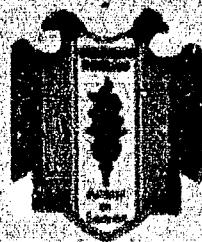


256

BIBLIOTECA DE C. QUÍMICAS



**VALORACION DE DIVERSAS REACCIONES COLORIMETRICAS Y
FLUOMETRICAS APLICABLES A LA DETERMINACION DE
ESTROGENOS EN LIQUIDOS BIOLÓGICOS**

MARGARITA LILI NAVARRO HERNANDEZ.



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

U. N. A. M.

**VALORACION DE DIVERSAS REACCIONES COLORIMETRICAS Y
FLUOMETRICAS APLICABLES A LA DETERMINACION DE
ESTROGENOS EN LIQUIDOS BIOLÓGICOS**

T E S I S

Que para obtener el título de:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
p r e s e n t a:

MARGARITA LILI NAVARRO HERNANDEZ.

México, D.F.

1963

A mi mamá

A la memoria de mi papá

*Agradezco a la Dra. Angélica Salas y al
Dr. Adolfo Rosado su valiosa dirección en esta tesis.*

*Se agradece a la Dirección y a la Oficina de
Enseñanza del Hospital de Oncología del Centro
Médico Nacional del U. M. S. S. por
las facilidades otorgadas en la realización
de este trabajo.*

CAPITULOS

- I.- INTRODUCCION
- II.- COLORIMETRIA DE ESTROGENOS
Antecedentes Históricos
- III.- FLUOROMETRIA DE ESTROGENOS
Antecedentes Históricos
- IV.- MATERIAL Y METODOS
- V.- PLANEACION Y DESCRIPCION DE TECNICAS
- VI.- RESULTADOS Y DISCUSION
- VII.- RESUMEN Y CONCLUSIONES
- VIII.- BIBLIOGRAFIA

+ + + + +

INTRODUCCION

Existen numerosas pruebas para estudiar la función estrogénica del ovario, pero la mayoría de ellos proporcionan malos resultados por inexactitud. Sin embargo se necesita con urgencia el desarrollo de una prueba simple, exacta, -- sensible y económica para estudiar esta función ovárica, -- puesto que las ocasiones en que tal prueba sería útil son -- al mismo tiempo numerosas e importantes: Ver.

Los síndromes hipogonadales, desde la disgenesia gonadal hasta la infertilidad pasando por toda la gama de amenorreas e hipomenorreas.

El solo problema de la infertilidad por sí mismo requiere actualmente de la posibilidad para estudiar correctamente la función estrogénica del ovario.

En el aborto habitual, y en todo el conjunto de casos que comprende la pérdida del feto in utero en el embarazo avanzado.

En la hemorragia uterina funcional.

En los tumores funcionantes del ovario.

En el síndrome menopáusico, especialmente como un método de investigación en los procesos de osteoporosis, aterosclerosis, enfermedad coronaria y disminución de la capacidad mental, que actualmente tienden a ligarse con la menopausia, puesto que actualmente se reconoce que un 20% de -- mujeres parecen requerir una indefinida ingestión de esteroides para protegerlas de estas enfermedades metabólicas.

El establecimiento de valores normales de estrógenos, perfectamente definidos, en este período, permitiría una mejor evaluación de los casos.

En la cirugía supresiva para el tratamiento de tumores mamarios considerados hormonodependientes. La coforectomía y adrenalectomía, procedimientos que producen regresión en un buen número de casos avanzados de cáncer metastásico de la mama, deben estar basados en el conocimiento fidedigno de los niveles de estrógenos en suero y líquidos biológicos. Puesto que la mayoría de los casos de cáncer mamario se presentan en mujeres post menopausia es necesario un método que permita medir niveles de estrógenos muy pequeños.

Los resultados de Cleveland (24) indican que utilizan do los métodos de Brown (15) y Bauld (6) se pueden demostrar la presencia de estrógenos en orina aún después de coforectomía, adrenalectomía o hipofisectomía.

En el Hospital de Oncología del I. M. S. S., donde el manejo de este tipo de enfermos es frecuente, se trató de montar una técnica a la vez fácil y sensible que permitiera determinar niveles muy bajos de estrógenos en orina, para evaluar la terapéutica indicada y la respuesta clínica.

Las pruebas habitualmente utilizadas en el Laboratorio de Hormonas de este Hospital para estimar el nivel estrogénico son la citología vaginal funcional y la Hormona Estimulante del Folículo, haciéndose uso, cuando así se requiere, de la biopsia endometrial, el estudio de la arborización del moco cervical, y particularmente en niños, el estudio

de la edad osea.

Todas ellas son pruebas indirectas basadas en el mecanismo de acción de los estrógenos y poseen todos los inconvenientes de los métodos indirectos.

Existen 2 principales métodos que miden directamente - los niveles de estrógenos: El biológico y el químico. En el método biológico se estudian los cambios producidos en - las células vaginales de los animales de laboratorio, parti - cularmente cuyos y ratas, después de la administración paren - teral de fluidos biológicos que contienen estrógenos.

El método químico, particularmente aplicado al estudio de estrógenos urinarios, a priori podría dar mejores resulta - dos puesto que, en primer lugar pueden determinarse los co - trógenos individualmente, es más sensible y específico, más barato y sin los inconvenientes que representa el trabajar - con animales.

El método químico para la determinación de los estróge - nos, comprende 4 procedimientos distintos.

- 1).- Hidrolisis,
- 2).- Extracción y purificación,
- 3).- Separación de los estrógenos,

4).- Cuantificación final.- La parte más importante de la valoración y que generalmente se lleva a cabo por métodos fluorométricos y colorimétricos.

La presente tesis es un estudio de las reacciones colo - rimétricas y fluorométricas comunicadas hasta la fecha, con el propósito de encontrar la más fácil y útil para la deter -

minación de estrógenos; se trató de encontrar la técnica o alguna modificación de las técnicas conocidas, que permitiera la medición fácil, exacta y reproducible de cantidades - pequeñas de estrógenos individuales.

* * * * *

COLORIMETRIA DE ESTROGENOS.

Reacción de Kober.

En 1929, el mismo año del aislamiento de la estrona simultáneamente por Doisy trabajando en Estados Unidos, y Rutemann en Alemania, Wieland trabajando con estrona encontró que la sustancia mostraba fluorescencia en presencia de ácido sulfúrico concentrado.

Kober en 1931 (36) repitió la observación y encontró -- por un afortunado accidente que la fluorescencia verde-amarillenta, de la solución obtenida por calentamiento de la estrona con ácido sulfúrico se transformaba en rosa por dilución con agua. El recomendó realizar la reacción en tres pasos: Calentamiento inicial con ácido sulfúrico concentrado, recalentamiento después de la dilución con agua, y dilución final con agua para obtener el volumen necesario para colorimetría. En la primera parte utilizó fenol que disminuye la fluorescencia y simplifica la medición del color final.

Desde entonces otros investigadores han introducido modificaciones diversas a la reacción, y en el momento actual, ésta puede considerarse realizada en dos etapas: La primera consistente en la formación de un pigmento amarillo por calentamiento de los estrógenos con ácido sulfúrico, este pigmento amarillo además presenta una intensa fluorescencia, -- que ha sido utilizada para la determinación fluorométrica de los estrógenos.

La segunda fase consiste en la adición de agua. La solución se calienta para producir la transformación del color amarillo a

rosa, base de las determinaciones colorimétricas.

Las condiciones de cada una de las etapas de esta reacción han sido minuciosamente estudiadas por un gran número de investigadores. De sus trabajos es posible obtener las siguientes consideraciones.

a).- Concentraciones de ácido sulfúrico.- Mientras Wigland en 1929, Kober en 1931, Cohen en 1934, Yenning en 1937, y Szogo 1940 utilizaron ácido sulfúrico concentrado (51), en 1943 (52), emplea un ácido al 83% en etanol. Brown en 1955 (14) demostró la importancia de la presencia de agua en la primera parte de la reacción encontrando que existían diferencias significativas en el comportamiento de los tres estrógenos principales (estrona, estradiol y estriol) dependiendo de la cantidad de agua en la reacción cada uno de ellos presenta la mayor intensidad del color producido a una concentración específica y estrecha de ácido sulfúrico siendo éstas 66% para la estrona, 60% para estradiol y 76% para estriol.

Siguiendo estas indicaciones la mayoría de los autores posteriores han utilizado estas concentraciones, sin embargo algunos han discrepado en sus observaciones, así Ittrich (31) señala que las concentraciones de ácido sulfúrico óptimas son: 52% para estradiol y 68% para estrona y estriol.

Nocke en 1961 varía las concentraciones de 40 a 100%, sus resultados coinciden con los obtenidos por Brown en 1955, a excepción del reactivo para estradiol que es de 55%.

b).- Además de la concentración de ácido sulfúrico también el tiempo de calentamiento de esta fase de la reacción parece ser de suma importancia para obtener los mejores resul-

tados. Desde Kober todos los autores son de opinión que la temperatura de ebullición del agua es la más conveniente, pero mientras Brown recomienda 20 minutos de calentamiento para los tres estrógenos Szego utilizó 3 minutos para la estrona, y seis minutos para estradiol (50) y posteriormente solo -- Ittrich decide utilizar un tiempo de calentamiento de 40 minutos. De los estudios cinéticos de Hocke se desprende que la intensidad del color producido es independiente del tiempo de calentamiento entre 10 y 50 minutos.

c).- Presencia de un agente reductor.- Ya desde 1931 -- Kober trató de disminuir la fluorescencia del color amarillo añadiendo un agente reductor él utilizó fenol. Szego utiliza ácido guayacolsulfónico, Cohen y Marrian emplean alcohol etílico y Venning ácido fenolsulfónico.

Brown en 1952 (13), (14) estudia sustancias reductoras con diferentes potenciales de oxidación, y encuentra que una mezcla de sulfato férrico y ferroso con un potencial de oxidación mayor de 0.75 no es útil, porque destruye fácilmente el color rosa de la segunda parte de la reacción; el ácido arsénico con un potencial de oxidación de 0.57 tampoco es -- útil porque aunque permite la producción total de color amarillo, impide su conversión al rosa; encuentra que el quinol con un coeficiente de oxidación de 0.70 es el mejor.

Baule en 1954 estudió las posibles causas por las que -- el poder reductor del reactivo podía verse disminuido. Estas causas son la sulfonación del reactivo, y presencia de -- agentes oxidantes como son los residuos de los extractos uri narios y de los solventes orgánicos. Consecuentemente encon

tró que sólo los valores de estriol se veían disminuídos por estas circunstancias, añadiendo que en el estriol es necesario prevenir una reacción altamente oxidativa, sino que sólo se permita una deshidratación a estrona, según lo anotado -- por Szego (50).

Todas las anteriores condiciones se refieren a la primera etapa de la reacción, o sea al desarrollo del precursor - del color rosa, en esta segunda etapa se estudiaron las condiciones óptimas para el desarrollo del producto rosa final.

d).- Dilución final del ácido.- Mientras Szego (51) encuentra como condiciones adecuadas para esta segunda etapa de la reacción una concentración de 22%, Brown en 1952 agrega agua afirmando que una dilución moderada del ácido permite la conversión del color amarillo a rosa y que las diluciones muy altas producen desaparición del color. En 1955 encontró que las concentraciones adecuadas era: 56.7 por ciento para la estrona, 56.6 para estradiol y 57% para estriol. En 1960 utilizó estas mismas concentraciones para una micro-determinación de estrona con un volumen final de 1.1 mililitros. En este mismo año Roy (43) utiliza la décima parte de los reactivos empleados por Brown en 1955 y obtiene las mismas concentraciones óptimas de ácido sulfúrico.

En 1956 Bauld encuentra diferentes concentraciones para ácido al final de la reacción teniendo valores de 63% para estrona, 59% para estradiol y 45% para estriol, sin embargo sus resultados en Densidad Óptica son menores que las de -- otros autores.

esta segunda fase, desde el 30 hasta el 76% para estriol, del 30 al 60% para estrona y desde el 30 al 66% estradiol. Encontró que para la estrona cuando se lleva a una concentración de 57% tal y como la había indicado Brown, la conversión al color rosa era incompleta pues en la curva de absorción se presentaba un pico a 465 milimicrones; lo mismo sucedía si se llegaba al final de la reacción con una concentración de 66% (sin diluir); cuando empleó una concentración del 31% todo el color amarillo pasó al rosa pero este color era inestable; se consideró entonces que era necesario un término medio que permitiera el cambio de color y que al mismo tiempo éste fuera estable. Señaló que la concentración adecuada era de 143.4% para estrona, 48.1% para estradiol y 49.8% para estriol.

e).- Recalentamiento.- La mayoría de los autores recalientan después de la dilución del ácido a excepción de Bachman.

Cohen en 1934, en esta segunda parte de la reacción recomienda calentar hasta la formación de un color rosa.

Brown (14) establece que la temperatura debe ser de 100 grados y el tiempo óptimo es de 10 minutos. Los demás autores utilizan el mismo tiempo a excepción de Hauld que utiliza 15 minutos (8), e Ittrich que desarrolla color a cero grados centígrado durante tres minutos.

f).- Presencia de oxidantes.- Cohen en 1934 encontró que si esta segunda fase de la reacción se realizaba a temperatura ambiente en presencia de un agente oxidante se aceleraba la conversión al rosa.

hidrógeno o sulfato férrico se desarrolla el color en uno o dos minutos, el hecho de que los agentes oxidantes tengan efecto acelerador hace pensar que esta parte de la reacción es un proceso oxidativo.

Bauld (8) añade nitrato de sodio en la preparación de los reactivos para proveer material oxidante, a diferencia de los demás autores que consideran suficiente la presencia del quinol en la primera parte de la reacción y en la segunda de sus productos de oxidación.

g).- Dilución final.- La dilución del color rosa después de desarrollado fué hecha por Kober (36) en 1931 agregando agua, más tarde en 1938 emplea un ácido 65%; Cohen y Marrian en 1934 usan un ácido sulfúrico al 5% y Venning usa un ácido al 10%, en 1952 Brown indica que la concentración óptima es de 50-60%, los demás autores omiten este paso considerando que existe disminución del color, y menor estabilidad si se sigue.

Eliminación de las lecturas de cromógenos no específicos en la cuantificación de los Estrógenos.

Kober en 1938 observó que el color de los estrógenos (rosa) desaparecía si se agregaba agua oxigenada, Stevenson hizo la misma observación cuando calentó en agua hirviendo durante hora y media, después de obtener el color rosa (48), Jayle logra la desaparición del color específico producido por los estrógenos con la adición de acetona (35); estas observaciones han llevado a concluir por una parte que la desaparición del color es un proceso oxidativo, y por otra parte se han utilizado para diferenciar el color específico de

los estrógenos haciendo una primera lectura con el color rosa y otra después de la desaparición del mismo, con lo cual sacando diferencia se hace una cuantificación más exacta. Jayle afirma que este procedimiento no es conveniente cuando se trabaja con menos de 2 microgramos por mililitro de reactivo.

Otra manera de dar especificidad a las lecturas es la aplicación de ecuaciones para corregir el color no específico, hizo las curvas de absorción de la sustancia estudiada, y de sus cromógenos; se resta la lectura de los segundos en su máxima absorción, de la lectura de la sustancia problema en las mismas condiciones.

Este tipo de corrección fué utilizado por Venning y Stimmel (47) leyendo en 420 y 520 milimicrones; sin embargo esta clase de corrección requiere que se conozca previamente la proporción del cromógeno que siempre varía de una muestra a otra ya sea de orina o de plasma.

Allen en 1950 (3) considerando la proporcionalidad de las curvas de los cromógenos aplica una fórmula de corrección con la cual se logran progresos importantes.

$$DOX_x = DOx - \frac{DOa}{2} \frac{DOb}{x}$$

En donde DOx es la densidad óptica máxima del estrógeno a una longitud de onda x.

DOa y DOb son las densidades ópticas en las longitudes de onda a y b, que son equidistantes de x.

DOXx es la densidad óptica calculada del estrógeno con máxima absorción en la longitud de onda x.

A partir de entonces todos los autores utilizan la fórmula

la de Allen para corregir las lecturas en colorimetría.

Ittrich en 1958, tratando de eliminar los cromógenos que en los extractos urinarios restan especificidad al método extrae selectivamente el color rosa con una solución de cloroformo para nitrofenol con lo cual además aumenta la intensidad de la densidad óptica, y la máxima es un pico específico que le permite una mejor corrección al aplicar la fórmula de Allen.

En 1960 el mismo autor (32) estudia cuál es el derivado fenólico y el solvente más adecuado para la extracción del color: utilizando cloroformo analiza el fenol, el para y el metanitrofenol, el 2.5 dinitrofenol, y el betanaftol y el paraclorofenol, encontrándose que el paranitrofenol es el más útil. Utilizando éste último cambia los solventes y así estudia el diclorometano, cloroformo, tribromometano, tetracloruro de carbono, bromoetano, dicloroetano, tetracloruro de etileno, tetrabromuro de etileno, concluye que éste último es el más sensible y que da mayor estabilidad a la reacción.

Bradshaw en 1961 extrae el color con cloroformo, reporta estabilidad de únicamente media hora, la primera parte de la reacción la realiza con ácido tricloroacético en lugar de agua.

FLUOROMETRIA DE ESTROGENOS.

La observación hecha en 1929 de que los estrógenos calentados con ácido sulfúrico producían fluorescencia quedó en el olvido hasta que después de la segunda guerra mundial, se desarrollaron instrumentos para medirla.

Los estrógenos producen fluorescencia aún en pequeñas cantidades y la intensidad de la misma puede relacionarse a la concentración del esteroide, lo que permite utilizar la fluorescencia como método de cuantificación de los mismos.

En 1947 Jailer (34) desarrolló un método que consiste en usar 8 mililitros en ácido sulfúrico al 60%, agregando 1 mililitro de alcohol metílico en tubos que contenían 0.025 gammas de cada uno de los estrógenos, después de calentar en baño maría durante 5 minutos, se enfriaron los tubos y se leyó en un fotofluorómetro Coleman modelo 18, existiendo una relación lineal entre la concentración del estrógeno y las lecturas en el galvanómetro. Realiza la lectura empleando filtros para tener una luz de excitación de 436 milimicrones; sus resultados tienen relación con los métodos biológicos.

Bates y Cohen en 1950 señalan que para la utilización del método fluorométrico en la determinación de estrógenos hay que considerar dos aspectos: (4), (5).

1.- Se necesita la máxima cantidad de compuesto capaz de fluorecer.

2.- La necesidad de tener instrumental adecuado para medir la fluorescencia.

En el primer punto deben considerarse diferentes aspec--

tos:

a).- Efecto del solvente.- En el desarrollo de la reacción de Kober se especifica que es necesario evaporar los solventes, en el desarrollo de fluorescencia no es necesario, -- siempre que el solvente no reaccione con ácido sulfúrico. Se estudiaron el agua, el éter etílico, metanol, etanol, dicloro etileno y acetona, concluyendo que el más adecuado era etanol agua.

b).- Cantidad del mismo.- La cantidad de etanol que se requiere es la necesaria para tener la dilución de ácido apropiado.

c).- Efecto de la concentración de ácido durante el calentamiento.- Un ácido 100% no desarrolla fluorescencia o más bien destruye la fluorescencia desarrollada, pero un ácido -- 40% no es suficiente para desarrollar fluorescencia. Concentraciones de 70 a 90% dan el máximo desarrollo de fluorescencia.

d).- Temperatura y tiempo del calentamiento.- Se encontró que existe una relación entre la concentración del ácido y el tiempo de calentamiento, para un ácido 90, 80% el tiempo óptimo era de 10 minutos, mientras que para un ácido 70% se requerían 20 minutos de calentamiento. Las temperaturas ideales para el desarrollo de fluorescencia son entre los 80 y -- 100 grados centígrados logrando mayor estabilidad a los 80 -- grados centígrados.

e).- Concentración de ácido durante la lectura de la -- fluorescencia.- La máxima fluorescencia se logra entre concentraciones de ácido 50-65%, pero la mayor estabilidad se logra

con una concentración de 70%. La fluorescencia se ve disminuida por dilución excesiva del ácido con agua y esta disminución se ve acelerada por efecto de la temperatura.

El segundo punto que se refiere al instrumental, y cuyo problema reside en la necesidad de poder seleccionar la óptima longitud de onda para excitar que no active el material - fluorescente contaminante pero sí al estrógeno; y seleccionar la longitud de onda de emisión de la sustancia estrogénica fluorescente.

Bates y Cohen (9) emplean un filtro 5970 para aislar la luz de activación a partir de una lámpara de mercurio con -- una máxima transmisión en 365 milimicrones, cuando cambiaron con un filtro que tenía una máxima transmisión en 422 no se encontró diferencia apreciable.

