las gotas y de las reacciones ion-molécula en la fase gaseosa.

a) La principal forma de ionización en la técnica de *termoespray* es la *evaporación directa del ion* que involucra la evaporación de los iones en disolución. La sensibilidad se mejora por la adición de una disolución amortiguadora volátil como acetato de amonio 0.01-0.1 M. La sensibilidad es mejor cuando predomina la disolución amortiguadora. Aunque la técnica puede ser usada con 100% de

²⁸ Fast Atom Bombardement/Liquid Secondary Ion Mass Spectrometry.

metanol, la sensibilidad es una limitante si el contenido de agua es menor al 20%.

b) Otro tipo de ionización en termoespray es por *operación sobre filamento*, el cual emplea un filamento para iniciar la ionización química. Este proceso es deseable cuando las muestras contienen disolventes orgánicos. También es útil cuando hay presencia de sales como acetato de amonio. La técnica de espectrometría de masas con termoespray puede ser usada en modo ión positivo o ión negativo. En modo ión positivo se producen iones moleculares MH^+ , pero se han encontrado iones MNH_4^+ (del disolvente), y los iones MNa^+ o MK^+ (de las muestras y de los disolventes). El termoespray en modo ión negativo es más útil para analizar conjugados de esteroides debido a la presencia de iones MH^- .

Se ha encontrado aplicación de esta técnica en el análisis de esteroides neutros y conjugados glucurónidos, pero la sensibilidad obtenida es baja.

2) Sistema de ionización por *electrospray*. En electrospray el flujo del líquido es nebulizado por aplicación de un alto potencial al final de un capilar de acero inoxidable por donde pasa el flujo. Se aplica aire comprimido como la fuente de nebulización y el resultado es un spray estable de gotitas cargadas. Cuando en la formación de gotas se emplea un gas nebulizador, el método se denomina *ionespray*. Las gotas altamente cargadas se evaporan y se produce abundantes iones moleculares positivos y negativos. En electrospray la ionización aparentemente involucra una desorción iónica de gotas cuyo tamaño ha sido reducido por evaporación del disolvente al pasar por un gradiente de presión. El electrospray se realiza a temperatura ambiente, por lo que el proceso es más suave. El proceso completo de la evaporación de los iones se lleva a cabo a presión atmosférica y sólo después de la ionización los iones entran al espectrómetro de masas para pasar por una cortina de gas, la cual previene que moléculas de disolvente y amortiguador entren al analizador de masas. En este método los flujos son bajos, de 5-10 $\mu\text{L}/\text{min}$. La incorporación de un gas nebulizador permite flujos más altos facilitando el acople directo a CLAE.

La técnica de electrospray se ha aplicado en el análisis de ésteres de testosterona y acetato de medroxiprogesterona CL-EM-EM (tandem de EM) [141], y de corticosterona en plasma utilizando el sistema de detección SIM [142]. Muchos otros analitos se han determinado mediante esta técnica de ionización por lo que se le ha considerado la técnica de ionización por selección para análisis por CL-EM.

La modificación postcolumna de la fase móvil se ha utilizado para mejorar la sensibilidad de la detección en EM. Amonio metabólico y trietilamina se han usado como modificadores para promover la desprotonación de los estrógenos ácidos débiles e incrementar la respuesta del EM operado en el modo ión negativo y por electrospray.

3) Una técnica diferente es la *nebulización térmica*, que se emplea para moléculas pequeñas. El eluato pasa por un nebulizador donde se produce una fina niebla por un propulsor de aire a alta velocidad (nebulización). Un gas auxiliar acarrea las gotas a un tubo de cuarzo calentado que vaporiza las gotas. El gas se calienta por lo regular a 100°C para evitar degradación térmica. La mezcla gaseosa entra a un reactor donde es químicamente ionizado por iones reactivos producidos por un elemento de descarga. Las moléculas de analito son ionizadas por transformación de protones solvatados en modo ión positivo o por transformación de protones a átomos de O₂ en el modo ión negativo. Los iones producidos pasan a través de una cortina de gas nitrógeno antes de entrar al espectrómetro de masas.

Los sistemas de ionización de *electrospray*, *termoespray* y el *nebulizador térmico* son usados en conjunto con analizadores de cuadrupolos del Espectrómetro de masas, aunque pueden ser usados con analizadores de sector magnético. Una desventaja de la ionización suave es la poca fragmentación, lo cual reduce la especificidad de la técnica como un sistema de detección y da poca información sobre características estructurales de compuestos desconocidos

4) Técnica de ionización FAB (Fast Atom Bombardement) ó LSIMS (Liquid Secondary Ion Mass Spectrometry). Este sistema involucra la inserción del analito disuelto en un líquido no volátil como el glicerol, esta disolución es bombardeada por átomos de Xenón o iones Cesio (Cs⁺) energéticos resultando en el esparcimiento de la muestra iónica y neutra. Los iones son acelerados de la fuente de ionización al analizador de masas.

Las principales especies iónicas generadas son MH⁺ y M⁺H. La producción de iones protonados se mejora por adición de ácido a la matriz. La complejidad de la química en la fase gaseosa y condensada resulta en la oxidación y reducción de especies diferentes a la molécula protonada. La *región iónica molecular* de los espectros de masas por FAB muestra abundancia relativa que refleja los productos de estos procesos, así como la contribución de diferentes variantes isotópicas.

FAB es un proceso de ionización suave, por lo que hay poca descomposición de las especies protonadas o desprotonadas.

La **separación de los iones** se logra empleando los mismos analizadores que para CG-EM. También se ha empleado la técnica de “*tandem*” de espectrometría de masas, que consiste en la utilización de instrumentos con varios analizadores de espectrometría de masas en línea (EMⁿ).

El método de CLAE-EM se ha aplicado en diferentes estudios sobre esteroides, por ejemplo, estudios “antidoping”, estudios de metabolismo, análisis farmacéuticos, monitoreo de

contaminantes ambientales y seguimiento de síntesis. A continuación se mencionan algunos de estos ejemplos.

