

## Condiciones para la hidrólisis de los esteroides conjugados de la orina humana

M. C. Ruiz y M. I. Arranz

Cátedra de Endocrinología Experimental  
y Laboratorio Hormonal del Hospital Clínico de San Carlos  
Facultad de Medicina  
Universidad Complutense  
Madrid

(Recibido el 2 de abril de 1975)

M. C. RUIZ and M. I. ARRANZ. *Hydrolytic Conditions of the Conjugated Steroids From Human Urine*. Rev. esp. Fisiol., 32, 335-340, 1976.

The hydrolysis of dehydroepiandrosterone sulfate added to human urine was studied under several hydrolytic procedures. Enzymatic and acid hydrolysis with and without the previous removal of enzymic inhibitors present in the human urine were compared. The simple precipitation of inorganic ions with barium acetate before the enzymatic hydrolysis was considered an efficient procedure giving an 81 % recovery of the added dehydroepiandrosterone. Since this procedure does not involve rearrangements in the steroid molecules, and because of its simplicity it is considered adequate for the determination of the urinary steroid excretion patterns in humans allowing the quantitation of some conjugates (16  $\alpha$ -hydroxy-dehydroepiandrosterone) otherwise not detectable because of its incomplete hydrolysis and extraction.

Una de las mayores dificultades que se presentan en la valoración de los metabolitos esteroideos urinarios, tanto por los métodos convencionales — colorimétricos y fluorimétricos — como por los específicos de cromatografía gaseosa, estriba en las condiciones de hidrólisis requeridas para la liberación de los esteroides conjugados.

La aplicación de la hidrólisis ácida es limitada debido a la degradación que sufren ciertos esteroides a pH bajo (4, 10, 12, 13). Mediante hidrólisis enzimática, glucuronidasa-sulfatasa, tampoco se obtienen resultados satisfactorios por la pre-

sencia en la orina de sustancias inhibidoras de la sulfatasa (6). Se impone, por tanto, una doble hidrólisis: enzimática-ácida, enzimática-solvolítica, o bien una eliminación previa a la hidrólisis de los inhibidores de la acción enzimática.

El objeto del presente trabajo es fijar las condiciones de hidrólisis óptimas, que permitan la valoración por cromatografía gaseosa de los diversos esteroides urinarios sin consumir un tiempo excesivo, lo cual dificultaría su aplicación práctica.

El estudio se ha realizado adicionando a la orina, como sustrato específico de la sulfatasa, sulfato de dehidroepiandroste-

rona \* y valorando posteriormente la dehidroepiandrosterona liberada mediante diferentes métodos hidrolíticos.

### Material y métodos

Alicuotas de 10 ml de un *pool* de orina se someten a diversas hidrólisis:

A) HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA. Se ajusta la orina a pH 5,2 (ácido acético o NaOH 1 N), se adicionan: 0,25 ml de enzima *Helix pomatia* Boehringer (glucuronidasa 1,3 UI, arilsulfatasa 0,65 UI), 2,5 ml de solución tampón de acetato sódico pH 5,2, 0,2 ml de cloroformo, se completa el volumen a 20 ml con H<sub>2</sub>O destilada y se incuba a 36° C durante 24 horas.

B) HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA Y ÁCIDA. Una vez hidrolizada enzimáticamente la orina, según A, y extraídos los esteroides liberados, como se indica posteriormente, se acidifica la fase acuosa a pH 1 con HCl o H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se lleva a 100° C durante 25 minutos.

C) HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA PREVIA PURIFICACIÓN URINARIA MEDIANTE COLUMNA CROMATOGRÁFICA. La orina se pasa a través de una columna de vidrio (12 × 1,5 centímetros) rellena con Amberlita XAD-2 (6,5 cm) que previamente ha sido lavada con H<sub>2</sub>O desionizada. Los esteroides se eluyen con 50 ml de metanol y el eluato se evapora en rotovapor con corriente de

---

*Abreviaturas.* Dehidroepiandrosterona (DHA). Sulfato de dehidroepiandrosterona (S·DHA). 16  $\alpha$ -hidroxi-dehidroepiandrosterona (16  $\alpha$ -OH-DHA). Androsterona (A). Etiocolanolona (Et). 11-oxo-androsterona (O-A). 11-oxo-eticolanolona (O-Et). 11  $\beta$ -hidroxiandrosterona (OH-A). 11  $\beta$ -hidroxi-eticolanolona (OH-Et). 5  $\beta$ -pregnano-3 $\alpha$ , 17 $\alpha$ , 20 $\alpha$ -triol (P<sub>3</sub>). Estándar-isobutirato de colesterol (St). Eteres-trimetil-silil (TMS). Eteres-trimetil-silil de metoximas (MO-TMS).

aire hasta sequedad a 50-65° C. Al residuo se adicionan 10 ml de H<sub>2</sub>O y se somete a hidrólisis enzimática A.

D) HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA PREVIA PURIFICACIÓN URINARIA MEDIANTE PRECIPITACIÓN CON ACETATO BÁRICO. El volumen inicial de orina (10 ml) se completa a 20 ml con H<sub>2</sub>O destilada, se ajusta el pH a 10,5-11 (NaOH 3-1 N), se adiciona 1 ml de solución acuosa de acetato bórico al 20 % y después de agitar y dejar sedimentar durante 5 minutos se centrifuga (1.800 r.p.m.) y decanta. El precipitado se lava con 3 ml de H<sub>2</sub>O destilada que, una vez centrifugados, se unen a la fase acuosa decantada anteriormente y se somete a hidrólisis enzimática A.

EXTRACCIÓN. Los hidrolizados se saturan con NaCl sólido, se les adiciona 1 ml de solución estándar interno (isobutirato de colesterol en acetato de etilo, 20  $\mu$ g/ml), 20 ml de acetato de etilo: cloruro de metileno (3:2) y se les lleva a agitador mecánico (19 r.p.m.) durante 20 minutos.

Después de centrifugar (15 minutos, 1.800 r.p.m.) se trasvasa la fase orgánica superior a tubo de ensayo limpio, se adicionan 10 ml de cloruro de metileno y se procede a lavar una vez con 5 ml de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>·6% en solución 12 % de NaCl en H<sub>2</sub>O y 3-4 veces con 5 ml cada vez de solución acuosa de NaCl (15 %). El pH del último lavado debe ser neutro.

Los extractos orgánicos se concentran en rotovapor a 50-65° C, hasta un volumen aproximado de 12 ml. Se secan con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se evaporan con corrientes de N<sub>2</sub> hasta sequedad.

FORMACIÓN DE DERIVADOS. a) Eteres-trimetil-silil (TMS): el residuo seco se disuelve en 0,3 ml de hexametildisilazano Serva; si es preciso se calienta a 50-60° C hasta completa disolución, se adicionan 0,05 ml de trimetilclorosilano Serva y se lleva a 65° C durante una hora.

b) TMS de metoximas (MO-TMS): al residuo seco se adicionan 0,5 ml de solución de clorhidrato de metoxiamina Serva al 3 % en piridina Merck seca y se deja 24 horas a temperatura ambiente. Se evapora a sequedad con corriente de N<sub>2</sub> y se forman los TMS como se ha indicado anteriormente.

**CROMATOGRAFÍA GASEOSA.** Los TMS una vez evaporados a sequedad con corriente de N<sub>2</sub> se disuelven en 1 ml de sulfuro de carbono, se lavan con 0,6 ml de H<sub>2</sub>O destilada e inmediatamente se centrifuga y separa la fase orgánica, que es evaporada de nuevo con corriente de N<sub>2</sub> hasta sequedad. El residuo se disuelve en 0,1 ml de sulfuro de carbono y se inyecta en el cromatógrafo 5 μl.

Las MO-TMS se evaporan y se extraen con sulfuro de carbono de forma similar a los TMS, realizando el lavado con solución acuosa saturada de ClNa.

El análisis cromatográfico se realiza mediante cromatógrafos de gases Perkin-Elmer 990 y Carlo Erba-Fractovap G-1 provistos de detectores de ionización de llama y columnas de vidrio (4 m × 2-3 mm) rellenas al 3 % sobre Gas Chrom Q de OV-1, para los TMS, y OV-225 para las MO-TMS. Como gas portador N<sub>2</sub> con un flujo de 40-50 ml/min, y temperaturas de trabajo 240° C para las columnas y 250° C para el bloque de inyección.

**CÁLCULO.** Las áreas de los picos cromatográficos se calculan por triangulación: altura por anchura media. Según la ecuación de la recta obtenida en el estudio de linealidad (fig 1) y teniendo en cuenta que se ha partido en los estudios realizados de 10 ml de orina, el cálculo final viene dado por:

$$\frac{A_{DHA}}{A_{st}} \cdot \frac{1}{0,046} \cdot \frac{1}{10} = \mu\text{g/ml}$$

A<sub>DHA</sub> = área del pico de DHA. A<sub>st</sub> = área del pico de estándar interno (20 μg).