Para seleccionar la longitud de onda de emisión de la - estrona y estradiol emplearon un filtro con una máxima transmisión a 540, basados en los experimentos de Bierry que ha-- bía fotografiado el espectro de emisión para estrona y estradiol después de tratados con ácido sulfúrico, encontró una - banda a 575 milimicrones.

En 1950 Engel (22) leyendo la fluorescencia en un fluo- rómetro Coleman modelo 13-A asociado a un Coleman B-2 emplea ron una luz de activación a 436 milimicras y una luz de emi- sión con una máxima a 525 milimicras.

La técnica por él empleada para el desarrollo de la - - fluorescencia fué la siguiente; después de evaporar el sol-- vente del estrógeno en 0.2 mililitros de una solución etanol/ tolueno (1:19), se agrega 2.5 mililitros de ácido sulfúrico

90%, se enfría y se añaden 7 mililitros de ácido sulfúrico al 65%; obteniendo una curva típica de calibración cuya proporcionalidad oscila entre 0.1 a 1 microgramo. Si utiliza otros solventes no miscibles con ácido, disminuye la fluorescencia, y si emplea un ácido sulfúrico que no sea marca Dupont se pierde la proporcionalidad de las curvas.

Salunwhite en 1951 (46) realiza la reacción con diversos esteroides empleando como luz de activación 436, y 525 milimicras como luz de fluorescencia, encontró que cambiando o quitando la función oxigenada del carbono 17 causa disminución de la fluorescencia así mismo, si se introduce grupo carbonilo a la estrona y estradiol. De ello se deduce el alto grado de especificidad del desarrollo fluorescencia.

Preedy y Aitken en 1953 (2) desarrollan fluorescencia -- del mismo modo que Engel sólo que en lugar de utilizar una -- mezcla etanol/tolueno, emplean una mezcla etanol/benceno en -- la misma proporción, trabajan con diferentes longitudes de -- onda para excitar y encuentran que la mejor es de 435 milimicrones, y la emisión de la fluorescencia con esta longitud de onda es de cerca de 480 para los tres estrógenos.

Goldzieher (26) en el mismo año sugiere la posibilidad -- de leer mezclas de estrógenos por fluorometría diferencial y empleando controles, el desarrollo de fluorescencia la realiza igual que Engel leyendo en un fluorómetro Farrand con una lámpara de mercurio y el uso de diversos filtros para lograr aislar las diferentes longitudes de onda de excitación (436, 405) y para la luz de emisión emplea una longitud de onda de 470 milimicrones.

Valdhius en 1953 (52) también utilizando ácido sulfúrico observa que los residuos plasmáticos producen una coloración no específica que puede destruirse al agregar agua oxigenada y hacer cálculos similares a los hechos para la reacción de Kober eliminando el valor de los contaminantes.

Proedy y Aitken en 1961 (42) desarrollan fluorescencia con ácido sulfúrico a extractos plasmáticos y urinarios previamente tratados en una columna de partición con lo que aumentan la sensibilidad y especificidad del método, el desarrollo de fluorescencia lo realizan de manera semejante a 1953, sólo que calientan 3 minutos después de agregar 0.2 mililitros de la mezcla etanol/benceno, lo cual permite que se evaporen los solventes y elimina el error producido por los residuos de benceno y etanol.

DESARROLLO DE FLUORESCENCIA CON ACIDO FOSFORICO.

Finkelstein en 1947 (25) utiliza el ácido fosfórico para el desarrollo de fluorescencia asegurando que se logra mayor especificidad que con el sulfúrico, fija las condiciones óptimas para el desarrollo de fluorescencia a extractos urinarios: la solución etanólica de estrógenos se evapora a 110 grados, se enfrían y se añade 1.25 mililitros de ácido fosfórico al 85%; se tapan los tubos y en baño maría se dejan durante 15 minutos, agitando durante los primeros cinco minutos; las lecturas se hacen: primero utilizando 4.0 milimicrones como luz de excitación y 520 milimicrones para emisión de fluorescencia; estas condiciones son específicas para el desarrollo de fluorescencia del producto contaminante en los extractos uri-

narios, segundo, cambia el filtro para tener una luz de 365 mm. para excitar la muestra la lambda de fluorescencia es la misma; a la primera lectura la llama A, y a la segunda la llama B, el valor real del contenido estrogénico es la diferencia de B-A.

Braunsberg (13) en el mismo año realiza la reacción con ácido fosfórico, asegurando que la reacción es más específica pero menos sensible, y que puede verse influida por trazas de humedad, señala que las curvas de absorción del complejo estrogénico fluorescente indirectamente da las características de la radiación fluorescente.

Dorfman 1963 (30) aplica el método de Finkelstein a una micro determinación y logra una sensibilidad de 0.002 microgramos de estrona.

DESARROLLO DE FLUORESCENCIA CON ACIDO FORMICO.

Goldziher en 1952 (29) utilizando ácido fórmico, y haciendo las lecturas con una lámpara de mercurio, y aislando la luz de excitación con un monocromador ultravioleta Farrand adapta el galvanómetro para que 0.002 microgramos de estrona correspondan a una división de la escala. Encuentra que la fluorescencia de los estrógenos es menor que la desarrollada con otros ácidos, a excepción del 17 alfa estradiol cuya fluorescencia es el doble que la desarrollada con sulfúrico.

FLUORESCENCIA DEL COLOR EXTRAIDO DE LA REACCION DE KOBER.

Ittrich en 1958 (31) lee la intensa fluorescencia del color extraído de la reacción de Kober. Para excitar emplea

una longitud de onda de 546 milimicrones y la fluorescencia la lee en 558 milimicrones. La sensibilidad lograda es de 0.005 microgramos de estrona pura, y la especificidad aumenta pues se logran eliminar muchos pigmentos al extraer selectivamente el color.

Roy en 1962 (44) lee la intensa fluorescencia verde amarillenta del color extraído de la reacción de Kober, la extracción la realiza con una solución de paranitrofenol en tetracloreto de carbono. Las longitudes de onda empleadas son las siguientes: 540 nm. para excitar y 560 nm. para leer la fluorescencia.

Ston en el mismo año (49) utiliza para la extracción tetrabromuro de acetileno, con lo cual conserva la estabilidad de la fluorescencia, logrando determinar hasta 0.025 microgramos de estrógeno en extractos urinarios, afirmando que sus resultados son mejores que los anteriormente reportados porque en su equipo logra aislar las longitudes de onda exactamente a 540 para excitar y a 569 para fluorescencia.

Salokangas en el mismo año hace la extracción con tetracloroetano y paranitrofenol siguiendo en la primera parte de la reacción las indicaciones dadas por Brown en 1955, asegurando que la sensibilidad lograda es ocho veces mayor, aunque la primera parte de la reacción es un micrométodo la extracción la realiza con 2 mililitros de reactivo.

En general la extracción del color es un avance importante en la especificidad del método.

MATERIAL Y METODOS.

APARATOS.

Espectrofotofluorómetro "Aminco Bowman".- Está constituido de:

- 1.- Unidad óptica, compuesta por una lámpara de Xenon, - dos monocromadores, un sistema de aberturas, un recipiente de celdillas, y un tubo fotomultiplicador.
- 2.- Fuente de poder para la lámpara de Xenon.
- 3.- Microfotómetro para amplificar la corriente producida por el fotomultiplicador.
- 4.- Oscilógrafo de rayos catódicos.

La utilización de una lámpara de xenon de gran intensidad luminosa como fuente de luz, permite extender las longitudes de onda utilizables como luz de excitación hasta regiones usualmente inaccesibles para otras fuentes luminosas, haciendo factible un espectro continuo de 200 a 800 milimicrones.

El uso de 2 sistemas monocromadores da gran versatilidad al aparato permitiendo seleccionar primero un haz de luz monocromática como luz de excitación y segundo seleccionar de la luz fluorescente producida por nuestra sustancia problema un haz monocromático, el más conveniente, para excitar el tubo - fotomultiplicador. Así mismo nos permite, con gran facilidad, producir un espectro de activación y uno de fluorescencia para cada longitud de onda escogida. Estos hechos permiten al operador cuantificar concentraciones de sustancias problema -- con gran exactitud en magnitudes muchas veces menores que las requeridas para la espectrofotometría usual.

La búsqueda de las longitudes de onda máximas de activación y fluorescencia aún es más facilitada por la posibilidad de variar continuamente el espectro producido por cada uno de los monocromadores mediante la asociación a cada uno de ellos de un motor eléctrico de velocidad variable y por la utilización de un oscilógrafo de rayos catódicos conectado al amplificador del fotomultiplicador de tal manera que registra continuamente la amplitud de la corriente producida en éste, y la longitud de la luz incidente.

ESPECTROFOTOMETRO "BECKMAN MODELO D. U."

Está constituido de:

- 1.- Fuente de poder; 2.- Lámparas de tungsteno y de hidrógeno; 3.- Sistema monocromador; 4.- Compartimiento de celdillas; 5.- Fototubo.

En el sistema óptico la luz proveniente de la lámpara -- (tungsteno ó hidrógeno) es hecha paralela y enfocada mediante un sistema de espejos sobre un prisma de cuarzo donde es dispersada al refractarse formando un espectro continuo. La parte de este prisma está aluminizada y refleja el espectro producido hacia un espejo colimador que la centra, a través de un sistema de aperturas, sobre la celdilla que contiene la muestra. Después de pasar la luz a través de la muestra, incide sobre un fototubo, permitiendo el paso de una pequeña corriente eléctrica, la cual es amplificada y registrada en un galvanómetro.

La posición del prisma de refracción puede ser ajustada continuamente por el selector de longitud de onda de tal ma-

nera que sobre el espejo colimador caiga sólo un haz monocromático correspondiente a la longitud de onda preseleccionada.

CELDILLAS DE CUARZO FUNDIDO PARA FLUOROMETRIA DE 10 mm. X 10 mm. X 46 mm. CAPACIDAD DE 4.6 MILILITROS, EL VOLUMEN -- SUFICIENTE PARA UNA LECTURA CORRECTA ES DE 1 MILILITRO APROXIMADAMENTE.

CELDILLAS DE SILICA DE 10 X 10 X 46 mm.

CELDILLAS DE SILICA DE 4 X 10 X 46 mm.

REACTIVOS.

ACIDO SULFURICO "BAKER" REACTIVO ANALITICO.

ACIDO FOSFORICO "BAKER" REACTIVO ANALITICO.

ALCOHOL ETILICO "MALLINCKRODT".- Según indicaciones de Brown (15) se reflujo con lentejas de hidróxido de sodio, durante 12 horas para remover las impurezas de aldehído, se destiló dos veces.

BENCENO "MALLINCKRODT".- Un litro de benceno se reflujo durante una hora con 3 gramos de cloruro de aluminio, dejándolo en su presencia durante 24 horas, se decantó, se lavó dos veces con 250 mililitros de solución saturada de carbonato de potasio y con 250 mililitros de agua destilada, se dejó en presencia de cloruro de calcio durante toda la noche, destilándose después cuidadosamente, con este tratamiento indicado por Freedy y Aitken 1961, se eliminan las interferencias fluorescentes.

CLOROFORMO "MALLINCKRODT".- Se destiló cuidadosamente -- tres veces.

HIDROQUINONA "MALLINCKRODT".- Se recristalizó a partir de etanol caliente y el punto de fusión de los cristales obtenidos fué de 162 grados centígrados, mismo que se había obtenido antes de la cristalización. No obstante el punto de fusión señalado en la literatura es de 170 grados centígrados.

PARA-NITROFENOL.- Eastman Organic Chemicals (E. O. Ch.) reactivo analítico.

PATRONES.

Los laboratorios Syntex proporcionaron estrona y estradiol puros y los laboratorios Parke Davis facilitaron estriol puro.

Los puntos de fusión indicados para las respectivas sustancias por los laboratorios aludidos, fueron ratificados.

Además se estudió el espectro ultravioleta de estos estrógenos disueltos en etanol utilizando el espectrofotómetro Beckman. Se utilizó etanol para ajustar el aparato a 100% T, y se procuró realizar las lecturas tan rápidamente como fué posible para evitar el error producido por la evaporación del solvente.

Los espectros encontrados, coinciden con los reportados en la literatura tanto en la forma general como en las longitudes de onda máximas de absorción (280 milimicrones para el estriol y estradiol), con excepción de la estrona cuya longitud de onda de máxima absorción reportada es 283-286 milimicrones, siendo la obtenida por nosotros 281-284 milimicrones en repetidas ocasiones. No obstante esta diferencia no se consideró importante.

Las soluciones se prepararon pesando en una balanza analítica 10 miligramos del estrógeno, se disolvieron en 100 mililitros de etanol, y de ahí se hicieron las diluciones necesarias para tener:

- 10 microgramos por mililitro
- 1 microgramo por mililitro
- 0.1 microgramo por mililitro

REACTIVOS PARA COLOMETRIA.

ACIDO SULFURICO AL 76% (v/v).- Con este reactivo se prepararon soluciones al 2 y al 4% de hidroquinona p/v, para disolver el quinol fué necesario un ligero calentamiento del ácido sulfúrico.

ACIDO SULFURICO AL 66% (v/v).- Con este reactivo se prepararon de manera semejante a la anterior soluciones que contenían 1, 2, 4, 5% de hidroquinona.

ACIDO SULFURICO AL 60% (v/v).- Se prepararon soluciones que contenían 2 y 4% de hidroquinona.

ACIDO SULFURICO AL 55% (v/v).- Se prepararon soluciones que contenían 2 y 4% de hidroquinona.

SOLUCION DE PARANITROFENOL.- Se preparó poniendo 2 gramos de paranitrofenol en 1 mililitro de etanol, se agregaron 50 mililitros de cloroformo y se calentó hasta la completa disolución. Se aforsó a 100 mililitros con cloroformo.

SOLUCION DE HIDROQUINONA EN ETANOL 2% (p/v).- Las soluciones ácido sulfúrico-hidroquinona se conservaron en frascos ámbar y en la obscuridad, se procuró prepararlas cuando menos una semana antes de su uso (15).

REACTIVOS PARA FLUOROMETRIA.

ACIDO SULFURICO 90% (v/v)
ACIDO SULFURICO 65% (v/v)
ACIDO FOSFORICO 85% (v/v)
SOLUCION ETANOL/BENCENO (1:19)

CRISTALERIA.

TUBOS PYREX 10mm. x 10 cm.
TUBOS PYREX 15mm. x 12 cm.
PIPETAS DE 10 ml. GRADUADAS EN DECIMOS
PIPETAS DE 1 ml. GRADUADAS EN CENTESIMOS
PIPETAS DE 0.2 ml. GRADUADAS EN MILESIMOS
PIPETAS CAPILARES
TAPONES DE HULE NUMEROS 00 Y 0 adicionados de una -
aguja número 20, con ello se evitaba la excesiva evaporación.

LAVADO DE MATERIAL.

El material para colorimetría se lavó primero con agua -
corriente y con agua destilada. Para quitar los restos de --
material orgánico se dejó en mezcla crómica durante 24 horas.
Se lavó con agua corriente, se dejó 18 horas en sulfito de --
sodio 0.2% acidificado con ácido sulfúrico, para arrastrar --
los restos de mezcla crómica, que podrían interferir en la --
reacción colorimétrica. Por último se lavó cuidadosamente con
agua corriente y agua destilada.

El material para fluorometría se lavó con agua corriente,
con agua destilada, se dejó en ácido nítrico (50%) hirviendo -
durante 18 horas, se lavó dos veces con agua destilada. Con -

este método se logra eliminar todo el material interferente -
en la determinación fluorométrica (23).

* * * * *

PLANEACION.

COLORIMETRIA:

- 1.- Desarrollo de la reacción de Kober según Brown 1955 (15).
- 2.- Modificaciones a la anterior reacción.
- 3.- Extracción del color de la reacción de Kober según - Ittrich 1958, 1960 (31, 32, 33)
- 4.- Reacción de Kober según Hocke 1961 (40).
- 5.- Modificación a la anterior reacción.

FLUOROMETRIA:

- 6.- Desarrollo de Fluorescencia con ácido sulfúrico según Preedy y Aitken 1961 (41, 42).
- 7.- Desarrollo de Fluorescencia con ácido fosfórico (25, 35)
- 8.- Lectura de Fluorescencia del Color extraído de la - reacción de Kober según Ittrich (31, 32, 33).

DESCRIPCION DE LAS TECNICAS.

DESARROLLO DE LA REACCION DE KOBER SEGUN BROWN (15):

- 10.- A una alícuota de estrógeno conteniendo de 0.5 a 10 microgramos de su solución en etanol se le agregan 0.2 mililitros de solución de hidroquinona al 2% en etanol (4 miligramos de hidroquinona) por tubo.
- 20.- Las soluciones se dejan evaporar a sequedad calentando en baño de agua. Se hace lo mismo con uno o dos tubos que no contienen estrógenos y que se utilizarán como blancos.
- 30.- Una vez secos se agregan a cada tubo 3 mililitros -

del reactivo ácido sulfúrico-hidroquinona apropiado.

ACIDO SULFURICO 66% PARA ESTRONA

ACIDO SULFURICO 76% PARA ESTRIOLO

ACIDO SULFURICO 60% PARA ESTRADIOL

todos ellos conteniendo la misma concentración de quinol (2%)

40.- Se calientan en baño de agua hirviendo durante 20 minutos procurando agitar cada tubo por lo menos 2 veces durante los 5 primeros minutos.

50.- Al retirar los tubos del baño de agua se enfrían -- con agua corriente y una vez fríos se les añaden -- agua destilada: 1 mililitro a los tubos que contengan estríol, 0.5 mililitros a los que contengan estrona y 0.2 mililitros a los que contengan estradiol.

60.- Se mezclan bien los tubos y se calientan nuevamente en baño de agua durante 10 minutos.

70.- Se enfrían los tubos en agua corriente y se lee la densidad óptica en el espectrofotómetro Beckman, - utilizando los tubos testigos para llevar el aparato a 100; después de leer estos contra agua destilada para cerciorarse de que los blancos nunca fueran demasiado altos.

80.- Las lecturas se hacen a las longitudes de onda especificadas en el Cuadro 1, y éstas se utilizarán para aplicar la fórmula de corrección de Allen (3).

MODIFICACION A LA ANTERIOR REACCION:

La modificación introducida por nosotros se refiere al paso 3; en este caso el volumen del reactivo ácido sulfúri-

co-hidroquinona agregado fué de 1.6 mililitros del reactivo - específico para cada estrógeno sólo que en este caso la concentración de hidroquinona era de 4%, con estrona se trabajaron concentraciones de 1 a 5% de hidroquinona.

Los demás pasos de la reacción son semejantes, y puesto que la cantidad de agua destilada agregada en el paso número 5 permaneció constante, también se varió la concentración final de ácido sulfúrico-hidroquinona.

EXTRACCION DEL COLOR DE LA REACCION DE KOBER SEGUN ITTRICH.

1o.- A tubos conteniendo de 0.2 a 10 microgramos de estrógenos en solución acuosa se adiciona 1 mililitro de solución de hidroquinona al 4% en etanol - - (40 miligramos por tubo) y se deja evaporar el solvente hasta sequedad.

2o.- El residuo seco se disuelve con 0.4 mililitros de agua destilada, se colocan los tubos en un baño de agua helada y se les añade 0.75 mililitros de ácido sulfúrico concentrado agitando continuamente para evitar que se eleve la temperatura.

3o.- Se tapan los tubos con los tapones especiales ya -- señalados y se calientan a la temperatura de obullción del agua durante 40 minutos, los tapones utilizados previenen la evaporación exagerada del solvente.

4o.- Se enfrían los tubos dejándolos 3 minutos en agua - de hielo, se les añaden 1.5 mililitros de agua destilada procurando dejar resbalar el agua por las --

paredes del tubo, y se agitan sin extraerlos del baño de agua helada.

50.- Después de otros 3 minutos en el agua helada se les añade a cada tubo 2 mililitros de la solución de -- paranitrofenol en cloroformo, se agita fuertemente durante 20 segundos y se centrifuga a la temperatura ambiente a 3000 revoluciones por minuto durante 5 minutos.

60.- Se desecha la capa superior así obtenida, extrayéndola cuidadosamente con una pipeta capilar, y se lee la densidad óptica de la capa inferior en el -- espectrofotómetro Beckman.

70.- Las lecturas se hacen a las longitudes señaladas en el Cuadro 3 aplicando la corrección derivada de la fórmula de Allen.

REACCION DE KOBER SEGUN NOCKE:

10.- Las soluciones patrones son pipeteadas en tubos que contengan 0.2 mililitros de la solución etanólica -- de quinol al 2% (4 microgramos de hidroquinona por tubo) y al dejar en baño maría de agua hirviente el solvente se evapora.