Se han determinado ésteres de testosterona por CLAE-EM mediante ionización por electroespray. La importancia del método radica en que los ésteres de testosterona son rápidamente hidrolizados a testosterona después de su administración oral o parenteral. Por tal motivo las concentraciones de ésteres de testosterona intacta son muy bajas en plasma, por lo que se tuvieron que formar derivados polares de los ésteres para poder ser separados por CLAE. El ión molecular y los fragmentos de iones obtenidos fueron monitoreados por un método desarrollado para detectar esteroides en plasma llamado SIR (selected-ion-recording). De esta manera los ésteres de testosterona se pudieron detectar después de su administración oral o intramuscular, lo cual es importante en pruebas “antidoping”. [143]

La técnica de CLAE-EM se ha acoplado con la Cromatografía de inmunoafinidad para formar un sistema de Cromatografía de inmunoafinidad-CLAE-EM (CIA-CLAE-EM), que ha demostrado ser un importante método en la determinación de esteroides a bajas concentraciones en matrices biológicas complejas. Los anticuerpos soportados sobre la columna de inmunoafinidad permiten el enriquecimiento del analito favoreciendo al proceso de EM. En lugar de usar gel de sepharosa como material de soporte en la columna de afinidad, se utiliza un polímero de polihidroxietil metacrilato (HEMA) que soporta presiones y velocidades de flujo más grandes. Este método se ha empleado para determinar los corticosteroides dexametasona y flumetasona después de su administración en caballos. La interface de rayo de partícula empleada permite la desolvatación y transporte del soluto al EM donde serán ionizados electrónicamente o químicamente. [144]

Los preparados farmacéuticos que se anuncian y venden por vía Internet no siempre cumplen con normas de calidad. Es el caso de preparados farmacéuticos (shampoo, crema y loción) indicados para tratamiento de la comezón, enrojecimiento y piel escamada causado por **eccema**²⁹, **seborrea**³⁰ y **psoriasis**³¹.

²⁹ Una de las dermatosis más frecuentes que se caracteriza por la presencia de vesículas sobre un fondo eritematoso.

³⁰ Tipo de dermatitis que se caracteriza por el aumento de secreción de las glándulas sebáceas de la piel. La lesión elemental es la dilatación de los poros y cuello de los folículos polisebáceos con acumulación de células epidérmicas descamadas, microbacilos y secreción sebacea.

³¹ Dermatitis crónica caracterizada por la aparición de placas rojas recubiertas de espesas escamas blancas en todo el cuerpo, predominando en codos, rodillas y torax. Es frecuente en cuero cabelludo y uñas.

Mediante análisis por CLAE-EM se encontró que contenían un corticosteroide, el propionato de clobetazol, clasificado como muy potente, y que no se mencionaba en la etiqueta como principio activo. El principio activo de la etiqueta era la piritona de zinc que se usa para el tratamiento de la caspa y seborrea del cuero cabelludo, pero no para el tratamiento de la psoriasis. Todos los corticosteroides tienen efectos colaterales que dependen de la potencia del esteroide y del tiempo de exposición. Estos esteroides se clasifican como de baja, alta y muy alta potencia. La detección se realizó por CLAE-UV y CLAE-EM y CLAE-EM-EM. [145]

El Estanozolol es un esteroide sintético que se ha empleado para tratar la osteoporosis y la deficiencia de síntesis de proteínas. También lo han utilizado deportistas para aumentar su desempeño, se ha empleado en carreras de caballos y como promotor del crecimiento en ganado vacuno. Se desarrolló un método por CLAE-EM-EM para determinar estanozolol, que podría sustituir a métodos por CG-EM que tenían ciertos inconvenientes como la dificultad para formar derivados y la adsorción de las muestras en las partes del inyector. Se llevó a cabo la detección de los extractos sin formación de derivados mostrando extensa fragmentación. La detección del 16 β -hidroxiestanozolol mostró aceptable reproducibilidad. [146]

Se ha desarrollado un método para determinar simultáneamente nueve corticosteroides en muestras de orina por CLAE-EM (ionización por electrospray), teniendo ventajas sobre otros métodos como son CG-EM, debido a que los corticosteroides son termolábiles y al formar derivados se pierde calidad en la información. Estos esteroides se han empleado para aumentar el desempeño físico de atletas. El análisis de corticosteroides presentó dificultades con otros métodos, por ejemplo, las bajas concentraciones al momento del análisis debido a su corto tiempo de vida media en plasma y orina. El espectro de masas obtenido en el modo ión negativo identifica y confirma la presencia de los corticosteroides en orina. Con este método se pueden evitar errores en los resultados como los obtenidos por el método de ELISA. [147]

La técnica de ionización por electrospray se ha vuelto la más común (junto con ionización química a presión atmosférica) para analizar esteroides no volátiles y polares por CLAE-EM. La técnica depende de la capacidad de la molécula para convertirse en ión positivo o negativo, lo cual a su vez depende de la composición de la fase móvil, pH, presencia de aditivos y tipo de muestra. Se ha demostrado que la adición de ácidos orgánicos volátiles (ácido fórmico, ácido acético y ácido trifluoroacético) en concentraciones trazas a la fase móvil, aumenta la señal de respuesta en el análisis de ergosteroides. También la adición postcolumna de sales de plata incrementó la

sensibilidad de estos compuestos. [148]

En los métodos por CLAE-EM para determinar esteroides como contaminantes en muestras de agua y suelos, es muy importante la limpieza de la muestra. Se han desarrollado métodos novedosos que incluyen un procedimiento de limpieza en línea con el sistema de CLAE-EM. El método consiste en un sistema de dos precolumnas conectadas en línea “column switching”. Las precolumnas están empacadas con un material denominado “material de acceso restringido” (MAR) que combinan los procesos de separación por exclusión de tamaño y separación por retención en fase reversa. El término acceso restringido indica el acceso limitado de los componentes de la matriz por barreras de difusión física (diámetro de poro pequeño) y barreras de difusión químicas (fase químicamente unida). [149]

Se ha investigado la reacción de glucuronidación *in vivo* del 24,25-dihidroxitamina D₃. Los monoglucuronidos formados se identificaron mediante CLAE y CLAE-EM, empleando como estándares de referencia tres isómeros de posición del metabolito y para realizar la hidrólisis enzimática se utilizó la enzima β-glucuronidasa. La 24,25-dihidroxitamina D₃ es uno de los principales metabolitos de la vitamina D₃, que es responsable del incremento del volumen óseo y fuerza mecánica sin hipercalcemia a dosis farmacológicas. La vitamina D₃ y sus derivados naturales y sintéticos también se han analizado por CLAE-EM, CLAE-EM-EM, y combinaciones de CLAE-EM con CG-EM debido a su importancia como agentes calcémicos y como agentes terapéuticos en la prevención y tratamiento del cáncer de próstata. [150,151]

