

UNIVERSIDAD IBEROAMERICANA
INCORPORADA A LA U.N.A.M.
FACULTAD DE QUIMICA BERZELIUS

DESARROLLO
DE UN PROCESO CROMATOGRAFICO
PARA LA PURIFICACION Y CUANTEO DE PREGNANO
3 Alpha 20 Alpha DIOL

TESIS
PARA OPTAR AL TITULO DE QUIMICO

1959

MARIA GUADALUPE MEJIA GUZMAN



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.

UNIVERSIDAD IBEROAMERICANA
INCORPORADA A LA U. N. A. M.
FACULTAD DE QUIMICA BERZELIUS

DESARROLLO DE UN PROCESO CROMATOGRAFICO PARA LA PURIFI
CACION Y CUANTEO DE PREGNANO 3 α 20 α DIOL.

TESIS PARA OPTAR AL TITULO
DE QUIMICO

MARIA GUADALUPE MEJIA GUZMAN

A mis padres

A mis hermanos

A Don Luis M. Verea
Director de la Fac.
de Química Berzelius

Al Dr. Francisco Gómez Mont
por su acertada dirección -
en este trabajo

A la Srta. Q. F. B. Martha Alamilla

Al Dr. Jesus Corral G.

Al Hospital de Enfermedades
de la Nutrición

S U M A R I O

- 1.- INTRODUCCION.
- 2.- MATERIAL Y METODO.
- 3.- PARTE EXPERIMENTAL.
- 4.- CONCLUSIONES.
- 5.- BIBLIOGRAFIA.

I N T R O D U C C I O N

Recientes progresos en investigaciones industriales han permitido aislar y encontrar substancias que tienen actividad progestacional y que son capaces de suprimir la función hipóficaria gonadotrófica.

La única forma de probar si un compuesto con actividad progestacional es capaz de suprimir la función ovárica es basándose en el estudio de la excreción de pregnandiol-urinario (pregnanol 5-20 días).

En un programa de Los Laboratorios Syntex en colaboración con el Laboratorio de Hormonas del Hospital de Enfermedades de la Nutrición se ha estudiado este método con el objeto de probar posteriormente si existe la actividad supresora de la función lútea de distintos compuestos administrados por vía oral y obtenidos en el Laboratorio de Investigación Química.

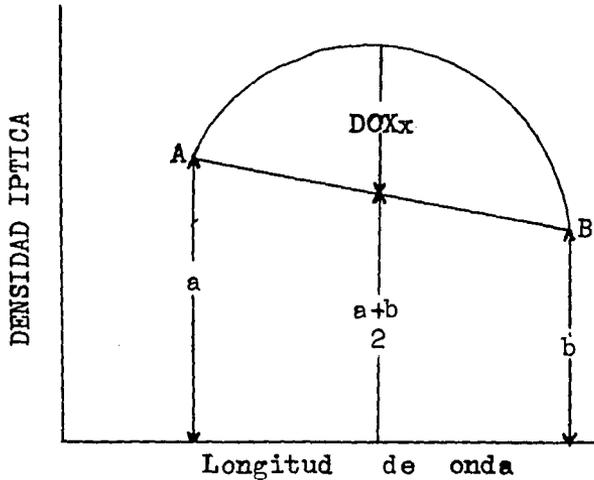
El objeto de este trabajo consiste fundamentalmente en la descripción del método químico de cuantificación. Trabajos posteriores de índole clínica serán motivo de otras publicaciones.

Para extraer de la orina este metabolito fundamental de la progesterona y cuantearlo se han ideado varios métodos descritos con anterioridad (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8). Sin embargo estos métodos exigen colecciones de grandes volúmenes de orina y son bastante inexactos.

No fué sino hasta el desarrollo de la espectrofotometría ultravioleta de los cromógenos de ácido sulfúrico de esteroides (9) y la corrección de Allen (10) para el cuanteo de esteroides en mezclas impuras que se permitió establecer métodos más sensibles.

La corrección de Allen está basada en la determinación del coeficiente de Extinción de la máxima de absorción en 425 m, no en relación con el cero de la ordenada de la gráfica sino con el punto intermedio de una línea que unen dos extremos equidistantes de esta curva tal como lo muestra la figura que sigue.

CORRECCION DE ALLEN



ECUACION DE ALLEN

$$DOX_x = DO_x \frac{DO_A + DO_B}{2}$$

EQUIVALENCIAS:

DOX_x = Densidad Optica de la substancia X que tiene un maximo de absorción en la longitud de onda \bar{x}

DO_x = Densidad Optica en la longitud de onda x de maxima absorción

DO_A y DO_B = Densidades Opticas en la longitudes de onda equidistantes a x

M A T E R I A L

Matraces redondos de boca esmerilada de 500 ml.

Matraces Erlenmeyer de 250 ml.