20.- Se agrega a cada tubo el reactivo de ácido sulfúrico hidroquinona, 2.1 mililitro de ácido sulfúrico -- 66%-hidroquinona 2% a los tubos de estrona, 2.1 mililitro de ácido sulfúrico 55%-hidroquinona 2% al -- estradiol y 2.5 mililitros de ácido sulfúrico 60% -- hidroquinona 2% al estrich, se tapan los tubos con

los tapones especiales y se dejan en baño maría de agua hirviente durante 20 segundos, agitándolos repetidas veces (12) durante los primeros 5 minutos.

3o.- Se enfrían los tubos colocándolos en un baño de agua helada durante 5 minutos, al final de los cuales se añaden 1.1 mililitro de agua destilada a los tubos que contengan estrona y estriol y 0.4 mililitros a los tubos del estradiol.

4o.- Se calientan nuevamente en baño de agua hirviente durante 6 minutos los tubos que contienen estrona, 10 minutos los que contienen estradiol y 14 minutos los tubos de estriol.

5o.- Se ponen los tubos en agua helada por 5 minutos y después de secarlos se dejan 10 minutos a temperatura ambiente, se procede a leer en el espectrofotómetro a las longitudes señaladas y se corrigen las lecturas por la fórmula de Allen.

La modificación hecha por nosotros a la técnica consiste: En reducir todos los volúmenes del 2o. paso en adelante a la mitad y en aumentar la concentración de hidroxidona de cada uno de los reactivos del segundo paso al 4%.

DESARROLLO DE FLUORESCENCIA CON ACIDO SULFURICO:

1o.- Se utilizaron alícuotas de la solución etanólica de estrógenos conteniendo desde 0.001 microgramo hasta 1.0 microgramo, diluyendo apropiadamente ésta cuando se creyó necesario; todos los tubos se ajustaron a un mismo volumen con etanol. Al mismo

tiempo se utilizaron 2 blancos de este volumen de etanol, sin nitrógeno.

20.- Después de evaporar el solvente colocando los tubos en un baño maría de agua hirviendo, se disuelve el residuo seco en 0.1 mililitro de una mezcla etanol; benceno (1:19), se agita y se calientan los tubos en un baño de agua hirviendo durante 3 minutos.

30.- Después de enfriarse los tubos se agregan 0.2 mililitros de ácido sulfúrico 90% y se colocan nuevamente en un baño cuya temperatura debe ser 80 grados centígrados, durante 10 minutos, al final de los cuales se enfrían en agua corriente.

40.- Se agrega a cada tubo 1.4 mililitros de ácido sulfúrico 65%, se dejan en la oscuridad 35 minutos, después de los cuales se lee la intensidad de la fluorescencia producida a 490 milimicrones mediante la excitación con una luz monocromática de 440 milimicrones. Se calcula la fluorescencia relativa rogando los valores dados por el blanco.

DESARROLLO DE FLUORESCENCIA CON ACIDO FOSFORICO:

10.- Alicuetas semejantes a las utilizadas para la medición de fluorescencia con ácido sulfúrico son evaporados esta vez a 110 grados en el horno.

20.- Después de enfriarse los tubos se les agrega 1.25 mililitros de ácido fosfórico al 85% y se ponen nuevamente al horno a 110 grados durante 15 minutos.

30.- Se enfrían los tubos con agua corriente, se conser-

van al abrigo de la luz durante 20 minutos leyendo la fluorescencia a 530 milimicrones, empleando para excitar un rayo de luz de 460 milimicrones de longitud de onda.

LECTURA DE LA FLUORESCENCIA PRODUCIDA POR EL COLOR EXTRAIDO DE LA REACCION DE KOBER:

Utilizando alcuotas de 0.002 microgramos a 1 microgramo de cada uno de los estrógenos, se desarrolló la técnica de -- Ittrich señalada en el experimento 1. Se lee la fluorescencia a 560 milimicrones de la misma fase utilizada para leer -- en el espectrofotómetro utilizando una longitud de onda para excitación de 535 milimicrones, se calcula la fluorescencia -- relativa.

+ + + + +

RESULTADOS.

RESULTADOS TECNICA DE BROWN:

Brown en 1955 indica que es conveniente realizar la evaporación de los solventes en una atmósfera inerte, para evitar la oxidación de los reactivos, para probar si tal hecho influía en los resultados se hicieron 2 experimentos paralelos, en uno de ellos la evaporación se hizo en agua hirviendo con los tubos expuestos al ambiente del laboratorio y en el otro en que después de evacuar los tubos se arrastraron los vapores haciendo pasar una corriente de nitrógeno. Los dos métodos dieron resultados iguales cuando se utilizaron estrógenos puros, pero en experimentos piloto en que se trató de separar los estrógenos puros (estronea, estradiol y estriol) por medio de cromatografía en papel o columna, los resultados obtenidos al evaporar con nitrógeno fueron sensiblemente mejores, probablemente porque la gran cantidad y variedad de solventes empleados en estos procedimientos contribuyen de manera importante a elevar el nivel de impurezas que al oxidarse producen sustancias coloridas interferentes. Sin embargo como en el presente trabajo se trató sólo de encontrar una reacción colorimétrica adecuada para medir niveles de concentración bajos, por lo tanto se trabajó sólo con sustancias estrogénicas puras, se decidió hacer siempre la evaporación en baño de agua por ser más fácil y menos costoso.

Se encontró que los reactivos de ácido sulfúrico-hidroquinona cuando se utilizan recién preparados, dan resultados nulos o erráticos. Ya Brown (15) había señalado sucintamente

que se requiere que los reactivos tengan una madurez de más de 24 horas para que los resultados de la reacción sean adecuados. Bauld (6) encuentra que este procedimiento es necesario sólo para el estriol y no así para la estrona y el estradiol. Nuestros resultados están de acuerdo con Brown, pues en el caso de los tres estrógenos estudiados, la estabilidad y reproducti**u** bilidad máximas de la reacción se obtuvieron sólo con reactivos de por lo menos 48 horas de madurez. Por esta razón y puesto que los reactivos son estables indefinidamente cuando se conservan al abrigo de la luz, se decidió utilizar siempre reactivos una semana después de haber sido preparados.

Bauld (6) señaló que era necesario agregar una substancia oxidante al reactivo de ácido sulfúrico hidroquinona, para - - proveer material oxidante a la segunda parte de la reacción, la mayoría de los autores considera suficiente los productos de oxidación provenientes del reactivo ácido sulfúrico-hidroquinona, así Brown prefiere no agregar ningún agente oxidante. En vista de que los resultados de Brown son mejores que los - indicados por Bauld, nosotros decidimos no utilizar ninguna - substancia oxidante agregada al ácido sulfúrico, puesto que - las características del ácido utilizado por nosotros (Baker - Analytical Reagent) son semejantes a las del ácido utilizado por Brown (Anala R. H₂SO₄ British Drug Houses Ltd.)

Las concentraciones de ácido sulfúrico utilizadas por - nosotros para esta prueba fueron exclusivamente las señaladas por Brown (15), es decir, 66% para estrona, 60% para estra- - diol y 76% para estriol, no se consideró útil el tratar de --

cambiar estas concentraciones, pues los datos encontrados en la literatura en que se estudió este factor, son bastante concluyentes para considerarlas óptimas (6, 7, 8, 26, 43).

Para el método de Brown todos los calentamientos se realizaron con los tubos destapados; posteriormente se decidió utilizar tapones de hule atravesados con una aguja B. D. No. 20, para evitar la excesiva evaporación de los solventes.

Los resultados obtenidos siguiendo la técnica de Brown con las aclaraciones señaladas fueron las siguientes:

Se trazó la curva de absorción leyendo 10 microgramos de cada uno de los estrógenos contra un blanco tratado de manera semejante, encontrándose la máxima absorción para oestrona a 506 - 508 milimicrones y para estradiol y estrial a 508 (gráfica 1). Nuestros datos difieren pues los datos encontrados por Brown son una máxima absorción para oestrona y a 513 milimicrones, y una máxima a 514 para estradiol 17 beta.

El espectro obtenido utilizando una concentración de 5 microgramos es sensiblemente igual al obtenido por 10 microgramos, pero en cambio cuando se trabaja con cantidades menores de 1 microgramo la curva pierde sus características.

Las lecturas se corrigieron del color inespecífico leyendo las densidades ópticas a 470, 508 y 546 milimicrones y aplicando la fórmula siguiente derivada de la de Allen.

$$D.O.C. / \quad D.O. a 508 \text{ mm.} - \frac{D.O. a 470}{2} \quad D.O. a 546$$

Nuestros resultados están expresados en la figura 7 donde se grafica D. O. contra concentración de estrógenos, debe-

mos hacer notar que la pendiente de nuestras curvas es significativamente menor que la encontrada por otros autores, de -- tal modo que la D.O. correspondiente a una concentración de 10 microgramos es parecida a la de 4 microgramos señalada por otros autores.

El método en nuestras manos proporcionó una sensibilidad muy pobre, pues con 1 microgramo de estrógeno en el sistema -- las D.O. fueron de 0,016, 0,020 para estradiol y 0,012 para -- estriol, lo cual permitiría la determinación de 1 microgramo en 200 mililitros de orina, puesto que volúmenes mayores son -- muy difíciles de manejar en los procedimientos de extracción e hidrólisis, de modo que, este método sería útil sólo en aque -- llos casos en que la eliminación de estrógenos en 24 horas es mayor de 5 microgramos, y sería preferible usarlo en casos de una eliminación mayor, y sería preferible no utilizarlo sino -- en los casos de una eliminación de estrógenos en 24 horas es mayor de 5 microgramos, y sería preferible no utilizarlo sino -- en los casos de una eliminación mayor, puesto que los valores observados para 1 microgramo caen dentro del rango de medición donde el error inherente en la lectura es un máximo.

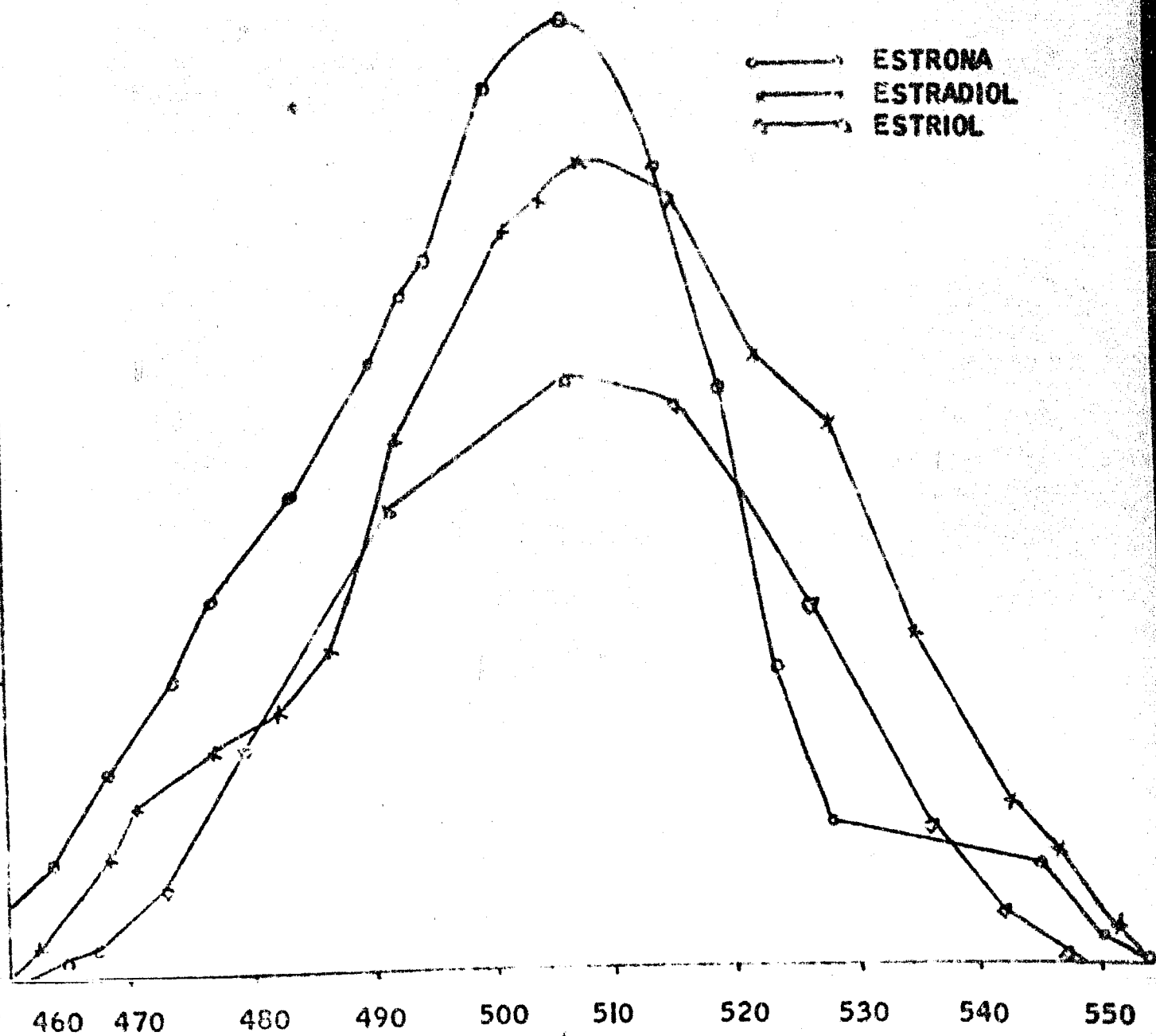
Sin embargo el método es reproducible puesto que el ran -- go de las mediciones no excedió el 10% del valor promedio lo que da una idea de su precisión, es barato, fácil de hacer, -- rápido y el color permanece estable durante 12 horas lo que -- facilita la medición en números grandes de muestras. El color además obedece la Ley de Lambert-Beer lo cual facilita la cuan -- tificación por medio de curvas de calibración obtenidas solo --

"GRAFICA 1"

CURVAS DE ABSORCION PARA 10 MICROGRAMOS DE ESTRONA,
ESTRADIOL Y ESTRIOL; SIGUIENDO EL METODO DE BROWN -
(15).

D.O

—○— ESTRONA
—●— ESTRADIOL
—×— ESTRIOL



"CUADRO 1"

DESARROLLO DE LA REACCION DE KOEER.

SEGUN BROWN 1959

1a. PARTE DE LA REACCION

ESTEROIDE	REACTIVO DE KOEER	CONC. DE AC. SULFURICO % v/v	CONC. DE QUINTOL % p/v	TIEMPO DE CALENTAMIENTO Minutos
Estrona	3	66	2	20
Estradiol	3	60	2	20
Estriol	3	76	2	20

2a. PARTE DE LA REACCION

ESTEROIDE	AGUA	CONC. FINAL DE AC. SULFURICO % v/v	TIEMPO DE CALENTAMIENTO Minutos	DESAPARICION DEL COLOR
Estrona	0.5	56.7	10	12 horas
Estradiol	0.2	56.5	10	12 horas
Estriol	1.0	57	10	12 horas

LONGITUDES DE ONDA.

	a	MILIMICRONES		D. O. CORREGIDA 10 microgramos
		x	b	
Estrona	470	506-508	546	.230
Estradiol	470	508	546	.224
Estriol	470	508	546	.145

"GRAFICA 2"

CURVAS DE CALIBRACION PARA ESTRONA, ESTRADIOL Y ESTRIOL EN LA REACCION DE KOBEL SEGUN BROWN (15). LOS VALORES DADOS SE ENCONTRARON EN DETERMINACIONES POR TRIPLICADO Y CUYO RANGO NO EXCEDIO AL 10%. LOS VOLUMENES FINALES FUERON 3.5 MILILITROS PARA ESTRONA, 3.2 MILILITROS PARA ESTRADIOL Y 4 MILILITROS PARA EL ESTRIOL. LOS VALORES DADOS EN MICROGRAMOS POR MILILITROS DEL SISTEMA SON LAS DENSIDADES OPTICAS CORREGIDAS EN LAS LONGITUDES DE ONDA INDICADAS EN EL CUADRO NUMERO 1.

LA ABCISA DA DENSIDADES OPTICAS CORREGIDAS SEGUN ALLEN (3) UTILIZANDO LA LONGITUD DE ONDA SEÑALADA EN EL - - - CUADRO 1 Y LAS ORDENADAS DAN MICROGRAMOS TOTALES EN EL SISTEMA.

+ + + + +

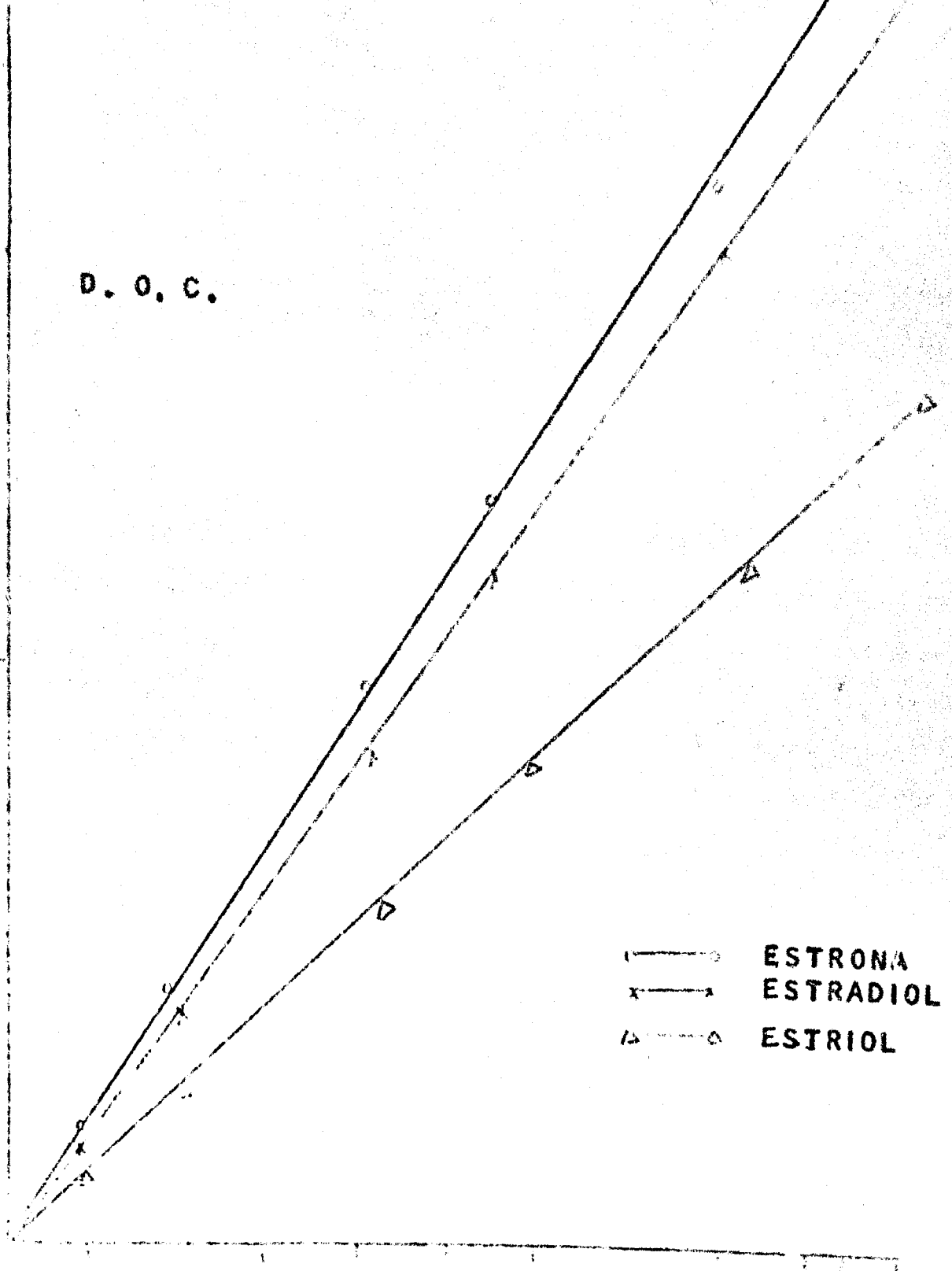
D. O. C.

00

00

—○— ESTRONA
—x— ESTRADIOL
—△— ESTRIOL

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



RESULTADOS DE LA MODIFICACION HECHA A LA REACCION DE KOBER
SIGUIENDO LA TECNICA DE BROWN (1955).

