

DICNE
\$ 500--

800260

FECHA DE DEVOLUCION

El último sello marca la fecha tope para ser devuelto este libro.

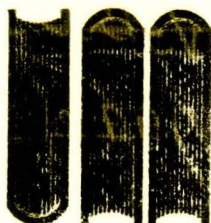
Vencido el plazo, el lector pagará 1.00 peso por cada día que pase.

(11-013)

~~10 NOV 1978~~
~~21 NOV. 1979~~

UNIVERSIDAD DE MONTERREY

DIVISION DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS



UNIVERSIDAD
DE MONTERREY

ESTUDIO COMPARATIVO DE 2 TÉCNICAS PARA
LA DETERMINACIÓN DE 17-CETOSTEROIDES
EN ORINA DE 24 HORAS

REPORTE DEL PROGRAMA DE EVALUACION FINAL

QUE PRESENTA

MA^{LD} ALMA VÁZQUEZ URIBE

EN OPCION AL TITULO DE
LICENCIADO EN QUIMICA CON ESPECIALIDAD
EN ANALISIS CLINICOS

BIBLIOTECA
UNIVERSIDAD DE MONTERREY

*Revisado
M. Ponce Lopez*

MONTERREY, N. L.

MAYO DE 1976

040.54
V393e

1976

800260

Con especial agradecimiento para mis maestros:

Sr. José Vargas Mena, Q.F.B. M.Sc.

Srita. Q.F.B. Ma. Teresa Garza Gallardo

Por su valiosa colaboración en la elaboración de este reporte
del Programa de Evaluación Final.

I N D I C E

	<u>PAGINA</u>
INTRODUCCION	1
MATERIAL Y METODOS	10
RESULTADOS	22
DISCUSION Y CONCLUSIONES.....	28
RESUMEN	30
BIBLIOGRAFIA	31

I N T O D U C I O N

Este estudio tiene como finalidad obtener una técnica adecuada para implantarse como análisis de rutina en un laboratorio.

La función de dicho estudio es comparar dos técnicas para la determinación de 17-Cetosteroides en orina de 24 horas, tomando en cuenta el tiempo de duración de cada técnica por muestra, el costo de los reactivos a utilizar, la dificultad para obtenerlos y las dificultades que puedan presentarse en cada determinación.

Para su establecimiento como un análisis rutinario de laboratorio, la técnica deberá cumplir con los siguientes requisitos: exactitud, precisión y especificidad.

ANALISIS DE ESTEROIDES.

Existen muchos métodos para la medición de Hormonas esteroides y sus metabolitos. La dilución de isótopos y los métodos de cromatografía de gases prometen ser de los más específicos y precisos que los métodos colorimétricos y fluorimétricos, pero es necesario utilizar un equipo muy especial que es -

caro, y que por lo tanto todavía no están al alcance de la mayor parte de los laboratorios clínicos. En general, los métodos espectrofotométricos y fluorométricos para el análisis de las distintas Hormonas esteroides dejan mucho que desear si se requiere una gran exactitud y precisión. Por lo tanto, a menudo es habitual sacrificar la especificidad en aras de la sencillez y reproducibilidad. Sin embargo, la utilidad del método sigue siendo grande cuando los resultados tienen significado clínico.

ESTIMACION DE 17-CETOSTEROIDES URINARIOS.

Los 17-Cetosteroides son metabolitos de andrógenos secretados por las adrenales, los testículos y posiblemente en cierto grado por los ovarios. En hombres, aproximadamente un tercio total de 17-Cetosteroides representa los metabolitos de testosterona secretada por los testículos, mientras la mayor parte de los dos tercios derivan de esteroides producidos por las adrenales. En mujeres, que de ordinario eliminan menores cantidades que las eliminadas por los hombres, el total de 17-Cetosteroides deriva casi exclusivamente de las adrenales. El grueso de los 17-Cetosteroides urinarios consiste en Androsterona, Epiandrosterona, Etiocolanolona, Dehidroepiandrosterona, 11-Ceto y 11beta-Hidroxianidrosterona, y 11-Ceto y 11beta-Hidroxi-etiolanolona. Debe recordarse que Dehidroepiandrosterona y 17-Cetosteroides 11-oxigenados son solo productos de las

adrenales, mientras los otros pueden proceder también de los precursores elaborados por las gónadas. Así el objeto principal de la determinación cuantitativa de estos metabolitos de esteroides, es comprobar la función gonadal y adrenal. En clínica su determinación sirve para valorar los posibles -- trastornos funcionales de estas glándulas (corteza suprarrenal, testículos y en pequeña proporción los ovarios). Se dispone de varios métodos químicos para la estimación total de 17-Cetosteroides, que ya mencionaremos a continuación. En la mayoría de todos los métodos que existen, la determinación cuantitativa final está basada en la reacción de color descrita originalmente por Zimmermann.

DEFINICION.