**Resultados**

La valoración de la DHA se realiza en forma de derivados TMS (9), cuya linealidad frente al estándar interno (isobutirato de colesterol) se muestra en la figura 1, siendo la ecuación de la recta resultante la aplicada para el cálculo final.

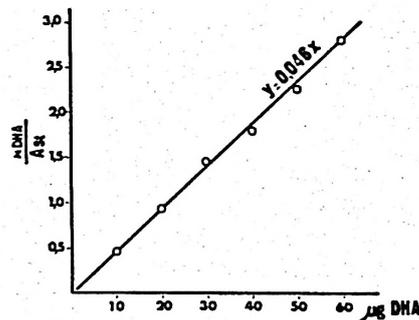


Fig. 1. Linealidad de respuesta del detector. Abscisa: μg de DHA; ordenada: relación de áreas de los picos cromatográficos para 20 μg de estándar interno (St).

Los valores de DHA, obtenidos en un pool de orina sometido a control de la hidrólisis enzimática, han sido de 0,17 μg/ml con enzima Serva (glucuronidasa 100.000 U Fishman/ml, arilsulfatasa 5 EU/ml), mientras que los correspondientes a los preparados enzimáticos Calbiochem (glucuronidasa 5,0 UI/ml, arilsulfatasa 5,0 UI/ml, arilsulfatasa 5,0 UI/ml).

Tabla I. Recuperación de DHA adicionada a la orina en forma de sulfato (3,69 μg/ml) y sometida a hidrólisis enzimática con diferente proporción de enzima y tiempo de hidrólisis.

Concentración inicial de DHA en la orina 0,26 μg/ml.

Enzima Boehringer		DHA		
Glucuronidasa UI/ml orina	Sulfatasa UI/ml orina	Tiempo horas	Encontrada μg/ml	Recuperada %
0,26	0,13	24	1,53	38,7
0,26	0,13	48	1,66	42,0
0,52	0,26	24	2,10	53,1

Tabla II. *Recuperación de DHA adicionada a la orina en forma de sulfato y sometida a diversas hidrólisis.*  
En Material y métodos se describen los distintos métodos utilizados.

Hidrólisis	Método	DHA			
		Inicial μg/ml	Adicionada μg/ml	Encontrada μg/ml	Recuperada %
Enzimática-simple	A	0,17	7,38	2,00	26,5
Enzimática-ácida (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	B	0,17	7,38	2,57	34,0
Enzimática-ácida (HCl)	B	0,17	7,38	3,39	44,9
Enzimática	C	0,51	3,69	3,35	79,9
Enzimática	D	1,31	3,69	4,05	81,0

tasa 1,0 UI/ml) y Boehringer (glucuronidasa 5,2 UI/ml, arilsulfatasa 2,6 UI/ml) son superiores, 0,24 μg/ml, e iguales entre sí y son por tanto los seleccionados.

Mediante la adición a la orina de S-DHA se ha valorado la recuperación de DHA liberada bajo diferentes condiciones de hidrólisis, según los métodos descritos. Los resultados obtenidos se muestran en las tablas I y II, siendo notablemente superiores y similares las recuperaciones correspondientes a hidrólisis enzimática previa purificación de la orina por colum-

na (método C) o por precipitación con acetato bórico (método D).

La figura 2 muestra los cromatogramas correspondientes a hidrolizados enzimáticos de una misma orina sin purificar (figura 2-a) y previa purificación con acetato bórico (fig. 2-b). Se aprecia un notable aumento de DHA y 16 α-hidroxi-DHA, en la orina sometida a purificación pre-hidrólisis, mientras que los demás esteroides permanecen prácticamente inalterados.

