



UNIVERSIDAD MOTOLINIA

INCORPORADA A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA DE QUIMICA

**DETERMINACION DE ESTRIOL DURANTE EL
EMBARAZO POR CROMATOGRAFIA DE GASES**

TESIS PROFESIONAL

MARIA TORRES TORRES



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

UNIVERSIDAD MOTOLINIA

INCORPORADA A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA DE QUIMICA

**DETERMINACION DE ESTRIOL DURANTE EL
EMBARAZO POR CROMATOGRAFIA DE GASES**

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

JURADO ASIGNADO
ORIGINALMENTE SE
GUN EL TEMA

PRESIDENTE: Q.F.B. MA. DEL CONSUELO HIDALGO

SECRETARIO: Q.F.B. LIZETTE STERLING DE KOMINIK.

VOCAL: Q.F.B. GUADALUPE CAMARENA TORRES.

1er. SUPLENTE: Q.F.B. ROSA MARTHA GONZALEZ M

2do. SUPLENTE: Q.F.B EMELIA FIERRO GONZALEZ.

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

LABORATORIO DE PRUEBAS ESPECIALES DEL I.S.S.S.T.E.

NOMBRE COMPLETO DEL SUSTENTANTE:

MARIA TORRES TORRES.

NOMBRE COMPLETO DEL ASesor DEL TEMA:

Q.F.B. MA. GUADALUPE CAMARENA TORRES.

NOMBRE COMPLETO DEL SUPERVISOR TECNICO:

DR. MIGUEL ANGEL GUILLEN GONZALEZ.

A MIS PADRES

A MIS HERMANOS

A MIS FAMILIARES Y AMIGOS

AL SR. DR. MIGUEL ANGEL GUILLEN GONZALEZ.
SUBDIRECTOR DE LOS LABORATORIOS DE PRUEBAS
ESPECIALES DEL ISSSTE, A QUIEN AGRADEZCO --
SINCERAMENTE SU AYUDA DESINTERESADA EN LA
DIRECCION DE ESTE ESTUDIO.

A MIS MAESTROS

AL HONORABLE JURADO

CONTENIDO

| | Pág. |
|--|------|
| INTRODUCCION. | |
| CAPITULO I. ANTECEDENTES CIENTIFICOS. | 1 |
| a). Historia y Química de los Estrógenos. | 1 |
| b). Síntesis, Regulación y Metabolismo del Estríol durante el Embarazo. | 3 |
| c). Métodos empleados en la Determinación de Estríol durante el Embarazo por Cro- matografía de Gas-Líquido. | 13 |
| d). Bases de la Cromatografía de Gas-Lí- quido. | 21 |
| CAPITULO II. MATERIAL Y METODO. | 36 |
| CAPITULO III. RESULTADOS. | 42 |
| CAPITULO IV. DISCUSION Y CONCLUSIONES. | 53 |
| CAPITULO V. RESUMEN. | 57 |
| BIBLIOGRAFIA. | 59 |

INTRODUCCION

Debido a la gran importancia que tiene el conocer las cifras de estriol durante el embarazo, ya que reflejan la integridad funcional de la placenta y la corteza suprarrenal fetal indicándonos de esta manera la viabilidad fetal en determinados estados patológicos, como: anencefalia, eclampsia, hipertensión, diabetes, defectos enzimáticos suprarrenales, isoimmunización por Rh, etc., es necesario contar en el laboratorio clínico especializado, con un método rápido y altamente específico para su determinación, que llene además los requisitos de exactitud, alta sensibilidad y precisión.

En la actualidad, existe dentro de la patología clínica un gran desarrollo en la instrumentación, que es paralelo a la existencia de métodos más específicos y relativamente más sencillos; entre ellos se cuenta con la cromatografía de gases líquido, un método de separación y cuantificación ampliamente usado para esteroides naturales y sintéticos (45), el cual hemos seleccionado para la determinación de estriol durante el embarazo.

En la realización de este estudio, se contó con la ayuda del personal de la Sección de Hormonas, del Laboratorio de Pruebas Especiales del I.S.S.S.T.E. facilitándonos además del material y equipo necesario el material clínico del Centro Hospitalario 20 de Noviembre de esta misma dependencia.

I. ANTECEDENTES CIENTIFICOS.

a). Historia y Química de los Estrógenos.

Desde que Allen y Doisy observaron que un extracto alcohólico de ovario era capaz de producir estrógeno, varios grupos de investigadores de todo el mundo — empezaron a estudiar las propiedades químicas de esta sustancia, y en un tiempo relativamente corto, la hormona fué obtenida en forma cristalina, denominándosele estrona o telin (del griego: hembra). Años más tarde, en 1930 y 1933 respectivamente, fueron obtenidos el estríol o telol y por reducción de la estrona se obtuvo el estradiol o dihidrotelin, un compuesto con un grupo alcohol secundario en posición 17 de la molécula esteroide.

La orina de la mujer embarazada, contiene estas tres hormonas en cantidades mucho mayores que en la no embarazada; explicable esto, por la franca evidencia de que la placenta como glándula de secreción interna transitoria, es capaz de sintetizar estrógenos y progesterona y muy probablemente algunos otros esteroides.

La eliminación urinaria de estos compuestos aumenta durante el embarazo alcanzando niveles aproximadamente 1000 veces mayores que los encontrados fuera de la gestación; después del alumbramiento los estrógenos urinarios descienden rápidamente.

Esto ha contribuido a que, en la actualidad la determinación de estrógenos, y en especial de estríol, sea aplicable al estudio clínico de ciertos padecimientos obstétricos, además de ser un parámetro importante en el terreno de la ginecología endócrina.

Los estrógenos, se agrupan con el nombre genérico de esteroides, a su vez éstos entran a formar parte de una familia química mucho más amplia, cuya denominación general es la de esterol, en la que se incluyen también el colesterol, estigmasterol, ácidos biliares, otras hormonas esteroides, etc.; desde el punto de vista estructural, los esteroides poseen un núcleo químico común, llamado norestrano o Ciclopentanoperhidrofenantreno, que es un hidrocarburo policíclico saturado, es decir, está compuesto por átomos de Hidrógeno y Carbono, agrupados estereoquímicamente en cuatro anillos carentes de enlaces dobles (14). Su fórmula estructural se representa en la fig. No. 1.

Los hexanos se han llamado "A" "B" y "C" y el pentano "D", numerados en el anillo "A" y "B" en sentido contrario a como giran las manecillas del reloj, el anillo "C" conforme giran las manecillas y en el anillo "D" en igual forma que los hexanos "A" y "B".

Como característica, los estrógenos son esteroides de 18 carbonos, que contienen un anillo aromático A y un metilo angular en C-13 que corresponde al C-18, este hidrocarburo saturado recibe el nombre de estrano, pero debido a que estos compuestos se encuentran triplemente insaturados en los carbonos 1-2, 3-4, 5-10, es decir aromáticos, reciben el nombre de estrenos.

Los principales estrógenos secretados por las glándulas suprarrenales y ovario son: la estrona, que tiene un grupo hidroxilo en C-3 y un grupo cetona en C-17; el estradiol 17 beta, que tiene dos grupos hidroxilos en los C-3 y C-17 en posición beta y el estriol que tiene dos grupos hidroxilos en C-3 y C-16 en posición alfa y un tercero en C-17 y posición beta.

En la fig. No. 2 se representan las fórmulas de los 3 principales estrógenos.

b). Síntesis, Regulación y Metabolismo del Estriol durante el embarazo.

Síntesis:

Como esbozamos en la introducción, durante el embarazo se produce -- una mayor cantidad de estrógenos (estrona, estradiol y estriol), se ha visto además -- que hay variación en sus concentraciones, según la edad del embarazo (10, 12, 20- y 21), por otro lado se sabe que la concentración sanguínea de los estrógenos se refleja en la excreción urinaria de los mismos (9 y 39). Para fines prácticos la determinación de estriol, que representa el 90% de los estrógenos que se producen durante el embarazo (40), es una de las pruebas de laboratorio clínico de mayor utilidad para conocer el estado de viabilidad del producto (feto) (15).

En la mujer no embarazada, la síntesis de estriol se lleva a cabo principalmente por el ovario (42) y en grado menor por la corteza suprarrenal (19 y 43); en ausencia de embarazo el estrógeno que se produce en mayor cantidad es el 17 beta estradiol y en el embarazo el estriol. La síntesis de los estrógenos en ovario (36 y 42), se lleva a cabo a partir del acetato activo (como aceto-coenzima A), fig.- No. 3 que, como sucede en la mayor parte de los tejidos, es el precursor inicial de la síntesis del colesterol, en el ovario al parecer es activada por la presencia de -- hormonas hipofisarias (hormona estimulante del folículo y hormona luteinizante); siendo estas mismas hormonas las que aceleran el paso de colesterol a pregnenolona (compuesto de 21 carbonos), al ser hidroxilado doblemente el colesterol en carbono 20 - alfa y 22 beta, y ser hidrolizado entre el carbono 20 y 22 por una desmolasa, se --

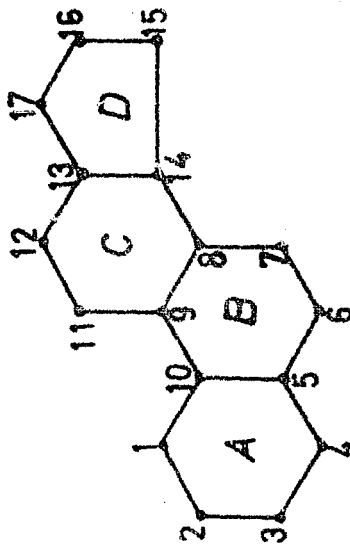
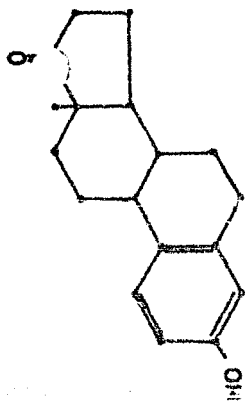
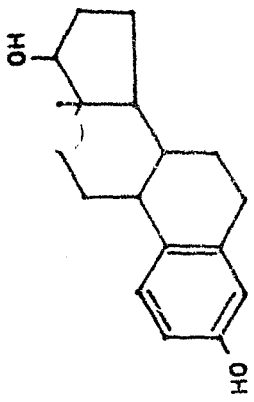


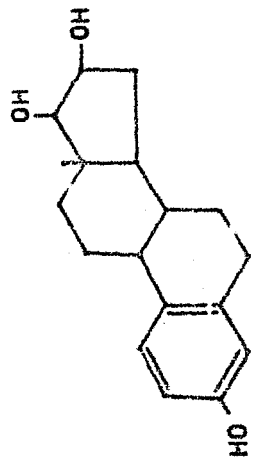
FIG. № 1. CICLOPENTANOPERHIDROFENANTRENO



ESTRONA



ESTRADIOL



ESTRIOL

FIG. No. 2. REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LOS PRINCIPALES ESTROGENOS

produce la pregnenolona.

La síntesis de estrógenos se lleva a cabo al ser hidroxilada la pregnenolona en C-17 alfa y formar la 17 alfa hidroxipregnenolona o actuar sobre ella la enzima delta 5, 3 beta hidroxisteroide deshidrogenasa para producir la progesterona; ésta puede posteriormente ser hidroxilada en el C-17 en posición alfa, y formar la 17 alfa hidroxiprogesteroína y así mismo la 17 alfa hidroxipregnenolona ser transformada a 17 alfa hidroxiprogesteroína por medio de la delta 5, 3 beta hidroxisteroide deshidrogenasa.

Tanto la 17 alfa hidroxipregnenolona, como la 17 alfa hidroxiprogesteroína, pueden ser hidrolizadas por una desmolasa que transforma a estos compuestos, en dehidroepiandrosterona y en androstenediona respectivamente, este último esteroide, por acción de una 17 beta hidroxilasa, es transformada en testosterona; a partir de estos dos últimos compuestos se sintetizan los estrógenos al actuar sobre ellos — primero la 19 hidroxilasa, produciendo respectivamente la 19 hidroxandrostenediona y la 19 hidroxitestosterona y al actuar después sobre estos últimos una enzima aromatizadora para producir la estrona y el 17 beta estradiol, que son fácilmente intercambiables entre sí, es decir, de estrona a 17 beta estradiol y viceversa; la producción de estríol se lleva a cabo a partir del 17 beta estradiol al ser hidroxilado en C-16— en posición alfa. De esta manera, la producción de estríol depende directamente — de la cantidad de 17 beta estradiol que siempre estará en equilibrio con la estrona.

Cuando se inició el estudio del metabolismo de los estrógenos en las — mujeres embarazadas por el método de dilución isotópica, se observó, que no existía relación directa entre la interconversión estrona a 17 beta estradiol y éste a estríol como sucede en la mujer no embarazada (33).

Esto llevó a los autores a suponer que en el embarazo existía una síntesis diferente de estríol, en donde el precursor principal no era el 17 beta estradiol como en la mujer no embarazada; por otro lado, se tenía el conocimiento de que a los animales embarazados a los que se les suprimía la suprarrenal y los ovarios después de la sexta semana de gestación, seguían produciendo una toza alta de estríol, lo que hace suponer que durante el embarazo, la producción principal de estrógenos se lleva a cabo en la placenta.