Esta denominación se aplica a la medición de 17-Cetosteroides neutros; la orina normal contiene también esteroides de ácidos biliares y fenólicos (estrógenos), así como corticoesteroides. Como ya dijimos antes que los 17-Cetosteroides neutros representan casi exclusivamente los productos metabólicos de los andrógenos (normalmente, una pequeña parte se debe también a oxidación de la cadena lateral en C-17 del cortisol).

Antes de describir con detalles los métodos de medición, puede ser ventajoso presentar las distintas etapas comunes a casi todos ellos:

1) Hidrólisis de los conjugados:

La mayor parte de las Hormonas esteroides se encuentran en la orina bajo la forma de conjugados acuosolubles, como sulfato o glucurónido, lo que obliga a liberar los esteroides por hidrólisis. Se utilizan para ello varios reactivos, como ácido clorhídrico. A veces se producen así sustancias que interfieren con la medición, y se prefieren actualmente otros reactivos, como: betaglucuronidasa o sulfatasa (enzimas), y ácido sulfúrico o perclórico, solos o en acetato de etilo.

2.- Extracción de los esteroides de los hidrolizados de orina: Los solventes más utilizados son el cloroformo, tetraloruro de carbono, cloruro de metilo, éter de metilo, éter dietílico, benceno, éter de petróleo, éter étílico. Sólo deben emplearse solventes muy puros. Algunos productos del comercio ya vienen con alto grado de pureza, pero otros deben purificarse antes del uso, otros tienen que purificarse repetidamente, por la formación espontánea de impurezas (por ejemplo: peróxidos en el éter dietílico).

3.- Eliminación de sustancias que interfieren con la medición: Ninguno de los solventes es selectivo de esteroides, y a menudo se extraen junto con el esteroides sustancias que interfieren con etapas posteriores de la técnica. Algunas de ellas (por ejemplo: los lípidos) se pueden eliminar por extracción con otro solvente antes de extraer los esteroides; otros se quitan del extracto orgánico mediante lavado con reactivos selectivos (por ejemplo: hidróxido sódico).

Si es posible se pueden utilizar los métodos de cromatografía --

en columna para separar los esteroides unos de otros, así como de las sustancias contaminantes.

4.- Eliminación del solvente: Se logra generalmente por simple evaporación al calor, o bajo presión reducida. Debe tenerse cuidado durante esta maniobra, porque los esteroides son termolábiles, y un calor excesivo los destruiría. Como los solventes en cuestión son tóxicos, y a veces inflamables, la evaporación debe llevarse a cabo en una campana bien ventilada, a prueba de explosión, sobre una placa caliente -- sin llama o en un baño de agua.

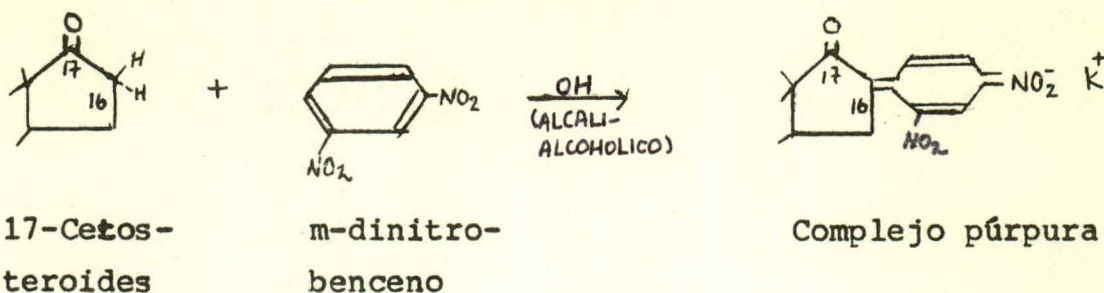
5.- Medición cuantitativa: Suele aplicarse al extracto seco una reacción coloreada propia de un determinado grupo de esteroides, en este caso se basa en la reacción de Zimmermann que se utiliza m-Dinitrobenceno con un alcali alcohólico.

6.- Patrones: Los esteroides utilizados como patrones deben ser sumamente puros.

REACCION DE CALLOW-ZIMMERMANN.

La base de la mayor parte de técnicas de medición de 17-Cetosteroides es la Reacción de Callow-Zimmermann, o sea la formación de complejos púrpura rojizo con absorción -- máxima en 520 nm durante la reacción entre esteroides de tipo 17-Ceto y m-Dinitrobenceno, en solución alcalina. Se ha demostrado que el desarrollo de color depende de la presencia de un grupo metileno activo adyacente a un grupo carbonilo, que

con mayor probabilidad de el producto: *



MUESTRA DE URINA.

Es preferible un volumen total de 24 horas, que se recogerá entre las 10 de la mañana del primer día y la misma hora del segundo día (para evitar el riesgo de error debido a la inclusión de dos muestras nocturnas). Se puede utilizar como preservador 1.0 gr. de sulfato de cobre anhidro en polvo fino, o 10 ml. de ácido clorhídrico concentrado, en el frasco de recolección.

COMENTARIOS.