Se ha determinado el colesterol total en suero empleando CLAE-EM y el método de dilución de isótopo [152]. Los metabolitos oxidados del colesterol se han determinado por CL-FR. Después de una ionización química a presión atmosférica (electrospray), los iones se separaron en un analizador de trampa de iones. En este estudio se buscó optimizar la sensibilidad modificando en el analizador la temperatura del nebulizador y el voltaje aplicado al electrodo en forma de anillo. [153]

Se han desarrollado métodos en donde se conjuntan CLAE y varios sistemas de detección en línea, como es el caso de la caracterización espectroscópica e identificación de ecdisteroides en extractos de plantas. La separación se llevó a cabo por CLAE. Como sistema de detección se utilizó una combinación de arreglo de diodos UV, RMN-H, IR-TF y EMTV. La combinación de los datos espectroscópicos permitió la completa caracterización estructural de estos compuestos. [154]

V) Otros métodos.

a) Polarografía. Es un método electroquímico de análisis, que se fundamenta en la medida del flujo de corriente que se produce por la electrólisis de una disolución en un microelectrodo polarizable en función del voltaje aplicado. La gráfica obtenida se denomina polarograma y proporciona información cualitativa y cuantitativa de sustancias que se pueden reducir y oxidar. En la polarografía de corriente directa, el microelectrodo es un electrodo de gota de mercurio que tiene un flujo de pequeñas gotas de mercurio de tamaño reproducible que caen lentamente desde el orificio de un tubo capilar conectado a un depósito de mercurio.

Se desarrolló un método polarográfico, rápido y sensible para la determinación de estradiol y de estriol. El método consistió de una reacción de nitración controlada usando una disolución de nitrato de sodio 0.4 M en un baño de agua a 100°C durante 30 min. El analito nitrado se determina directamente en la mezcla de reacción por polarografía. Debido a la fuerte capacidad de adsorción de los compuestos nitrados, la sensibilidad en este método es extremadamente alta. Los límites de detección son del orden de 6×10^{-8} mol/L para el estradiol y de 4×10^{-8} mol/L para el estriol. Este procedimiento se aplicó en la determinación de estriol en orina de mujeres embarazadas. [155]

b) Análisis por inyección de flujo (AIF), también llamado FIA de sus siglas en inglés (Flow Injection Assay), es otro método de análisis que se ha empleado para determinar esteroides. Es un procedimiento analítico de flujo continuo, es decir, se mide la concentración del analito sin detener el flujo del gas ó líquido en el que está contenido. La muestra líquida se inyecta dentro de otro líquido que funciona como portador sin que exista una división de este por burbujas de aire ni ciclos de lavado. La muestra inyectada es transportada a lo largo del sistema hasta un detector que continuamente registra una señal proporcional a la concentración. A pesar de que tiene ciertas ventajas con respecto a otros métodos (los tiempos de análisis son mas cortos, los costos son menores y se pueden automatizar) se han reportado pocos estudios de esteroides por este método. [156]

Uno de estos estudios que se ha reportado, ha sido el acoplamiento de la técnica de ELISA competitivo en un sistema de análisis por inyección de flujo para determinar el esteroide denominado **budesonide**³² en muestras de plasma. La limpieza de las muestras se llevó a cabo mediante extracción en fase sólida y cromatografía de líquidos. El marcador enzimático fue la

³² El Budesonide también llamado Budesónida es un corticosteroide que se emplea como antiasmático, antialérgico, antiinflamatorio y descongestivo nasal. Es un esteroide no halogenado con alta afinidad por el receptor de glucocorticoides y 200 veces más potente que la hidrocortisona, lo que le proporciona su actividad antiinflamatoria.

fosfatasa alcalina que reaccionó con el p-aminofenil fosfato para producir p-aminofenol. El p-aminofenol se detectó electroquímicamente empleando un electrodo de carbón de vidrio a 250 mV y como referencia un electrodo de calomel saturado (Ag/AgCl). El esteroide se cuantificó en las muestras de plasma por debajo de una concentración de 10pM (picomolar 10^{-12} mol/L). La importancia del budesonide es que tiene menos efectos adversos con respecto a otros corticosteroides convencionales. [157]

El desarrollo de estos sistemas de inyección de flujo a los que se les han incorporado reacciones inmunoquímicas para determinar esteroides se pueden automatizar con mayor facilidad, con la posibilidad de emplear diferentes sistemas de detección. Por ejemplo, se ha utilizado una técnica de reacción enzimática postcolumna para determinar cortisol y budesónidos. Se emplea una columna de afinidad a la que se le han fijado anticuerpos afines al complejo esteroide-proteína (hapteno). Cuando se satura la columna, los analitos no enlazados pasan a través de ella y reaccionan enzimáticamente en un sistema de reacción postcolumna. El producto de la reacción enzimática se detectó por amperometría. En otros casos la detección fue por fluorometría. En este método no es necesario lavar la columna de los residuos acumulados, acortando los tiempos de análisis y aumentando el tiempo de vida media de la columna. Es importante mencionar que este método permitió analizar hasta 20 muestras por hora, incluyendo la reacción enzimática postcolumna. [158]

Los métodos automatizados por AIF son muy versátiles en cuanto al número de muestras que se pueden procesar, un ejemplo es el método AIF automatizado para determinar cortisona, hidrocortisona, dexametasona, prednisolona, metilprednisolona, progesterona, corticosterona, testosterona y betametasona. El método emplea un sistema de detección quimioluminométrico que se basa en la sensibilidad de cada esteroide en una reacción quimioluminógena con sulfito de Cerio IV. Este método permitió medir más de 100 muestras por hora y puede ser usado para pruebas de uniformidad de contenido en la industria farmacéutica. [159]

Una variante en el estudio de los esteroides por AIF, es la de utilizar estos compuestos para aumentar la sensibilidad en reacciones quimioluminocentes y obtener así, efectivos sistemas de detección. Con este método se puede detectar la reacción de oxidación entre sulfito de cerio IV y iones bromato para detectar la cantidad de iones bromato presentes en muestras de agua, este ion es tóxico y se ha clasificado como carcinógeno para el ser humano. [160]

CONCLUSIONES.

La importancia de analizar esteroides se debe a sus múltiples funciones en los seres vivos (animales, vegetales o microorganismos), estas funciones resultan esenciales para la regulación de su metabolismo y de su desarrollo, si no existieran los esteroides, la regulación de estos procesos vitales sería difícil. Por tal motivo se han desarrollado diversos métodos analíticos para su determinación, aplicando los avances de la ciencia y la tecnología, lo cual se pone de manifiesto por el gran número de artículos que se han publicado en cuanto al análisis de esteroides, indicando la importancia que tiene para los científicos la determinación de estos compuestos en el campo clínico, síntesis de anticancerígenos, monitoreos ambientales, pruebas “antidoping”, etc.