Los valores correspondientes a ambos

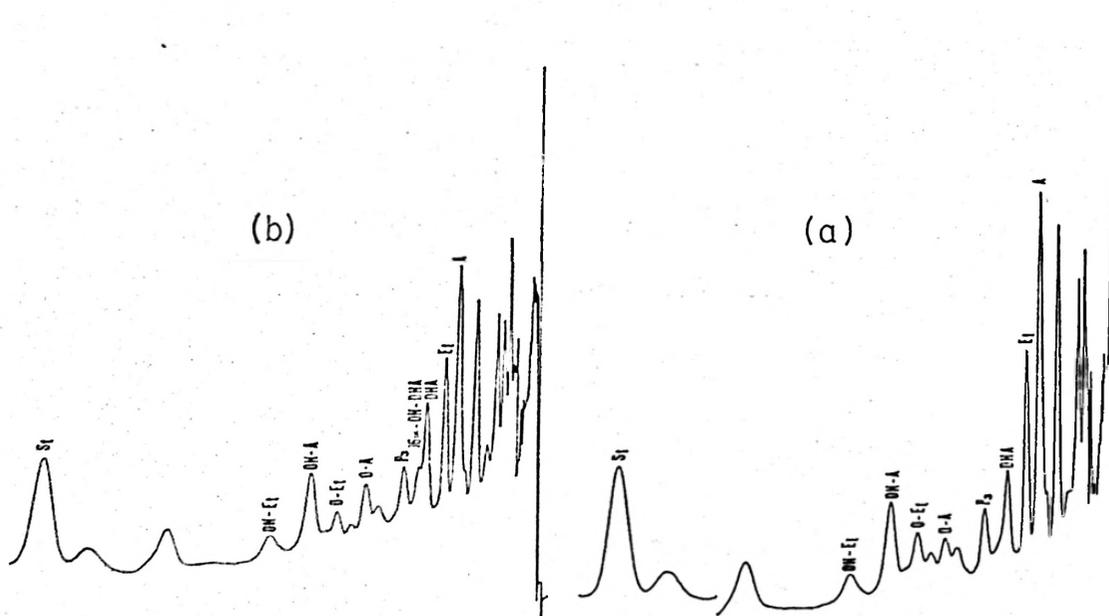


Fig. 2. *Cromatogramas de esteroides TMS correspondientes a una misma orina sometida a hidrólisis enzimática sin purificar (a), y previa purificación con acetato bórico (b).* Valores cuantitativos en tabla III.

Tabla III. *Metabolitos esteroideos de una orina sometida a hidrólisis enzimática sin y previa purificación con acetato bórico.*

Esteroiide	Orina (mg/día)	
	Sin purificar	Purificada
Androsterona	2,06	1,91
Etiocolanolona	1,33	1,28
Dehidroepiandrosterona	0,67	1,15
16 $\alpha$ -hidroxi-DHA	0,09	0,59
11-oxo-androsterona	0,08	0,11
11-oxo-etiolanolona	0,19	0,19
11 $\beta$ -hidroxi-androsterona	0,60	0,73
11 $\beta$ -hidroxi-etiolanolona	0,18	0,21
Pregnandiól	0,16	0,25
5 $\beta$ -Pregnano-3 $\alpha$ ,17 $\alpha$ ,20 $\alpha$ -triól	0,68	0,61
Tetrahidrocortisona	2,98	3,01
Tetrahidrocortisol	3,07	2,94
$\alpha$ -Cortolona	0,64	0,98
$\beta$ -Cortolona	0,14	0,17
$\alpha$ -Cortol	0,01	0,04
$\beta$ -Cortol	0,09	0,59

hidrolizados se dan en la tabla III, habiendo sido cuantificados los 17-cetosteroides como TMS, excepto la 16  $\alpha$ -OH-DHA que con el resto de los demás esteroideos ha sido valorada como MO-TMS (8).

### Discusión

El análisis de los diversos 17-cetosteroides en forma de derivados TMS, mediante fase OV-225, se realiza con buena resolución (fig. 2) a excepción de la 16  $\alpha$ -OH-DHA, en cuya cuantificación interfiere la DHA, por lo que su cálculo se hace en forma de MO-TMS (14) derivado que adicionalmente permite la dosificación de los pregnanos y 17-hidroxycorticosteroides (15).

Mediante hidrólisis enzimática simple sólo se recupera un 26,5 % de DHA (tabla II), que si bien se supera incrementando el tiempo y la proporción de enzima (tabla I) no llega a ser satisfactoria (53,1 %) ni con 0,26 UI de arilsulfatasa/ml de orina, cantidad de enzima que

aumenta considerablemente las emulsiones y dificulta la metodología.

De las posibles combinaciones de hidrólisis: enzimática-solvoltica, enzimática-ácida con extracción orgánica continua y enzimática-ácida rápida, las dos primeras no han sido ensayadas por considerar alargan notablemente el tiempo de análisis, y los resultados de recuperación de DHA obtenidos mediante hidrólisis enzimática-ácida rápida, método B, no han sido satisfactorias (34,0-44,9 %).