Tenemos además otros hechos; cuando la placenta es perfundida con acetato activo marcado con C-14 demuestra producción de estríol C-14, pero en una cifra insignificante, a pesar de que usen esteroides de 21 carbonos (como la progesterona) al perfundir la placenta no se obtiene estríol (32).

Se sabe que la placenta es capaz de aromatizar compuestos esteroideos como la androsterona y festosterona y aún más, que esta enzima se encuentra en la fracción microsomal; la placenta por lo tanto, es una glándula de secreción interna incompleta, ya que necesita de precursores que provienen de la madre o del feto, por otro lado, la placenta es rica en sulfatasa que libera a los esteroides esterificados (6, 7 y 8).

También se tiene el conocimiento de que, la síntesis de los esteroides por la suprarrenal fetal tiene un comportamiento diferente a la suprarrenal del adulto, ya que, tanto anatómica como histológicamente son diferentes. La suprarrenal fetal, tiene deficiencia relativa de la delta 5, 3 beta hidroxisteroide deshidrogenasa, por lo que acumula y vierte a la sangre, compuestos que conservan como el colesterol, la doble ligadura entre el carbono 5-6 y persiste también el grupo hidroxilo del C-3.

(28) es así como la cifra de esteroides esterificados con sulfato en C-3 es mucho mayor y la producción de dehidroepiandrosterona sulfato es superior que en el adulto. El hígado fetal es rico en una enzima, la 16 alfa hidroxilasa (18 y 40).

Con estos antecedentes, y conociendo que del feto provienen compuestos esteroides hidroxilados en posición alfa en C-16 se supone que la producción de estriol durante el embarazo tiene otra fuente, además del ovario, y es necesaria la unidad feto-placenta para esta síntesis, por lo que algunos autores, le llaman unidad biosintética feto placentaria (40). En los fetos que no producen precursores de 18 carbonos (dehidroepiandrosterona, androstenediona o testosterona), por no formar hormona adrenocorticotrófica, es decir los fetos anencefálicos, las cifras de estriol son muy bajas (24, 28 y 35).

La síntesis del estriol, se llevaría a cabo de la siguiente manera fig. No. 4 (18, 22 y 40) la dehidroepiandrosterona sulfato producida por la suprarrenal fetal como se ha indicado anteriormente, (y por estar esterificada no puede sufrir substituciones o cambios en su molécula) pasa del feto a la placenta donde por acción de la sulfatasa, queda libre al ser hidrolizada. La dehidroepiandrosterona libre es devuelta al feto donde es hidroxilada en C-16 en posición alfa por el hígado fetal, dando como resultado la 16 alfa hidroxidehidroepiandrosterona, que vuelve a pasar a la placenta en donde es transformada a la 16 alfa hidroxiestrona por aromatización del anillo A; el cual por acción de la 17 beta hidroxilasa es transformada a estriol, siendo éste la fuente mayor de estriol durante el embarazo. Otra parte es producida en el lado opuesto de la placenta, es decir, en la madre; una parte de la dehidroepiandrosterona sulfatada fetal pasa a través de la placenta y es vertida en la sangre materna; y en la madre o en la placenta es hidrolizada, ya que en

ambos sitios existe la sulfatasa, y la dehidroepiandrosterona libre pasa nuevamente a la placenta, donde es transformada por aromatización del anillo A en estrona y ésta a 17 beta estradiol, por hidroxilación del C-17 y de aquí a estriol, por hidroxilación del C-16 en posición alfa.

Regulación:

Como hemos visto con anterioridad, la secreción de estriol durante el embarazo depende de tres factores: el ovario de la madre, la placenta y el feto, pero principalmente por estos dos últimos, los cuales analizaremos por separado.

La cantidad de estriol en la sangre o en la orina, dependerá por una parte, de la cantidad de dehidroepiandrosterona producida por la suprarrenal fetal, es decir, es importante la cifra de dehidroepiandrosterona y fundamental para la síntesis de estriol por la placenta (6, 7, 8).

La secreción de dehidroepiandrosterona por la corteza suprarrenal fetal, depende después de la sexta semana, de la cantidad de hormona adrenocorticotrófica producida por la hipófisis fetal, esto se ha corroborado tanto clínica como experimentalmente, por ejemplo: en fetos anencefálicos, no se produce hormona adrenocorticotrófica y los niveles de estriol en la madre son muy bajos; por otro lado, la corteza suprarrenal se encuentra atrófica y los niveles de sulfato de dehidroepiandrosterona son nulos. Experimentalmente, Jost ha demostrado que, la decapitación de los fetos de rata entre el 16o. y 20o. día, muestran atrofia de la corteza suprarrenal, y disminución al mínimo de los esteroides producidos por la corteza suprarrenal (28 y 35).

Este mismo autor, ha demostrado que la hormona adrenocorticotrófica -

de la madre, es incapaz de atravesar la barrera placentaria, ya que si la atraviesa, en estos fetos anencefálicos se estimularía la corteza suprarrenal para producir cantidades suficientes de dehidroepiandrosterona y por lo tanto de estriol, lo contrario no sucede; cuando la madre carece de esteroides suprarrenales o de hormona adrenocorticotrófica, el feto en un intento de aumentar la síntesis de esteroides aumenta la producción de hormona adrenocorticotrófica y produce una hipertrofia de su propia suprarrenal (28).

La secreción de la placenta, es regulada en un principio por la hormona luteotrófica, pero sólo las primeras semanas, ya que, posteriormente en ausencia de esta hormona, la placenta sigue funcionando. Además la placenta produce la gonadotropina coriónica, que regula la secreción de las hormonas esteroides por ovario, pero al parecer, se autoregula en la secreción del estriol producida por ella misma, ya que se ha observado que, placentas a término perfundidas con gonadotropina coriónica elevan sus niveles de estriol (32).

Debido a esto, la producción de estriol durante el embarazo, depende tanto del feto como de la placenta, siendo un índice del estado funcional de ambas estructuras y por ende la vitalidad del feto, por lo que es usado ampliamente en la clínica.

El estriol se encuentra de esta manera en tres compartimientos: la madre, el feto y líquido amniótico (29) fig. No. 4.

Metabolismo.

Una vez vertido a la madre, el estriol se une a las proteínas plasmáticas, (3) esta conjugación lo hace inactivo biológicamente, y al mismo tiempo, im-

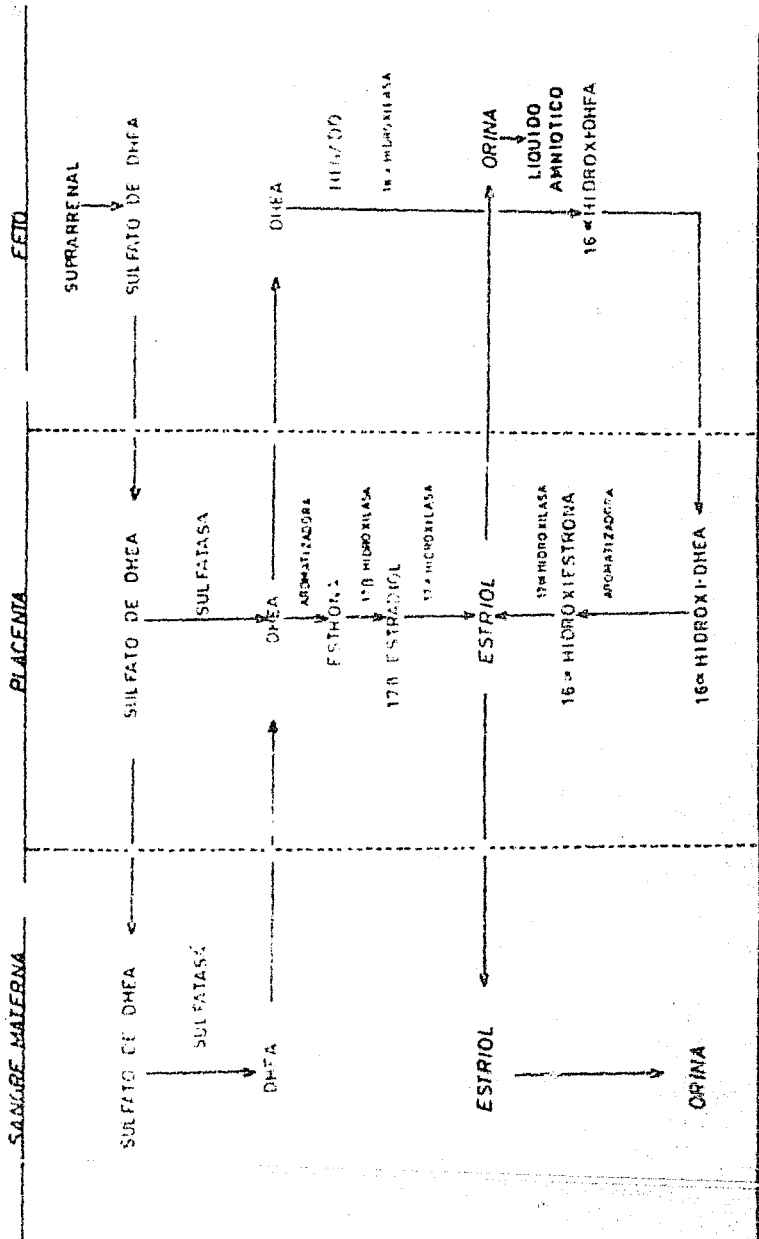


FIG. No. 4. SINTESIS Y METABOLISMO DE LOS ESTROGENOS DURANTE EL EMBARAZO.

pide que actúe sobre ella las enzimas, esterificándola a su paso por el hígado, impidiendo también su filtrado por el riñón y la excreción urinaria. Parte del estriol no se une a las proteínas y siempre se encuentra en equilibrio con el conjugado, - este estriol es el biológicamente activo (36) y esterificado al paso por el hígado - matemáticamente con sulfatos y/o glucuronidatos, (48) que también lo hacen inactivo y fácilmente excretable (por hacerlo relativamente más soluble) por la bilis y/o riñón; - el estriol sulfato o glucuronidato, que es eliminado por la bilis, es reabsorbido nuevamente en intestino y vertido a la sangre en su mayor proporción y eliminado en la orina, de aquí que su mayor excreción sea urinaria (1).

El estriol es esterificado con glucuronidatos o sulfatos en el C-3 y C-17, éstos pueden ser esterificados doblemente con un mismo ester, o con diferente, o únicamente con alguno de ellos en alguna de las dos posiciones.

Existen otros catabolitos del estriol, como el 2 metoxi estriol y otros derivados de menor importancia para fines de laboratorio clínico (23).

En la fig. No. 5 se representa al estriol conjugado con ácido glucurónico en C-3 posición beta.

Así la determinación de estriol puede ser llevada a cabo en sangre, orina de la madre (25) o en líquido amniótico (5).

c). Métodos Empleados en la Determinación de Estriol durante el Embarazo por Cromatografía de Gas Líquido.

Los métodos empleados se basan en su mayor parte, en los métodos previos (2) como en los biológicos, espectrofotométricos o espectrofluorométricos, y, como en todas las determinaciones de este esteroide, se fraccionan en los siguientes pasos:

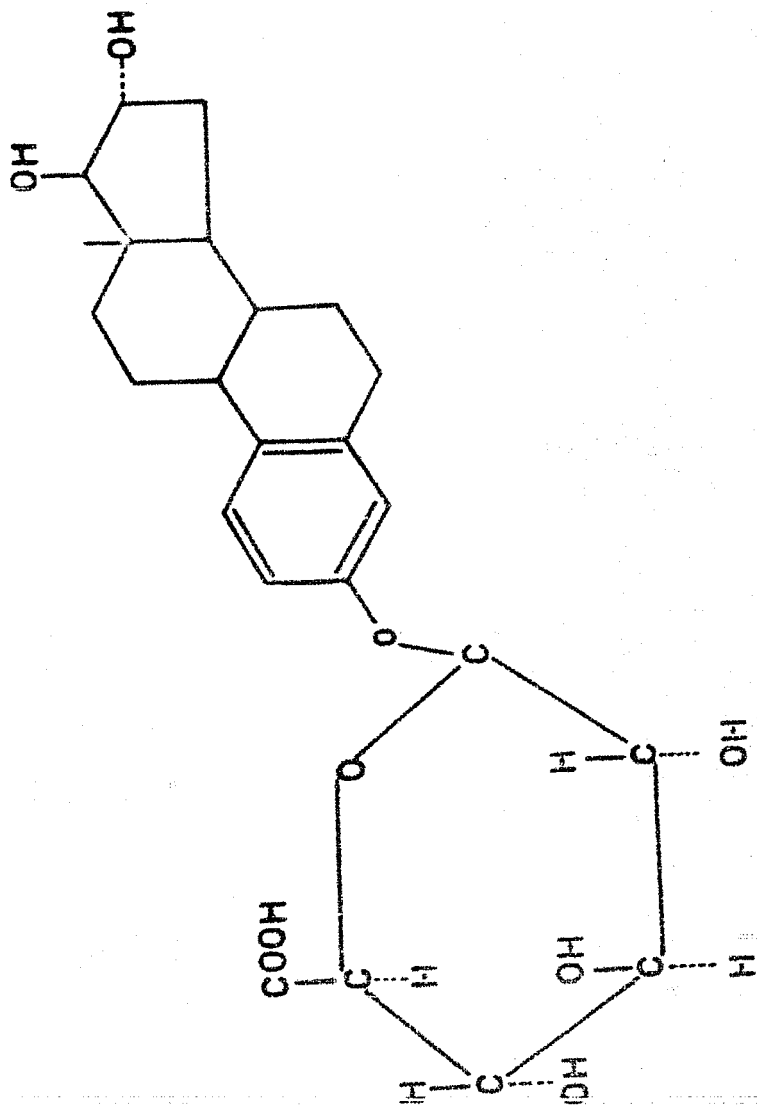


FIG No.5. 3 BETA GLUCOURONIDATO DE ESTRIOLO

a).- Hidrólisis. b).- Extracción. c).- Purificación y d).- Cuan-
tificación.