Uno de los avances que se ha logrado en el análisis de esteroides es el desarrollo de técnicas para el tratamiento previo de las muestras. Materiales especiales como los PIM (polímeros de inclusión molecular), MAR (materiales de acceso restringido) y materiales de inmuoafinidad son los más útiles para este fin. Por lo tanto, la búsqueda de esteroides no se ha limitado solo a fluidos biológicos sino también en muestras ambientales como son lodos, polvos y aguas residuales donde pueden existir estos analitos y han provocado efectos mutagénicos en la fauna.

Los métodos inmunológicos han mejorado el procedimiento de determinación, en cuanto al modo de evitar reacciones cruzadas y tener métodos más precisos, para esto ha sido importante el desarrollo de métodos que utilizan anticuerpos policlonales altamente específicos y anticuerpos monoclonales que reconocen específicamente una región del analito que se está investigando. También se ha evitado el empleo de compuestos radioactivos, sustituyendo a estos por diferentes tipos de enzimas, disminuyendo de esta manera los residuos contaminantes y los costos del proceso. Los métodos inmunológicos se han acoplado a métodos de Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAE) y de inyección de flujo (AIF) automatizados, obteniéndose métodos altamente específicos.

Dentro de los métodos que se han desarrollado para el análisis de esteroides, están los que se basan en la electroforesis capilar, los cuales han resultado efectivos en cuanto al número de muestras que se pueden analizar por tiempo, su rapidez en la obtención de resultados, volúmenes pequeños de disolventes y de muestra, lo cual involucra una disminución de los desechos y por lo tanto, disminución de los costos.

Los métodos más utilizados en la investigación y el análisis de esteroides son los métodos cromatográficos. Los aspectos más relevantes en CLAE y CLAE-EM son los siguientes, e indican que se ha trabajado e investigado para mejorar los métodos ya existentes:

- Fluidos supercríticos y agua supercalentada utilizados como fase móvil.
- Polímeros de inclusión molecular y materiales de acceso restringido como materiales de empaque en pequeñas columnas de extracción en fase sólida y columnas cromatográficas de CLAE. Estos materiales han permitido el empleo de precolumnas en línea “column-switching” para análisis en CLAE-EM.
- El empleo de columnas a base de Zirconio en lugar de sílice como soporte.
- El empleo de detectores en línea (EM, RMN, IR y UV)
- La búsqueda de disolventes menos tóxicos para el analista y el medio ambiente.
- El desarrollo de métodos por CLAE-EMⁿ ha mejorado la sensibilidad de la técnica.
- El método de dilución de isótopo estable es muy empleado en CLAE-EM.

En CG y en CG-EM, se ha mejorado en los siguientes aspectos:

- La ionización de los derivados formados para producir resultados confiables.
- Se han fabricado columnas metálicas para trabajar a temperaturas más altas a las habituales, mejorando así la separación y la forma de las bandas de elución.
- La CG-EM se ha mejorado desarrollando métodos de CG-EMⁿ, los cuales se han aplicado en estudios “antidoping” y diagnóstico clínico.
- El desarrollo de métodos que incluyen pirolisis y CG-EM es otro avance, aunque sea una técnica que involucre un proceso mas elaborado.

Se ha llevado a cabo el desarrollo de otras técnicas que son menos utilizados en el análisis de esteroides, estos métodos (polarografía, análisis por inyección de flujo) indican la preocupación por tener más herramientas útiles en la determinación de estos compuestos tan importantes. La técnica de AIF podría tener más aplicación que la polarografía, debido a que se pueden obtener resultados en tiempos cortos y se pueden crear procesos automatizados, lo cual es importante en los análisis clínicos, la industria farmacéutica y la industria alimenticia.

Como conclusiones finales cabe señalar dos aspectos importantes de la investigación bibliográfica:

1) La importancia que tienen las técnicas cromatográficas para cualquier tipo de análisis. Tal es la

sensibilidad que pueden tener estos instrumentos que es una de las principales herramientas con la que se han equipado las sondas espaciales en sus misiones al planeta Marte para analizar el suelo y subsuelo marciano tratando de encontrar evidencia de material biológico, por ejemplo, aminoácidos.

2) Y la importancia que tiene la determinación de esteroides por cualquier método. La investigación en el análisis de esteroides ha llegado al grado de utilizarlos en terapias para prolongar la vida de los organismos, actuando de alguna manera en la elongación de los telómeros de los cromosomas, es decir, se trata de utilizar a los esteroides como una especie de elixir de la vida.

BIBLIOGRAFÍA.

