

## Análisis directo de esteroides urinarios por cromatografía gas-líquido

J. M.ª Macarulla, J. A. Gómez-Capilla y C. Osorio

Departamento de Fisiología y Bioquímica  
Facultad de Medicina  
Granada

(Recibido el 22 de diciembre de 1972)

J. M.ª MACARULLA, J. A. GÓMEZ-CAPILLA and C. OSORIO. *Quantitative Analysis of Steroids in Urine by Gas-liquid Chromatography*. Rev. esp. Fisiol., 30, 67-70. 1974.

A method of acid hydrolysis of steroid substances in urine, with simultaneous extraction with trichlorethylene as organic solvent, is developed. The qualities of this solvent for the extraction of steroids from aqueous solution are discussed.

Doing, in the extract, a direct gas-chromatography, without silylation of steroid substances, at a programmed temperature from 190° C to 265° C increasing 2.5° C per minute, in 30 minutes, it is possible to obtain a quantitative analysis of 17-ketosteroids, testosterone, pregnandiol, allo-pregnandiol and cholesterol, using cholestanone as internal standard.

The method seems adequate for the clinical follow up of pregnancy and also for diagnosis and clinical follow up of adrenal cortex dysfunction.

Las técnicas de cromatografía en fase gaseosa, aplicadas al análisis de sustancias esteroides (1-6), han resultado especialmente útiles en cuanto a precisión, especificidad y sencillez del análisis.

Los esteroides se eliminan por la orina en forma de derivados glucurónicos o ésteres sulfúricos hidrosolubles. Para el análisis cromatográfico se precisa hidrolizar los glucurónidos y los ésteres con el fin de extraer los esteroides — liposolubles — y determinarlos individual y conjuntamente.

La hidrólisis enzimática resulta relativamente larga y costosa; por otra parte, la hidrólisis ácida supone pérdidas consi-

derables por destrucción de algunos esteroides. VAN KAMPEN y ANKER (7) acoplan la hidrólisis ácida a una extracción simultánea con 1,2-dicloroetano (DCE), reduciendo las pérdidas y realizan un análisis cromatográfico directo, sin silanizar los esteroides.

En el método que a continuación se describe se sigue la orientación de VAN KAMPEN y ANKER, pero se ha preferido otro disolvente, se modifica la técnica y se adopta otro programa cromatográfico. El objetivo fundamental es hacerla aplicable al análisis diario en el Laboratorio de Bioquímica Clínica.

### Material y métodos

Se recoge la orina de 24 horas en un frasco que contiene 1 ml de HCl concentrado y se guarda en frigorífico a 4° C hasta completar la recogida de la muestra. Se mezcla bien, se anota el volumen total y se procede al análisis.

En un matraz esférico de 100 ml de capacidad y boca esmerilada, se introduce por este orden: 10 ml de tricloroetileno (TCE), 25 ml de orina problema y 8 ml de HCl concentrado. Se agita bien, se adapta al matraz un refrigerante de reflujo y se coloca en baño maría. Se cronometran 10 minutos desde que empieza la ebullición del TCE, se saca del baño y se enfría el matraz antes de separar el refrigerante.

Se descarta la fase acuosa y se transfiere la fase orgánica — más densa — a un tubo de centrifuga de 15 ml con tapón esmerilado. Se añaden 5 ml de NaOH 2,5 N para extraer estrógenos y pigmentos. Se agita y se centrifuga 5 minutos a 2.000 rpm descartando la fase acuosa.

Se lava el TCE con agua destilada hasta pH rigurosamente neutro, decantando cada vez, después de centrifugar. Se pasan 4 ml de la fase orgánica a otro tubo igual, se añaden 20  $\mu$ l de una disolución patrón de colestano en TCE de 2 mg/ml; se mezcla bien y se seca a 37° C bajo corriente de nitrógeno. A continuación, se disuelve el extracto seco en 100  $\mu$ l de etanol absoluto. Se toman 3  $\mu$ l de esta disolución de esteroides con una microjeringa Hamilton y se inyectan a la columna cromatográfica.