Hidrólisis. La mayor parte de los estrógenos eliminados en la orina se encuentran conjugados a sulfatos y/o glucuronidatos por lo que para su extracción en orina es necesario liberarlos de sus conjugados hidrosolubles, para lo cual se somete la orina a hidrólisis ácida, hidrólisis enzimática o solvólisis.

Hidrólisis Ácida. La hidrólisis ácida a temperatura elevada (ebullición) o en autoclave a 120°C ., tiene la desventaja de producir descomposición de los estrógenos, en este caso el estriol; sin embargo, autores dedicados al estudio obtienen recuperaciones semejantes a los demás tipos de hidrólisis, es decir alrededor del -- 70%, estas hidrólisis se llevan a cabo de la siguiente manera:

Hidrólisis ácida en ebullición; se coloca la alícuota de orina en un -- matraz erlenmeyer de boca esmerilada, se diluye al doble con agua destilada, para facilitar la hidrólisis, y se cambia el pH a 4.5 con ácido acético glacial, posterior- mente se agrega ácido clorhídrico al 17% en relación a la orina diluida, se coloca en la boca del matraz un tubo de reflujo y en una parrilla de plancha se deja en -- ebullición por espacio de 60 minutos, se enfría, se filtra y posteriormente se extrae el estriol con solventes adecuados.

La hidrólisis ácida en autoclave: (20 y 21), en un matraz erlenmeyer -- se coloca la alícuota de orina de 24 hrs., dependiendo del tiempo de embarazo de $1/50$ ó $1/200$ y se diluye con agua destilada a 40 ml., se agrega 2.4 ml., de áci- do sulfúrico al 50% en solución acuosa, tapándose el matraz con algodón y se lleva al autoclave por una hora a 120°C ., se enfría, se filtra y está preparado para la ex

tracción del estriol.

Hidrólisis Enzimática. Tiene la ventaja de que es específica para glucuronidatos o sulfatos, si se usa la combinación de sulfatasa y glucuronidasa, actualmente disponible en el mercado; pero tiene el inconveniente de que existen - - sustancias en la orina que pueden interferir con su actividad, así también existen muchos compuestos que por estar esterificados con sulfatos o glucuronidatos, completan en la hidrólisis y es necesario poner exceso de estas enzimas (16), además tiene el inconveniente de que se forma emulsión en la extracción y puede ser motivo de pérdida de esteroides, la hidrólisis enzimática se lleva a cabo de la siguiente manera:

La orina de 24 horas diluida a 1500 ml., es filtrada a través de papel Whatman No. 1 y ajustada a pH de 5.2 ± 0.2 por adición de ácido acético 2 M., a una alícuota de 5 ml., de orina se le agregan 0.25 ml., de buffer de acetatos - pH 5.2 y se añaden 5000 U., Fishman de beta glucuronidasa y 2500 U., Reynolds de sulfatasa, incubándose por 24 horas a 37°C ; posteriormente se ajusta el pH entre 6.5 a 7.0 con hidróxido de sodio 10 N., y queda lista para ser extraída (16).

Solvólisis. Procedimiento que se basa en la hidrólisis y conjugación del esteroide con el solvente usado; es poco empleado en la hidrólisis de los estrógenos, a pesar de su gran eficiencia.

Extracción. El solvente más usado en la extracción de estriol urinario, previa hidrólisis es el éter etílico, pero es necesario que éste se encuentre libre de peróxidos por lo que se purifica el solvente antes de su uso; recomendándose ser refluado por dos horas o puesto en reposo por 48 horas con hidróxido de potasio al -

2% o sulfato ferroso al 15%, 100 ml., para cada litro y redistilado antes de su uso (37). Se han usado otros solventes como acetato de etilo, benceno, éter de petróleo y cloroformo, pero ha tenido más aceptación al éter etílico (37).

La cantidad de solvente, siempre es semejante al volumen de la orina y es necesario extraer cuando menos en dos ocasiones ya que el coeficiente de partición agua-éter no es 1:1 (20 y 21), debido a esto se usa el sulfato de amonio añadido a la orina para hacer menos soluble al estrógeno en el agua y permitir de esta manera mayor extracción de estriol.

Purificación. La orina contiene gran parte de sustancias de deshecho del organismo, así como materia orgánica del producto de descomposición del tracto urinario, por lo que es necesario siempre purificar los extractos o la orina antes o después de ser hidrolizada con objeto de obtener resultados óptimos.

Seling en 1963 (4) publicó su monografía sobre el comportamiento de los glucuronidos y/o sulfatos de estrógenos en sephadex G-25 de 100 a 200 mallas, sustancia que es un polisacárido formado con dextranos; con el que se prepara una columna cromatográfica y observa que, por su conformación fenólica, los estrógenos son retenidos por largo tiempo y se necesitan grandes volúmenes de agua para eluirlos; emplea de 2 a 6 ml., de orina dependiendo del tiempo de embarazo y una columna cromatográfica de 500 mm., de altura por 10 mm., de diámetro interno con un recipiente en el extremo opuesto a la llave, usa entre 5 y 7 gr., de sephadex que den una altura de empaque de 35 cm., aproximadamente, indica que es de especial interés que el sephadex sea hinchado antes de ponerse en la columna y recomienda ser suspendido en agua, eliminando las partículas sobrenadantes, y con

servándolo en el refrigerador por espacio de tres semanas resuspendiendo cada día en 3 ó 4 ocasiones y cambiando el agua.

Enfatiza también que para que el empaque del sephadex sea correcto en la columna es necesario que esté rotando o vibrando constantemente durante el relleno, por lo que recomienda se haga con un rotor mecánico a 75 revoluciones por minuto.

Como hemos dicho antes, los estrógenos son eluidos con agua y se encuentran entre los 34 y 39 ml., con la fracción I y entre los 39 y 45 ml., en la fracción II, ambas fracciones son hidrolizadas por separado y posteriormente extraídas con éter, este procedimiento de purificación previa tiene muchas ventajas para la hidrólisis enzimática en donde es menor la interferencia o inhibición de las enzimas; también disminuye la emulsión y mejora la extracción.

Echaute y Col., (16) basándose en el principio de que en el mecanismo de la cromatografía de filtración en gel, el volumen de elución es determinado en gran parte por el tamaño y estructura de la molécula, siendo inversamente proporcional al tamaño de la misma, por lo que usen la purificación en gel después de haber hidrolizado la orina, eluyendo igualmente que Beling con agua, obteniendo la mayor parte de estrógenos entre los 32 y 57 ml., los cuales son colectados para la extracción y purificación, sobre estas bases Van Baelen y Col., (47), también preparan la columna de sephadex-G-25 con objeto de evitar la gran elución con agua, purifican con 9 ml., de agua y eluyen con 10 ml., de acetato de etilo, obteniendo tan buenos resultados como Echaute.

Aún después de esta purificación siguen otros antes de hacer a cabo la

determinación de estriol por cromatografía de gas.

El reactivo de Brown (13) es uno de los más empleados para purificar los extractos etéreos, también llamado buffer de carbonato (pH 10.4) y se prepara mezclando 1000 ml., de bicarbonato de sodio al 8% y 150 ml., de hidróxido de so dio al 8%.

También se purifica con hidróxido de sodio al 8% y bicarbonato de so dio al 8% por separado (20 y 21).

Posteriormente se evapora el éter a sequedad y se sigue purificando con partición entre benceno-agua (13), benceno-éter de petróleo-agua (4), entre carb ona to de sodio 3.2 N-tetracloruro de carbono-cloroforno 2:1 (20 y 21), éter e hidróxi- do de sodio 1 N. pH 7 (46) o hidróxido de potasio y éter (37).

Cuando se esperan pequeñas cantidades de estriol se purifica por colum na cromatográfica de alúmina pero modificando la molécula de estriol al 3 metil éter, y usando diferentes mezclas de solventes para la elución (13).

La metilación se lleva a cabo en extractos de hidróxido de sodio al -- 40% en tubos cónicos de 100 ml., a los que se les añade 1 ml., de dimetil sulfato- y 0.9 gr., de ácido bórico, se tapan y se agitan a disolver el ácido bórico en baño maría a 37°C., se deja en el baño por 15 a 30 minutos, se añade después 1 ml., -- de hidróxido de sodio al 40% agitando a disolver los reactivos; se vuelve a colocar -- en el baño maría a 37°C., por 15 a 30 minutos, se enfría y se deja en reposo por -- toda la noche. Se añaden 2.5 ml., de hidróxido de sodio al 40% y 2.5 ml., de -- peróxido de hidrógeno al 30% y en un embudo de separación el estriol metilado se -- extrae con 2.5 ml., de benceno y éste último lavado en dos ocasiones con 5 ml., -- de agua destilada.

Es también purificado por cromatografía de columna, usando generalmente alúmina o sílica gel como adsorbentes, en la primera se pasan a través de la columna 12 ml., de 1.25% de etanol en benceno, que se descartan y posteriormente con 15 ml., de etanol en benceno al 2.5% con el que se eluye el 3 metoxi estriol (13). En ocasiones el estriol se acetila y es cromatografiado en columna de alúmina (49), y eluidos en 10 ml., de benceno en éter de petróleo al 25%, 15 ml., de benceno en éter de petróleo al 50% y 15 ml., de benceno en éter de petróleo al 75%; éstas tres fracciones se descartan y el acetato de estriol se eluye con 20 ml., de benceno.

La purificación se efectúa también por cromatografía en placa fina, usando como soporte alúmina o sílica gel G y como fase móvil mezclas de acetato de etilo 45, ciclohexano 45 y etanol 10 ó acetato de etilo 50 ciclohexano 50 (30).

Para revelar las placas se usan vapores de yodo, ácido sulfúrico al 50% en etanol, ácido fosfórico al 50% en etanol, y otros menos prácticos (30).

Una vez purificado el estriol, para cuantificarlo con mayor facilidad es necesario hacer de él un compuesto más volátil, la formación de trimetilsililestriol es el método más usado, aunque pueden producirse otros derivados como los metoximas, acetatos, etc., (26).

La formación de trimetilsililestriol se lleva a cabo de la siguiente manera (31): el extracto de la última purificación se evapora a sequedad en un tubo de centrifuga de 2 ml., y se le añaden 0.75 ml., de piridina o tetrahidrofurano redistilados, posteriormente se le añaden 0.25 ml., de hexametildisilazano y 10 gotas de trimetilclorosilano, se tapan perfectamente de preferencia con ~~un tapón de goma~~ y se dejan en reposo durante 24 horas a temperatura ambiente o durante 60 minutos en "

baño maría a 60°C, posteriormente se evaporan a sequedad bajo corriente de nitrógeno y se resuspende en la cantidad deseada de tetrahidrofurano, acetona o algún otro solvente puro para después proceder a inyectar en el cromatógrafo de gas.

Cabe mencionar que antes de este último paso, generalmente se añade el estándar interno con el que se ha llevado a cabo la calibración interna, pudiéndose emplear el colestano, el colesterol, el coprestano, etc., en cantidades conocidas.

El empaque de la columna se hace con diferentes tipos de soporte y fase líquida, del primero se usan tierras diatómicas y de la segunda neopentilglicolato de cincato, Q. F. 1 (floruro de silicón), SE 30 (silicón 200 desgranada), XE 60 (nitrato de goma de silicón) OV 17 (metil fenil silicón) etc., generalmente en porcentaje menor al 5% siendo las más usadas entre el 2 y 3%.

Los detectores más frecuentemente usados son el detector de flama y el de captura de electrones (17, 27, 38, 41, 45, 46 y 49). Se han publicado varias técnicas para la determinación de estríol durante el embarazo basadas en los pasos anteriores.

d). Bases de la Cromatografía de Gas Líquido.

Definición. La cromatografía de gas-líquido es una técnica de separación de mezclas de sustancias volátiles a la temperatura empleada, que interaccionan con una fase líquida y son arrastradas o ayudadas por una fase gaseosa, de ahí que su separación dependerá del punto de ebullición del compuesto o compuestos por analizar, de la fuerza y tiempo de interacción de éstos con la fase líquida y de la velocidad del gas de arrastre (11).