- 1) Raju, Uma; Sepkovic, Daniel W.; Miller, William R.; Dixon, J Michael; Bradlow, H. Leon; Levitz, Mortimer. *Steroids* 2000, 65, 883-888.
- 2) Bradlow, H. Leon; Sepkovic, Daniel W.; Klug, Thomas; Osborne, M.P. *Steroids* 1998, 63, 406-413.
- 3) Mano, Nariyasu; Nishimura, Koji; Narui, Takashi; Ikegawa, Shigeo; Goto, Junichi. *Steroids* 2002, 67, 257-262.
- 4) Salvadori, Myriam C.; Azevedo, Cristina P.; Rieser, Evalyn M.; Beiro-Neto, Luciane M. Ribeiro-Neto; Camargo, Marcia M.A.; Andraus, Maristela H.; Za, Mirtes E. V. Souza; Lopez, Nancy M. R.; Neto, Jodo Palermo. *Revista Brasileira Toxicológica* 2000, 13 (1), 11-24.
- 5) Henricks, D.M.; Gray, S.L.; Owenby, J.J.; Lackey B.R. *APMSI* 2000, 109 (4), 273-283.
- 6) Von Schoultz, B. *Menopause Millenium, Proc. Int. Menopause Soc. Worl Congr. Menopause 9th* 1999, (pub. 2000), 182-185.
- 7) Wren, B.G. *Menopause Millenium, Proc. Int. Menopause Soc. World Congr. Menopause 9th* 1999, (pub. 2000), 298-302.
- 8) Saletu, B.; Anderer, P.; Gruber, G.; Mandl, M.; Gruber, D.; Metka, M.; Huber, J.; Loffler, H.; Abu-Bakr, M. Hassan; Saletu-Zyhlarz, G.M. *Drugs of today* 2001, 37(Suppl. G), 39-62.
- 9) Kawahara, Masahiro; Kuroda, Yoichiro. *Celular and Molecular Neurobiology* 2001, 21 (1), 1-13.
- 10) Hogervorst, Eva; Williams, Jonathan; Budge, Marc; Barnetson, Lin; Combrinck, Marc; Smith, A. David. *Neuroendocrinology Letters* 2001, 22(3), 163-168.
- 11) Shibasaki, T.; Sasagawa, I.; Suzuki, Y.; Ichianagi, O.; Matsuki, S.; Miura, M.; Nakada, T. *Archives of Andrology* 2001, 47 (3), 173-176.
- 12) Alex, C. Sonnenwirth; Leonard, Jarett. *Métodos y diagnóstico del laboratorio 8^a* Edición, Editorial Médica Panamericana, 1991, México.
- 13) Shu, Youheng; Jones, Stephen R.; Kinney, William A., Selinsky, Barry S. *Steroids* 2002, 67, 291-304.
- 14) Iwashima, Makoto; Nara, Ken; Iguchi, Kazuo. *Steroids* 2000, 65, 130-137.
- 15) Iwashima, Makoto; Nara, Ken; Nakamichi, Yoshiyuki; Iguchi, Kazuo. *Steroids* 2001, 66, 25-32.
- 16) Shen, Ya-Ching; Venkata Sai Prakash, Chaturvedula; Chang, Yao-To. *Steroids* 2001, 66, 721-725.
- 17) Rueda, Ana; Zubía, Ana; Ortega, María J.; Salvá, Javier. *Steroids* 2001, 66, 897-904.
- 18) Aiello, Anna; Fattorusso, Ernesto; Menna, Marialuisa. *Steroids* 1999, 64, 687-714.
- 19) Ramírez, Javier A.; Teme Centurión, Osvaldo M.; Gros, Eduardo G.; Galagovsky, Lydia R. *Steroids* 2000, 65, 329-337.
- 20) Iglesias-Arteaga, Martín A.; Pérez Martínez, Carlos; Coll Manchado, Francisco. *Steroids* 2002, 67, 159-163.
- 21) Toyama, Susumu. *Nippon Sakumotzu Gakkai Kiji* 2000, 69(4), 453-463.
- 22) Ko, Dong-Hoon; Heiman, Ann S.; Hudson, Charles E.; Lee, Henry J. *Steroids* 2002, 67, 211-219.
- 23) Sicinski, Rafal R.; Prah, Jean M.; Smith, Connie M.; De Luca, Hector F. *Steroids* 2002, 67, 247-256.
- 24) Zhao, Xiao-Yan; Feldman, David. *Steroids* 2001, 66, 293-300.
- 25) Xiao, Xiao-Yao; McCalley, David V.; McEvoy, James. *Journal of Chromatography A* 2001, 923 (1-2), 195-204.
- 26) López de Alda, Maria J.; Barceló Damiá. *Journal of Chromatography A* 2001, 938 (1-2), 145-153.

- 27) McMurry, John. Química Orgánica, México, 6ª Edición, Ed. International Thomson, 2001, pag. 114-1025.
- 28) Makin, H.L.J.; Gower, D.B.; Kira, D.N. *Steroids analysis*. Blackie Academic & Professional. Ed. Oxford, 1995, Printed in Great Britain, page 25-109 and 185-214.
- 29) Goldman, Bruce D. *Steroids* 1999, 64, 679-685.
- 30) Gratsias, Yiannis ; Moutsatsou, Paraskevi ; Chrysanthopoulou, Georgia; Tsagarakis, Stelliios ; Thalassinos, Nikolaos ; Sekeris, Constantine E. *Steroids* 2000, 65, 851-856.
- 31) Fenske, Marti. *Journal of Chromatography B* 1995, 670, 373-375.
- 32) Roitt, Ivan M.; Brostoff, Jonathan; Male, David K. *Inmunología* 3ª Edición. Ediciones Científicas y Técnicas S.A. 1997.
- 33) Rost, Natalia S.; Murphy, Kristine; Hafer, Laurie; Pavao, Matthew; Traish, Abdulmageed M. *Steroids* 2000, 65, 429-436.
- 34) Blaehr, Lars K.A.; Björkling, Fredrik; Binderup, Ernst; Calverley, Martin J.; Kaastrup, Peter. *Steroids* 2001, 66, 539-548.
- 35) Cook, C.J. *Journal of Neuroscience Methods* 2001, 110 (1-2), 95-101.
- 36) Miller, Michel A.; Sagnella, Giuseppe A.; Macgregor, Graham A. *Clinical Chemistry (Washington D.C.)* 1997, 43 (10), 1995-1997.
- 37) Spierito, F.W.; Gardner, F.; Smith, S.J. *Steroids* 2001, 66, 59-62.
- 38) Daxenberg, Andreas; Hageleit, Melanie; Kraetzel, Wolf-Dieter; Lange, Iris G.; Claus, Rolf; Le Bizec, Bruno; Meyer, Heinrich H.D. *Livestock Production Science* 2001, 69, 139-144.
- 39) Jana, Chandan K.; Ali, Esahak. *Steroids* 1999, 64, 228-232.
- 40) Tanaka, Touichi; Yanagi, Masayuki; Kubodera, Akiko. *Steroids* 1998, 63, 516-522.
- 41) Boudi, Ahmed ; Giton, Frank ; Galons, Hervé ; Eulry, Bertrand ; Villette, Jean-Marie ; Soliman, Hany ; Boudou, Philippe, Fiet, Jean. *Steroids* 2000, 65, 103-108.
- 42) Fiet, Jean ; Giton, Frank ; Boudi, Ahmed ; Boudou, Philippe ; Soliman, Hany ; Villette, Jean-Marie ; Galons, Hervé. *Steroids* 2001, 66, 609-614.
- 43) Robertson, David M.; Pruyers, Enid; Stephenson, Tanneale; Pettersson, Kim; Morton, Sue; McLachlan, Robert I. *Clinical Endocrinology (Oxford, United Kingdom)* 2001, 55(3), 331-339.
- 44) Jia, Min, He, Zhihui; Jin, Wenrui. *Journal of Chromatography A* 2002, 966 (1-2), 187-194.
- 45) Szentesi, A.; Gergely, A.; Horvath, P.; Maho, S.; Matyus, P.; Szasz, Gy. *Current Medicinal Chemistry* 2001, 8 (11), 1341-1347.
- 46) Groh, Helmut; Schön, Renate; Ritzau, Michael; Kasch, Helmut; Undisz, Katrin; Hobe, Gerhard. *Steroids* 1997, 62, 437-443.
- 47) Daghbouche, Yasmina; Garrigues, Salvador; De la Guardia, Miguel. *Analytical Chemistry Acta* 1997, 354 (1-3), 97-106.
- 48) Nikolich, K. ; Sergides, C. ; Pittas, A. *Journal Serb. Chemistry Society* 2001, 66 (3), 189-198.
- 49) Mappus, Elisabeth; Chambon, Christophe; Rolland de Ravel, Marc; Grenot, Catherine, Cuilleron, Claude Y. *Steroids* 1997, 62, 603-620.
- 50) Ruan, Benfag; Wilson, William K.; Schroepfer Jr., George J. *Steroids* 1999, 64, 385-395.
- 51) Sandvoss, Martin; Weltring, Anja; Preiss, Alfred; Levsen, Karsten; Wuensch, Gerold. *Journal of Chromatography A* 2001, 917, 75-86.
- 52) Cherkaoui, Samir ; Bekkouche, Khalid ; Christen, Philippe ; Veuthey, Jean-Luc. *Journal of Chromatography A* 2001, 922 (1-2), 321-328.
- 53) Fritz, James S. *Analytical Solid Phase Extraction*, John Wiley & Sons, Inc. 1998, USA, pp. 1-14 and 63-87.
- 54) Al-Alousi, Louay; Anderson, Robert A. *Steroids* 2002, 67, 269-275.