Columnas de cromatografía de 11 mm. de diámetro.

Refrigerantes, tubos de ensaye, pipetas, probetas.

Reactivos y solventes usados:

HCl concentrado, Q.P.

Tolueno de tercera destilación.

NaCl en NaOH 1N. al 25%

KMnO_4 al 4 % en NaOH 1N.

Benceno de tercera destilación.

Alcohol de quinta destilación.

Cloruro de acetilo.

NaHCO_3 al 8 %

Eter de Petróleo segunda destilación.

Hexano tercera destilación.

Alúmina con arena de plata.

Sulfito de sodio anhidro.

Acido sulfúrico Q.P.

tos. Se enfría a chorro de agua el matraz, se separa la capa de tolueno y el extracto acuoso se reextrae con 50 ml. más de tolueno. Se combinan estos dos extractos y se lavan con 25 ml. de la solución de cloruro de sodio en sosa normal.

Este lavado tiene por objeto eliminar compuestos fenólicos presentes en la orina que pueden interferir con la reacción colorida.

Se añaden después 5 ml. de permanganato de potasio en sosa normal al 4 % con objeto de oxidar el pregnandiol que pudiera existir y que más tarde sería motivo de error.

Se lava luego con agua destilada para eliminar el permanganato, se filtra y se destila el tolueno al vacío hasta quedar un extracto seco, el cual se disuelve en benceno y será el que se pase por la primera columna de alúmina.

PRIMERA CROMATOGRAFIA

Se prepara una columna de alúmina con arena de plata de tres cms. de alto por 11 mm. de diámetro, se lava con 20 ml. de benceno para eliminar impurezas. Después se pasa la frac-

ción de pregnandiol disuelta en benceno y se añaden 15 ml. - de una solución de benceno-etanol al 0.5 % para eliminar los pigmentos urinarios, esta fracción se desecha. Por último el pregnandiol que es una substancia muy polar es eluida con 50 ml. de una solución de benceno-etanol al 0.8 %.

Se evapora el solvente y se acetila el pregnandiol con 2 ml. de cloruro de acetilo por espacio de una hora. Se añaden luego 25 ml. de éter de petróleo, se lava con agua y con bicarbonato de sodio al 8 % y nuevamente con agua .

La reacción del cloruro de acetilo con agua es muy violenta y es como sigue:



El bicarbonato de sodio elimina acidez.

El éter de petróleo conteniendo el diacetato de pregnandiol es evaporado bajo corriente de nitrógeno a baño maría, quedando el extracto seco al que se le hace la segunda cromatografía para una separación más completa.

SEGUNDA CROMATOGRAFIA

Se prepara una columna de alúmina como la anterior, se-

pasa hexano para lavarla y luego el extracto disuelto en hexano. El diacetato de pregnandiol que es una substancia mucho menos polar que el pregnandiol se eluye con 20 ml. de benceno.

Se evapora este benceno bajo corriente de nitrógeno en baño maría. Es difícil que después de la doble separación pueda haber algún contaminante que interfiera la reacción de identificación y cuanteo. Esta está basada en la máxima de absorción que presente el cromógeno de ácido sulfúrico de pregnandiol en 425 m

La reacción se hace añadiendo al extracto seco 5 ml. de ácido sulfúrico Q.P. y 10 mgr. de sulfito de sodio anhidro, se deja reposar 17 horas al cabo de las cuales se lee en espectrofotómetro Beckman en las siguientes longitudes de onda:

380 - 400 - 425 - 450 - 470.

Se hace la corrección de Allen, como ya se indicó.

La curva standard contra la que se comparan los problemas se hace con 100 y 200 gammas de pregnandiol puro disueltas en agua y corridas a través de todo el procedimiento.

Así mismo se prepara un testigo de reactivos y contra él -- son leídos tanto los standards como los problemas. Los cálculos se hace como sigue:

El resultado de las gammas correspondientes a cada problema se multiplica por 20 ya que se trabaja con un $1/20$ -- del volúmen total de 24 horas y se divide entre 1000. Se -- tiene así mgrs. de pregnandiol en 24 horas.

P A R T E E X P E R I M E N T A L

El ácido sulfúrico con los diferentes esteroides produce diversas coloraciones que tienen su curva espectrofotométrica específica.

Lo primero que se hizo fué establecer la curva de absorción del pregnandiol con ácido sulfúrico.

Para esto, una vez desarrollado el color amarillo característico se leyó a diferentes longitudes de onda desde 200 hasta 600 m obteniéndose dos máximas de absorción en 330- y 425 quedando la curva como lo muestra la figura (1).

Se escogió la longitud de onda de 425 para todas las --

lecturas posteriores por estar dentro de los límites del as
pecto visible.

Obtenida la curva de absorción se estudió la reproducibilidad de lecturas en dosis variables, primero de pregnandi-
diol puro y luego de pregnandi-
diol acetilado.