Se plantea, por tanto, la necesidad de eliminar los inhibidores urinarios de la sulfatasa, bien por adsorción de los esteroideos conjugados en columna cromatográfica y posterior hidrólisis enzimática del eluato esteroideo, técnica seguida por diversos autores (2, 7, 11, 13, 16); o bien precipitando de la orina con acetato bórico a pH básico los sulfatos y fosfatos inorgánicos (5), principales inhibidores enzimáticos de *Helix pomatia* (6).

Los resultados obtenidos mediante ambos tipos de purificación urinaria prehidrólisis enzimática, métodos C y D, son aceptables y similares (tabla II); no obstante, por su mayor sencillez se selecciona el método D que requiere un tiempo mínimo para su realización.

Las diferencias más significativas encontradas en los resultados de los esteroideos valorados con y sin purificación urinaria previa a la hidrólisis (tabla III), corresponden como es lógico a DHA y 16  $\alpha$ -OH-DHA esteroideos eliminados fundamentalmente en forma de sulfatos.

La proporción de enzima utilizada, 1,3 y 0,65 UI de  $\beta$ -glucuronidasa y arilsulfatasa, respectivamente, se ha calculado para una cantidad de esteroideos del orden de 100-130  $\mu$ g, para lo cual se valoran previamente los 17-cetosteroides urinarios totales por método semiautomatizado de la reacción de Zimmerman (1) y se parte de la alícuota de orina correspondiente (máximo 20 ml). Con dicha proporción de enzima las recuperaciones de DHA obtenidas mediante el método D (81,0 %),

son aceptables para aplicación en la práctica clínica, y lo consideramos idóneo para la valoración de los metabolitos esteroideos urinarios por cromatografía gaseosa.

#### Agradecimiento

Agradecemos al Prof. Oriol-Bosch la revisión y crítica del presente trabajo.

#### Resumen

Mediante la adición a la orina de sulfato de dehidroepiandrosterona se estudia la recuperación de DHA liberada bajo diferentes técnicas de hidrólisis enzimáticas: simple, combinada con hidrólisis ácida y previa eliminación urinaria de los inhibidores enzimáticos. El método de purificación pre-hidrólisis por eliminación de iones inorgánicos urinarios mediante precipitación con acetato bórico, se considera el más eficaz para aplicación clínica, dada la recuperación de DHA obtenida (81 %), su sencillez metodológica, y la no existencia de destrucciones esteroideas que permite la dosificación simultánea de diversos metabolitos urinarios.

#### Bibliografía

1. BAGAZGOITIA, F. J. y ORIOL-BOSCH, A.: *Arch. Fac. Med. Madrid*, **26**, 203-216, 1974.
2. BOYCE, K. y JENNER, F. A.: *Clin. Chim. Acta*, **23**, 23-25, 1969.
3. BRADLOW, H. L.: *Steroids*, **11**, 265-272, 1968.
4. CURTIUS, H. C. y MULLER, M.: *J. Chromat.*, **30**, 410-427, 1967.
5. CHEVINS, R., LAUNAY, J. M., JULIEN, R. y DREUX, C.: *Clin. Chim. Acta*, **55**, 333-343, 1974.
6. DODGSON, K. S. y SPENCER, B.: *Biochem. J.*, **55**, 315-320, 1973.
7. FAUCETTE, W. E. y CAWLEY, L. P.: *Clin. Biochem.*, **4**, 287-296, 1971.
8. GARDINER, W. L. y HORNING, E. C.: *Biochim. Biophys. Acta*, **115**, 524-526, 1966.
9. GLEISPACH, H., PODOLSKI, B., HOHENWALLNER, W. y BERGER, H.: *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.*, **6**, 592-598, 1969.
10. GOLDZIEHER, J. W. y AXELROD, L. R.: *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **22**, 1234-1241, 1962.
11. GRAEF, V. y FUCHS, M.: *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.*, **13**, 163-167, 1975.
12. HENRY, R. y THEVENET, M.: *Ann. Endocrinol.*, **14**, 628-641, 1953.
13. LIEBERMAN, S., MOND, B. y SMYLES, E.: *Recent. Prog. Hormone Res.*, **9**, 113-130, 1954.
14. RUIZ-GONZÁLEZ, M. C., MARTÍNEZ-VERANO, J. y ORIOL-BOSCH, A.: *J. Steroid Biochem.* (En prensa.)
15. RUIZ-GONZÁLEZ, M. C.: 2.º Simposio Int. Análisis de Esteroides. Barcelona, 1974. (En prensa.)
16. SHACKLETOS, C. H. L. y SJOVALL, J. y WISEN, O.: *Clin. Chim. Acta*, **27**, 354-356, 1970.