- 55) Baronti, C. ; Curini, R. ; D'Ascenzo, G. ; Di Corcia, A. ; Gentili, A., Samperi, R. *Environmental Science and Technology* 2000, 34 (24), 5059-5066.
- 56) Petrovic, Mira; Eljarrat, Ethel; López de Alda, María J.; Barceló, Damiá. *Journal of Chromatography A* 2002, 974 (1-2), 23-51.
- 57) Appelblad, Patrik; Irgue, Knut. *Journal of Chromatography A* 2002, 955 (2), 151-182.
- 58) Riepe, F.G.; Wonka, S.; Partsch, C.; Sippell, W. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 2001, 763, 99-106.
- 59) Dötsch, Jörg; Dörr, Helmuth G.; Stalla, Günter K.; Sippell, Wolfgang G. *Steroids* 2001, 66, 817-820.
- 60) Riepe, F.G.; Krone, N.; Peter, N.; Sippell, W.G.; Partsch, C. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 2003, 785, 293-301.
- 61) Khalil, M.; Strutt, B.; Vachon, D.; Killinger, D. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 1993, 46, 585-595.
- 62) Joe, Ikro; Ramírez, Victor D. *Steroids* 2001, 66, 529-538.
- 63) Feng, Wenke; Graumann, Klaus; Hahn, Rainer; Jungbauer, Alois. *Journal of Chromatography A* 1999, 852, 161-173.
- 64) Cert, A.; Moreda, W. *Journal of Chromatography A* 1998, 823, 291-297.
- 65) Yu, Mingyan. *Yaowu Fenxi Zazhi* 2000, 20 (6), 429-430.
- 66) Godin, Chantal; Poirier, Donald; Blomquist, Charles H.; Tremblay, Yves. *Steroids* 1999, 64, 767-769.
- 67) Zarzycki, P.K.; Wierzbowska, M.; Lamparczyk, H. *Journal of Chromatography A* 1999, 857, 255-262.
- 68) Zarzycki, Pawel K. *Journal of Chromatography A* 2002, 971 (1-2), 193-197.
- 69) Bathori, M.; Blunden, G.; Kalasz, H. *Chromatographia* 2000, 52 (11-12), 815-817.
- 70) Goto, Junichi; Murao, Naoaki; Oohashi, Junji; Ikegawa, Shigeo. *Steroids* 1998, 63, 180-185.
- 71) Lapčík, Oldrich; Hill, Martin; Hampl, Richard; Wähälä, Kristiina; Adlercreutz, Herman. *Steroids* 1998, 63, 14-20.
- 72) Forgács, Esther; Cserhádi, Tibor. *Journal of Chromatography A* 1999, 845, 447-453.
- 73) Arici, Aydin; Marshburn, Paul B.; MacDonald, Paul C.; Dombrowski, Raymond A. *Steroids* 1999, 64, 530-534.
- 74) Matsuoka, Ryu; Yanaihara, Atsushi; Saito, Hiroshi; Furusawa, Yoshiaki; Toma, Yoshiro; Shimizu, Yukiko; Yanaihara, Takumi; Okai, Takashi. *Steroids* 2002, 67, 655-659.
- 75) Doostzadeh, Jaleh ; Cotillon, Anne-Cécile ; Benalychérif, Aïda ; Morfin, Robert. *Steroids* 1998, 63, 608-614.
- 76) Altria, K.D. *Journal of Chromatography A* 1999, 844, 371-386.
- 77) Kim, Jong-Bok; Otsuka, Koji; Terabe, Shigeru. *Journal of Chromatography A* 2001, 912, 343-352.
- 78) Lurie, Ira S. *Journal of Chromatography A* 1997, 780, 265-284.
- 79) Monton, Maria Rowena N.; Otsuka, Koji; Terabe, Shigeru. *Journal of Chromatography A* 2003, 985 (1-2), 435-445.
- 80) Que, Amy H.; Palm, Anders; Baker, Andrew G.; Novotny, Milos V. *Journal of Chromatography A* 2000, 887, 379-391.
- 81) Liu, Yi; Pietrzyk, Donald J. *Journal of Chromatography A* 2001, 920, 367-375.
- 82) Del Rio, José C.; Gutierrez, Ana; González-Vila, Francisco J. *Journal of Chromatography A* 1999, 830, 227-232.
- 83) Kurosawa, Takao; Sato, Masahiro; Kikuchi, Fumihiko; Watanabe, Takafumi; Suga, Tetsuya; Toma, Masahiko. *Steroids* 1997, 62, 474-481.
- 84) Callies, Frank; Arlt, Wiebke; Siekmann, Lotear; Hübler, Doris; Bidlingmaier, Allolio Bruno. *Steroids* 2000, 65, 98-102.