Dado lo bajo de nuestros resultados con el método de - - Brown se decidió estudiar la causa de ello. Pinnow en 1915 - había señalado que el hidroquinona en presencia de ácido sulfúrico diluido podía ser cuantitativamente sulfonado y disminuir su poder reductor. Bauld (6) repitió en parte los experimentos de Pinnow y estuvo de acuerdo con él, indicando que al perder su poder reductor, disminuía el color producido por el estríol, esta sulfonación se producía sobre todo durante la maduración del reactivo, pues con un reactivo con 2% de hidroquinona en ácido sulfúrico 76% y conservado a temperatura ambiente contiene más del 90% de hidroquinona sin modificar a las 24 horas, pero menos del 2% a las 3 semanas. Bauld entonces propone la adición de quinol fresco al reactivo de ácido sulfúrico madurado, inmediatamente antes del desarrollo de color. Siguiendo a Brown, nosotros agregamos esta hidroquinona fresca directamente a las fracciones de estrógenos antes de la evaporación de los solventes.

No obstante, decidimos estudiar cuál sería el efecto de variar la concentración de hidroquinona en el ácido sulfúrico (dato con el cual no se había trabajado experimentalmente) y así se utilizaron concentraciones del 1 al 5% en el ácido sulfúrico de la concentración indicada. Los resultados de la gráfica 4 permiten concluir que la hidroquinona al 2% no es la concentración óptima, al menos cuando se usan reactivos de

cial de la hidroquinona con una disminución proporcional de su poder reductor, y por ende de la formación del color amarillo, precursor del específico de Kober.

Por otra parte cuando la concentración de hidroquinona fué del 5%, la intensidad del color disminuye, probablemente en este caso el poder reductor fué excesivo, lo cual impide la conversión del color amarillo al rosa, puesto que Brown -- consideró (14) que este cambio se veía acelerado por la adición de agentes oxidantes.

La concentración óptima encontrada por nosotros fué del 4%.

Al mismo tiempo se decidió tratar de mejorar la sensibilidad de la reacción utilizando concentración de ácido sulfúrico finales más bajas que las señaladas por Brown (15), pero un poco más elevadas que las señaladas por Hocko (40) como -- óptimas, para tratar de hacer el color más intenso que el -- anteriormente obtenido, pero sin afectar la estabilidad del color que nos parece una de las ventajas del método. Así -- pues se utilizaron las concentraciones de ácido sulfúrico finales 50% para estrona, 53.8% para estradiol y 45.7 para estriol.

Todavía más, puesto que nuestro particular interés radica en encontrar un método que permita medir niveles muy bajos de estrógenos en orina, y otros líquidos orgánicos, decidimos reducir el volumen de todos los reactivos empleados, para obtener un semimicrométodo. El volumen final fué de 1.6 y fué leído en celdillas especiales en el espectrofotómetro Beckman.

Bajo las anteriores condiciones la sensibilidad del método aumentó aproximadamente unas 4 veces, puesto que con éste, las densidades ópticas corregidas para 1 microgramo de estrógeno fueron 0.05 para estrona, 0.05 para estradiol y 0.034 para estriol.

Los resultados están expresados en la figura 4, cada punto es el promedio de 3 determinaciones, la precisión del método no se modificó pues el rango no excedió al 10% del valor promedio.

Esta modificación nos permitiría pues medir teóricamente cantidades hasta de 2 a 4 microgramos de estrógenos en orina de 24 horas y podría ser de utilidad en algunos casos.

+ + + + +

"GRAFICA 3"

INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE HIDROQUINONA EN EL --
REACTIVO DE KOBER.

DENSIDADES OPTICAS CORREGIDAS DEL COLOR PRODUCIDO POR 10
MICROGRAMOS DE ESTRONA, Y QUE SE VEN INFLUENCIADAS POR --
LA DIFERENTE CONCENTRACION DE HIDROQUINONA EN EL REACTIVO
DE KOBER. LOS VALORES CORRESPONDEN AL PROMEDIO DE LOS --
OBTENIDOS POR TRIPPLICADO SIGUIENDO LA TECNICA CONFORME AL
CUADRO NUMERO 2.

+ + + + +

100

00

00

0

D. O. C.

ESTRONA

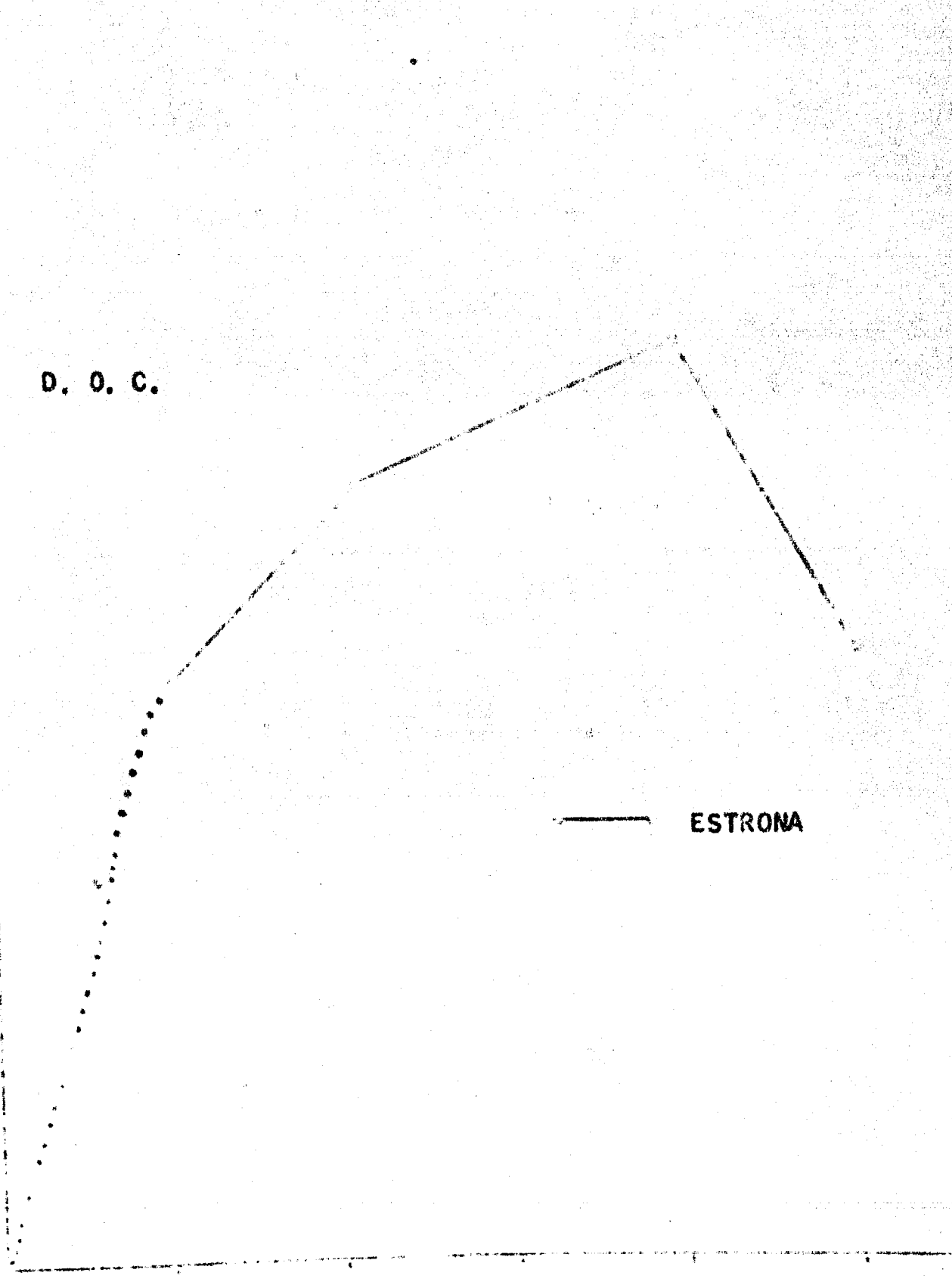
1

2

3

4

5



"CUADRO 2"

MODIFICACION A LA TECNICA DE BROWNE
PARA EL DESARROLLO DE LA REACCION
DE KOBER.

1a. PARTE DE LA REACCION

ESTEROIDE	REACTIVO DE KOBER mililitros	CONC. DE AC. SULFURICO % v/v	CONC. DE QUINOL % p/v	TIEMPO DE CALENTAMIENTO
Estrona	1.6	66	4	20
Estradiol	1.6	60	4	20
Estriol	1.6	76	4	20

2a. PARTE DE LA REACCION

ESTEROIDE	AGUA AGREGADA mililitros	CONC. FINAL DE ACIDO SULFURICO % v/v	TIEMPO DE CALENTAMIENTO minutos	DESAPARICION DEL COLOR
Estrona	0.5	50	10	12 horas
Estradiol	0.2	53.8	10	12 horas
Estriol	1.0	26.6	10	12 horas

LONGITUDES DE ONDA

ESTEROIDE	a	x	b	D.O.C. 10 microgramos
Estrona	470	506-510	546	.603
Estradiol	470	506-508	546	.382
Estriol	470	506-508	546	.330

"GRAFICA 4"

CURVAS DE CALIBRACION PARA ESTRONA, ESTRADIOL, ESTRIOL CON LA MODIFICACION A LA TECNICA DE BROWN SEGUN CUADRO 2, LOS VALORES DE LOS PUNTOS SON PROMEDIO DE DETERMINACIONES POR TRIPLICADO. EL VOLUMEN FINAL ES PARA ESTRONA 2.1 MILILITROS, PARA ESTRADIOL 1.8 MILILITROS Y PARA ESTRIOL 2.6 - - MILILITROS. LOS DEMAS DATOS COMO EN LA GRAFICA 2.

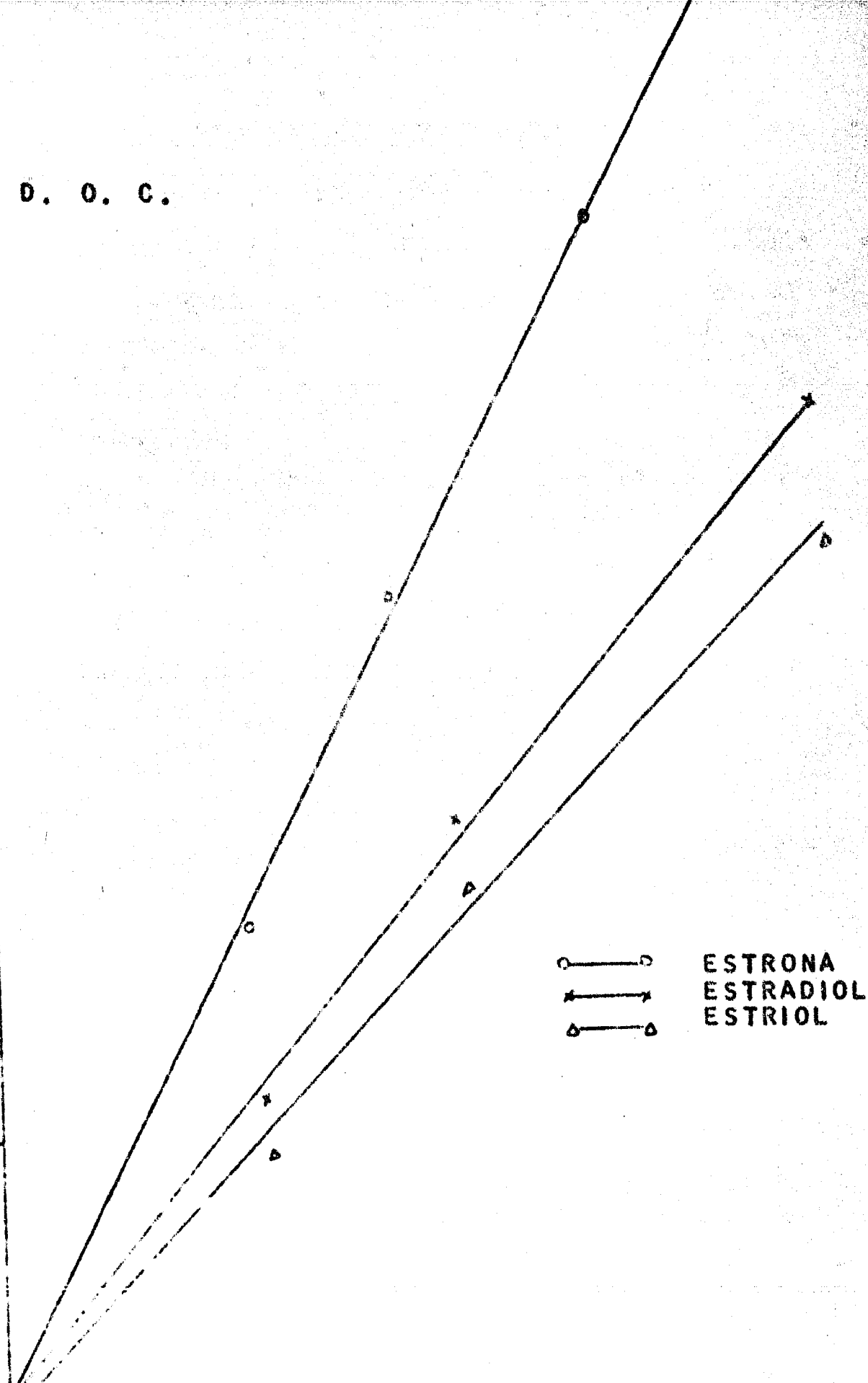
+ + + + +

D. O. C.

.500
.400
.300
.200
.100

○ — ○ ESTRONA
× — × ESTRADIOL
△ — △ ESTRIOL

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



RESULTADOS DEL DESARROLLO DEL COLOR Y EXTRACCION DEL MISMO
SIGUIENDO LA TECNICA DE ITTRICH (31, 32, 33).

Ittrich en 1958 describe una modificación de la reacción de Kober que aparentemente le da una mayor especificidad al método, extrayendo selectivamente el color con una solución de paranitrofenol en cloroformo, la adición de reactivos la realiza de dos maneras:

- 1.- Adicionando 1 mililitro del reactivo ácido sulfúrico-hidroquinona específico para cada estrógeno (Para estriol ácido 68%, y para estrona y estradiol un ácido 52% ambos conteniendo un 2% de hidroquinona).
- 2.- Agrega 0.3 mililitros de agua, 0.74 mililitros de ácido sulfúrico y 20 miligramos de hidroquinona.

Las anteriores condiciones las realiza con estrógenos puros y les añade 0.1 mililitro de orina para demostrar que la extracción del color da un método muy específico sin la interferencia habitualmente encontrada por la producción de pigmentos en la orina.

En 1960 estudia los diferentes solventes y compuestos fenólicos, realiza la adición de reactivos como en el punto 2, y la extracción la hace con paranitrofenol en tetracloruro de acetileno, más tarde aplica la reacción a las determinaciones en líquidos biológicos.

Con las bases anteriores se hicieron diversos experimentos paralelos; a tubos que contenían 10 microgramos de estrona:

- a).- Se agregaron 0.5 mililitros del reactivo de hidroquinona en etanol equivalentes a 20 miligramos, se agregaron 0.4 mililitros de agua y 0.75 mililitros de ácido sulfúrico (No se evaporó el etanol).
- b).- Se agregaron 0.5 mililitros de la solución de quinol (20 miligramos), se evaporó, se agregaron 0.4 mililitros de agua y 0.75 mililitros de ácido sulfúrico.
- c).- Después de evaporar el etanol del patrón se agregó 1 mililitro de ácido sulfúrico al 65% conteniendo - 4% de quinol.
- d).- Junto con el etanol del patrón se agregaron 1 mililitro de la solución etanólica de hidroquinona (40 miligramos) se evaporaron a baño maría y al residuo se le agregaron 0.4 mililitros de agua y 0.75 mililitros de ácido sulfúrico.

El tiempo de incubación para el desarrollo de color fué de 40 minutos en agua hirviente, la dilución del ácido se hizo agregando 1.5 mililitros de agua tras de enfriar 3 minutos, la extracción del color se realizó con 2 mililitros de para-nitrofenol en cloroformo.

Las lecturas se hicieron en espectrofotómetro con blancos tratados de manera semejante a cada uno de los experimentos, las densidades ópticas corregidas se obtuvieron aplicando la fórmula de corrección.

Los resultados son los siguientes:

Experimentos: a).- D.C.C. para 10 microgramos de estrona

a).- .550

b).- .585

c).- .383

d).- .640

Las condiciones óptimas corresponden al adicionar los componentes del reactivo por separado, sólo que nosotros adicionamos en lugar de 20 miligramos, 40 miligramos; al evaporar el etanol de los patrones junto con los 40 miligramos de hidroquinona se previene cualquier contaminación oxidativa.

Al adicionar el agua al residuo éste se disuelve completamente, la adición de ácido se hace cuidadosamente dejándolo resbalar por las paredes del tubo para evitar el calentamiento excesivo, la principal ventaja de agregar el ácido y la hidroquinona por separado reside en el hecho ya señalado previamente, del peligro de sulfonación del reactivo con la consecuente disminución del desarrollo de color.

Otro punto importante es que el tiempo transcurrido entre cada paso debe ser exacto puesto que pequeñas variaciones modifican los resultados colorimétricos.

La agitación después de haber agregado el paranitrofenol debe ser muy enérgica para lograr la completa extracción del color; esta extracción con cloroformo tiene como principal inconveniente, la rápida desaparición del color, la gráfica número 5 nos indica la rápida disminución del color producido por 10 microgramos de estrona con la lectura obtenida a 534 milimicrones, la abscisa corresponde a la densidad óptica y la ordenada a la densidad transcurridos después de desarrollada -

la reacción, de ello se deduce que la disminución del color - empieza después de 10 minutos, razón por la que debe trabajarse con rapidez; en numerosas ocasiones se trabajó contra tiempo para rectificar la posible estabilidad entre los 14 y 19 minutos puesto que cuando se trabajan numerosos problemas se puede leer en este período haciendo los cálculos de por ciento de disminución de la lectura.

Se trazaron las curvas de absorción para 10 microgramos de estrona, estradiol y estriol, gráfica número 7 encontrándose se diferencias en la máxima longitud de onda encontrándose para estrona y estradiol a 534, y para estriol 532-534. La máxima absorción encontrada por Yttrich fué en 535.5 para los tres estrógenos.

Se trazaron curvas de calibración para los tres estrógenos con determinaciones por triplicado pero como el rango excedió al 10% en algunos puntos, se trazaron las gráficas de cada uno de ellos por separado, la gráfica número 7 corresponde a los valores para estrona, la gráfica número 8 a estradiol y la gráfica número 9 a estriol, la variación entre los puntos es grande lo que resta precisión a la determinación.

La sensibilidad obtenida es muy buena, semejante a la obtenida por el autor. Para 0.2 microgramos de estrona obtenimos una densidad óptica corregida de .016, para estradiol sensibilidad de 0.5 microgramos con una densidad óptica de .015, y para estriol la misma sensibilidad con una lectura de .017.

Nuestros resultados coinciden con los obtenidos por ...

Scholler empleando tetrabromuro de acetileno, que le da mayor estabilidad a la reacción (33). Sus resultados para 4 microgramos de estrona en E. O. C. son: .280; para estradiol .185; y para estriol .240; nuestros resultados en E. O. C. fueron - .281; 172; .167 respectivamente.

Nuestros resultados no se pueden comparar con los obtenidos por el autor, pues emplea otra fórmula en la que saca factores de la derivada de Allen; en nuestro caso las correcciones se hicieron con la fórmula derivada de Allen haciendo las lecturas a 47 para estrona y estradiol, la máxima y 572; igual para estriol.

+ + + + +

"GRAFICA 5"

CURVA PARA 10 MICROGRAMOS DE ESTRONA SIGUIENDO TECNICA DE ICTRICH, LA ASCISA CORRESPONDE A LA DENSIDAD OBTENIDA A 534 MILIMICRONES, Y LA ORDENADA A LOS MINUTOS - TRANSCURRIDOS DESPUES DE DESARROLIADA LA REACCION.

+ + + + +

800

10 μ g ESTRONA

700

534

D.O.