La cromatografía de gas-líquido es una técnica relativamente reciente; en 1952 James y Martin publicaron su experiencia al respecto, y aunque desde 1941 Martín y Synge ya habían trabajado en la partición cromatográfica gas-líquido con fases líquidas polares; fué hasta 1959 cuando Eglemton y Col., obtuvieron cromatogramas de separación de esteroides, que sin embargo fueron totalmente imprácticos, ya que el tiempo de elución o retención era de horas a pesar de emplear temperaturas elevadas; posteriormente en 1960 Sweely y Homing observaron que cuando se usaban fases líquidas polares a altas temperaturas, los esteroides podían eluirse en un tiempo menor, pero aún con la desventaja que se producía descomposición de los mismos; resolviéndose el problema usando fases líquidas en pequeña proporción (1-3%) preparadas con una fase líquida estable a la temperatura empleada (Vandenkevel, en 1960), ya que con temperaturas que varían de 210 a 230°C, el tiempo de retención de los esteroides varía de unos minutos a una hora. Posteriormente se introdujo la formación de derivados para disminuir el punto de ebullición de los compuestos y desde luego el tiempo de retención (17).

Cromatógrafo de Gases. Este aparato consta de elementos indispensables como son:

1. Fuente de Gas de Arrastre: generalmente es un tanque de gas comprimido. Los gases usados son: Helio, Argón, Nitrógeno e Hidrógeno; ya que estos gases tienen características muy próximas a las ideales, que son: a) inerte, b) con un mínimo de difusión gaseosa, c) puro, d) barato y e) conveniente para el uso del detector.

2. Manómetro: controla la presión y flujo (rotámetro) del gas del tan-

que, para que ésta sea uniforme durante el tiempo del estudio, que como se discutirá más adelante, son factores que hay que tomar en cuenta.

3. Puerto de Inyección con Homo: se llama puerto de inyección al sitio donde se introduce la muestra para que sea arrastrada por el gas de la columna; generalmente el puerto de inyección sólo es una "T", que por un lado permite la entrada del gas de acarreo, por otro se inyecta y el último es la columna en sí; como se describió anteriormente, éste tiene un homo cuya temperatura será controlada por un termostato desde fuera del aparato, y que a la vez está conectado a un pirómetro que se encuentra en su interior; la temperatura en este sitio deberá ser mayor al punto de ebullición de los compuestos a determinar, con objeto de que rápidamente sean vaporizados y en este estado entren en la columna.

4. Columna y Homo: la columna es un tubo de metal, vidrio o polietileno; en la separación de esteroides es conveniente el uso de vidrio ya que los metales como el acero inoxidable y cobre pueden dañar o fijar las moléculas en proceso, el de polietileno tiene la desventaja de que no puede alcanzar altas temperaturas. Existen dos tipos de columnas: las capilares también llamadas de Goulat o abiertas, y las empacadas; las primeras son columnas de un diámetro pequeño y de gran longitud por lo que siempre son espirales, las paredes de la columna son cubiertas en su totalidad por la fase líquida, tienen ventajas con respecto a su resolución, pero son difíciles de preparar. Las columnas empacadas son de un diámetro mayor que fluctúa entre 4 y 8 mm., para cromatografía analítica; de menor longitud, lo que permite sean en U, W o espirales, generalmente su largo es de 6 a 10 pies; estas columnas están empacadas con un soporte que generalmente es una sustancia inerte de tamaño peque

no y uniforme que varía de 60 a 200 mallas, el cual es cubierto en su totalidad por la fase líquida, dando de esta manera una mayor superficie en una longitud menor; tienen ligera desventaja en su resolución con respecto a los capilares, pero son mucho más fáciles de empacar y más prácticas. La columna se encuentra dentro de un horno, a semejanza del puerto de inyección, con termostato y pirómetro que van a permitir que el control de la temperatura sea fija o programada, la temperatura dependerá principalmente del punto de ebullición de la fase líquida usada y desde luego tomando en cuenta el punto de ebullición de los compuestos a determinar.

5. Detector y Horno: el detector es un aparato de diferente composición, existen: el detector de argón, detector de conductibilidad térmica, detector por ionización de flama, detector de captura de electrones, detector de fósforo y detector de helio; cada uno de ellos con diferentes características, pero como denominador común son capaces de enviar señales o dejar de emitir las, cuando el gas de arrastre transporta una substancia, la mayoría de las veces insensibles a una u otra sustancia, por ejemplo aire y agua o a compuestos más complicados como en el detector de captura de electrones. El horno, al igual que los anteriores deberá conservar una temperatura estable y mayor que el de la columna para evitar condensación de los compuestos y permitir que sean desalojados del aparato.

6. Equipo Electrónico: necesario para multiplicar la señal generalmente dada por electrones y transformarla en pulsos eléctricos que al ser enviados al graficador se convierten en pulsos mecánicos.

7. Registrador; con plumilla y entrada de 1 MV., que es la señal usualmente enviada por los cromatógrafos, de preferencia con integrador de disco, para --

calcular el área de los picos una vez inscritos (34 y 44).

Una vez descrito el aparato podemos analizar el comportamiento de ca da uno de sus componentes durante el trabajo.

La aplicación de la muestra al aparato generalmente se hace por medio de una jeringa, calibrada en microlitros; las cuales pueden también introducir sustancias sólidas o gaseosas; para estos dos últimos ejemplos también se emplean aparatos de pirólisis o válvulas, respectivamente.

En la cromatografía de gas-líquido de muestras biológicas, debido al comportamiento de las sustancias orgánicas es necesario formar derivados de ellas, las razones son: los derivados formados son más volátiles, disminuye la adsorción en la columna cromatográfica, mejora la separación y los análisis cuantitativos alcanzan mayor linealidad (26).

Los compuestos libres al ser analizados por cromatografía de gas sufren adsorción y ruptura, produciendo en el cromatograma un pico que se inscribe rápidamente y a su fase de descenso que es muy prolongada, se le llama coileo, también existe una falta de linealidad al graficar cantidades crecientes de una sustancia, esto es debido a la adsorción del compuesto, a la fase líquida o a la columna que no es uniforme y por lo tanto impredecible. Los compuestos de gran peso molecular o con gran polaridad difícilmente son volátiles.

Los derivados más comunmente usados en el análisis de esteroides (27) son:

- a) Metil silil éter
- b) Acetatos

- c) Metoximas
- d) Hidrazonas
- e) Metil éter y
- f) Heptafluorobutiratos

El flujo de gas a través de la columna dependerá de la presión inicial y a la resistencia que ofrezca a dicha presión; la resistencia dependerá de la viscosidad del gas, y de la permeabilidad de la columna, que estará supeditada al diámetro de las partículas de relleno y porosidad de las mismas; así como a la longitud de la columna; las variaciones en presión y velocidad del gas, alargarán o retardarán la salida de la substancia por analizar; por lo que siempre se debe tener presión y velocidad del gas semejantes para obtener una mejor reproducibilidad, la presión se mide en libras por pulgada cuadrada (psi), y el flujo o velocidad en mililitro de gas por minutos (ml/min).

La columna, además del gas que fluye a través de ella, consta de la fase líquida o estacionaria y su eficiencia dependerá de la interacción del compuesto con la fase líquida y lo cual a su vez influirá con el tiempo que tardará en atravesar la columna; seleccionando el tipo de fase líquida podemos tener una mejor resolución de los cromatogramas.

Por otro lado tenemos que la eficiencia de la columna, dependerá del diseño y condiciones de operación de ella y está directamente relacionada con la anchura del pico del cromatograma, lo cual es descrito como el alto equivalente a un plato teórico (AEP), esto se refiere al largo de la columna necesario para obtener un equilibrio en la distribución del compuesto a determinar, entre la fase móvil (gas)

y la fase estacionaria (líquido).

De la eficiencia de la fase líquida y de la columna resulta la eficiencia de la cromatografía.

Las curvas de elución de la columna que van a dar como resultado el ancho del pico del cromatograma depende de:

- a) Una difusión de gas en remolino (o refiujo) debido al empaque,
- b) Difusión molecular
- c) Resistencia a la transferencia de masa (gas o líquido)

El cálculo del número de platos teóricos, es dado por la distancia que existe desde el momento de inyección hasta el punto medio del pico (34), entre el ancho del pico en la línea base, al cuadrado y multiplicado por 16 fig. No. 6.

N = Número de platos teóricos

X = Distancia desde el punto de inyección hasta el vértice del pico

Y = Ancho del pico a la altura de la línea base.

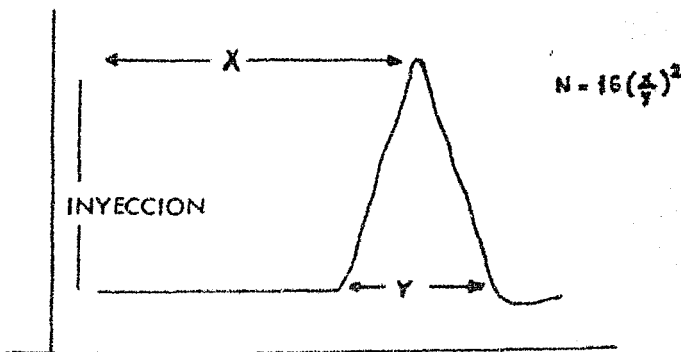


FIGURA No. 6.

Las fuerzas de interacción entre los compuestos a separar y la fase estacionaria o líquida, que van a determinar el tiempo de elución son:

1. Interacción de dipolos instantáneos; que se encuentran presentes -- siempre y son la única fuente de energía entre dos sustancias no polares.
 2. Doble polo inducido; resultado de la interacción de un doble polo permanente y el doble polo inducido en una molécula vecina.
 3. Puente de hidrógeno; interacción de dobles polos permanentes, que es la interacción de mayor fuerza en la cromatografía de gas-líquido.
 4. Formación de enlaces químicos; entre la muestra y la fase líquida.
- Así, de esta manera, los compuestos polares se eluirán rápidamente en una fase estacionaria no polar y los compuestos no polares menos rápido, a pesar de que el punto de ebullición de ambos compuestos sea el mismo, lo contrario también sucede.

Los soportes para la columna deben tener determinadas características - que son:

- a) Gran área de superficie entre 1 y $20M^2/gr$.
- b) Estructura porosa, de pequeña superficie, de diámetro uniforme y - aproximadamente de 10 micras.
- c) Inerte
- d) De forma y tamaño uniforme
- e) De consistencia firme.

Las sustancias que más similitud presentan respecto a estos requisitos - son las tierras diatómeas, que son esqueletos de algas unicelulares de aproximadamente 10,000 especies. Las más recomendadas son:

- 1) Cromosorb P., es un preparado de calcinación de diatómeas y un-

onlace a 900°C., con área de 4 M²/gr.

2) Cromosorb W., preparado por flujo de carbonato de sodio calcinando las diatomitas a 900°C., con área de 1 M²/gr.

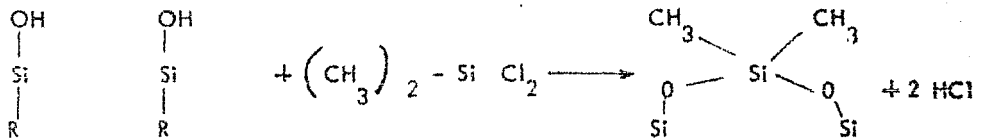
3) Cromosorb G., preparado por flujo, calcinando las diatomitas con área de 0.5 M²/gr.

4) Gas Chrom S y P., similares al Cromosorb W., pero de una salafuente diatomea.

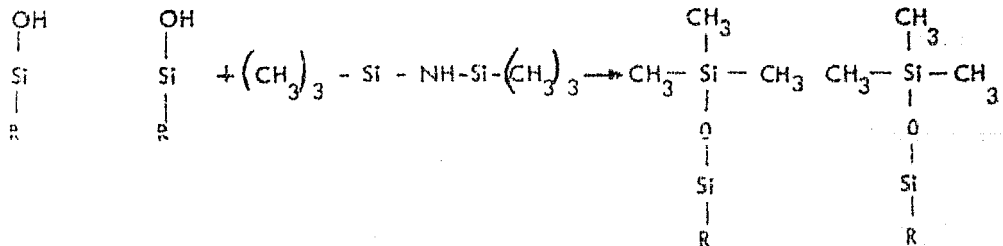
Existen muchos otros como los de teflón, vidrio, metal, hidrocarburos, arena, vidrio molido, etc.

Estos soportes no son totalmente inertes, por lo que se tratan con sustancias que se combinen con sus grupos funcionales, principalmente los grupos hidroxilos, esto se lleva a cabo tratándolos con dimetilclorosilano y hexametildisilazano - (31).

Así la superficie de las diatomeas es rica en sílice, pero contiene grupos hidroxilos que reaccionarán con estos compuestos de la siguiente manera, haciéndolos inertes:



DIMETILCLOROSILANO



HEXAMETILDISILAZANO

También, si es conveniente, pueden hacerse alcalinas o ácidas, dependiendo de la fase líquida que las cubrirá y de los compuestos a determinar. El tamaño de la partícula varía entre 60 y 80 millas, para columnas de diámetro interno de 4 mm., y entre 100 y 200 mallas para diámetros mayores.

Fase Líquida. Las características ideales de una fase líquida son:

- a) No volátil, presión de vapor 0.01 a 0.1/mm., a la temperatura -- que se opera.
- b) Térmicamente estable.
- c) Químicamente inerte a los compuestos a determinar.