- 85) Li, Song-Lin; Li, Ping; Lin, Ge; Chan, Shun-Wan; Ho, Yee-Ping. *Journal of Chromatography A* 2000, 873, 221-228.
- 86) Stead, D.A.; Reid, R.G.; Taylor, R.B. *Journal of Chromatography A* 1998, 798, 259-267.
- 87) Neue, Uwe D. *HPLC Columns: Theory Technology and Practice*. Wiley. VCH, Inc., 1997 pp 106-129.
- 88) Dolan, John W. *Guide to LC Method Development* LCGC Magazine 2000, Ed. Advanstar Communications, First Edition, USA.
- 89) Ruan, Benfang; Wilson, William K.; Pang, Jihai; Schroepfer Jr., George J. *Steroids* 2000, 65, 29-39.
- 90) Chen, Zuliang; Wang, Shaofan. *Analytical Letters* 1997, 30 (13), 2315-2325.
- 91) Saitoh, Tohru; Matsudo, Toshiyuki; Matsubara, Chiyo. *Journal of Chromatography A* 2000, 879, 121-128.
- 92) Ruiz-Angel, M.J.; Caballero, R.D.; Simó-Alfonso, E.F.; García-Alvarez-Coque, M.C. *Journal of Chromatography A* 2002, 947, 31-45.
- 93) Whalley, P.M.; Bakes, D.; Grime, K.; Weaver, R.J. *Journal of Chromatography B: Biomedical Science Applied* 2001, 760 (2), 281-288.
- 94) Lin, Dong-Liang ; Chang, Hsien-Cheh ; Chen, Chau-Yang. *Yaowu Shipin Fenxi* 2000, 8 (4), 283-288.
- 95) Lee, B.L.; New, A.L.; Ong, C.N. *Journal of Chromatography B: Biomedical Science Applied* 1997, 704 (1-2), 35-42.
- 96) Caboni, M.F.; Costa, A.; Rodríguez, Estrada M.T.; Lercker, G. *Chromatographia* 1997, 46 (3-4), 151-155.
- 97) Zhang, Rong-Zhen; Li, Long; Li, Jian-Cai; Liu, Shu-Tao; Chen, Ru-Ming; Shi, Bi-Hong; Gao, Wen-Hong; Chen, Gong-Rui; Zheng, Yu-Qiang; Rao, Ping-Fan. *Food Health Pac. Rim, International 3rd Conference Food Science Technology* 1997 (pub. 1999), 198-205.
- 98) Parab, Indira D.; Deshpande, S.G.; Singh, K.K. *Indian Drugs* 1997, 34 (10), 564-566.
- 99) Wang, Qiao; Ye, Jincui; Chen, Guoshen. *Yaowu Fenxi Zazhi* 1999, 19 (4), 244-246.
- 100) Zhu, Juan; Luo, Xia-Ping. *Zhongguo Yiyao Gongye Zazhi* 2000, 31 (6), 272-273.
- 101) Kuang, Peilin; Li, Ping; Luo, Xiaohong; Li, Yuan. *Yaowu Fenxi Zazhi* 2000, 20 (5), 351-352.
- 102) Zarzycki, Pawel K.; Smith, Roger. *Journal Chromatography A* 2001, 912 (1), 45-52.
- 103) Zarzycki, Pawel K.; Kulhanek, Kathrin M.; Smith, Roger. *Journal of Chromatography A* 2002, 955, 71-78.
- 104) López de Alda, María J.; Barceló Damiá. *Journal of Chromatography A* 2001, 911, 203-210.
- 105) Dinan, Lawrence; Savchenko, Tamara; Whiting, Pensri. *Phytochemistry* 2001, 56 (6), 569-576.
- 106) Meng, Yanhui; Whiting, Pensri; Zibareva, Larisa; Bertho, Gildas; Girault, Jean-Pierre; Lafont, René; Dinan, Lawrence. *Journal of Chromatography A* 2001, 935, 309-319.
- 107) Fields, Steven M.; Ye, Christine Q.; Zhang, Dee Dee; Russell, Branch B.; Zhang, X. Jason; Okafo, Ngozi. *Journal of Chromatography A* 2001, 913, 197-204.
- 108) Kagan, Michael Z. *Journal of Chromatography A* 2001, 918 (2), 293-302.
- 109) Yaku, Koji; Morishita Fujio. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 2000, 43 (1-3), 59-76.
- 110) Kuronen, Pirjo; Volín, Pirkko; Laitalainen, Tarja. *Journal of Chromatography B* 1998, 718, 211-224.
- 111) Miyairi, Shinichi; Maeda, Kaoru; Oe, Tomoyuki; Kato, Toyooki; Naganuma, Akira. *Steroids* 1999, 64, 252-258.