600

500

4

8

12

16

20

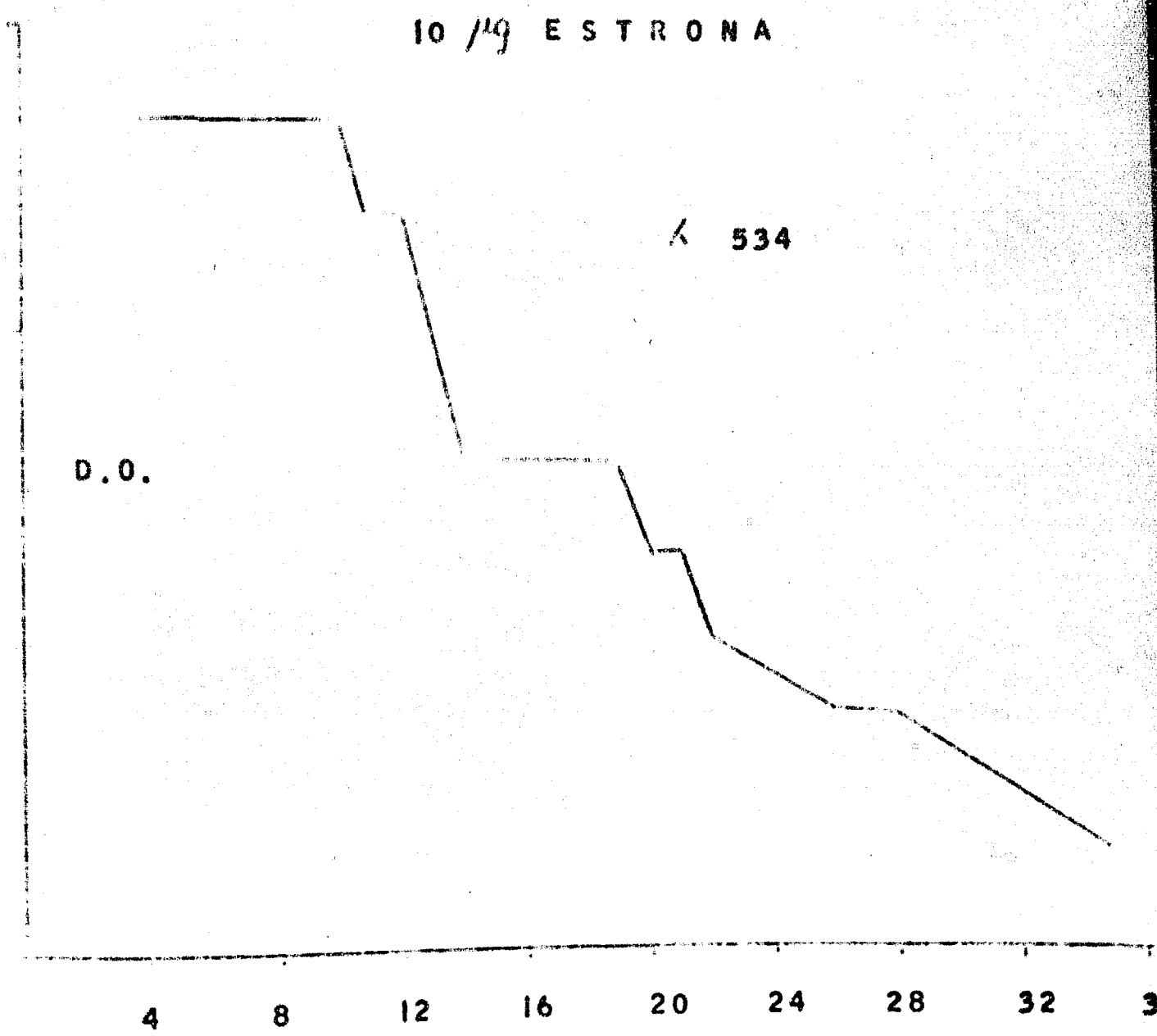
24

28

32

36

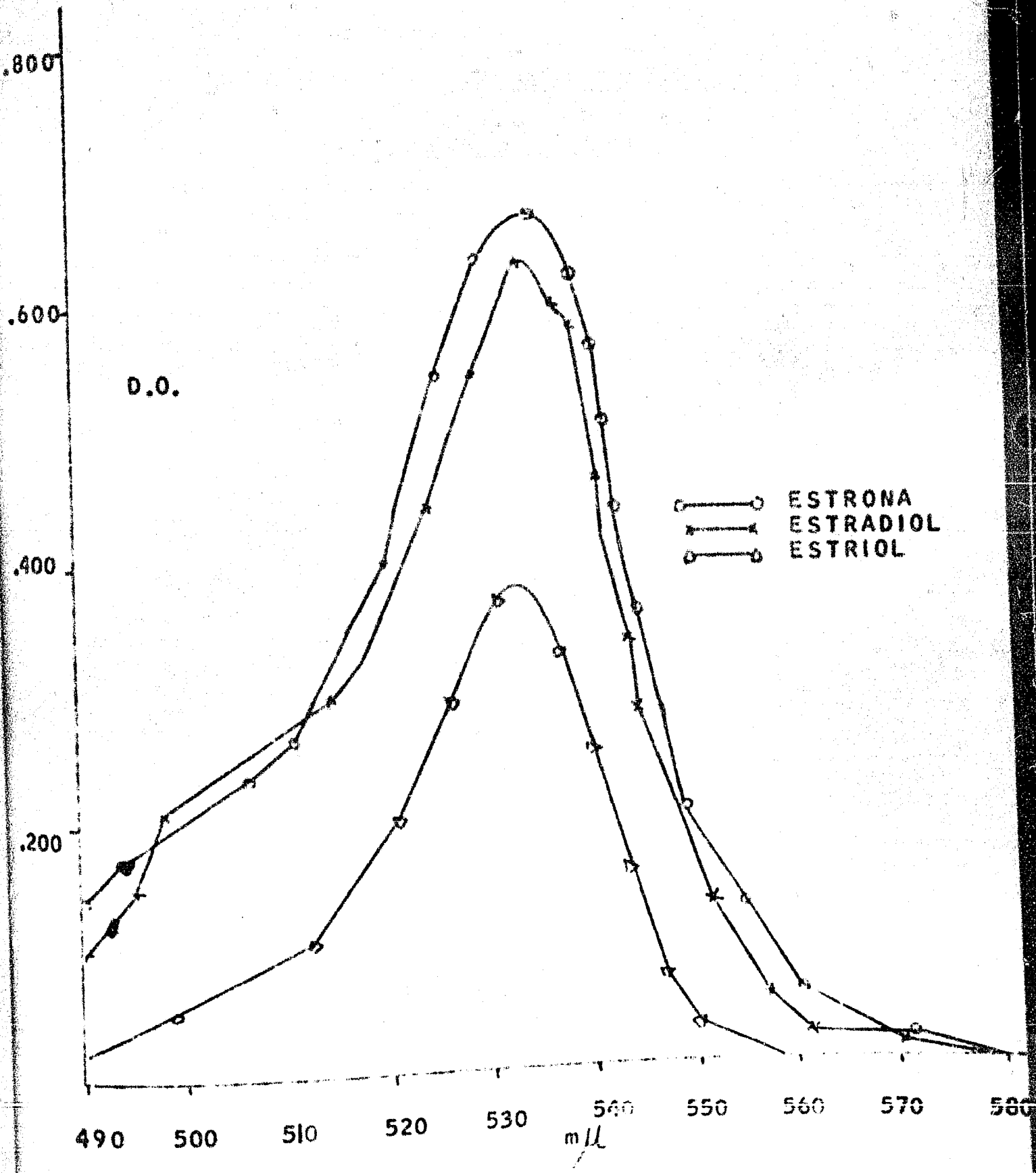
MINUTOS



"GRAFICA 6"

CURVA DE ABSORCION PARA 10 MICROGRAMOS DE ESTRONA, -
ESTRADIOL Y ESTRIOL. DESARROLLO DE COLOR Y EXTRAC--
CION DEL MISMO SEGUN TECNICA DE ITTRICH, CONFORME AL
CUADRO NUMERO 3.

+ + + + +



"CUADRO 2"

REACCION DE FOMER CON EXTRACCION DEL COLOR.

IEYRICH 1958, 1960.

1a. PARTE DE LA REACCION.

ESTEROIDE	ACIDO SULFURICO CONCENTRADO mililitros	AGUA AGREGADA mililitros	CONCENTRACION ACIDO SULFURICO % v/v	QUINOL miligramos	TIEMPO DE CALENTA MIENTO minutos
Estrona	0.75	0.4	65	40	40
Estradiol	0.75	0.4	65	40	40
Estriol	0.75	0.4	65	40	40

2a. PARTE DE LA REACCION.

ESTEROIDE	AGUA AGREGADA mililitros	CONCENTRACION FINAL DE ACIDO SULFURICO % v/v
Estrona	1.5	46
Estradiol	1.5	46
Estriol	1.5	46

EXTRACCION DEL COLOR.

ESTEROIDE	REACTIVO DE PARANITROFENOL mililitros	DESAPARICION DE COLOR
Estrona	2	10 minutos
Estradiol	2	10 minutos
Estriol	2	10 minutos

LONGITUDES DE ONDA.

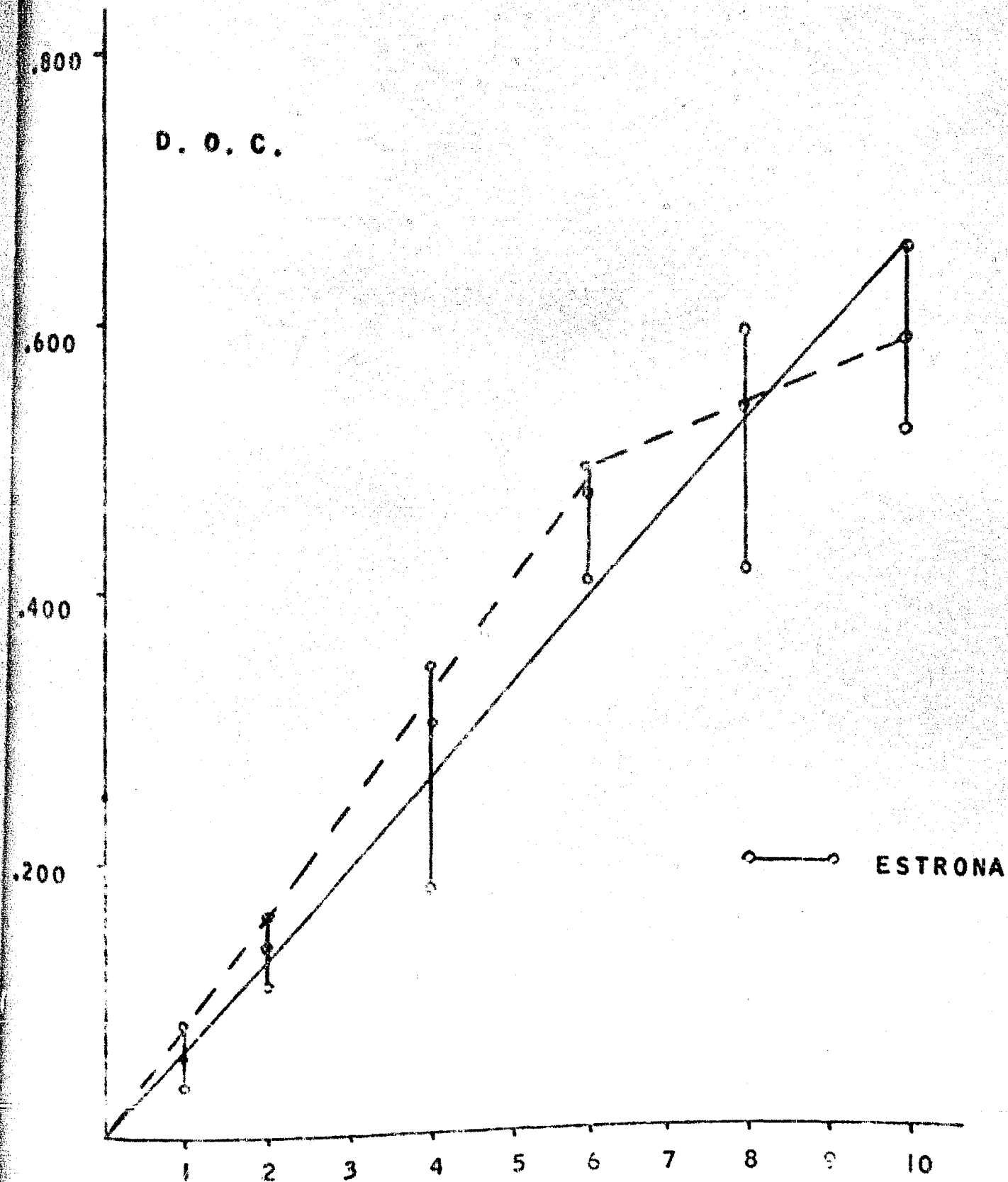
ESTEROIDE	a	x	b	D.O.C. 10 microgramos
Estrona	496	532	572	.598
Estradiol	496	532	572	.543
Estriol	496	532-534	572	.315

"GRAFICAS 7, 8, 9"

LAS GRAFICAS 7, 8 Y 9 CORRESPONDEN A LAS CURVAS DE CALIBRACION DE ESTRONA, ESTRADIOL Y ESTRIOL RESPECTIVAMENTE, LOS PUNTOS CORRESPONDEN A DETERMINACIONES HECHAS EN DIFERENTE TIEMPO.

+ + + + +

D. O. C.



D. O. C.

.800

.600

.400

.200

1

2

3

4

5

6

7

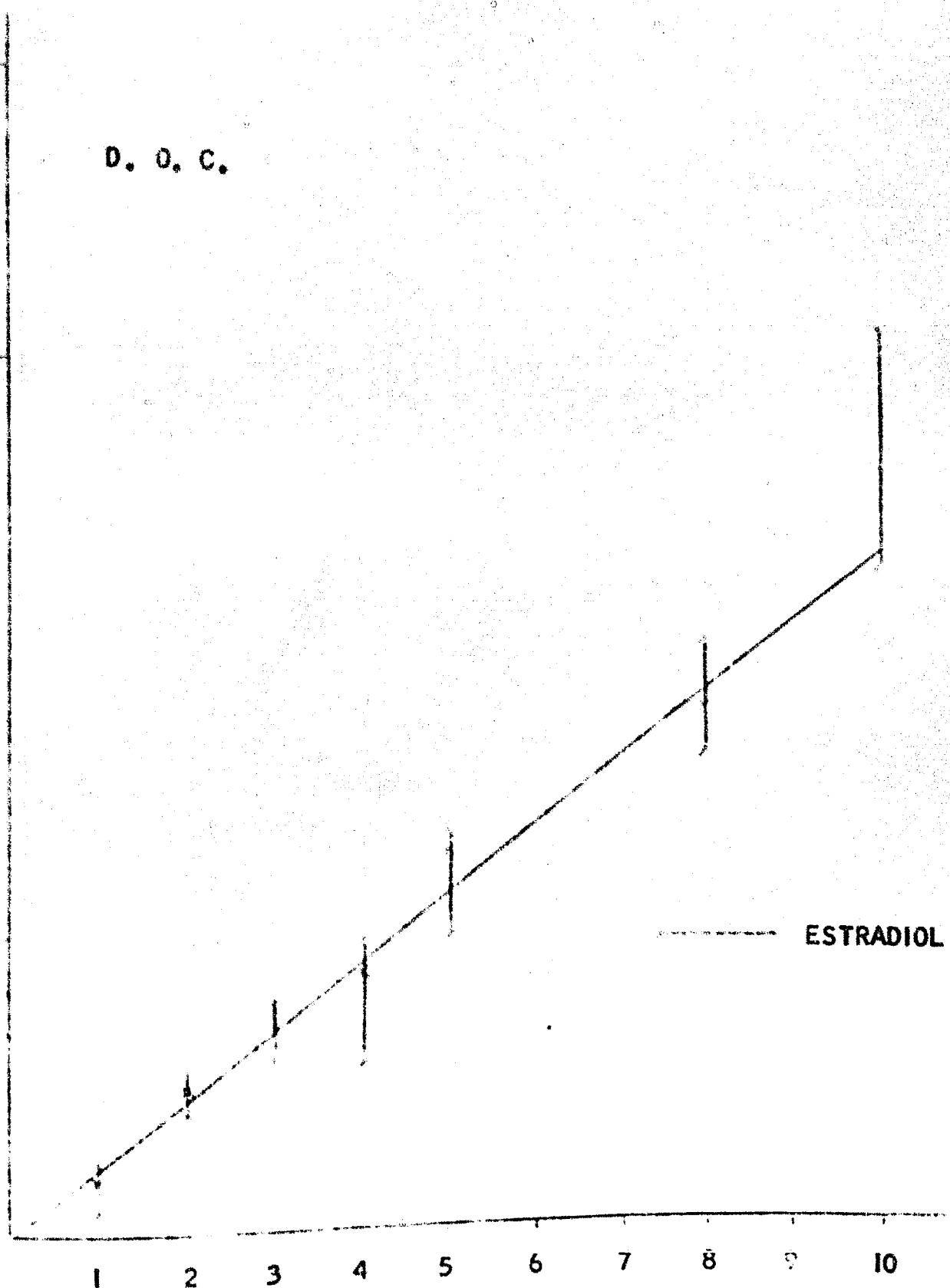
8

9

10

ESTRADIOL

119



.600

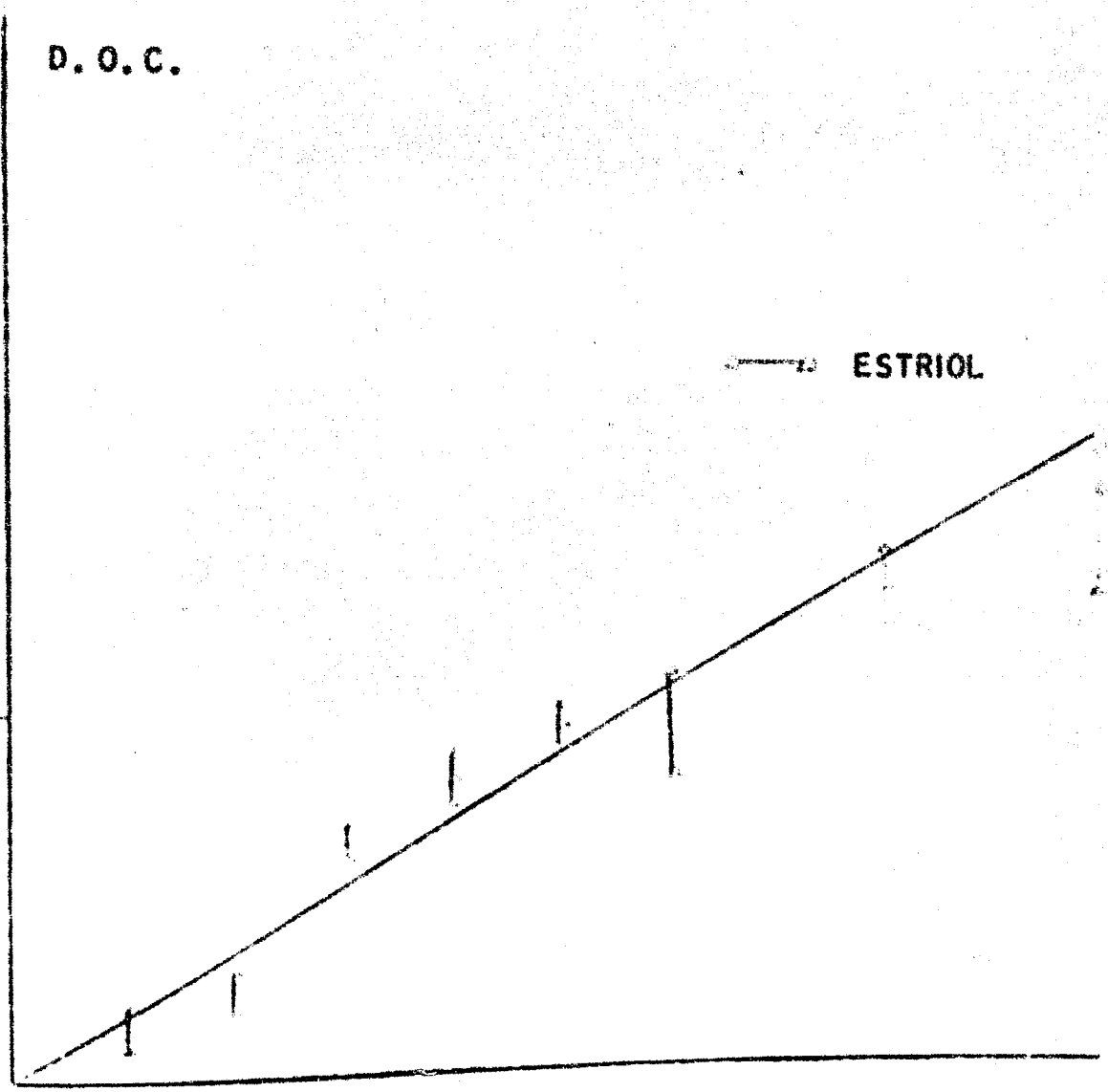
D. O. C.