Para esto se tomaron cantidades crecientes de pregnan-
diol de 25 a 500 gammas y se les añadió ácido sulfúrico y -
sulfito de sodio anhidro, después de 17 horas se leyó en el
espectrofotómetro obteniéndose una relación lineal casi per
fecta.

En el caso de pregnandi-
diol acetilado la relación lineal-
también fué evidente. Las figuras 2 y 3 lo demuestran gráfi
camente.

En vista de la relación lineal presentada tanto en la -
forma pura como en la forma acetilada del pregnandi-
diol se es
tudió el comportamiento del pregnandi-
diol en las columnas.

Después de algunos ensayos se usó alúmina lavada con --
acetato de etilo y desactivada a la temperatura de 180°C por
dos horas.

Esta alúmina se conserva en desecador con ácido sulfúrico 21.5N.

Se usaron columnas de 20 cms. de alto por 11 mms. de diámetro. La altura de la columna de alúmina es de 3 cms. y los solventes para el caso del pregnandiol no acetilado fueron: benceno, benceno-etanol 0.8% y benceno-etanol al 3% -- que son los que indican la técnica original de Klopfer (11) y se recogieron fracciones de 2 en 2 ml. de los eluidos, -- después de evaporar el solvente se hizo reacción de ácido sulfúrico y se vió que el pregnandiol puro es eluido en la solución de benceno etanol al 0.8% desde los primeros ml. -- que pasan. Klopfer dice que es eluido en el benceno-etanol al 3% sin embargo en los ensayos se demostró que es eluido con el benceno etanol al 0.8% por lo que fué necesario pasar por la columna un solvente menos polar que este que elimina algunos e impurezas, así se escogió una solución de benceno-etanol al 0.8% que se usó después de haber lavado la columna previamente con benceno y de haber pasado el benceno en el que fué disuelto el pregnandiol y se recogió

el eluado en fracciones de 5 ml. Se encontró que con los primeros 15 ml. era suficiente para eliminar impurezas y pigmentos ya que, pasada esta cantidad el pregnandi^{ol} comenzaba a ser eluado. Después se pasó el benceno-etanol al 0.8% para eluar todo el pregnandi^{ol} de la columna.

Quedaron entonces determinadas las cantidades de los diferentes solventes usados como sigue:

Para el lavado de la columna 20 ml. de benceno.

Para pasar el pregnandi^{ol} a la columna 20 ml. de benceno.

Para eliminar pigmentos 15 ml. de benceno-etanol al 0.5%.

Por último 50 ml. de benceno-etanol al 0.8% para recoger todo el pregnandi^{ol} no acetilado. La figura (4) lo muestra claramente.

Para el estudio de la segunda columna se procedió conforme la técnica original. Esta indica que después de tener el pregnandi^{ol} acetilado disuelto en éter de petróleo, sea con este solvente con el que se pase a la columna y después

se eluya con benceno.

Se trabajaron así varias columnas, pero el éter de petróleo por ser tan volátil da lugar a la formación de burbujas de aire dentro de la columna, descomponiéndola, por lo que se determinó evaporar el éter de petróleo y usar como solvente tanto para lavar la columna como para pasar el diacetato de pregnandiol, hexano. Se recogió en fracciones de 2 ml. hasta 20 ml. en los dos casos y luego se pasó benceno.

El diacetato de pregnandiol es eluado desde los primeros mls. de benceno. Se pasaron luego benceno-etanol al 0.8% y benceno-etanol al 3% para comprobar que todo había sido ya eluado en la fracción de benceno. La figura (5) demuestra el comportamiento de esta columna.

Se estudió la pérdida del esteroide ocasionada en los pasos fundamentales de la reacción y se encontró que la acetilación no disminuye la recuperación de esteroide. (cuadro No. 1).

RECUPERACION DE PREGNANDIOL

Después de acetilar con Cloruro de Acetilo

Cantidad en gammas	D.O. antes de acetilar	D.O. después de acetilar	Promedio de recuperación
50	.062	.058	98.2%
50	.064	.066	
100	.125	.123	101.%
100	.128	.130	

Se determinó también la pérdida ocasionada por el paso a través de las columnas y se obtuvieron los siguientes datos- (cuadros 2 y 3).

RECUPERACION DE PREGNANDIOL PURO DESPUES DE SEPARAR EN COLUMNA DE ALUMINA.

Cuadro No. 2

Cantidades en gammas	D.O. antes de pasar por columna	D.O. después de pasar por columna	Promedio de recuperación
50	.090	.103	97.2%
50	.115	.108	
100	.200	.195	97.9%
100	.220	.215	

RECUPERACION DE PREGNANDIOL ACETILADO DESPUES DE SEPARAR EN COLUMNA DE ALUMINA.