- 112) Kicha, Alla A.; Ivanchina, Natalia V.; Kalinovsky, Anatoly I.; Dmitrenok, Pavel S.; Stonik, Valentín A. *Tetrahedron Letters* 2003, 44, 1935-1937.
- 113) Budde, William L. *Analytical Mass Spectrometry. Strategies for Environmental and Related Applications*. American Chemical Society, Washington D.C. USA, 2001, page 3-18 and 21-95.
- 114) Willoughby, Ross. *A global View of LC/MS: How to solve your most challenging analytical problems*. Global View Publishing, Pittsburgh, PA, 1998 pp 502-541.
- 115) Iida, Takashi; Hikosaka, Masahiro; Goto, Junichi; Nambara, Toshio. *Journal of Chromatography A* 2001, 937, 97-105.
- 116) Brandon, David D. ; Isabelle, Lorne M. ; Samuels, Mary H. ; Kendall, John W. ; Loriaux, D. Lynn. *Steroids* 1999, 64, 372-378.
- 117) Kasuya, Yasuji ; Yokokawa, Akitomo ; Shibasaki, Hiromi ; Furuta, Takashi. *Steroids* 2002, 67, 783-788.
- 118) Xiao, Xiao-Yao; McCalley, David. *Rapid Communication Mass Spectrometry* 2000, 14 (21), 1991-2001.
- 119) Wudy, Stefan A.; Hartmann, Michaela; Solleder, Claudia; Homoki, Janos. *Steroids* 2001, 66, 759-762.
- 120) Wudy, Stefan A.; Hartmann, Michaela; Solleder, Claudia; Homoki, Janos. *Steroids* 2002, 67, 851-857.
- 121) Shackleton, Cedric H.L.; Phillips, Andy; Chang, Tony; Li, Ye. *Steroids* 1997, 62, 379-387.
- 122) Schaenzer, Wilhelm. *GIT Labor- Fachzeitschrift* 2001, 45 (10), 1096-1098.
- 123) Prevost, Stephanie ; Nicol, Tatiana ; Monteau, Fabrice ; Andre, Francois ; Le Bizec, Bruno. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2001, 15 (24), 2509-2514.
- 124) Dehennin, Louis ; Ferry, Mathieu ; Lafarge, Patricia ; Pérés, Gilbert ; Lafarge, Jean-Pierre. *Steroids* 1998, 68, 80-87.
- 125) Gremaud, G. ; Piguet, C. ; Baumgartner, M. ; Pouteau, E. ; Decarli, B. ; Berger, A. ; Fay L.B. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2001, 15 (14), 1207-1213.
- 126) Ho, Choi Man; Rae, kim Kyoung; Chul, Chung Bong. *Steroids* 2000, 65, 54-59.
- 127) Le Bizec, Bruno ; Bryand, Fabrice ; Gaudin, Isabelle ; Monteau, Fabrice ; Poulain, Frédéric ; Andre, François. *Steroids* 2002, 67, 105-110.
- 128) Peng, Shi-Hua; Segura, Jordi; Farré, Magí; González, José Carlos; De la Torre, Xavier. *Steroids* 2002, 67, 39-50.
- 129) Catlin, Don H.; Leder, Benjamín Z.; Ahrens, Brian D.; Hatton, Caroline K.; Finkelstein, Joel S. *Steroids* 2002, 67, 559-564.
- 130) Caradoso, Claudia A.L.; Vilegas, Wagner; Honda, Neli K. *Journal of Chromatography A* 1998, 808, 264-268.
- 131) Del Rio, José C.; Romero, Javier; Gutiérrez, Ana. *Journal of Chromatography A* 2000, 874, 235-245.
- 132) Shackleton, Cedric H.L.; Roitman, Esther; Kratz, Lisa E.; Kelley, Richard I. *Steroids* 1999, 64, 446-452.
- 133) Shackleton, Cedric H.L.; Roitman, Esther; Kelley, Richard I. *Steroids* 1999, 64, 481-490.
- 134) Marchand, P. ; Le Bizec, Bruno ; Gade, C. ; Monteau, F. ; André, F. *Journal of Chromatography A* 2000, 867, 219-233.
- 135) Impens, Sandra ; De Wasch, Katia ; Cornelis, Marc ; De Brabander, Hubert F. *Journal of Chromatography A* 2002, 970, 235-247.
- 136) Huenerbein, Andréas; Sípoli Marques, Marlice A.; Dos Santos Pereira, Alberto; Radler de Aquino, Francisco. *Journal of Chromatography A* 2002.
- 137) Schaaf, O.; Detener, K. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2000, 75, 187-199.

- 138) Hubbard, Walter C.; Liu, Mark C.; Bickel, Carol; Argenti, Domenick. *Analytical Biochemistry* 2001, 290, 18-25.
- 139) Hill, M.; Lapčík, O.; Havlíková, H.; Morfin, R.; Hampl, R. *Journal of Chromatography A* 2001, 935, 297-307.
- 140) Dehnhard, M.; Hatt, J.; Eulenberger, K.; Ochs, A.; Strauss, G. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2003.
- 141) Kim, Seong-Mo; Kim, Dong-Hyun. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2001, 15 (21), 2041-2045.
- 142) Marwah, Ashok; Marwah, Padma; Lardy, Henry. *Journal Chromatography B. Biomedical Science Applied* 2001, 757 (2), 333-342.
- 143) Shackleton, Cedric H.L.; Chuang, Hans; Kim, Jhon; De la Torre, Xavier; Segura, Jordi. *Steroids* 1997, 62, 523-529.
- 144) Creaser, Colin S.; Feely, Stephen J.; Houghton, Edward; Seymour, Mark. *Journal of Chromatography A* 1998, 794, 37-43.
- 145) Reepmeyer, John C.; Revelle, Larry K.; Vidavsky, Ilan. *Journal of Chromatography A* 1998, 828, 239-246.
- 146) Van de Wiele, M.; De Wasch, K.; Vercammen, J.; Courtheyn, D.; De Brabander, H.; Impens, S. *Journal of Chromatography A* 2000, 904, 203-209.
- 147) Fluri, Karl; Rivier, Laurent; Dienes-Nagy, Agnes; You, Chunhui; Maître, Arnaud; Schweizer, Carine; Saugy, Martial; Mangin, Patrice. *Journal of Chromatography A* 2001, 926, 87-95.
- 148) Marwah, Ashok; Marwah, Padma; Lardy, Henry. *Journal of Chromatography A* 2002, 964, 137-151.
- 149) Petrovic, Mira; Tavazzi, Simona; Barcelo, Damia. *Journal of Chromatography A* 2002, 971, 37-45.
- 150) Higashi, Tatsuya; Horike, Maki; Kikuchi, Ryuta; Shimada, Kazutake. *Steroids* 1999, 64, 715-725.
- 151) Higashi, Tatsuya; Miura, Kanako; Kikuchi, Ryuta; Shimada, Kazutake; Hiyamizu, Hiroko; Ooi, Hidenori; Iwabuchi, Yoshiharu; Hatakeyama, Sujumi; Kubodera, Noboru. *Steroids* 2000, 65, 281-294.
- 152) Kock, Ruediger; Delvoux, Bert; Greiling, Helmut. *Clinical Chemistry (Washington D.C.)* 1997, 43 (10), 1896-1903.
- 153) Manini, P. ; Andreoli, R. ; Careri, M. ; Elviri, L. ; Musci, M. *Rapids Communications Mass Spectrometry* 1998, 12 (13), 883-889.
- 154) Loudon, D.; Handley, A.; Taylor S.; Lenz, E.; Miller, S.; Wilson, I.D.; Sage, A.; Lafont, R. *Journal of Chromatography A* 2001, 910 (2), 237-246.
- 155) Hu, Shengshui; He, Qiong; Zhao, Zaofan. *Analytica Chimica Acta* 1992, 259, 305-309.
- 156) Valcarcel, M.; Luque de Castro, M.D. *Flow Injection Analysis. Principles and Applications*. Ed. John Wiley & Sons, Great Britain 1987, page 15-58 and 114-221.
- 157) Kronkvist, Karin; Lövgren, Ulf; Edholm, Lars-Erik; Johansson, Gillis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 1993, 11 (6), 459-467.
- 158) Kronkvist, Karin; Lövgren, Ulf; Johan, Svenson; Edholm, Lars-Erik; Johansson, Gillis. *Journal of Immunological Methods* 1997, 200, 145-153.
- 159) Deftereos, Nikolaos T.; Calokerinos, Anthony C. *Analytica Chimica Acta* 1994, 290, 190-200.
- 160) Esteves da Silva, Joaquim C.G.; Dias, José R.M.; Magalhães, Júlia M.C.S. *Analytica Chimica Acta* 2001, 450, 175-184.