.400

ESTRIOL

.200

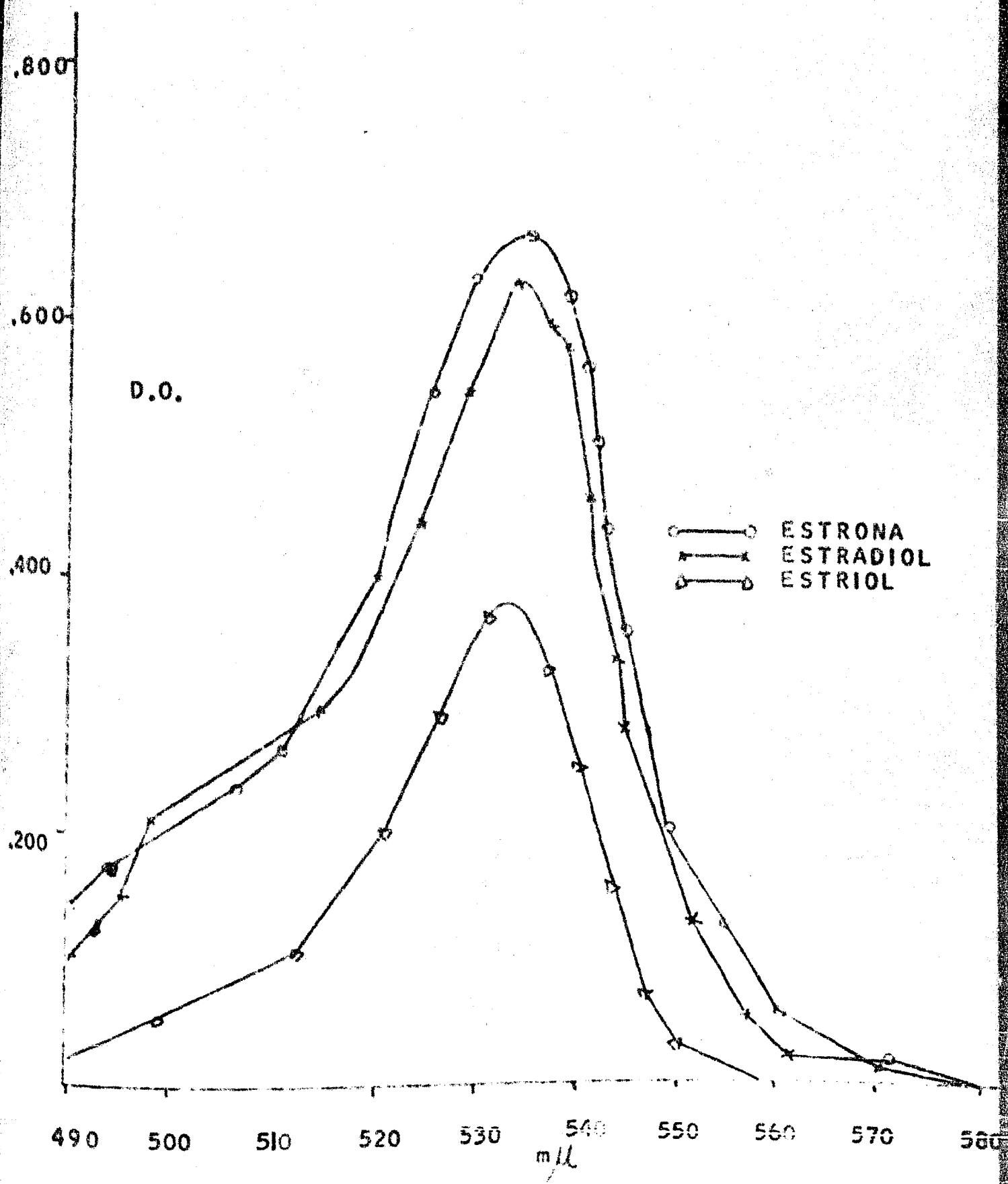
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



"GRAFICA 10"

CURVAS DE ABSORCION PARA 10 MICROGRAMOS DE ESTERONA, -
ESTRADIOL Y ESTRITOL, SIGUIENDO LA TECNICA INDICADA POR
NOCKE SEGUN EL CUADRO 4.

* * * * *



"CUADRO 4"

DESARROLLO DE LA REACCION DE KOBER.

SEGUN NOCKE 1961.

1a. PARTE DE LA REACCION.

ESTEROIDE	REACTIVO DE KOBER	CONCENTRACION DE ACIDO SULFURICO % v/v	CONCENTRACION DE QUINOL % p/v	TIEMPO DE CALENTAMIENTO minutos
Estrona	2.1	66	2	20
Estradiol	2.8	55	2	20
Estriol	2.1	76	2	20

2a. PARTE DE LA REACCION.

ESTEROIDE	AGUA AGREGADA	CONCENTRACION FINAL DE ACIDO SULFURICO % v/v	TIEMPO DE CALENTAMIENTO minutos	DESAPARICION DEL COLOR
Estrona	1.1	43.4	6	24 horas
Estradiol	0.4	48.1	10	24 horas
Estriol	1.1	49.6	14	24 horas

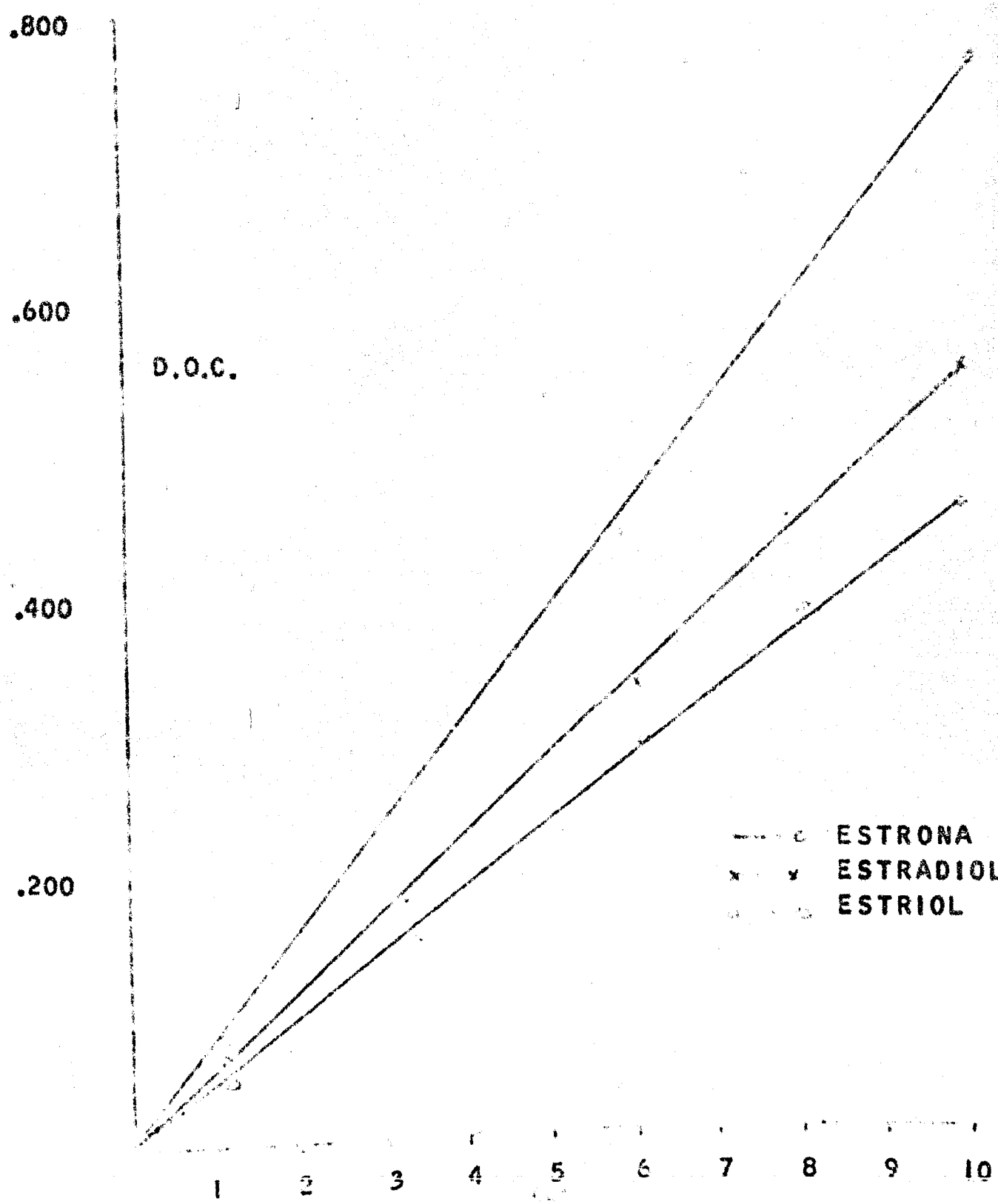
LONGITUDES DE ONDA.

ESTEROIDE	a	milimicrones x		b	D.O.C. 10 microgramos
Estrona	471	510-512		553	.760
Estradiol	471	510-512		553	.547
Estriol	467	508		549	.453

"GRAFICA 11"

CURVAS DE CALIBRACION PARA ESTRONA, ESTRADIOL Y ESTRIOL
LOS PUNTOS MARCADOS SON LOS VALORES PROMEDIO DE TRES --
DETERMINACIONES Y CUYO RANGO NO EXCEDIO AL 10%, LAS --
CORRECCIONES PARA OBTENER LA D. O. C. ESTAN SEÑALADAS EN
EL CUADRO 4.

+ + + + +



"GRAFICA 12"

CURVAS DE CALIBRACION PARA ESTRONA, ESTRADIOL Y ESTRIOLO
CON LOS VALORES DE DENSIDAD OPTICA CORREGIDA BAJO LAS -
CONDICIONES OPTIMAS INDICADAS POR NOCKE Y REDUCIENDO --
LOS VOLUMENES A LA MITAD. (VEASE CUADRO 5).

+ + + + +

.800

D. O. C.

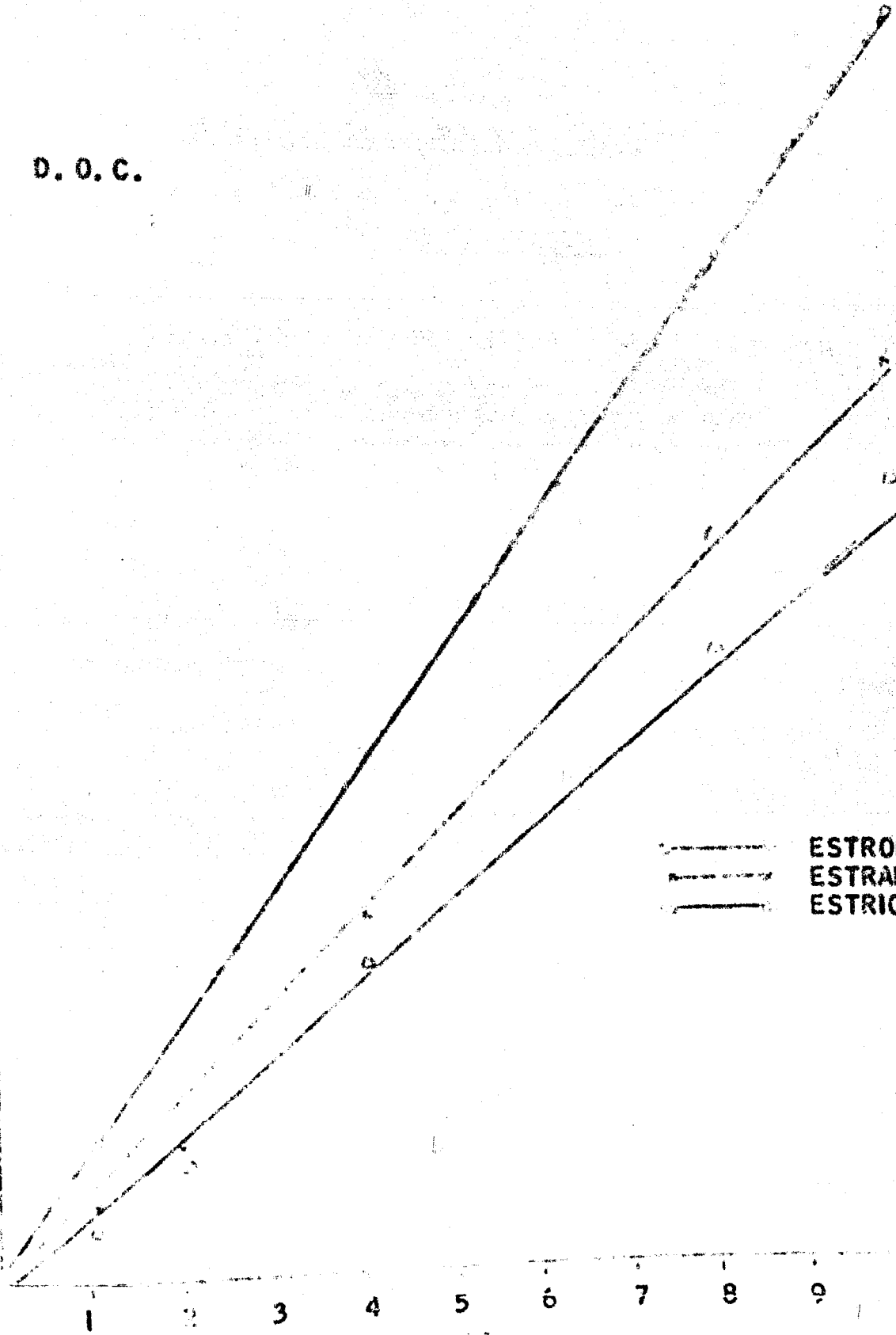
.600

.400

.200

ESTRONA
ESTRADIOL
ESTRIOL

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



"CUADRO 5"

DESARROLLO DE LA REACCION DE KOBER.
MODIFICACION DE LA TECNICA DE NOCKE.

1a. PARTE DE LA REACCION

ESTEROIDE	REACTIVO DE KOBER	CONCENTRACION DE ACIDO SULFURICO % v/v	CONCENTRACION DE QUINOL % p/v	TIEMPO DE CALENTAMIENTO minutos
Estrona	1.05	66	4	20
Estradiol	1.4	55	4	20
Estriol	1.05	76	4	20

2a. PARTE DE LA REACCION

ESTEROIDE	AGUA AGREGADA mililitros	CONCENTRACION DE ACIDO SULFURICO FINAL % v/v	TIEMPO DE CALENTAMIENTO minutos	ESTABILIDAD DEL COLOR
Estrona	0.55	43.4	6	24 horas
Estradiol	0.2	48.1	10	24 horas
Estriol	0.55	49.8	14	24 horas

LONGITUDES DE ONDA.

ESTEROIDES	a	milimicrones		D.O.C. 10 mcrogramos
		x	b	
Estrona	471	512	553	.847
Estradiol	471	512	553	.607
Estriol	465	506	547	.531

RESULTADOS DEL DESARROLLO DE COLOR SIGUIENDO LA TECNICA DE -
NOCKE (40).

Nocke en 1961 señala también que el método de Brown para la estimación de estrógenos urinarios no le da buenos resultados. También indicó que la intensidad del color dado por los estrógenos puros es mucho menor que el especificado por Brown (15) y Bauld (8). Puesto que en sus curvas encuentra además del pico de absorción máximo otro pico en 460 milimicrones, - concluye que no todo el color amarillo de la primera parte de la reacción ha sido convertido al color rosa leído finalmente.

Realiza un estudio exhaustivo de las condiciones de la - reacción tratando de obtener la sensibilidad señalada por - - Bauld y Brown.

Concluye que las condiciones óptimas de la primera parte de la reacción son fundamentalmente las señaladas por Brown - con la diferencia de que la concentración de ácido sulfúrico óptima para estradiol fué de 95% en vez del 60% indicada, y - de disminuir un poco los volúmenes iniciales del reactivo de Keber; sin embargo no estudió el efecto de variar la concentración de hidroquinona en este reactivo.

Las modificaciones principales radican en el segundo -- paso de la reacción, las cuales deben ser escogidas para producir la completa conversión del color amarillo al rosa; de - importancia fundamental fué la concentración de ácido final, las condiciones óptimas encontradas por él fueron para estrona 43.4% para estradiol 46.1, para estriol 43.4, mientras que

como ya señalamos las indicadas por Brown son respectivamente 56.7, 56.7 y 57.

Un dato importante señalado por Nocke en su estudio reside en el estudio comparativo del ácido sulfúrico utilizado -- por él, y el utilizado por Brown (British Drug Houses). Resulta de sumo interés comprobar que la pureza de ambos productos es marcadamente diferente, siendo la diferencia más notable la cantidad de nitratos, el cual es 100 veces mayor en el ácido de Nocke que en el de la British D. H. Esto explica -- por qué la intensidad del color no haya sido aumentada, en el caso de Nocke, por la adición de pequeñas cantidades de agentes oxidantes, puesto que la cantidad de nitratos que contiene el ácido sulfúrico utilizado por él es más del doble de la -- agregada por Hauld en su reactivo modificado.

El ácido utilizado por nosotros posee características -- muy similares al de la B. D. H. en su contenido de nitratos, es pues posible que los valores bajos que hemos obtenido dependen, al menos en parte, en la ausencia de la concentración adecuada de sustancias oxidantes en la segunda parte de la -- reacción.

En nuestras manos el método descrito por Nocke proporcionó resultados un poco diferentes, las D. O. máximas obtenidas por nosotros para 10 microgramos de estrógenos fueron de 512 mm. para estradiol, 510 para estrona y 506 para estriol, -- Nocke da sus valores de la máxima en 518, 515 y 514 mm. para estradiol, estrona y estriol respectivamente. Asimismo la -- D. O. Corregida aplicando fórmula de Allen en las lecturas -- indicadas en el Cuadro 4, nos dan lecturas menores aproxima-

damento de un 10 a 15%, tal vez sea debido, como ya indicamos, a la falta de substancias oxidantes.

La principal ventaja del método reside en la estabilidad del color, pues después de 24 horas se hicieron lecturas y la Densidad Optica corregida y no varió de un 2%.

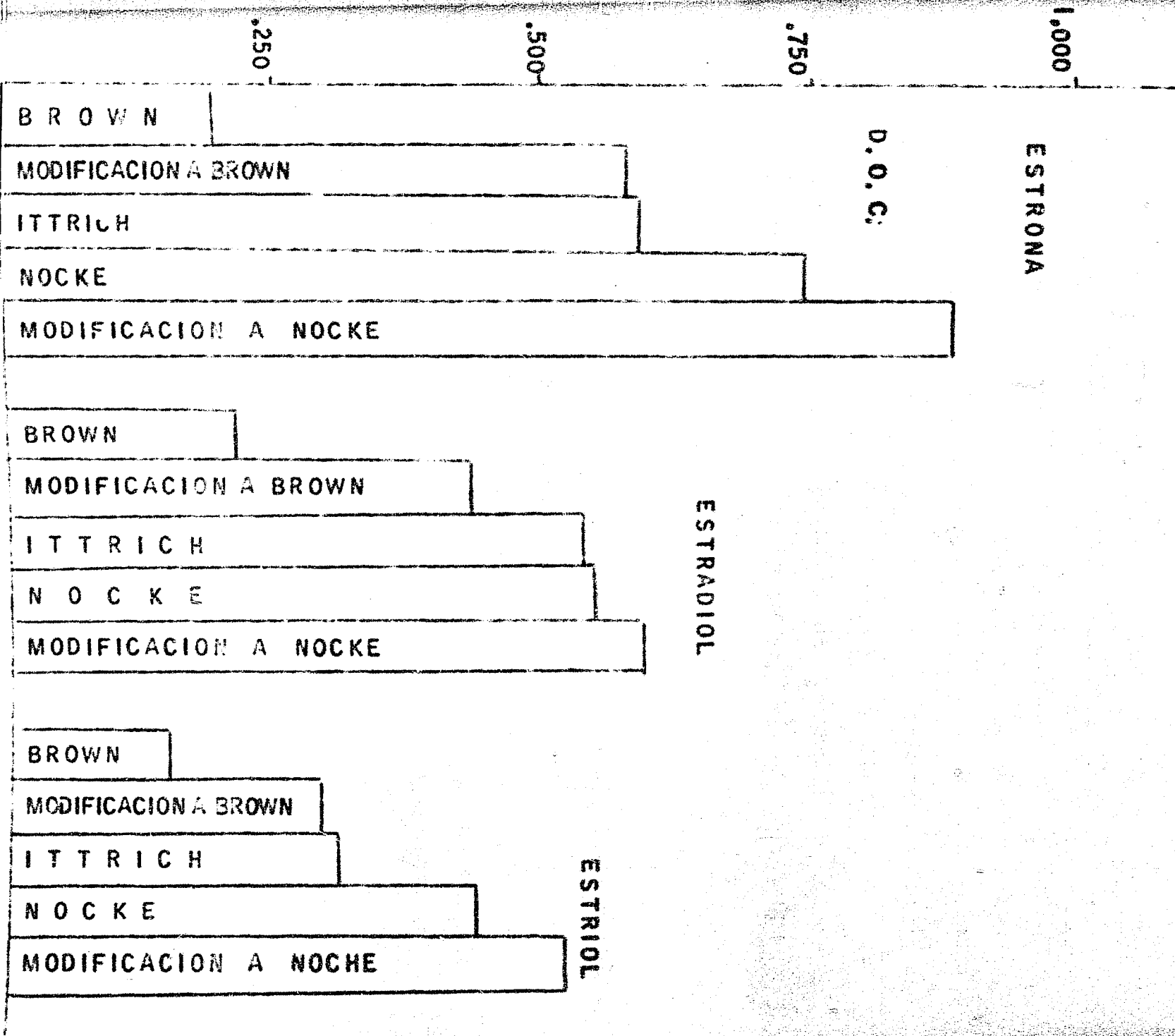
La sensibilidad dada por la modificación de Nocke reduciendo volúmenes, es un poco mejor que la dada por la reacción de Brown, Nocke da una Densidad Optica corregida para un microgramo de estrona 0.085, para estradiol 0.065, y para estriol - 0.05 a nosotros nos dió valores de 0.08, 0.04 y 0.04 respectivamente.