Las fases recomendables para los esteroides son:

1. STPA; fase para análisis de esteroides
2. XE-60; goma de silicona nitrilo
3. QF-1; fluoruro de silicona
4. SE-30; Silicona desgranado
5. NGS; neopentil glicol succinato

Estos compuestos son sólidos a la temperatura ambiente y solubles en -- solventes adecuados; de tal manera que al ponerse en contacto con el soporte y evaporarse, cubren totalmente el soporte, volviéndose sólida, pero a las temperaturas de trabajo volverá a ser líquida.

Detectores. El detector indica la presencia y mide la cantidad de compuesto en el efluente de la columna, existen dos tipos: el integral y el diferencial -- (44).

Los detectores integrales, dan cromatogramas que miden el efecto produ

cido por los compuestos en aumento, y las diferenciales registran algunas propiedades momentáneas del effluente de gas, que serán sobre los que trataremos.

Así, existen varios tipos de detectores:

Detector de Conductibilidad Térmica. Se basa en la transferencia de calor de un cuerpo caliente a un gas.

Detector de Captura de Electrones. Está basada en la propiedad de las moléculas a analizar para capturar un electrón lento, producido por la ionización del gas de acarreo, lo que lleva a una reducción en la cantidad de corriente que se está produciendo.

Detector de Helio. Se basa en la propiedad de aumentar el nivel energético del helio, por emisión de radiaciones beta por una hoja metálica de tritio, el helio estable ioniza el compuesto a determinar y la cantidad de electrones, emitidos producirá un cambio de corriente que será registrado.

Detector de Ionización por Flama. Se basa en la propiedad de ionizar los compuestos orgánicos por medio de oxígeno e hidrógeno en combustión, producen bióxido de carbono, agua, dos iones positivos, un ión negativo y un electrón. La suma de iones negativos más la suma de electrones producirá un cambio de potencial que será registrado.

Detector Microtransversal. Se basa en la ionización producida por las emisiones beta de una placa de Tritio en la substancia a determinar y la cantidad de electrones producidos, corresponderá a la concentración de la substancia.

Todos estos detectores son usados en cromatografía de gas líquido, siendo los más sensibles; el detector de captura de electrones, detector de ionización

por flama y el detector de helio, teniendo además la ventaja de ser lineales, en relación con la concentración de la sustancia inyectada y la señal dada por el detector mismo al registrarlas.

Las desventajas de los diferentes detectores son las siguientes:

El detector de ionización por flama es insensible a gases inertes, aire, agua y además destruye la muestra. El detector de captura de electrones, solo detecta a las sustancias capaces de capturar un electrón lento. El detector de helio, debido a su sensibilidad, a la fase líquida, impide que sea usado en cromatografía de gas-líquido. El detector microtransversal tiene la desventaja de ser poco sensible igual que el detector de conductibilidad térmica (34).

Análisis Cualitativo y Cuantitativo por Cromatografía de Gas.

Análisis Cualitativo. La Cromatografía de Gas, es una técnica de separación que permite la identificación de los compuestos, de ahí que el problema más importante es la identificación de los picos que aparezcan en el cromatograma. Este se lleva a cabo por el conocimiento del tiempo de retención de un estándar conocido.

Como hemos dicho anteriormente, el tiempo de retención, es el tiempo que transcurre desde el momento de la inyección hasta el vértice del pico a determinar y ello depende de los siguientes factores:

1. La dimensión de la columna (largo y diámetro)
2. Tipo y proporción de la fase líquida
3. Tipo de soporte y tamaño de las partículas
4. Temperatura

5. Velocidad del flujo del gas
6. Tipo del gas portador
7. Volumen inerte del instrumento
8. Caída de la presión del gas

Tiempo de retención corregido. Este es el tiempo que transcurre, desde el inicio del registro del solvente en que se suspendió la muestra, hasta el vértice del pico a determinar.

Esta corrección se lleva a cabo para eliminar el volumen inerte del instrumento (34, 44).

Tiempo relativo de retención. Indica la relación que existe entre el tiempo de retención del compuesto a determinar y el tiempo de retención de una substancia que se toma como norma. Este tiene la ventaja de que independientemente de que varían las condiciones de la columna, siempre será el mismo y sólo dependerá del tipo de fase líquida y de la longitud de la columna.

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

Análisis Cuantitativo. La precisión cuantitativa con la cual las muestras pueden ser analizadas, es uno de los factores que ha llevado al rápido desarrollo de la cromatografía de gas en el campo del análisis instrumental. En el análisis cuantitativo existen varios factores de igual importancia y son los siguientes:

- I.- Introducción exacta de la muestra
- II.- Parámetro de operación constante

- III.- Exactitud al medir el área de los picos
- IV.- Factores de sensibilidad de cada compuesto
- V.- Linealidad de los detectores
- VI.- Columnas de buena resolución.

Procedimiento de Calibración. La cuantificación de una sustancia en cromatografía de gas, depende de la altura y área del pico; las tablas elaboradas -- del tamaño del pico contra la concentración de la muestra no son tan lineales como las tablas elaboradas en donde el área del pico se grafica en relación con la concentración de las muestras.

Medición de Areas (44). El cálculo del área de un pico se puede llevar a cabo por los siguientes métodos:

A. Cortar el papel del área comprendido en el pico y pesarlo. Esta técnica, no es muy exacta y no se pueden estimar satisfactoriamente los picos superpuestos.

B. El uso de un planímetro, cuyo manejo es difícil y en ocasiones la sensibilidad es poca e insuficiente para propósitos analíticos.

C. Triangulación. Este es un método práctico que puede ser comparado con otros métodos electrónicos, como son la integración de disco o la integración digital; se lleva a cabo de la siguiente manera: cuando el pico tiene características Gaussianas (campanas de Gauss) la medición del área se efectúa por triangulación -- (fig. No. 6) del pico del compuesto, multiplicando la base por la altura y dividiendo el resultado entre dos. Cuando los picos no son simétricos se mide la base a la altura de un 15% y la anchura del pico al 80% de la altura, ~~sumando estos dos~~

churas del pico se multiplica por la altura del pico y se divide entre dos lo que nos dá el área del pico.

Al ser comparadas las precisiones en la medida del área por otros procedimientos, el de mayor precisión es el digital (electrónico), después el integrador de disco (mecánico), la triangulación y por último el método de pesada. Cuando los compuestos no tienen una resolución completa, es decir que se imbrican las bases de dos compuestos, puede usarse únicamente la altura.

Calibración del Aparato. Calibración directa. Es aquella en la cual se traza una curva del área de la norma estándar a diferentes concentraciones y se compara contra el peso en microgramos del componente. Esta calibración tiene la desventaja de ser muy laboriosa y además, las condiciones del aparato no son reproducibles día a día con exactitud.

Estandarización Interna. En la realización de este procedimiento se mezclan las sustancias desconocidas con una sustancia de peso conocido (estándar), y se traza una curva, en la que se comparan el cociente del área del componente entre el área de la norma, contra el cociente del peso del compuesto sobre el peso de la norma.

Normalización Interna. Este método se usa sólo cuando se desea conservar la proporción de un compuesto dado en una mezcla que se tomará como 100%, para ésto se medirán todas las áreas de los picos existentes en el cromatograma y la suma de ellos se tomará como 100%. El compuesto a determinar se dividirá entre la suma total de áreas y nos dará un porcentaje de éste con relación a los demás productos.

II. MATERIAL Y METODO.

a. Reactivos.

Acido Sulfúrico Q. P. (Merck), Eter Etilico (Backer), Bicarbonato de Sodio Q. P. (Backer), Carbonato de Sodio anhidro Q. P. (Backer), Hidróxido de Sodio Q. P. (Monterrey) Sulfato de Amonio Q. P. (Backer), Hexametildisilazano HMDS (Pier. Chem. Co.) Trimetilclorosilano TMS (Pier. Chem. Co.), Estríol cristales (Searle) Colesterol Cristales (Harleco).

b. Soluciones.

Buffer de Carbonatos pH 10.4 a 1000 ml., de bicarbonato de sodio al 8% (en un matraz aforado de 1000 ml., colocar 80 gr., de bicarbonato de sodio, se disuelve en agua destilada y se afora a la marca), se agregan 150 ml., de hidróxido de sodio al 8% (en un matraz volumétrico de 250 ml., se vierten 200 ml., de agua destilada y 20 gr., de hidróxido de sodio, se agita a disolver y se afora a la marca), posteriormente se ajusta el pH a 10.4.

Solución Estándar de Estríol 100 mg., de estríol se colocan en un matraz aforado de 100 ml., se disuelven en etanol y se afora con este a la marca (esta solución es marcada como solución madre y contiene 1000 microgramos por mililitro).

Solución de Trabajo 10 ml., de la solución madre son colocados en un matraz volumétrico de 100 ml., y aforados con etanol a la marca, (para evitar con-

taminación y concentración de esta solución de trabajo fué repartida en pequeños frascos de tapón de rosca, de capacidad de 3 ml., y guardados en el refrigerador,) esta solución contiene 100 microgramos por mililitro.

Solución Estándar de Colesterol 100 mg., de colesterol se colocaron en un matraz volumétrico de 100 ml., se disolvió en etanol y afará a la marca, esta solución madre contiene 1000 microgramos por mililitro.

Solución de Trabajo 5 ml., de la solución anterior se colocan en un matraz volumétrico de 100 ml., y se afara la marca con etanol (esta solución es vertida a pequeños frascos de 3 ml., con tapón de rosca y guardados en el refrigerador), esta solución contiene 50 microgramos por mililitro.

c. Purificación de los Solventes.

El Tetrahidrofurano fué redistilado en un aparato de vidrio, descartando en cada ocasión los primeros y últimos 10%, su colección se hizo sobre sulfato de sodio anhidro. El éter etílico fué lavado con sulfato ferrroso al 15% en agua y se usaron 100 ml., para cada 1000 ml., de éter, posteriormente fué lavado con 100 ml. de agua y redistilado descartando los primeros y últimos 10%.

d. Equipo.

Aparato de destilación. Consta de matraz de bola, fondo plano, con boca esmerilada 24/40, columna de Vigreux con salida y entrada esmerilada de 24/40, puente con entrada para termómetro con dos salidas esmeriladas 24/40, refrigerante de rosario con entrada y salida esmerilada 24/40, columna de vidrio pyrex para cromatografía de gas (Varian Aerograph), 6 pies de longitud y diámetro interno $1/2$ "., matraces erlenmeyer de 250 ml., embudos de separación con boca esmerilada y tapón -

de capacidad de 60 y 250 ml., tubos de centrifuga de 2 y 10 ml., pipetas serológicas de 0.1, 1.0, 5.0, y 10.0 ml., pipetas volumétricas de 1 ml., Jeringas Hamilton con capacidad de 1 y 10 microlitros.

La vidriería fué lavada con detergente, agua, agua destilada, mezcla-crómica, agua bidestilada y secada al horno a 120°C .

Cromatógrafo de gases Varian Aerograph serie 1800, detector de ionización por flama, con columna de vidrio de 6 pies de largo por $1/8''$ de diámetro interno, empacada con Chromosorb W como soporte y SE 30 (silicona desgranada) al 3% como fase fija (o líquida). Registrador de entrada de un MV, con velocidad -- del papel de registro variable, Varian Aerograph serie 200.

METODO.

Hidrólisis Ácida. A una alícuota de $1/20$ de orina de 24 horas se le agrega agua destilada hasta un volumen de 100 ml., adicionando además 6 ml., de ácido sulfúrico al 50%, se agita y se lleva a un autoclave a 120°C ., por una hora.

Extracción. Después de la hidrólisis se enfrían y se filtran a través de papel Whatman No. 1, pasándolos a embudos de separación de 250 ml., se añaden 6 gr., de sulfato de amonio y se extrae en dos ocasiones con 100 ml., de éter etílico; los extractos etéreos se colocan en un embudo de separación de 250 ml.,

Purificación. Se agregan 10 ml., de buffer de carbonatos de pH 10.4, se agita y se descarta la fase acuosa, se agregan 5 ml., de hidróxido de sodio al 8% se agita y sin descartar la fase acuosa se agregan 10 ml., de bicarbonato de sodio al 8%, se agita y se descarta la fase acuosa, se añaden 5 ml., de bicarbonato-

de sodio al 8%, agitando nuevamente y eliminando la fase acuosa; posteriormente se lava en dos ocasiones con 5 ml., de agua.

El extracto etéreo se transfiere a un matraz erlenmeyer de 250 ml., lavando el tapón y matraz con 5 ml., de éter llevándose a sequedad bajo corriente de aire en baño maría a 60°C.

El extracto seco es resuspendido en 10 ml., de una mezcla benceno-éter de petróleo 1:1 y 10 ml., de hidróxido de sodio 1 N., se agita a resuspender y se pasa a un embudo de separación de 60 ml., donde se vuelve a agitar y se elimina la fase orgánica, al hidróxido de sodio se le cambia el pH entre 9.5 y 10 con bicarbonato de sodio sólido, colocándose en el embudo de separación de 60 ml., donde es extraído en una ocasión con 20 ml., de éter, el cual se lava en una ocasión con 1 ml. de bicarbonato de sodio al 8% y en dos ocasiones con 4 ml., de agua. Se agrega sulfato de sodio anhidro y se transfiere a un tubo de centrífuga en fracciones de 5 ml., que son llevados a sequedad en baño maría a 60°C., bajo corriente de aire, por una hora se dejan en desecador que tiene carbonato de calcio anhidro.