Cuadro No. 3

Tubo	Cantidad original gammas	Columna	D.O.	Recuperación
1	250	-	.650	-
2	250	-	.640	-
3	250	SI	.670	103%
4	250	SI	.630	97%

La pérdida por extracción la muestra el cuadro que --
sigue:

RECUPERACION POR EXTRACCION

Cantidad Original Gammas	D.O. antes de extracción	D.O. después de extracción	Promedio de recuperación
100	.166	.171	98.8%
100	.176	.168	
200	.345	.342	99.4%
200	.350	.345	

Hay que tener en cuenta que la Densidad Optica varía de acuerdo con el lote de ácido sulfúrico usado.

Para estudiar la recuperación de pregnandiol añadido a orina se hicieron comparaciones entre orina y orina más 100-gammas de pregnandiol, las recuperaciones obtenidas son las siguientes:

RECUPERACION DE 100 GAMMAS DE PREGNANDIOL DE ORINA

Registro	Nombre	Orina	Orina más 100 gammas	% de Recuperación
A-559	C.M.	840	950	110 %
A-415	G.R.	54	145	91 %
Q-82	C.A.C.	880	975	95 %
Q-149	G.H.	85	175	90 %
Q-158	H.R.	285	380	95 %
Q-159	E.H.	136	242	104 %
Q-171	R.H.	63	150	87 %
Q-184	R.H.	48	138	90 %
Q-188	C.C.	953	1065	112 %
Q-223	T.A.	78	183	105 %
Q-224	V.R.	54	146	92 %
Q-225	J.A.	125	234	109 %
Q-228	G.L.	20	116	96 %
Q-229	V.R.	156	262	106 %
Q-230	J.A.	310	392	82 %
Q-231	T.A.	102	206	104 %
Promedio de recuperación				98 %

UTILIDAD CLINICA DEL METODO

El procedimiento anteriormente descrito fué empleado en la determinación del pregnandiol urinario en pacientes del Hospital de Enfermedades de la Nutrición.

En un grupo se hizo la determinación de pregnandiol en pacientes del sexo femenino que subdividimos en:

a).- En las que se suponía una insuficiente producción de progesterona, los resultados que se obtuvieron fueron:

Registro	Nombre	Diagnóstico	Resultado
Q-94	A. G.	Esterilidad Secundaria	1.73 mg.
Q-171	R. H.	Difusión ovárica	1.28 mg.
Q-184	R. H.	Difusión ovárica	0.96 mg.
Q-228	G. L.	Hipemenorrea	0.4 mg.
A-415	G. R.	Difusión ovárica	0.98 mg.

b).- En aquellas en las que la producción de progesterona debiera estar elevada, los resultados fueron los siguientes:

Registro	Nombre	Diagnóstico	Resultado
Q-82	C. A. C.	Embarazo	17.6 mg.
Q-160	C. R. C.	"	10.10 mg.
Q-188	C. C.	"	19.3 mg.
A-559	C. M.	"	16.9 mg.
A-601	D. A.	"	14.12 mg.

En el segundo grupo se observan los resultados obtenidos en pacientes del sexo masculino a los que se determinó pregnandiol urinario antes y después de la administración de 50 mg. de progesterona.

Registro	Nombre	Antes de Progesterona	Después de Progesterona
Q-149	G. H.	1.6 mg.	2.88 mg.
Q-150	H. R.	1.58 mg.	5.64 mg.

Registro	Nombre	Antes de Progesterona	Después de Progesterona
Q-223	T. A.	1.6 mg.	2.1 mg.
Q-224	V. R.	1.08 mg.	3.28 mg.
Q-225	J. A.	1.5 mg.	6.02 mg.

El método propuesto como puede observarse, satisfizo -- las pruebas de utilidad clínica a que fué sometido.

C O N C L U S I O N E S

1.- El aislamiento y purificación del pregnandiol son -- posibles por medio de procedimientos sencillos y rápidos.

2.- El método de cuantificación permite detectar cantida des tan bajas como 20 gammas del esteroide por lo que es po sible utilizar volúmenes pequeños de orina. En las determi-- naciones hechas a personas normales, los valores encontra-- dos son --ncordantes a su estado fisiológico. Este método -- de detrminación está siendo utilizado en la actualidad para determinar la influencia que algunos carbonos del núcleo --

esteroide o las sustituciones de sus hidroxilos pueden tener en la supresión de hormonas gonadotróficas. Este trabajo se realiza en colaboración con los Laboratorios Syntex para tratar de determinar lo siguiente:

a).- Si la eliminación del metilo angular del carbono 19 aumenta la actividad antigonadotrófica.

b).- Para determinar si la acetilación en el hidroxilo - del carbono 17 de la 17 hidroxiprogesteroona suprime la acción gonadotrófica de la pituitaria.

c).- Para conocer la influencia que las dobles ligaduras en los carbonos 1, y 4, puedan tener sobre la pituitaria.