Las condiciones que adoptamos en el análisis cromatográfico son las siguientes: Cromatógrafo Carlo Erba, modelo GI, columna de vidrio de 2 m con soporte inerte gas chrom P silanizado, líquido de partición SE 30 al 1% y nitrógeno puro como gas portador. Cámara de inyección a 270° C. Flujo de nitrógeno 12 ml/min. Atenuación 100:8. Programa de temperatura de la columna desde

190° C hasta 265° C, con incremento regular de 2,5° C/min. El tiempo total de salida de los esteroides urinarios, siguiendo este programa, es de 30 minutos.

*Cálculos.* Se identifica cada esteroide por lectura del tiempo de retención absoluto o relativo al patrón interno, y se determina su concentración comparando el área de su pico respectivo con el área del pico del patrón interno. En las condiciones de trabajo descritas, el área del patrón equivale a 4 mg de esteroide por litro de orina.

### Resultados y discusión

El disolvente orgánico utilizado (TCE) ofrece las condiciones requeridas para un líquido de extracción de sustancias esteroideas con una temperatura de ebullición de 87° C frente a la de 83,5° C del DCE (8), lo que resulta ventajoso para una hidrólisis más rápida y cuantitativa.

Cuanto más alta sea la densidad del disolvente, resulta también más fácil la separación de las fases acuosa y orgánica. El TCE tiene una densidad de 1,464 g/cc frente a la densidad de 1,235 g/cc del DCE (8).

En análisis paralelos con ambos disolventes, los resultados finales son idénticos, si bien con el DCE se requieren 15 minutos para la hidrólisis completa y se invierte más tiempo en las centrifugaciones y decantaciones, por su menor densidad.

Con mezclas sintéticas de esteroides se ha determinado el tiempo de retención exacto siguiendo nuestro programa, y se ha comparado con el tiempo de retención de la colestano, como patrón interno. En un conjunto de siete cromatogramas, perfectamente concordantes y ajustados al método descrito, se realizan las mediciones que se reflejan en la tabla I.

El tiempo de la colastano fue de  $29,51 \pm 0,02$  minutos y a este valor se refieren los resultados de la tabla I.

La figura 1 representa el cromatograma de una mezcla de cuatro esteroides patro-

Tabla I. *Tiempos de retención (medias ± DS) de varias sustancias esteroideas referidas a la colestanona como unidad. (Tc) siete determinaciones de cada esteroide.*

Esteroides	T esteroide/T colestanona (Tc ± DS)
Androstendiol	0,421 ± 0,004
Etiocolanona	0,430 ± 0,005
Dehidroepiandrosterona	0,468 ± 0,003
Androsterona	0,471 ± 0,005
Testosterona	0,554 ± 0,002
Pregnan diol	0,603 ± 0,005
Alopregnan diol	0,630 ± 0,004
Hidroxiandrostendiona	0,719 ± 0,004
Pregnan triol	0,762 ± 0,005
Pregnan triolona	0,871 ± 0,006
Colesterol	0,972 ± 0,006
Colestanona	1,000 —

nes en concordancia con lo expuesto. Los tiempos de retención corresponden a los determinados en la tabla y las áreas de cada pico son proporcionales a la concentración de esteroide.

En la figura 2 se representan superpuestos tres cromatogramas de esteroides realizados en orina de mujeres. En el A,