Estándar Interno. Se agrega 1 ml., de la solución de trabajo del colesterol y se lleva a sequedad bajo corriente de aire.

Formación de Derivados. (Trimetil-sililación). El extracto seco se resuspende en 0.75 ml., de tetrahidrofurano recientemente redistilado y se agrega 0.25 ml., de hexametildisilazano, y 10 gotas de trimetilclorosilano, se tapa con tapón de caucho y se lleva a baño maría a 60°C., por espacio de 30 minutos, posteriormente se seca bajo corriente de aire y se resuspende en 20 microlitros de tetrahi-

dofurano, de aquí con jeringa Hamilton se inyecta 1 microlitro al cromatógrafo de gases.

Cromatografía de Gas Líquido. Se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: la velocidad de los gases de la flama fueron: aire 400 ml./min., hidrógeno 40 ml./min., el gas de acarreo fué nitrógeno a una velocidad de 40 ml./min., y la presión (libras por pulgada cuadrada) de 50, a la temperatura de 260°C., en el horno de la columna.

Temperatura de los hornos. Puerto de inyección 325°C., columna - - 260°C., detector 325°C.

Las condiciones del electrómetro fueron 10^{-11} con atenuación de 1 a 64. La velocidad del papel de registro fué de 10 pulgadas por hora.

EXPERIMENTAL.

Se determinaron los tiempos de retención y el número de platos teóricos para ambos estándares.

Linealidad del Detector. Se inyectaron diferentes concentraciones de estríol y se graficaron las áreas de los picos contra la cantidad en peso.

Linealidad del Electrómetro. Una cantidad fija de estríol (un microlitro) fué inyectado en varias ocasiones con atenuaciones de 2, 4, 8, 16, 32 y 64 - graficándose una curva de atenuación contra área del pico.

Curva de Calibración Interna. Se llevaron a cabo las siguientes proporciones estríol: colesterol 0.25: 1, 0.50 : 1, 1: 1, 2 : 1, 4 : 1 y 8 : 1; ésto se llevó a cabo de la siguiente manera: 25 microgramos de estríol se mezclaron con 100 microgramos de colesterol, se llevaron a sequedad y se formaron los trimetil silit

derivados como se describió previamente, se resuspendió en 100 microlitros de THF y se inyectó 1 microlitro, lo mismo se hizo para cada una de las proporciones. Se graficó el cociente del área estriol/colesterol contra el cociente de la concentración de cada uno de los compuestos.

Sensibilidad. A una alícuota de 1/20 de orina de hombre se le agregaron 0, 2, 4, 8, 16 y 32 microgramos de estriol y se llevó a cabo la determinación de estriol por el método usual, graficando los resultados de área de pico contra peso del estriol en microgramos.

Especificidad. Dos alícuotas de 1/20 de orina de mujer embarazada en el último trimestre fueron procesadas por el método empleado, una de ellas fué cromatografiada en placa fina de sílica gel antes de ser inyectada al cromatógrafo de gas. Se comparó el área del pico con y sin cromatografía de placa fina.

Exactitud. Se llevó a cabo curva de recuperación en alícuotas de 1/20 de orina de 24 horas de mujer embarazada en el último trimestre añadiendo 0, 2, 4, 8, 16 y 32 microgramos de estriol a cada alícuota y se procesaron por el método empleado y los resultados fueron graficados y comparados con los valores esperados.

Precisión. 8 Alícuotas de 1/20 de orina de 24 horas de mujer embarazada en el último trimestre fueron procesadas y los valores obtenidos fueron analizados por método estadístico.

III. RESULTADOS.

Determinación de Tiempo de Retención y Número de Platos Teóricos. --

Para el estriol (APTE₃), en columna de vidrio de 6 pies de longitud con diámetro interno de 1/8" de SE 30 al 3% sobre Chromosorb W en temperatura isotérmica a 260°C., con flujo de gas de acarreo 40 mil., /min.,

Tiempo de retención 12.5 minutos

Volúmen de retención 500 ml.

Ancho del pico 0.6 cm.

$$\text{APTE}_3 = 16 \frac{(12.5)^2}{0.6} = 6400 \text{ entre } 6 = 1066$$

APTE₃ por pie de columna 1066 (gráfica No. 1)

Tiempo de retención y número de platos teóricos para el colesterol --

(APT Col.) en columna y condiciones semejantes que la anterior.

Tiempo de retención 21.9 minutos

Volumen de retención 876 ml.

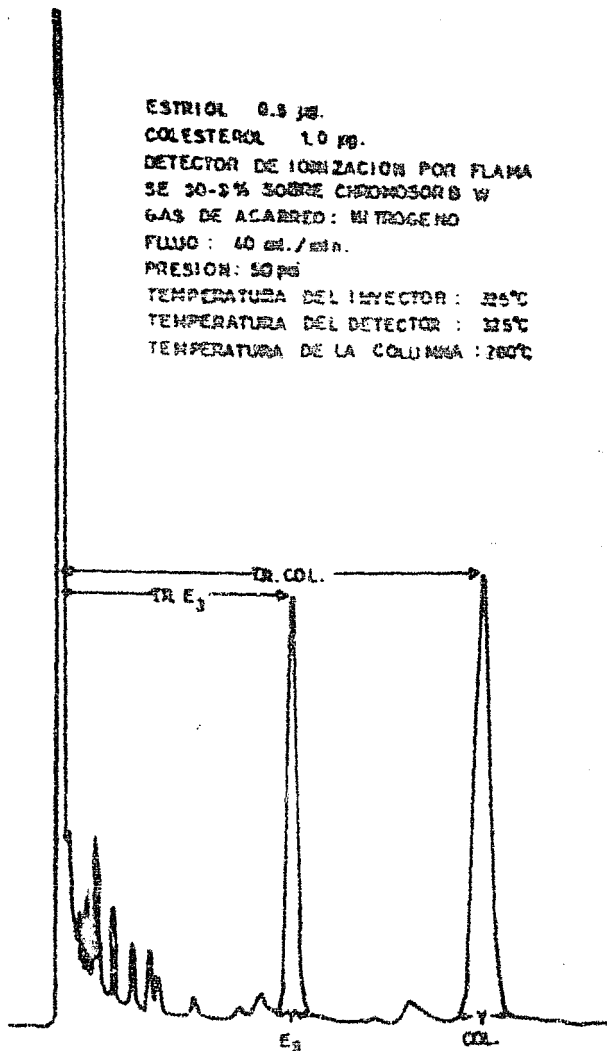
Ancho del pico 1.0 cm.

$$\text{APT Col.} = 16 \left(\frac{21.9}{1.0} \right)^2 = 7673 \text{ entre } 6 = 1278.$$

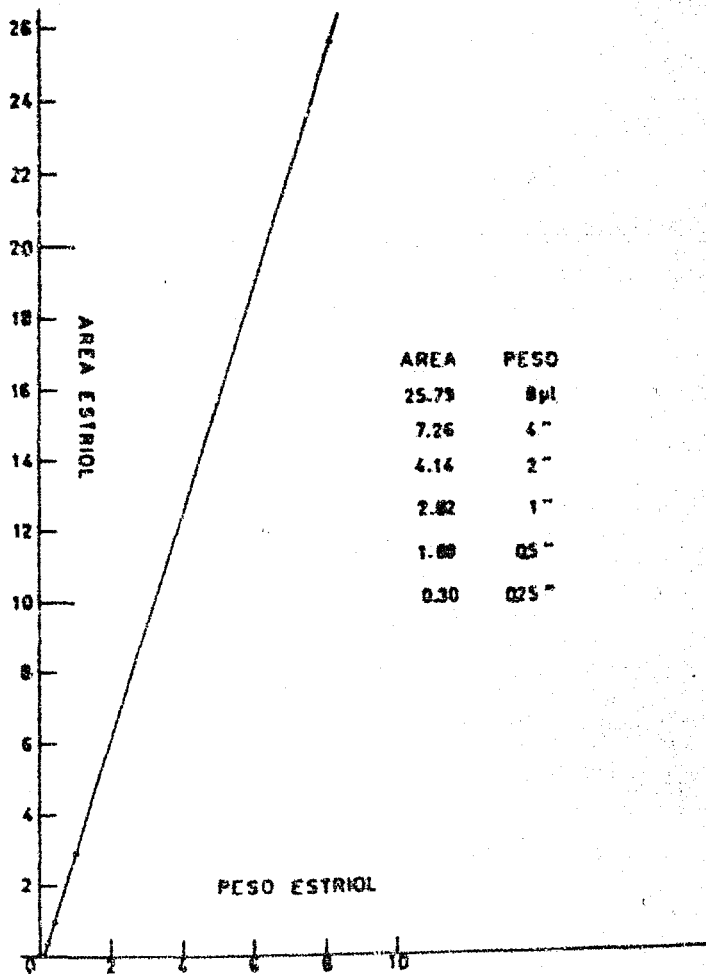
APTCol. por pie de columna 1278 (gráfica No. 1)

Linealidad del Detector. La gráfica No. 2 muestra la linealidad que si que el detector en respuesta a diferentes cantidades de estriol. ella se compara --

ESTRIOL 0.3 µg.
COLESTEROL 1.0 µg.
DETECTOR DE IONIZACION POR FLAMA
SE 30-3% SOBRE CROMOSORB W
GAS DE ACARREO: NITROGENO
FLUJO: 40 ml./min.
PRESION: 50 psig
TEMPERATURA DEL INYECTOR: 225°C
TEMPERATURA DEL DETECTOR: 325°C
TEMPERATURA DE LA COLUMNA: 260°C



GRAFICA No.1. CROMATOGRAMA DE ESTANDARES
DE COLESTEROL Y ESTRIOL



GRAFICA No.2. LINEARIDAD DEL DETECTOR.

la cantidad en peso de estriol contra el área de los picos de las gráficas, en ella se añaden la tabla de valores encontrados.

Linealidad del Electrómetro. En la gráfica No. 3 se exponen las áreas de una misma cantidad de estriol a diferentes atenuaciones del electrómetro.

Curva de Calibración Interna. Se llevó a cabo graficando el cociente obtenido al dividir el área del estriol (norma problema) entre el área del colesterol (norma interna) contra el cociente de la división del peso del estriol entre el peso del colesterol (gráfica No. 4).

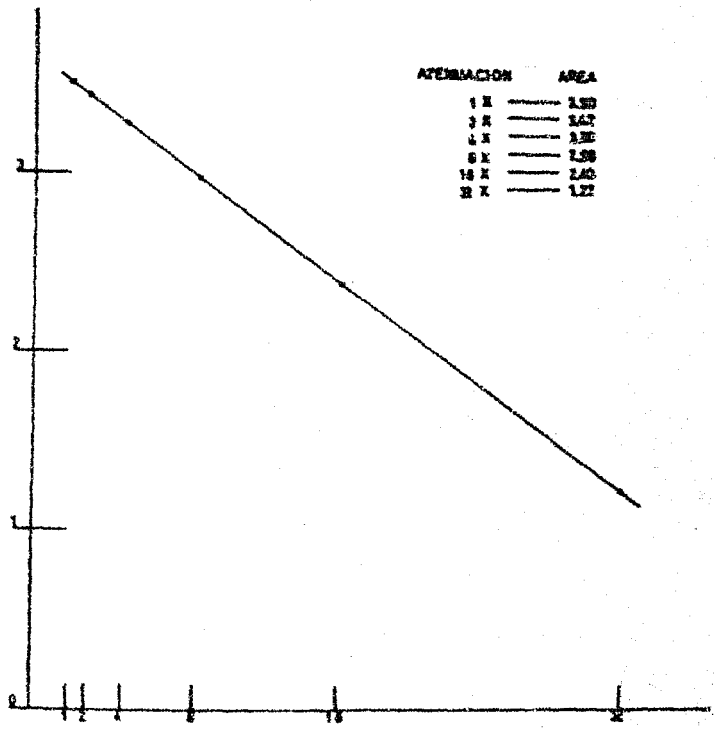
Sensibilidad. El aparato detectó 0.2 microgramos situando el electrómetro con sensibilidad de 10^{-11} y con atenuación por 1, en que se llevaron a cabo las determinaciones. En orina de 24 horas se tiene un límite inferior de 80 microgramos, usando una alícuota de 1/20 de la orina de 24 horas y se resuspende el extracto final en 20 microlitros de los cuales se inyectó un microlitro.

Especificidad. Los problemas analizados sin previa purificación por placa fina y aquéllos en que se llevó a cabo, presentaron cambios poco significantes. Las orinas de varones analizadas no mostraron picos con tiempo de retención igual a los del estriol o el área era tan pequeña que se llevaron a cabo su lectura en la curva de calibración, su lectura era cero.