* * * * *

"GRAFICA 16"

VALORES EN DENSIDAD OPTICA CORREGIDA PARA 10 MICROGRAMOS
DE ESTRONA, ESTRADIOL Y ESTRIOLO, SIGUIENDO LAS DIFERENTES
TECNICAS COLORIMETRICAS PREVIAMENTE DESCRITAS.

* * * * *



RESULTADOS DE FLUORESCENCIA CON ACIDO SULFURICO.

Se establecieron las condiciones óptimas del aparato, - después se encontraron las mejores longitudes de onda para emplearlas como luz de excitación, se seleccionó a 480 milimicrones como luz de fluorescencia, y se variaron las longitudes de onda de excitación desde 200 hasta 800 milimicrones; encontrándose diversos picos de luz de excitación: 310, 320, 340, 360, 365, 430, 445, 470, 490 milimicrones; se procedió a hacer las lecturas en esas longitudes de onda leyendo la fluorescencia producida por el blanco y por el patrón del microgramo de estrógeno, encontrándose que la mayor diferencia se ora a 440 milimicrones como luz de excitación; con este dato se fijó la luz de excitación y se modificaron las longitudes de onda de la luz de fluorescencia encontrándose como la máxima 490 milimicrones dato que corresponde con la literatura (41) puesto que Preedy y Aitken realizan las lecturas de fluorescencia empleando como luz de excitación 436 mμ., y como luz de fluorescencia 484 mμ.

La técnica seguida fué exactamente como lo indican - - Preedy y Aitken (41), quienes recomiendan hacer la lectura a los 80 minutos para el completo desarrollo de la fluorescencia, nosotros hicimos lecturas desde los cero hasta los 120 minutos encontrando: aumento de la fluorescencia hasta los 35 minutos y desde entonces hasta los 105 minutos no hubo cambios en la lectura de fluorescencia, lo que indica la estabilidad de la reacción, la única precaución que se tomó fué mantener los tubos al abrigo de la luz.

Otra precaución que se tomó fué lavar el material con ácido nítrico 50%, con lo que aumentan las lecturas de los problemas, disminuyendo el valor del blanco, que equivale a .001 microgramo de estrona.

Para facilitar los cálculos de la fluorescencia se estabilizó el aparato a una sensibilidad de 10, los resultados se dieron en fluorescencia relativa, dato que resulta de multiplicar el valor obtenido en % de transmitancia por el indicado en el botón No del espectrofotofluorometro y a este valor restarle el valor del blanco.

Se trazaron curvas de calibración, encontrándose que hasta 1 microgramo se lograba rectitud en las curvas, pero que ésta se perdía entre este valor y 10 microgramos.

La sensibilidad lograda fué de .004 microgramos de estrona con una Fluorescencia relativa de .07; para estradiol fué .006 con una F. R. de .02, y para estriol .008 con una F.R. de .03.

RESULTADOS DE FLUORESCENCIA CON ACIDO FOSFORICO:

Según los reportes de diversos autores la máxima longitud de onda de fluorescencia se encuentra en 530 milimicrones, se seleccionó esta longitud de onda y se buscó la longitud de onda para excitar, encontrándose que ésta era 460 mm.

La evaporación de solventes y el desarrollo de fluorescencia se hizo primero en agua hirviente y en tubos destapados, con lo cual los resultados fueron más bajos: para 1 microgramo de estrona 0.334 que los obtenidos cuando la evaporación y el desarrollo de fluorescencia se hizo en la estufa

a 110 grados (para 1 microgramo de estrona 3.35).

Los tubos se leyeron dentro de los 20 primeros minutos después de desarrollada la fluorescencia, y los tubos se -- protegieron de la luz.

La sensibilidad lograda fué de .006 microgramos de estrona con una fluorescencia relativa de .060; para estradiol la sensibilidad fué .006 con F. R. de .040 y para estriol -- una sensibilidad de .02 microgramos con una F. R. de .010

RESULTADOS DE LA FLUORESCENCIA PRODUCIDA POR EL COLOR EXTRAIDO DE LA REACCION DE KORN:

Las mismas precauciones que se tuvieron en el desarrollo de color y extracción para leer en colorimetría se tuvieron aquí, sólo que las lecturas deben hacerse dentro de los primeros 5 minutos.

De manera semejante a las anteriores reacciones se buscó la óptima longitud de onda para excitar y de fluorescencia, encontrándose 530 milimicrones para luz de excitación y 560 milimicrones para luz de fluorescencia.

La sensibilidad lograda fué .006 microgramos para estrona con una fluorescencia relativa de .035; para estradiol .006 microgramos, con una fluorescencia relativa de .068 y -- para estriol la misma cantidad con una fluorescencia relativa de .035.

La sensibilidad reportada por el autor es de .005 microgramos de estrona leyendo en 546 como luz de excitación y 577 como luz de fluorescencia.

"GRAPICA 13"

CURVA DE CALIBRACION PARA ESTRONA, ESTRADIOL Y ESTRIOL.
DESARROLLO DE FLUORESCENCIA CON ACIDO SULFURICO, GRAFI-
CANDO MICROGRAMOS CONTRA FLUORESCENCIA RELATIVA.

+ + + + +

100

10

F. R.

1

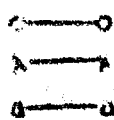
.1

.01

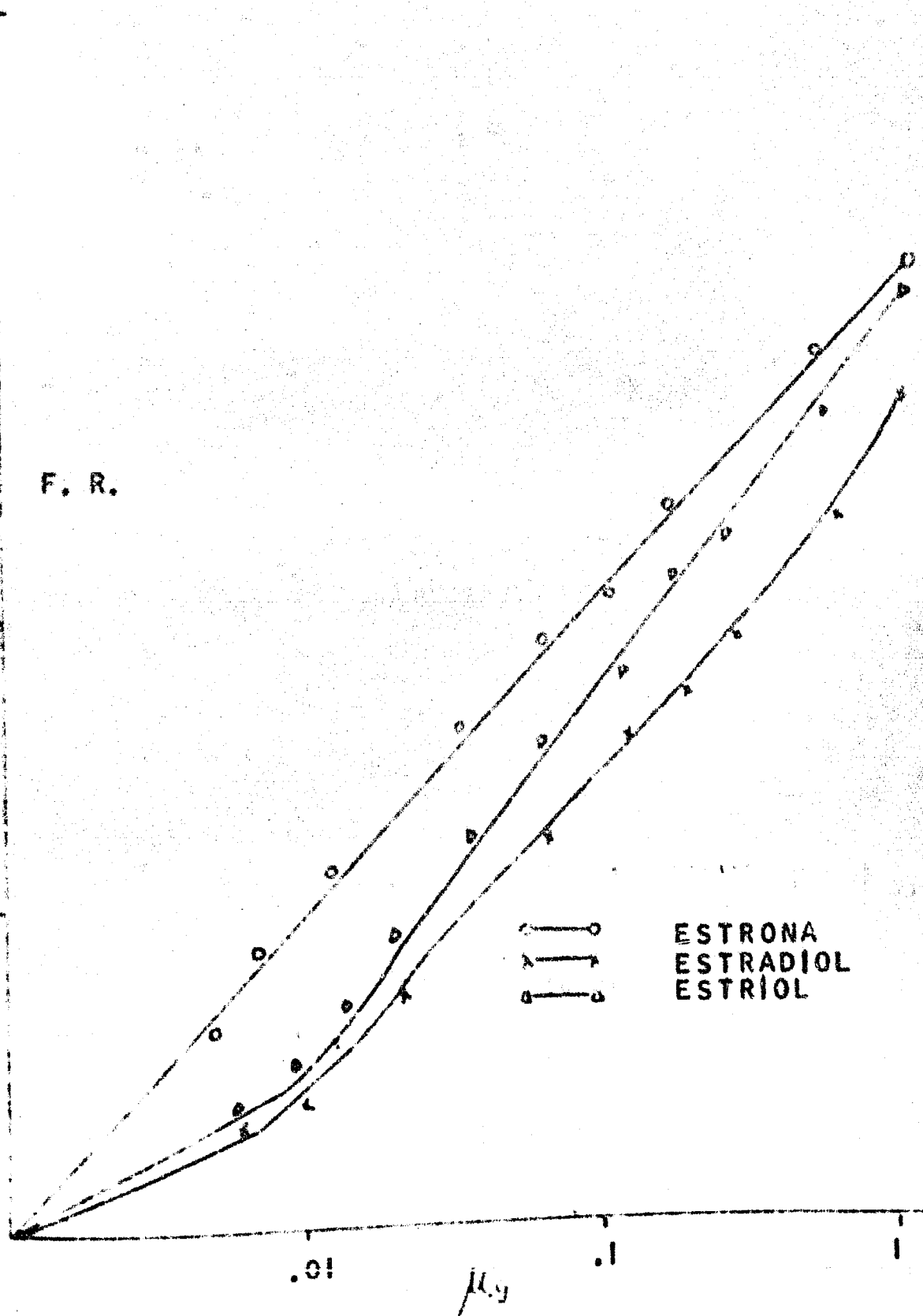
.1

1

μg



ESTRONA
ESTRADIOL
ESTRIOL

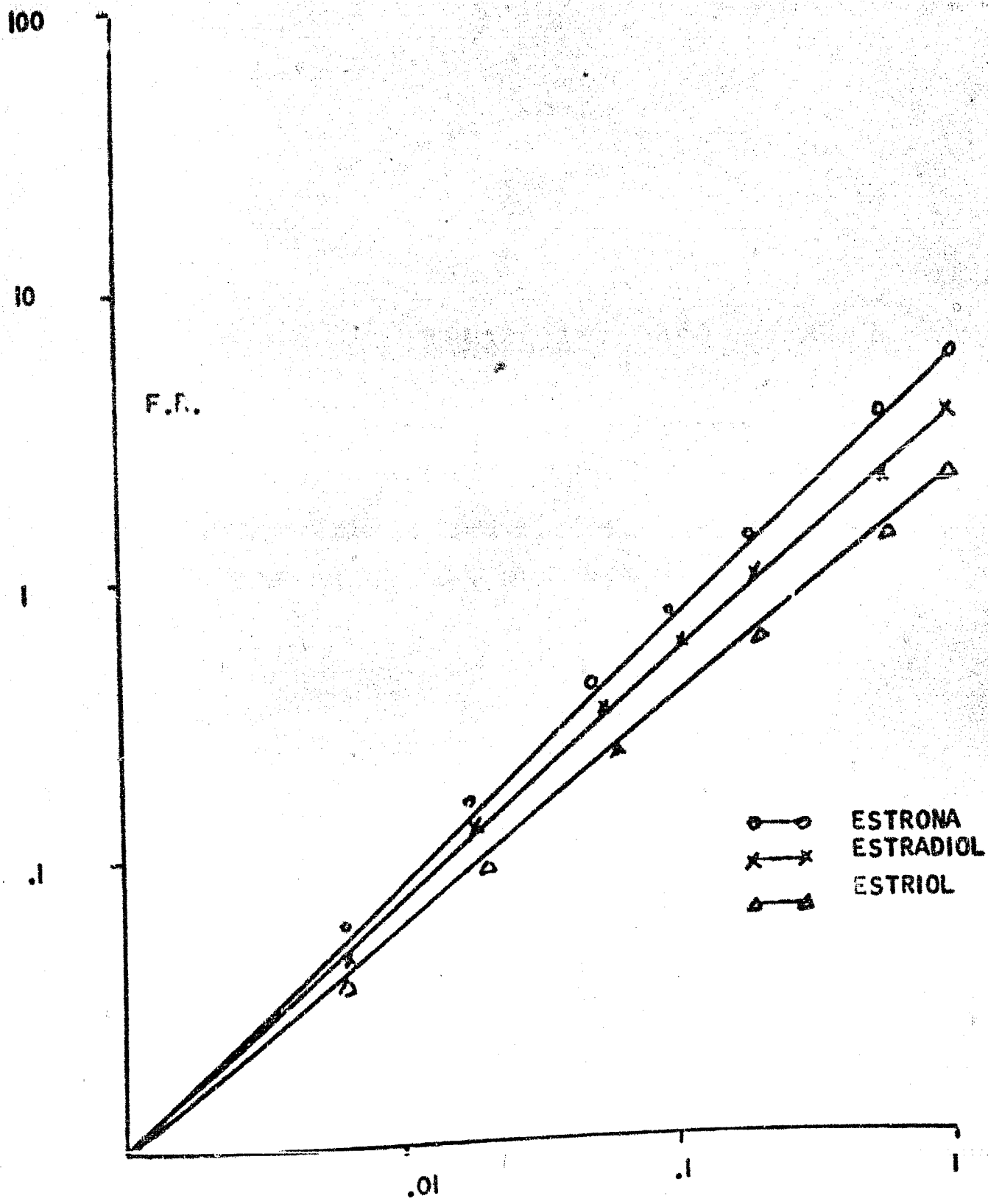


"GRAFICA 14"

DESARROLLO DE LA FLUORESCENCIA CON ACIDO FOSFORICO.

CURVA DE CALIBRACION PARA ESTRONA, ESTRADIOL Y ESTRIOL.

+ + + + +



"GRAFICA 15"

CURVA DE CALIBRACION PARA ESTRONA, ESTRADIOL Y ESTRIOL.
FLUORESCENCIA PRODUCIDA POR EL COLOR EXTRAIDO CON CLORO
FORMO SEGUN TECNICA DE ITRICH. LOS PUNTOS CORRESPON-
DEN A DETERMINACIONES DE LA FLUORESCENCIA RELATIVA POR
TRIPLICADO.

+ + + + +

100

10

F.R.

1

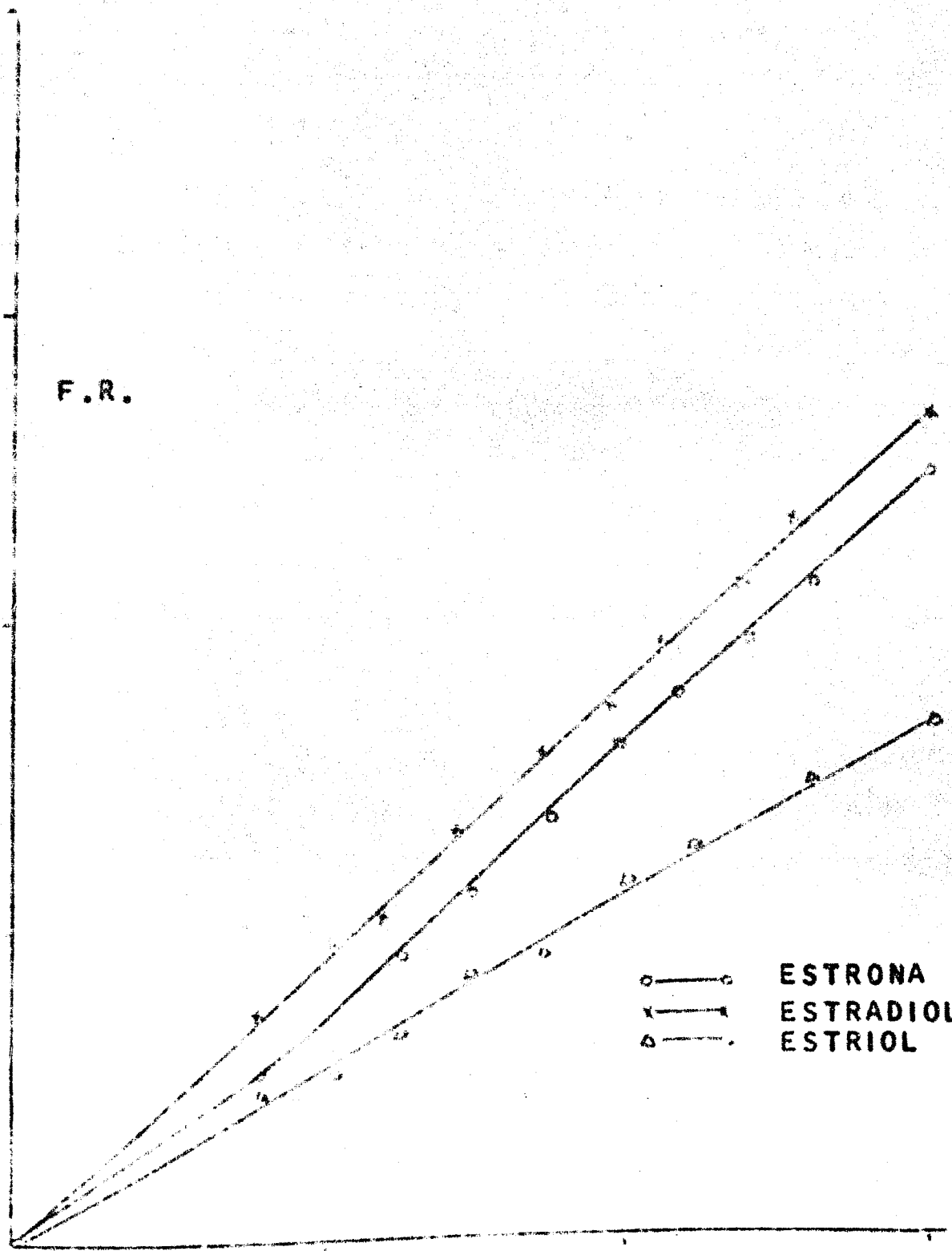
.1

.01

.1

1

○ — ○ ESTRONA
x — x ESTRADIOL
△ — △ ESTRIOL



DISCUSION.

COLORIMETRIA:

ESPECIFICIDAD.- La reacción empírica de Kober es muy específica de los fenolsteroides porque para que resulte positiva requiere que exista en el anillo A en posición 3 una función fenólica y que el anillo D se encuentre intacto, o bien oxigenado en la posición 17. La sustitución de un hidrógeno al estradiol como es el 17 metilestradiol disminuye el color, y más aún el etilen estradiol suprime prácticamente la coloración de Kober. La reacción es igualmente negativa para la 16 ceto estrona y la 2 metoxy estrona (39). De lo anterior se deduce la alta especificidad de la reacción para estrona, estradiol y estriol.

Brown (16) analiza el valor del método para la determinación de estrona, estradiol y estriol urinarios aplicando la reacción colorimétrica (15), y señala la posible interferencia que pueden significar para la determinación final la presencia en los extractos urinarios de fenoftaleína, ciertos eupépticos, y estrógenos sintéticos; por el intenso color rojo producido con la reacción de Kober.

Por otra parte Dalbrock da evidencia de la especificidad no sólo de la determinación final sino del método completo de Brown, comparándolo con el método de bioensayo, - la correlación fué buena a excepción de los casos en que la orina se obtuvo de pacientes que habían ingerido cortisona.

Además de los interferentes ya mencionados existen en los extractos urinarios múltiples cromógenos que interfieren la cuantificación final colorimétrica; Ittrich logra un gran avance en la especificidad de la reacción logrando extraer selectivamente el color producido por los estrógenos, con lo que se eliminaba la coloración del cromógeno, para probar la especificidad de la reacción Ittrich desarrolló color con diferentes hormonas esteroide, así como también con un residuo seco de 0.1 mililitro de orina, sus resultados fueron lecturas muy bajas de las otras hormonas, lo mismo que la lectura del extracto urinario solo sin estrógeno fué casi nulo; lográndose con ello probar el aumento de la especificidad de la reacción y de la extracción del color.