CURVA DE ABSORCION DE PREGNANDIOL PURO

HACIENDO REACCION DE H_2SO_4

Fig. 1

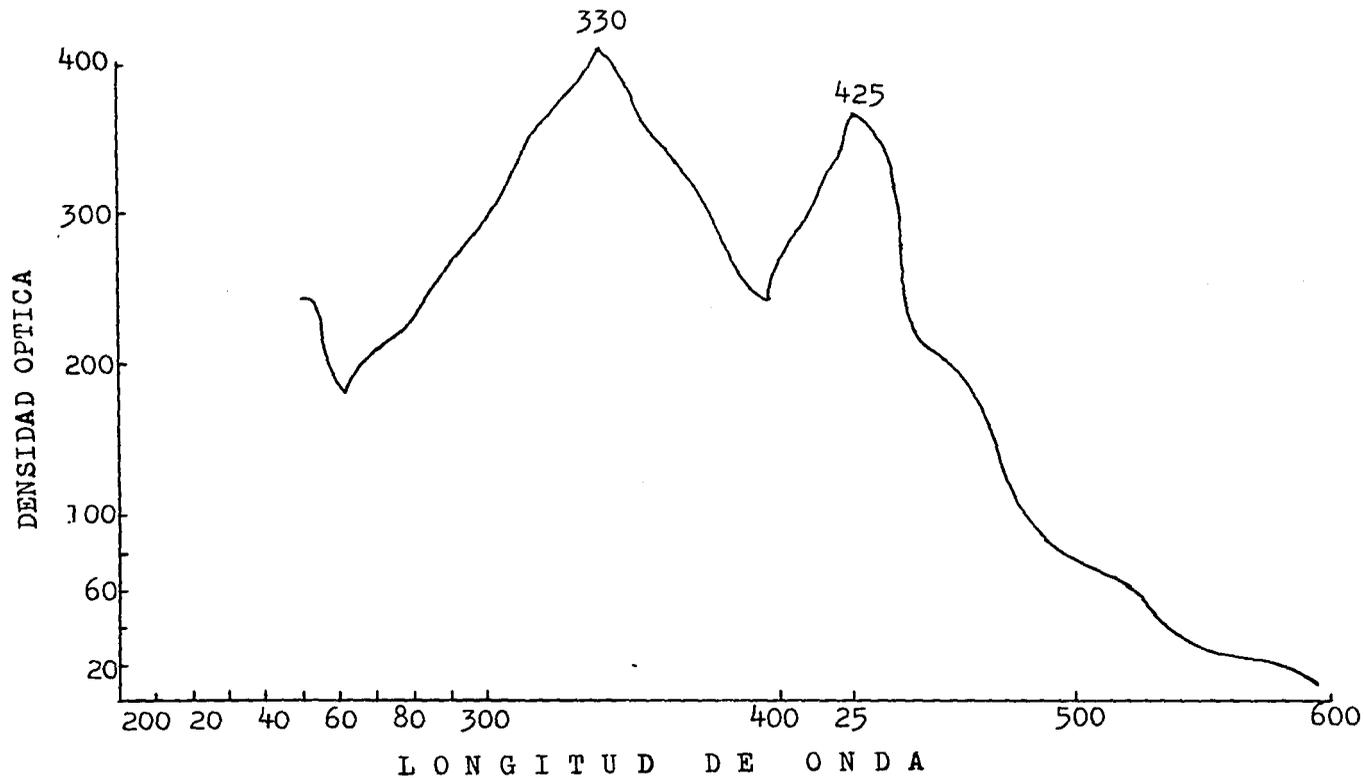


Fig. 2