Precisión. Para conocer la precisión del método se llevó a cabo la determinación de una muestra de mujer embarazada en 8 ocasiones, los resultados obtenidos fueron analizados por las siguientes fórmulas:

$$\sigma = \sqrt{\frac{(\sum x - \bar{X})^2}{n-1}}$$

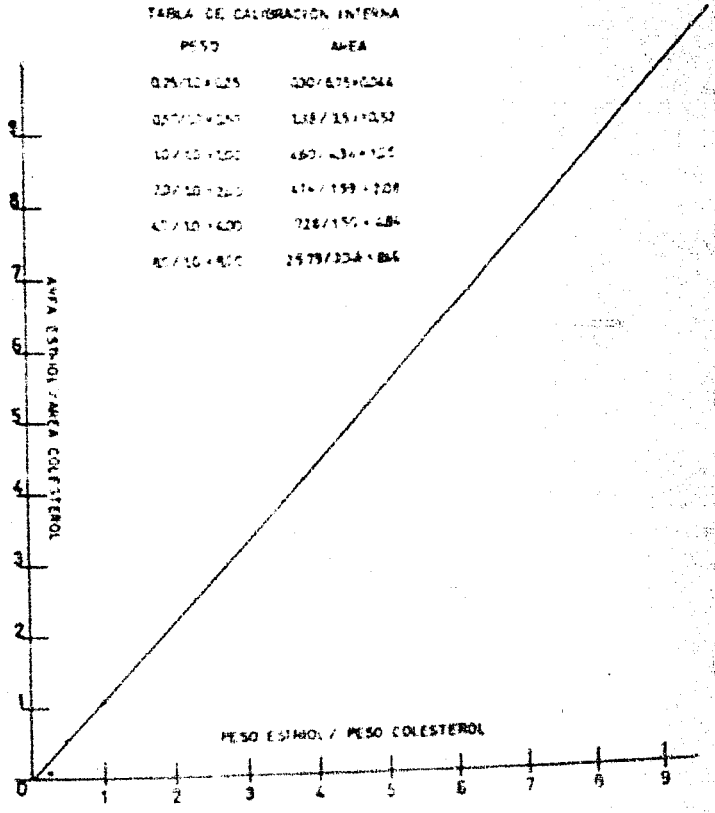
$$\sigma_c = \frac{\sigma}{\bar{X}} = 100$$



GRAFICA No. 3. LINEARIDAD DEL ELECTROMETRO

FABLA DE CALIBRACION INTERNA

| PESO | AREA |
|------------------|--------------------|
| 0.25 / 10 + 0.25 | 100 / 6.75 + 0.044 |
| 0.50 / 10 + 0.50 | 138 / 15 + 0.52 |
| 1.0 / 10 + 1.00 | 460 / 30 + 1.05 |
| 2.0 / 10 + 2.00 | 470 / 150 + 2.09 |
| 4.0 / 10 + 4.00 | 728 / 150 + 4.84 |
| 8.0 / 10 + 8.00 | 2579 / 324 + 8.66 |



GRAFICA No. 4. CURVA DE CALIBRACION INTERNA
ESTRIOL-COLESTEROL

Los resultados y su análisis estadístico se encuentran en la tabla No. 1.

Exactitud. La curva de recuperación de estriol en una orina de hombre demostró linealidad, y al ser analizada por la fórmula:

$$r = \frac{\sum \left(\frac{X_i - \bar{X}}{s_X} \right) \left(\frac{Y_i - \bar{Y}}{s_Y} \right)}{n}$$

Demostó una correlación del 0.7346, y los datos se exponen en la tabla No. 2.

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

| n | X | X - \bar{X} | (X - \bar{X}) ² |
|---|-------|---------------|-------------------------------|
| 1 | 68.75 | 4.32 | 18.66 |
| 2 | 57.50 | -6.93 | 48.02 |
| 3 | 58.75 | -5.68 | 32.26 |
| 4 | 67.50 | 3.07 | 9.42 |
| 5 | 66.25 | 1.82 | 3.31 |
| 6 | 69.75 | 5.32 | 28.30 |
| 7 | 68.75 | 4.32 | 18.66 |
| 8 | 58.25 | -6.18 | 38.19 |

$$\bar{X} = 64.43$$

$$196.82 \text{ entre } 7 = 28.11$$

$$\sqrt{28.11} = 5.3 \quad \sigma = \frac{\sigma}{\bar{X}} \times 100$$

$$\frac{5.3}{64.43} = .082 \quad \sigma = .082 \times 100 = 8.2\%$$

TABLA No. 1.

| n | X | Y | $(X - \bar{X})$ | $(Y - \bar{Y})$ | $\frac{(X - \bar{X})}{s_X}$ | $\frac{(Y - \bar{Y})}{s_Y}$ | $\frac{(X - \bar{X})}{s_X} \times \frac{(Y - \bar{Y})}{s_Y}$ |
|---|----|-------|-----------------|-----------------|-----------------------------|-----------------------------|--|
| 1 | 2 | 1.90 | -10.4 | -10.42 | -.9541 | -.6404 | .6110 |
| 2 | 4 | 3.75 | - 8.4 | - 8.57 | -.7706 | -.5267 | .4058 |
| 3 | 8 | .75 | - 4.4 | - 3.57 | -.4036 | -.2194 | .0885 |
| 4 | 16 | 1 .00 | 3.6 | 3.68 | .3302 | .2261 | .0746 |
| 5 | 32 | 3.20 | 19.6 | 22.56 | 1.7981 | 1.386 | 2.4921 |
| | 62 | 61.60 | | | | | 3.673 |

$$\bar{X} = 12.40 \quad \sigma_x = 10.90$$

$$\bar{Y} = 12.32 \quad \sigma_y = 16.27$$

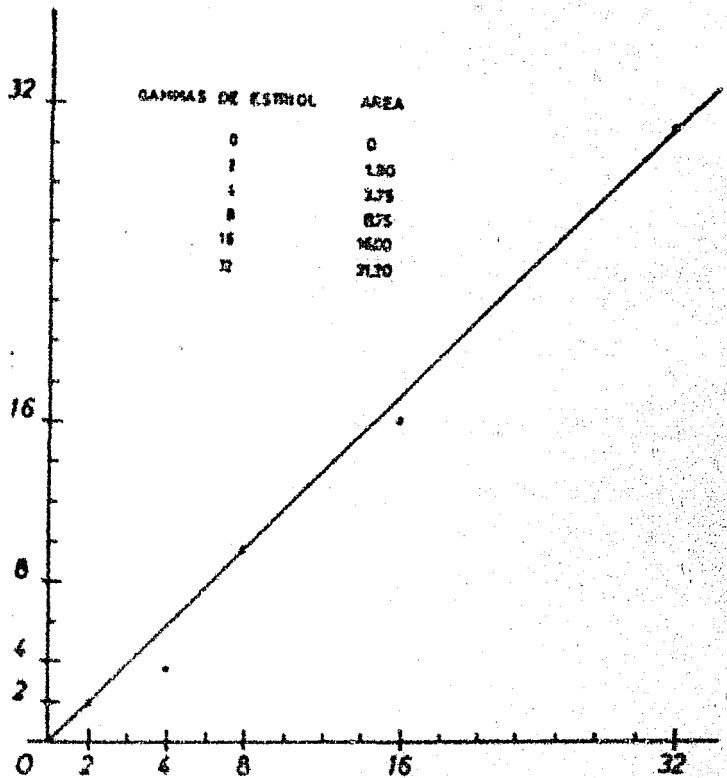
$$r = 3.673 \text{ entre } 5 = .7346$$

$$r = \frac{\frac{(X - \bar{X})}{s_X} \frac{(Y - \bar{Y})}{s_Y}}{n}$$

$$EEr = \frac{1}{\sqrt{n-1}} = \frac{1}{\sqrt{4}} = \frac{1}{\sqrt{2}} = 0.5$$

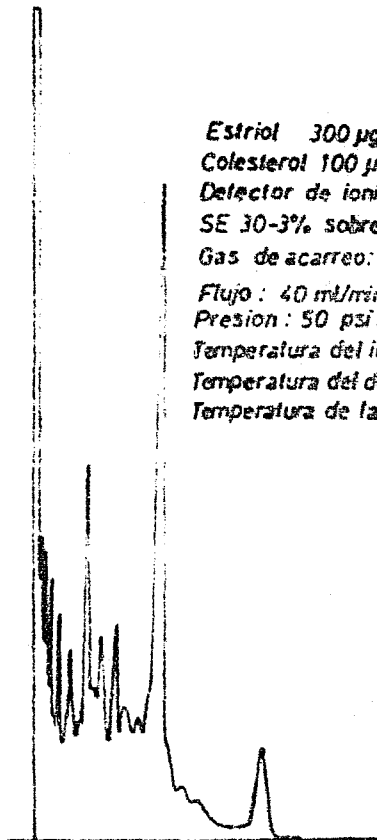
$$\frac{r}{EEr} = .7346 \text{ entre } 0.5 = 1.46$$

TABLA No. 2.



GRAFICA No.5.

CURVA DE RECUPERACION DE ESTRÍOL



Estriol 300 µg.
Colesterol 100 µg.
Detector de ionización por flama
SE 30-3% sobre chromosorb W
Gas de acarreo: Nitrogeno
Flujo : 40 ml/min.
Presión : 50 psi.
Temperatura del inyector: 325°C
Temperatura del detector: 325°C
Temperatura de la columna: 260°C

GRAFICA No.6. CROMATOGRAMA DE ESTRIOL DE ORINA DE UNA MUJER EMBARAZADA DURANTE EL ULTIMO TRIMESTRE.

CAPITULO IV

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Discusión. La eficiencia de la columna de SE 30 al 3% es buena, ya que para los compuestos empleados estril y colesterol, la altura de platos teóricos es mayor de 500 por pie de columna.

El tiempo de retención del colesterol fue de 21.9 minutos, por lo que podemos considerar que el término medio de un cromatograma será entre 22 y 25 minutos, que puede considerarse bueno para la eficiencia que se obtiene en la separación.

Para conocer las condiciones del aparato se investigó la linealidad del detector con respecto a la substancia problema, como se indica en la gráfica No. 2, existe linealidad de área del pico del compuesto y el peso del compuesto inyectado; al ser analizado por estadística $r = 1.0$, que nos indica que existe correlación positiva, es decir, que las cantidades crecientes del compuesto en peso, se acompañan de un ascenso proporcional del área y que su probabilidad por las muestras inyectadas es de $p = 0.1$, lo que a la vez nos indica que solo en una ocasión de cada cien puede darse una proporción semejante al azar.

La linealidad del electrómetro tuvo las mismas características, ya que $r = -1.0$ y $p = 0.1$ en este caso la r negativa nos indica que la relación entre área del problema y el grado de atenuación es inversamente proporcional, es decir, existe correlación negativa, a mayor atenuación menor área del problema, la probabilidad

lidad, igual que la anterior es de $p = 0.1$.

Se llevó a cabo la curva de calibración interna, con objeto de hacer menos laboriosas los cálculos y evitar algunos errores de pipeteo o de inyección de la muestra. La gráfica nos enseña la linealidad que se obtuvo, siendo analizada estadísticamente, obteniendo $r = 0.97$, indicando que la correlación es positiva, ya que al aumentar la cantidad de estriol manteniendo fija la cantidad de colesterol, la relación de las áreas obtenidas guarda relación directa con las proporciones obtenidas, siendo su $p = 0.1$. Lo cual demuestra significación estadística.

La sensibilidad de la técnica empleada se calcula teóricamente teniendo en cuenta que la cantidad apreciable de estriol en el cromatograma es de 0.2 microgramos, y teniendo en cuenta que la alícuota empleada es de $1/20$ y que el extracto final es suspendido en 20 microlitros, la cantidad mínima es de 20 microgramos en la alícuota, por lo tanto de 400 microgramos en la orina de 24 horas, siendo esta técnica útil para la dosificación de estriol a partir del primer mes de embarazo.

La especificidad del método fue probada utilizando orinas en que se supone que la cantidad de estriol en la alícuota empleada es menor de un microgramo; conociendo la sensibilidad del método, esto no deba ser detectado, y para ello se emplearon orinas de hombre, obteniendo solo en varias ocasiones un pico con el mismo tiempo de retención que el estriol, pero de área tan pequeña que queda por debajo de los límites fijados de sensibilidad. Por lo que respecta a las muestras de mujer embarazada que fueron previamente cromatografiadas por placa fina, recibieron una menor cantidad en el cromatograma que aquellas que no recibieron este tratamiento, pero esto puede ser debido a la pérdida que sufre el compuesto

bo la cromatografía en placa fina y no a la eliminación de un compuesto que llevara el mismo tiempo de retención.

La precisión del método fue investigada al llevar a cabo la determinación en alícuotas de una orina de mujer embarazada, en la tabla No. 1 representando el análisis estadístico de las muestras, en donde se encuentra que la variabilidad del método es de 3.2%, que podemos considerar alta, pero no para la técnica de cromatografía en gas en sí, sino al método de purificación empleado, ya que al usar de la silitación, la suspensión e inyección de la muestra es atenuada al mínimo al usar la curva de calibración interna; las condiciones del aparato, como la linealidad del detector y del electrómetro no tendrían importancia en esta variación.