La especificidad del método completo está unida a la precisión de los pasos previos de extracción y purificación.

La especificidad de nuestros resultados está basada en la pureza de los patrones usados en las determinaciones colorimétricas de los estrógenos puros, siguiendo las técnicas de Brown, Ittrich, Nocke y sus modificaciones.

SENSIBILIDAD.- Nuestros resultados indican una mayor sensibilidad siguiendo la técnica de Nocke y la modificación que de ella hicimos (0.5 microgramo), la misma sensibilidad se logró con la reacción de Ittrich pero con menor lectura en densidad óptica; los valores mínimos que se lograron determinar siguiendo la técnica de Brown fueron de

1 microgramo.

Los valores más altos en Densidad Optica Corregida se lograron con la modificación a la técnica de Noeke, siendo la estrona la que desarrolló más color, este dato coincide con el obtenido por otros autores (15), (20), (35), de las mayores lecturas para estrona, el siguiente valor para estradiol y el valor más bajo para estriol.

	Mínima cantidad de estrona leída.	D.O.C.
Brown (15)	1 microgramo	0.018
Modificación	1 microgramo	0.050
Ittrich (31)	0.5 microgramo	0.017
Noeke (40)	0.5 microgramo	0.020
Modificación	0.5 microgramo	0.041

Ittrich (31) señala como sensibilidad de la reacción colorimétrica 0.2 microgramos de estrona.

REPRODUCIBILIDAD.- La precisión de nuestros resultados en las reacciones colorimétricas es digna de confianza puesto que la variación de las lecturas para una misma concentración no varió del 10%, y con ello la Densidad Optica Corregida se mantuvo dentro de un rango de 10%, excepción hecha de la reacción de Ittrich en que la variación según se aprecia en las gráficas 7, 8, 9, excede del 10%.

ESTABILIDAD.- la estabilidad del color es un dato muy importante en la aplicación de la reacción colorimétrica a trabajos de rutina.

La mayor estabilidad se logró con el desarrollo de la

reacción según Hocke y la modificación que de ella hicimos - puesto que después de 24 horas la disminución de la Densidad Óptica Corregida fué del 1%, lo que permite su aplicación en casos en los que no se pueda leer inmediatamente después de desarrollado el color.

La reacción de Kober según Brown, tiene una estabilidad de 12 horas, y la de Ittrich de 10 minutos lo que constituye uno de los mayores inconvenientes cuando se hace la extracción con cloroformo, Ittrich señala que cuando se emplea - - tetrabromuro de acetileno se logra una mayor estabilidad (32).

FACILIDAD.- La facilidad para realizar las reacciones de Brown, Hocke y sus modificaciones realizadas por nosotros son la base para la aplicación de ellas en los casos en que se -- maneje gran número de problemas; una vez trazadas las curvas de absorción y controladas todas las condiciones del desarrollo, bastara con hacer la lectura en las longitudes de onda señaladas en los cuadros 1, 2, 4, 5, para la corrección de -- la lectura; y así los valores en Densidad Óptica Corregida -- comparados con los de los controles tratados de manera semejante, nos darán un resultado correcto de la cantidad de estrógeno presente en la muestra. La reacción extrayendo el -- color según Ittrich requiere un poco más de cuidado al trabajo.

COSTO.- El costo de la reacción colorimétrica por cualquiera de los métodos empleados no es grande, los reactivos fáciles de adquirir, y probablemente se pudieran utilizar -- otros espectrofotómetros sólo que trabajando con cantidades mayores que las utilizadas por nosotros.

FLUORESCENCIA:

ESPECIFICIDAD.- Salunwhite (45) comprobó la fluorescencia de diversos compuestos con ácido sulfúrico y fosfórico, encontrando que si se quitaba la función oxigenada del carbón 17 de los esteroides causaba una disminución, y si se introducían -- grupos acetilosos a la estrona y estradiol la fluorescencia -- desaparecía, demostrando con ello la especificidad de la reacción.

El emplear una longitud de onda de excitación diferente a la longitud de onda de emisión da una posibilidad de una especificidad mayor que en las determinaciones colorimétricas en -- que se emplea una misma longitud de onda.

En nuestro caso se logró una especificidad mayor puesto que se hicieron lecturas en muy diferentes longitudes de onda de excitación y de fluorescencia, hasta encontrar la longitud de onda específica de excitación y la longitud de onda de -- fluorescencia en que la diferencia del blanco y de 1 microgramo de estrógeno fuera mayor.

SENSIBILIDAD.- Indudablemente la sensibilidad es muy adecuada en el método fluorométrico de ello se deduce su aplicación en la determinación de cantidades pequeñas de estrógenos.

La mejor sensibilidad según nuestros resultados se logró con la fluorescencia con ácido sulfúrico, semejante a la obtenida por la fluorescencia con ácido fosfórico, la sensibilidad menor se obtuvo con el color extraído según Ittrich.

	Mínima cantidad de estrona leída.	Fluorescencia relativa.
Acido sulfúrico	.004 microgramos	.070
Acido fosfórico	.006 microgramos	.060
Extracción del color.	.006 microgramos	.035

Freedy y Aitken aplicando la reacción de fluorescencia - con ácido sulfúrico reporta una sensibilidad para el método - completo en el que utiliza una columna de partición (41), para determinaciones de orina 1.5 microgramos de estrona, 1.8 - microgramos de 17 beta estradiol, y 3 microgramos de estriol en orina de 24 horas. Para determinaciones en plasma con el mismo método reporta sensibilidad de 0.005 microgramos de estrona, 0.07 microgramos de estradiol, y 0.1 microgramos de -- estriol por los mililitros de plasma.

Ichii y Dorfman (30) reportan una sensibilidad de 0.002 microgramos de estrona y estradiol; 17 beta empleando una -- microdeterminación con ácido fosfórico.

Ittrich (31) señala una sensibilidad para estrona de -- 0.005 microgramos de estrona.

REPRODUCIBILIDAD.- Siempre que se sigan las indicaciones señaladas para la determinación fluorométrica por lo referente a tiempo evaporación de solvente, conservar los tubos al - abrigo de la luz, el rango de error es de alrededor 10%, lo - que señala la confianza que se puede tener en el método.

ESTABILIDAD.- La mejor estabilidad del compuesto fluorescencia se logra desarrollando la fluorescencia con ácido sulfúrico, a diferencia de lo indicado por Freedy (41) la fluores-

encia no cambia entre los 35 y 130 minutos, la estabilidad de la fluorescencia con ácido fosfórico es menor de 80 minutos, y la fluorescencia del color extraído es de 6 minutos cuando se emplea cloroforme este hecho implica una desventaja para su aplicación a métodos de rutina. Stea (49) logra una estabilidad del compuesto por 30 minutos empleando tetrabromuro de -- acetileno para la extracción.

FACILIDAD.- En el desarrollo de la fluorescencia no existe el factor consumo de tiempo señalado por otros autores puesto que el desarrollo de la fluorescencia y la lectura pueden hacerse con rapidez; no se requiere para lograr buenos resultados más que trabajar siempre en las mismas condiciones (tiempo, cantidad de reactivos), el lavado cuidadoso del material, el evitar la exposición excesiva de los tubos a la luz durante el desarrollo de la reacción.

COSTO.- El costo del aparato para la lectura de fluorescencia con los resultados óptimos de especificidad, sensibilidad, y facilidad señalados es un inconveniente, sin embargo se pueden emplear adaptaciones más accesibles con otros espectrofotómetros.

RESUMEN Y CONCLUSIONES.

Se trabajó en la reacción de Kober para producción de color de los estrógenos para determinaciones cuantitativas de -- los mismos siguiendo la técnica de Brown 1955, extracción del color según Ittrich, y aplicando la técnica seguida por Nocke en 1961.

La técnica de Brown presenta inconvenientes en cuanto a -- su sensibilidad, no así a su reproducibilidad pues el rango no excedió nunca el 10%, al modificar esta técnica, reduciendo el volumen inicial, la concentración de hidroquinona y la concentración final de ácido se lograron mejorar los resultados en -- cuanto a sensibilidad.

La técnica de Ittrich para extracción selectiva del color mejora la especificidad del método sobre todo si se trabaja -- con material biológico que contenga material interferente, pero el rango de error excedió al 10%, y la inestabilidad del -- color impide que se trabajen muchos problemas.

La técnica de Nocke resulta óptima por su sensibilidad, -- por el aumento de la lectura de densidad óptica corregida, por la proporcionalidad de los valores entre 1 microgramo y 10 microgramos, y sobre todas estas ventajas está la de la estabilidad del color (24 horas); reduciendo los volúmenes de reactivo empleado se logra un aumento de las densidades ópticas corregidas sin perder las demás características de la reacción.

La Fluorescencia desarrollada con ácido sulfúrico nos da lecturas de fluorescencia más altas, y una mayor sensibilidad -- 0.004 microgramos de estrona, la estabilidad de la reacción --

permite trabajar muchos problemas simultáneamente.

La Fluorescencia desarrollada con ácido fosfórico es menor la exactitud en las curvas de calibración en algunos puntos se pierde, sin embargo la especificidad es muy grande, y el material interferente es muy pequeño, el único inconveniente es lo cuidadoso del tratamiento con respecto a la humedad, el método aplicado a determinaciones en líquidos biológicos presentaría la ventaja de mayor especificidad.

La fluorescencia producida por el color extraído de la reacción de Kober según Itrich da resultados reproducibles y con una sensibilidad de .006 microgramos de estrona, el inconveniente más grande es la desaparición rápida de la fluorescencia, lográndose mayor especificidad por la extracción selectiva del color producido por el estrógeno.

Comparando las medidas colorimétricas y fluorométricas no existen dudas acerca de la mayor sensibilidad del método fluorométrico, parece claro que esta sensibilidad es sólo comparable con el método isotópico.

En fluorometría y especialmente en nuestro caso que se contaba con un aparato que permitía emplear un espectro muy amplio, y de él hacer una selección muy específica de las longitudes de onda de emisión y de fluorescencia, existe la posibilidad de una especificidad mayor en la lectura de la fluorescencia.

El desarrollo de la fluorescencia es simple, y en la desarrollada por ácido sulfúrico no existe el factor tiempo señalado por otros autores (41), pues la estabilidad de la reacción es de unos 15 minutos, lo que permite trabajar simul

táneamente varios problemas.

En nuestro caso especial de determinación de niveles muy bajos hacen inmejorable la selección del desarrollo de fluorescencia.

El único inconveniente del método fluorométrico es lo costoso del aparato.

+ + + + +

BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Adlercreutz H.
Acta Endocr. Suppl 72 1962
"Studies in Oestrogen Excretion in Human Bile".
- 2.- Aitken E. H. and Preedy, J. H. K.
J. Endocrinol. 2, 251 (1953)
"The Fluorescence and Absorption Spectra of Oestrone, Oestradiol-17-beta, and Oestriol Compounds".
- 3.- Allen W. M.
J. Clin. Endocrinol. 10, 71 (1950)
"A simple method for analyzing Complicated Absorption - Curves of use in the Colorimetric Determination of - - Urinary Steroids"
- 4.- Bates R. W.
Endocrinology, 47, 166 (1950)
"Experimental Basis for Selecting the Optimal Conditions for Quantitative Fluorometry of Natural Estrogens".
- 5.- Bates R. W., Cohen H.
Endocrinology, 47, 182 (1950)
"Fluorescence Spectra of Natural Estrogens and their - Application to Biological Extracts".
- 6.- Bauld W. S.
Biochem J. 56, 426 (1954)
"Some errors in the Colorimetric Estimation of Oestriol, Oestrone and Oestradiol by Kober Reaction".
- 7.- Bauld W. S.
Biochem J. 59, 294 (1955)
"Separation of Oestrogens in Urinary Extracts by Partition Chromatography".
- 8.- Bauld W. S.
Biochem J. 61, 488 (1956)
"A Method for the Determination of Oestriol, Oestrone - and Oestradiol 17 beta in Human Urine by Partition - - Chromatography and Colorimetric Estimation".
- 9.- Bauld W. S., Greenway A. N.
Glick D., Ed. Methods of Biochemical Analyses 5 New York
pag. 337 (1957)
"Chemical Determination of Estrogens in Human Urine".
- 10.- Felling C. C.
Acta Endocrinol.
Suppl 70 1963
"Gel Filtration of Conjugated Urinary Oestrogens and its Application in Clinical Assay".

- 11.- Bradshaw L.
Nature 190, 810 (1961)
"A Supplement to the Kober Reaction".
- 12.- Bransberg H. Osborn S. B. Stern M. I.
J. Endocrinol. 11, 177 (1954)
"The determination of Oestrogens in Body Fluids".
- 13.- Brown
J. Endocrinol. 8, 196 (1952)
"Some Observations on the Kober colour and Fluorescence Reactions of the Natural Oestrogens".
- 14.- Brown J. B. in G. E. Wolstenholme ed. Ciba Foundation Colloquia on Endocrinology Vol. II J and A Churchill Ltd London 1952 p. 132
"Mechanism of the Kober Reaction".
- 15.- Brown J. B.
Biochem J. 60, 185 (1955)
"Estimation of Oestrogens in Urine".
- 16.- Brown J. B. Bulbrook R. D. Greenwood F. C.
J. Endocrinol 16, 41 (1957)
"An evaluation of a Chemical Method for Estimation of Oestriol, Oestrone, and Oestradiol 17 beta in Human - Urine".
- 17.- Brown J. B. Bulbrook R. Greenwood F. C.
J. Endocrinol 16, 49 (1957)
"The relationship between Urinary Oestrogens and Oestrogens Produced in body".
- 18.- Brown J. B. Blair H. A.
J. Endocrinol. 20 331 (1960)
"A method for the determination of Very Small Amounts of Oestrone in Human Urine".
- 19.- Bulbrook R. D. Greenwood F. C. Williams P. C.
In Alstair R. Currie ed Endocrine Aspects of Breast Cancer - E. and S. Livingstone Ltd. Edinburgh and London, 1958 pag. 159 "Urinary Oestrogens".
- 20.- Dorfman R. I.
In Dorfman "Methods in Hormone Research".
Academic Press N. Y. & London
Vol. II pag. 59 (1962)
"Estrogens".
- 21.- Eberlein W. R. Bongiovanni A. M. Francia C. M.
J. Clin. Endocrinol Metab. 18, 1274 (1958)
"A Simplified Method for the Routine Measurements of Urinary Estriol".

- 22.- Engel L. L. Salunwhite W. R. Carter P. Nathanson I. T.
J. Biol. Chem 185, 255 (1950)
"The separation of Natural Estrogens by Counter current
Distribution".
- 23.- Engel L. L. Cameron C. B., Stoffyn A.
Anal. Biochem 2, 114 (1961)
"The Estimation of Urinary Metabolites of Administered
Estradiol 17 beta 6₁₂".
- 24.- Encarnillo R. F.
In F. K. Davis Co. "Laboratory Test in Diagnosis and -
Investigation of Endocrine Functions".
pag 397 (1962)
"Urinary Estrogens".
- 25.- Pinkelstein M. Bestrin S. et Koch W.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 64, 64 (1947)
"Estimation of Steroid Estrogens by Fluorimetry".
- 26.- Givner M. I. Ewald W. S. & Vagi K.
Biochem J. 77, 400 (1960)
"A Method for the Quantitative Fractionation of mixtures
of 2 Methoxy oestrone, Oestrone, Ring D alfa ketolic --
Oestrogens Oestradiol 17 beta, 16 epi Oestriol and --
Oestriol by Partition Chromatography and Girard Reaction".
- 27.- Givner M. I. Ewald W. S. & Vagi K.
Biochem J. 77, 400 (1960)
"A Chemical Method for the quantitative Determination of
2 Methoxyoestrone, Oestrone, Ring alfa ketolic Oestro-
gens, Oestradiol 17 beta, 16 epi Oestriol and Oestriol
in Human Urine".
- 28.- Goldzieher J. W.
Endocrinology 53, 527 (1953)
"The Measurement of Estrogen Mixtures by Differential -
Fluorimetry".
- 29.- Goldzieher J. W. Bodenchuk J. M. and Nolan P.
J. Biol. Chem 189, 621 (1952)
"The fluorescence Reaction of Steroids".
- 30.- Ichii S. Ferchielli E. Perloff W. H. Dorfman R. I.
Anal Biochem 2, 452 (1961)
"De termination of Plasma Estrone and Estradiol 17 beta".
- 31.- Itlich G.
Hoppe Seylers Z. Physiol Chem. 312, 1 (1958)
"Eine neue Methode zur chemischen Bestimmung der - - -
Oestrogenen Hormone im Harn".

- 32.- Ittrich G.
Acta Endocrinol, 15, 34 (1960)
"Untersuchungen über die Extraktion des Rüten Kober-
Farbstoffe durch Organische Lösungsmittel zur Oestro-
genbestimmung im Harn".
- 33.- Ittrich G.
Hoppe Seylers Z. physiol Chem. 320, 103 (1960)
"Eine Methode zur chemischen Bestimmung von Oestrogenen
Hormone in Blut, Milch an Colostrum".
- 34.- Jailer J. W.
Endocrinology 41, 198 (1947)
"A Fluorometric Method for the Determination of Estrogens".
- 35.- Jayle M. P.
In Masson et Cie Ed. "Analyse des Steroides Hormonaux"
Vol. II pag 330 (1962) Paris.
"Analyse des Phenolesteroïdes".
- 36.- Kober
Biochem Ztschr 139, 209 (1911)
"Ein kolorimetrische Bestimmung des Brunsthormons".
- 37.- Lisbon B. P. and E. Diezfalusy
Acta Endocr. 40, 60 (1962)
"Separation and characterization of Steroid Oestrogens
by means of Thin Layer Chromatography".
- 38.- Lisbon B. P. and Diezfalusy
Acta Endocr. 41, 545 (1963)
"Localization of Steroid Oestrogens in situ from Thin
Layer Chromatography".
- 39.- Marlow H. W.
J. Biological Chem. 183, 167 (1950)
"Groups involves in Zimmerman and Kober Reactions".
- 40.- Nocke W.
Biochem J. 78, 593 (1961)
"A Study of the Colorimetric Estimation of Oestradiol
17 beta Oestradiol 17 alfa, Oestrone, Oestriol and 16
epi Oestriol by Kober Reaction".
- 41.- Freedy J. R. K. Aitken E. H.
J. Biol. Chem 236, 1297 (1961)
"Column Partition Chromatography of Estrone, Estradiol
17 b and Estriol in Phenolic Extracts of Urine; Fluorescence
Characteristics of Interfering Material".
- 42.- Freedy J. R. K. and Aitken E. H.
J. Biol. Chem 236, 1300 (1961)
"The Determination of Estrone, Estradiol and Estriol in
Urine and Plasma with Column Partition Chromatography".

- 43.- Roy E. J. Brown J. B.
J. Endocrinol. 9, 21 (1960)
"A Method for the Estimation of Oestriol, Oestrone, and Oestradiol 17 beta in the Blood of the Pregnant Woman and of the Foetus".
- 44.- Roy E. J.
J. Endocr. 25, 361 (1962)
"Application of the Ittrich extraction procedure to the Fluorometric measurement of Oestrogens in Blood".
- 45.- Salonenkangas E. A. & Fulbrook R. D.
J. Endocr. 22, 47 (1961)
"The determination of Small Quantities of Urinary Oestrone, Oestradiol 17 beta, Oestriol using Ittrich's - Extraction Method".
- 46.- Slaunwhite W. B. Jr.
J. Biol. Chem 191, 627 (1951)
"The Fluorescence and Extinction and Partition Coefficients of Estrogens".
- 47.- Stimmel B. F.
J. Biol. Chem 165, 73 (1946)
"The utilization of a Color Correction Equation with the Kober Reagent for the Estimation of the Estrogens in Human Urine with low Estrogen Content".
- 48.- Stevenson M. F., Marrian G. F.
Biochem J. 41, 507 (1947)
"The Determination of Oestrogens in Human Pregnancy Urine, A new Method of Correcting for the Brown Colour Developed in Kober Reaction by Non oestrogenic Substances".
- 49.- Stea F. Thorsen T.
Acta Endocr. 41, 481 (1962)
"Fluorometric determination of Oestrogenic Steroids using Ittrich's extraction method".
- 50.- Szego C. M. and Samuels L. T. J.
J. Biol. Chem. 151, 587 (1943)
"Colorimetric Determination of Estrogens: A method for - the Determination of Total Estrone and Estradiol from Tissue Sources".
- 51.- Szego C. M., Samuels L. T. J.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 43, 263 (1940)
"A New Reagent for Quantitative Estimation of Estrone".
- 52.- Veldhuis A. H.
J. Biol. Chem 202, 107 (1953)
"A Chemical method for the Determination of Estrogens in Plasma".
- + + + + +