CURVA DE PREGNANDIOL PURO HACIENDO
REACCION DE H_2SO_4

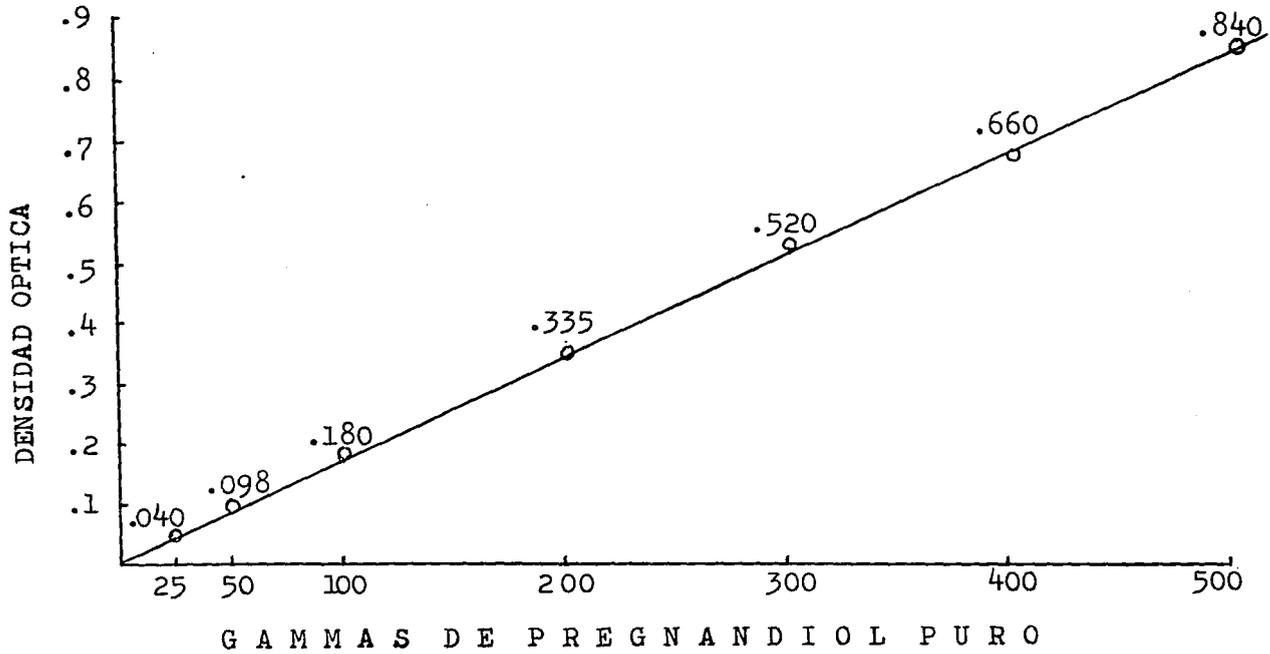
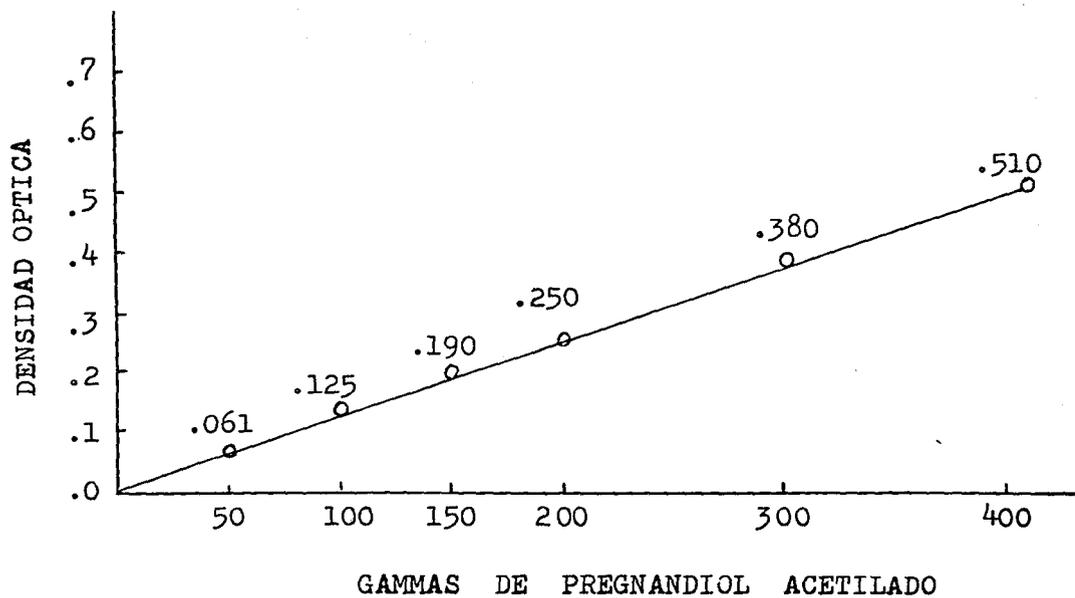