La exactitud se conoció llevando a cabo la recuperación de estríol -- en una orina de hombre a la que se añadieron diferentes cantidades de estríol, la curva de recuperación mostró linealidad, no obstante el análisis estadístico demostró correlación positiva de $r = 0.70$, con $p = 0.2$, que nos indica que no existe correlación perfecta, nuestra recuperación fue de 80% en las alícuotas empleadas.

El empleo de la cromatografía de gas en la determinación de estríol -- en orina de mujer embarazada, tiene como ventaja la de ser más específica que las técnicas colorimétricas, siendo una desventaja el tiempo que se lleva cada determinación, por lo que para trabajo rutinario, será mejor el uso de técnicas espectrofotométricas o espectrofluorométricas sobre todo si se esperan resultados altos.

La cromatografía de gas, por el tiempo que se emplea en cada cromatograma, será utilizado en aquellas determinaciones en que sea necesario gran precisión, o en las que los valores a determinar sean muy bajos.

Conclusiones. Se considera que el método empleado en este estudio, tiene ventajas sobre otros en lo que respecta a la especificidad obtenida, pero el tiempo que se lleve en cada determinación es mucho mayor que el usado en técnicas espectrofotométricas o espectrofluorométricas; la sensibilidad es también mayor que la de las técnicas espectrofotométricas pero no a la de las espectrofluorométricas. Principalmente debido a que en las determinaciones espectrofluorométricas, se lleva a cabo en la totalidad del extracto de la alícuota y en la cromatografía de gas se usa siempre una parte de ella que siempre es menor a una décima de la alícuota.

La recuperación obtenida es muy semejante a la obtenida por otros autores, y si se recuerda esta técnica, es en sí la que se lleva a cabo en la determinación ya sea espectrofotométrica o fluorométrica.

La variabilidad del método también es semejante a otras técnicas empleadas.

La utilización de extractos crudos puede tener mayores ventajas para la determinación de estril en embarazo sobre todo cuando se esperan valores, es decir entre el 2o. y 3er. trimestre de embarazo.

CAPITULO V

RESUMEN

El objeto del trabajo fue probar una técnica para la determinación de estriol en orina de mujer embarazada, introduciendo para la determinación la cromatografía de gas-líquido.

Se hizo una somera revisión de los principales conocimientos teóricos y prácticos de la cromatografía de gas-líquido, y fue seguido por la discusión de la estructura, biosíntesis, regulación, secreción, transporte en el plasma, catabolismo, conjugación y eliminación del estriol durante el embarazo.

El experimento consistió en aplicar una técnica de extracción semejante a los usados para la determinación de estriol, para ser determinados por otros métodos, a la que se le añadió la determinación por cromatografía de gas y en la que se estudió; la sensibilidad, exactitud, precisión y especificidad.

Se obtuvo una precisión y exactitud semejante a las obtenidas por otros métodos, no así la sensibilidad que fue superado por la fluorimetría, pero debe tomarse en cuenta que no fue usada la máxima sensibilidad del aparato por considerar que el extracto no era totalmente puro. La especificidad es mayor que en otros métodos empleados, sobre todo cuando se lleva a cabo la determinación en muestras que contienen cantidades muy pequeñas.

Las conclusiones a que se llegaron fueron que para la ~~cromatografía~~

de gas en la determinación de estriol de orina de embarazo, deberán usarse extractos más crudos con objeto de compensar el tiempo empleado en obtener el cromatograma.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Adlercreutz H.: Biochemical and Clinical Aspects of the Enterohepatic Circulation of Oestrogens.
Acta Endoc. (K.B.H.) Supp. 124; 101; 1967.
- 2.- Adlercreutz H., A. Salakangas and T. Lukkainen; Measurement of Oestrogens in Biological Material in: *Memoirs of the society for Endocrinology* No. 16, - 89, 1967.
- 3.- Adlercreutz H., A. Suarbord and A. Anberg; Recurrent Jaundice in Pregnancy II, A Study of the Oestrogens and their Conjugation in late Pregnancy.
Amer. J. Med. 42, 341, 1967.
- 4.- Beling G.C.; Gel Filtration of Conjugated Urinary Oestrogens and its Application in Clinical Assay.
Acta Endoc. Supp. 79, 43, 1963.
- 5.- Berman A., M. Kalchman G., C., Chattoaj S. C. and Scommegna A. Relation of Amniotic Fluid Estriol to Maternal Urinary Estriol.
Amer. J. Obst. and Gynec. 100, 15, Jun. 1968.
- 6.- Bolté E., Mancuso E., Erickson G., Wiqvits N. and Diczfalusy E. Studies - on the Aromatization of Neutral Steroids in Pregnant Women II.
Acta Endocr. 45, 560, 1964.
- 7.- Bolté E., Mancuso S., Erickson G., Wiqvits N. and Diczfalusy E. Studies - on the aromatization of Neutral Steroids in Pregnant Women I.
Acta Endocr. 45, 537, 1964.
- 8.- Bolté E. Mancuso S. Erickson G., Wiqvits N., and Diczfalusy E. Studies - on the Aromatization of Neutral Steroids in Pregnant Women.
Acta Endocr. 45, 560, 1964.
- 9.- Brown, J.B.: The Relationship between Urinary Oestrogens and Produced in the Body.
J. Endroc. 16, 202, 1957.
- 10.- Bradshaw, T. E. T. Jessopp, W. J. E.: The Urinary Excretion of Oestrogens and Pregnanediol at the and During the Early Puerperium.
Acta Endocr. 60, 450, 1964.

- 11.- Brooks C. J. W. and Zabkiewicz J. A.: *Gas Chromatography Hormones in -- Blood.*
Edit. C. H. Gray Vol. 2, 1967.
- 12.- Brown, J. B.: *Urinary Excretion of Oestrogens During Pregnancy, Lactation -- and Reestablishment of Menstruation.*
Lancet. 1, 704, 1956.
- 13.- Brown J. B.: *A Chemical Method for the Determination of Oestrial, Oestrone and o Estradiol in Human Urine.*
Biochem. J. 60, 185, 1965.
- 14.- Corona T. Leonidas Dr.: *Bioquímica Clínica de las Hormonas Esteroides.*
Editora Zig Zag, S.A. Santiago de Chile 1956.
- 15.- Diczfalusy, E. and S. Troon, P.: *Endocrine Functions of the Human Placenta.*
Vitam. and Horm. 19, 229, 1961.
- 16.- Echaute W. and Demaster G.: *Fluorimetric Determination of Total Estrogens - after Gel Filtration of Enzymatically Hidrolyzed Urine.*
J. Endroc. 25, 142, 1963.
- 17.- Eik-nes K. B. and E. C. Horning.: *Gas Phase Chromatography of Steroids.*
Springer Verlag New York Inc. 1969.
- 18.- Eik-nes K. B. and Hall P. F.: *Secretion of Steroid Hormones in Vivo. Vitamins and Hormones.*
Acad. Press. Vol. 23, 199-200, 1965 New York and London.
- 19.- Forsham P. H. and Melmon K. L.: *The Adrenal Cortex, Textbook of Endocrinol.*
Edit. Williams R. H. W. B. Saunders Co. 1969.
- 20.- Frandsen V. A. and Stakemann G.: *Determination of Urinary Estriol Excretion in Early Pregnancy.*
Acta Endocr. 44, 196, 1963.
- 21.- Frandsen V. A. and Stakeman G.: *Determination of Urinary Estriol Excretion in Late Pregnancy.*
Acta Endocr. 44, 202, 1963.
- 22.- Frandsen V. A. and Stakeman G.: *The Site of Production of Oestrogens Hormones on Human Pregnancy III.*
Acta Endroc. 47, 265, 1964.
- 23.- Gallagher T. F., Fukushima D. K., Naguchi S., Fishman J., Bradlow H. L., Cassoute J., Zumoff B., and Helman Icon.: *Recent Studies in Steroid Hormone Metabolism in Men. Recc. Prog. Horm. Res.*
Edit. Pincus G. Acad. Press. N. Y. London 1965.

- 24.- Gurrpide E., Mc Donald P., C., Vander Welle, R. L. and Lieberman S.: -- Measurement of the Rates of Secretion and Peripheral Metabolism of two Interconvertible Compounds: Dehydroisandrosterone-Dehydroisandrosteredione. *J. Clin. Endocr. Metab.*, 23, 346-354, 1963.
- 25.- Greene J. W. and Touchstone J., C.: Urinary Estriol as an Index of Placental Function. *Amer. J. Obst. and Gynec.* 85, 1, 1963.
- 26.- Hammerstrand K.: and E. J. Bonelli: Derivative Formation in Gas Chromatography. *Varian Aerograph*, 1968.
- 27.- Hammerstrand K.: Gas Chromatographic Analysis of Steroids. *Varian Aerograph* 1967.
- 28.- Jost A., Problems of Fetal Endocrinology; The Adrenal Glands *Rec. Prog. -- Harm. Res.* Edit. Pincus G., Acad. Press. N. Y. and London 1965.
- 29.- Levitz, M., and Dancis, J.: Transfer of Steroids between Mother and Fetus. *Clin. Obst. and Gynec.* 6, 62, 1963.
- 30.- Lisboa B. P. and E. Diezfalusy.: Separation and Characterisation of Steroid - Oestrogens by Means of Thin-layer Chromatography. *Acta Endocr.* 40. 60, 1962.
- 31.- Lukkainen T. W. J. A. Vanden Heuvel, E. O. Haacht and E. C. Homing.: - Gas Chromatographic Behaviour of Trimethylsilyl ethers of Steroid. *Biochem. Biophys. Acta*, 52, 599, 1961.
- 32.- Mancuso, Benagiano G. Dell' Acqua, Shaperom, Wqvist N. and Diezfalusy - E.: Studies on the Metabolism of C-19 Steroids in Human Foeto-Placental. *Acta Endocr.* 57, 208, Julio 1968.
- 33.- Mc Donald P. C. and Siiteri P. K.: Study of Estrogen Production in Women with Hydatidiform Mole. *J. Clin. Endocr. Met.*, 24, 685-690, 1964.
- 34.- Mc Nair M. H. and E. J. Bonelli: Curso Básico de Cromatografía de gas. *Varian Aerograph* 1966.
- 35.- Nichols J., An Encephaly: Geographic Incidence Etiology and Hormonal Relations of the Pituitary and Adrenal Cortex. *An Introduction to Clinical Neuroendocrinol.* Edit. E. Bajusz, The Williams and Wilkins Co. Baltimore USA. 1967.

- 36.- O-Donnell V. J. and Preedy J. R. K.: *The Oestrogens, Hormones in Blood.*
Edit. Glt. Gray Vol. 2, 1967.
- 37.- Paulsen C. and M. D. Alvin: *Estrogen Assays in Clinical Medicine Basis and -
Methodology* Seattle.
University of Washington Press.
- 38.- Patti A. A., P. Bonanno, T. F. Frawley and A. A. Stein: *Preliminary Studies
on the Application of Gas Phase Chromatography to Separation and Identification
of Steroids in Biological Fluids.*
Springer Verlag New York Inc. 1969.
- 39.- Preedy J. R. K.: *Estrogens Method in Hormone Research.*
Edit. R. F. Dorfman, Acad. Press. N. Y. and London 1962.
- 40.- Scommegna A.: *Pregnancy Estriol and its Clinical Significance.*
Year Book of Obst. and Gynec 1967-1968 PP. 267-283.
- 41.- Schinler A. E., M. C. Lindberg and W. L. Herrmann: *The Measurement of Es-
triol in Urine and Amniotic Fluid by Gas-Liquid Chromatography. Gas Chromo-
tography of Steroids in Biological Fluid.*
Edit. Mortimer B. Lipsitt. Plenum Press. N. Y. 1965.
- 42.- Smith W.O. and Ryan K.J.: *Biosynthesis of Estrogens by the Human Ovary the
Conversion of Androstenedione 4 C-14 to Estrone and Estradiol in High Yield.*
Endocrinol 69: 869; 1961.
- 43.- Soffer L. J., Dorfman R. I. and Gabilova J. L.: *The Human Adrenal Gland.*
Lea and Febiger, USA 1961.
- 44.- Storch de Gracia A. J. M. *Fundamentos de la Cromatografía de Gases.*
Edit. Alhambra, S.A. Madrid, Buenos Aires, México 1968.
- 45.- Sweeley C. C. and E. C. Horning: *Microanalytical Separation of Steroid by
Gas Chromatography.*
Nature 197, 114, 1960.
- 46.- Touchstone J. C., *Gas Chromatography of Estriol in Pregnancy Urine. Gas --
Chromatography of Steroids in Biological Fluids.*
Edit. Mortimer B. Lipsitt. Plenum Press. Y. Y. 1965.
- 47.- Von Baelen H., W., Heyns, and P. de Moor: *Measurement of Urinary Estro-
gens Using Absorption on Sphadex.*
J. Clin. Endocr. 27, 1056, 1967.

48. - Watkins O.: Free and Conjugated Estrogens in Blood and Urine Before And --
During Parturition in Human Pregnancy.
Acta Endocr. Supp. 104, 51, 1966.
49. - Watiz H. H. and S. C. Chatteraj.: Gas Chromatography and its Role in the -
Versatile Analysis of Urinary Estrogens.
Gas Chromatography of Steroids in Biological Fluids.
Martimer B. Lipsett. Plenum Press 1965.