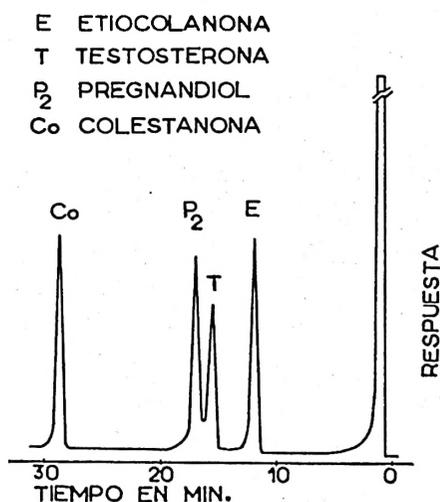


Fig. 1. *Cromatograma de una mezcla de cuatro sustancias esteroideas.*

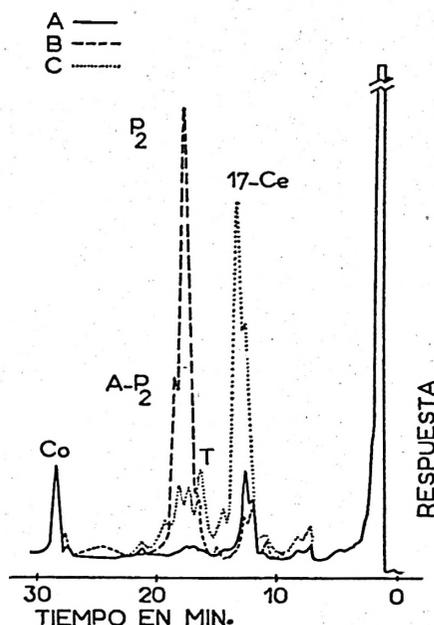


Fig. 2. *Cromatogramas de esteroides en orina de mujer.*

A: mujer normal. B: mujer embarazada. C: mujer con síndrome adrenogenital. Abreviaturas: 17-Ce = 17-cetosteroides; T = testosterona; P<sub>2</sub> = pregnandioli; A-P<sub>2</sub> = alopregnan dioli; Co = colestanona.

de mujer normal, además del patrón interno, los picos más destacados corresponden a los 17-cetosteroides. En el B, de mujer embarazada, se observa un considerable aumento de pregnandioli y alopregnan dioli. En el C, de mujer con síndrome adrenogenital, lo más destacado es el aumento de 17-cetosteroides; aparece un pico correspondiente a la testosterona y aumentan el pregnandioli y alopregnan dioli.

El método de extracción con tricloroetileno simultáneamente con la hidrólisis ácida de los esteroides urinarios evita el largo tratamiento enzimático y los resultados son suficientemente precisos para utilizar el método en análisis clínico diario. La duración total del análisis de cua-

tro muestras de orina por este método, simultaneizando convenientemente, no es superior a tres horas, con la cromatografía incluida. Por todo ello, se estima que puede ser útil en la valoración rápida de hormonas esteroideas con fines clínicos.

### Resumen

Para la determinación directa de esteroides en orina se ha modificado el método de hidrólisis y extracción simultánea de VAN KAMPEN y ANKER, eligiendo el tricloroetileno como líquido de extracción y programando la temperatura de cromatografía de 190 a 265° C, a razón de 2,5° C/minuto. Se exponen los resultados obtenidos en orina normal, de mujeres embarazadas y de mujer con síndrome adreno-genital. El método elaborado resulta muy útil en la clínica diaria.

### Bibliografía

1. ADLERCREUTZ, H. y LUUKKAINEN, T.: En «Gas Chromatography of steroids in Biological Fluids» (M. B. Lipsett, ed.). Plenum Press, Nueva York, 1965.
2. HEIKKILÄ, J. y ADLERCREUTZ, H.: *J. Steroid Biochem.*, **1**, 243, 1970.
3. KELLY, R. W.: *J. Chromatog.*, **54**, 345, 1971.
4. KLOPPER, A. I.: *Clin. Chim. Acta*, **34**, 215, 1971.
5. MACARULLA, J. M., GÓMEZ-CAPILLA, J. A. y OSORIO, C.: *Actas XIV Reun. Nal. Soc. esp. C. Fisiol.*, Sevilla, 1973, 48.
6. VAN DER MOLEN, H. J., JONG, F. H. y COOKE, B. A.: *Clin. Chim. Acta*, **34**, 1969, 1971.
7. VAN KAMPEN, E. J. y ANKER, A. P.: *Clin. Chim. Acta*, **34**, 241, 1971.
8. WEAST, R. C.: «Handbook of Chemistry and Physics». The Chemical Rubber. Cleveland, 1972. C-307, 314.