Fig. 3

CURVA DE PREGNANDIOL ACETILADO
CON CLORURO DE ACETILO Y REACCION
CON $H_2 SO_4$

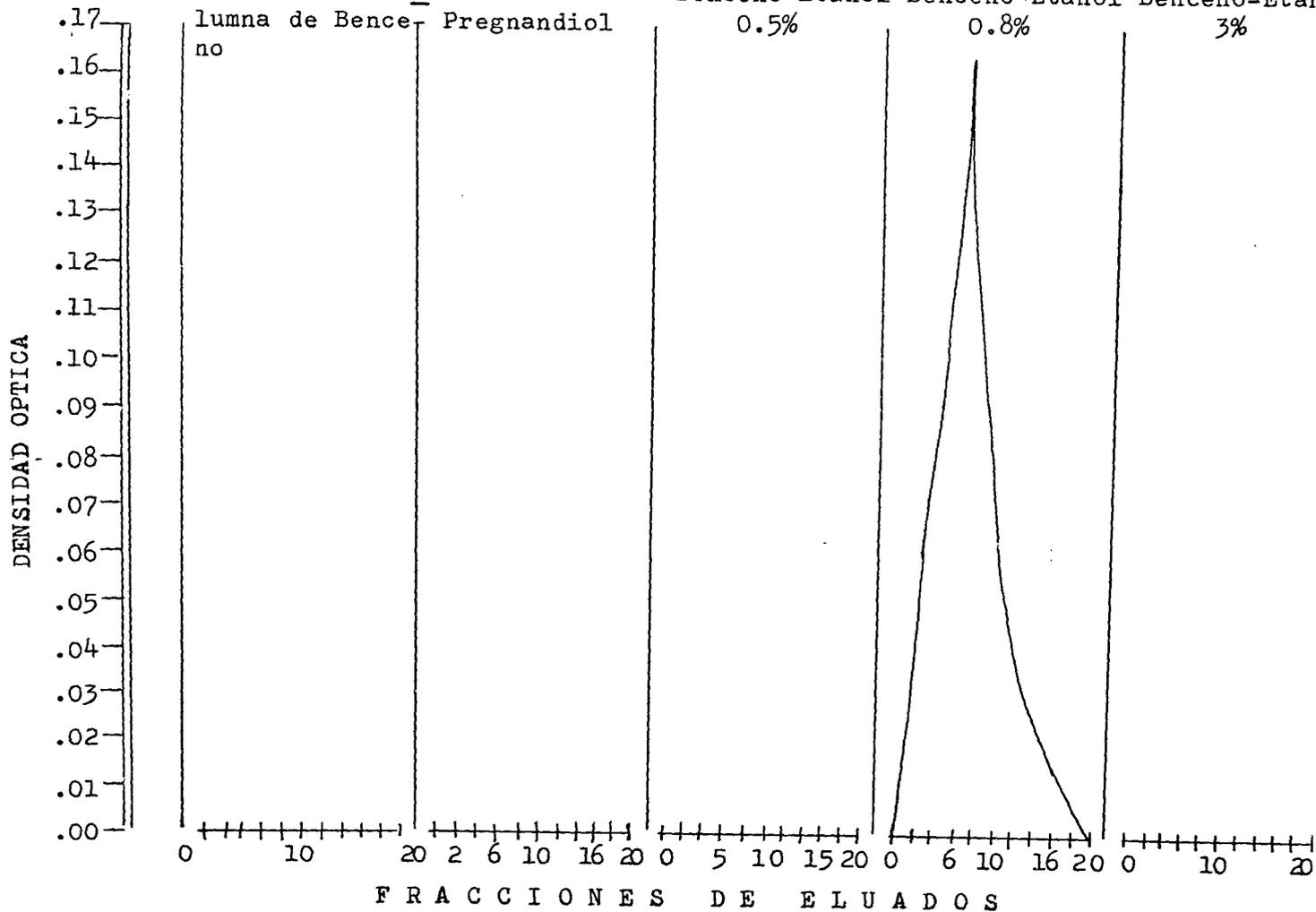


COLUMNA DE PREGNANDIOL PURO CON LOS DIFERENTES

SOLVENTES USADOS

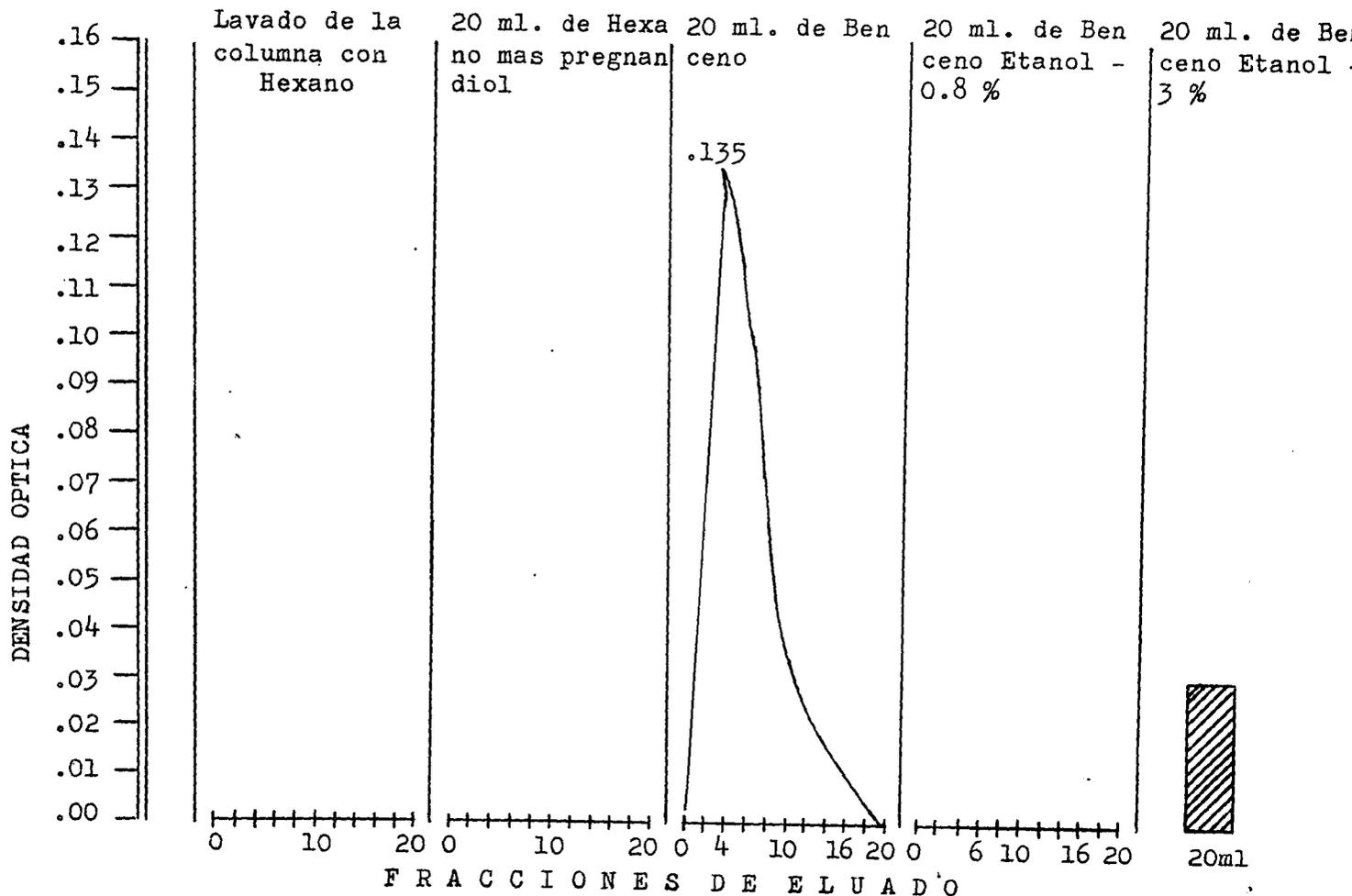
Fig. 4

Lavado de la Columna de Benceno más Pregnan diol
 Benceno más Pregnan diol
 Benceno-Etanol 0.5%
 Benceno-Etanol 0.8%
 Benceno-Etanol 3%



COLUMNA DE PREGNANDIOL ACETILADO

Fig. 5



B I B L I O G R A F I A

- 1.- Sommerwille I.F. and Marrian G.F. Rapid determination of pregnandiol; Lancet 2;8 -90; 1948.
- 2.- Watkins Smith O. The quantitative determination of urinary pregnanediol in pregnate women. The influence the method upon results J. Clin. Endocrinol 10: 496. 1950.
- 3.- Simmel B. F. Randolph J.D. Conn W.U. Procedure for concomitant photometric of pregnanediol in human urine J.Clin Endocrinol. and Metabol. 12;371. 1954.
- 4.- Guter H. S. Schroeder U.S.A. simplified Technique for -- the quantitative colorimetric estimation of pregnanediol in urine. J. Clin. Med. 33.356. 1957.
- 5.- Guterman H.S. & Schoeder U.S.
A simplified technique for the quantitative colorimetric estimation of pregnanediol in urine.
J. La. Clin. Med. 33:356, 1948.
- 6.- Sommerville J.F., Gough N. & Marrian G.F.
The quantitative determination of small amounts of pregnanediol in human urine. J.Endocrinol. 5:247,1947-48.

7.- Bongiovanni A.M. & Clayton G.W.

A simplified method for the routine determination of --
pregnanediol and pregnanetriol in urine.

Bull. Johns Hopkins Hosp. 94:180, 1954.

8.- Smith O.W.

The quantitative determination of urinary pregnanediol -
in pregnant women. The influence of the method upon ---
results. J. Clin. Endocrinol. 10:496. 1950.

9.- Zaffaroni A. "Absorption Spectra of sulfuric acid Chromog
gers obtained from. Adrenal steroids y Related compounds"
y Am. Chem. Soc. 72, 3828. 1950.

10.-Allen W.M.

A simple method for analysing complicated absorption cur-
ves of use in the colorimetric determinations of urinary
steroids. J. Clin. Endocrinol. 10:71. 1950.

11.-Klopper A., Michie E.A. Brown J.B.

A method for the determination of urinary pregnanediol.
J. Endocrinol. 12:209, 1955.