La mayor parte de los 17-Cetosteroides urinarios son eliminados en forma de sus conjugados sulfato y glucurónido, los cuales son hidrolizados por ácido concentrado y calor. La duración de la hidrólisis es muy crítica. Menos de 10 minutos causaría hidrólisis incompleta y más de 15 minutos conduciría a destrucción gradual de los esteroides y formación de mayor cantidad de cromógenos no esteroides. La adición de ácido acético glacial puede ayudar a reducir al mínimo la formación de cromógenos no específicos durante el proceso de la hidrólisis, en particular en el caso de una orina alcalina.

Aunque para la extracción son adecuados disolventes como benceno, tetracloruro de carbono y éter; el dicloro etileno es el mejor disolvente de extracción en este caso porque puede extraer las Hormonas esteroides de la orina hidrolizada más cuantitativamente con una razón relativamente baja de disolvente a orina. Técnicamente, esto es una gran ventaja para un método de laboratorio rutinario porque evita la necesidad de manejar y evaporar grandes cantidades de disolvente (en nuestro caso, no se puede utilizar por la dificultad para conseguirse en esta ciudad).

El tratamiento del extracto con lentejas de hidróxido sódico es superior al tratamiento del extracto de cos---tumbre con solución acuosa de hidróxido sódico (en nuestro -- caso utilizamos ambos reactivos). Pero el hidróxido sólido -- elimina fenoles y otros pigmentos urinarios más completamente.

Comentarios acerca de la Hidrólisis:- Ya hemos mencionado antes que en ocasiones se producen cromógenos contaminantes a partir de pigmentos urinarios durante la hidrólisis ácida, y con esto hay un error, ya que dan complejos de color menos intenso al efectuar la reacción de coloración de Callow-Zimmermann y estos absorben máximamente entre 400-440 nm. Por lo tanto, es fundamental la hidrólisis, pero los métodos disponibles no son perfectos. La hidrólisis ácida, con ayuda de calor, da lugar a la aparición de pigmentos y cromógenos contaminantes, y tiende además, a alterar algunas moléculas esteroides, en especial las no saturadas. Para lograr -

una hidrólisis completa, la ebullición en solución ácida debe durar 10 minutos cuando menos, sin pasar de ninguna manera de 20 minutos.

VALORES NORMALES.

En general:

Hasta 1 año	-----	menos de 1 mg./24Hs.
1-4 años	-----	menos de 2 mg./24Hs.
5-8 años	-----	menos de 3 mg./24Hs.
9-12 años	-----	3-10 mg./24Hs.
13-16 años	-----	5-12 mg./24Hs.
Varón adulto	-----	10-30 mg./24Hs.
Hembra adulta	-----	5-15 mg./24Hs.

Para los niños los valores de eliminación son los mismos para ambos sexos durante la infancia. En ambos sexos, la velocidad de eliminación disminuye después de la edad de 60 años, aproximadamente. La disminución es progresiva.

IMPORTANCIA CLINICA.

Se obtienen valores disminuidos en: Hipogonadismo primario (síndrome de Klinefelter, castración), Hipogonadismo secundario (Pan-hipopituitarismo) e Hipoadrenalismo primario (enfermedad de Addison, especialmente en mujeres).

Se obtienen valores aumentados en: tumores testiculares (tumor de células intersticiales, corioepitelioma), Hiperplasia adrenal y Carcinoma adrenal.

Nivel de esteroides urinarios en distintas enferme-

dades :

Condición:

17-Cetosteroides/24Hs. :

- | | | |
|--------------------------------|-------|------------------------|
| 1) Síndrome suprarrenogenital | ----- | Aumentados |
| 2) Enfermedad de Cushing: | | |
| por hiperplasia | ----- | Normales o aumentados |
| por cáncer | ----- | Generalmente altos |
| por adenoma | ----- | Rara vez aumentan |
| 3) Enfermedad de Addison | ----- | Muy bajos |
| 4) Panhipopituitarismo | ----- | Bajos o muy bajos |
| 5) Tumor testicular de Leyding | ----- | Muy altos |
| 6) Síndrome de Stein-Leventhal | ----- | Ligeramente aumentados |
| 7) Mixedema | ----- | Disminuidos |
| 8) Anorexia nerviosa | ----- | Ligeramente bajos |
| 9) Tirotoxicosis | | |
| (algunos casos) | ----- | Normales |
| 10) Obesidad (algunos casos) | ----- | Normales |
| 11) Cirrosis hepática | ----- | Disminuidos |
| 12) Terapéutica | | |
| con estrógenos | ----- | Disminuidos |
| 13) Salciliatos | | |
| (tratamiento prolongado) | ----- | Disminuidos |

MATERIAL Y METODOS

Se emplearon en este estudio las técnicas de: A) Hy-
cel (1) y de B) Dreker, Heisler, Seism, Person y McGavack (2).
Además se hizo una modificación de la técnica "B".

Se trabajaron 12 muestras por triplicado en cada o--
casión para cada una de las técnicas, haciéndose un total de -
36 determinaciones en una mezcla homogénea de orinas de 24 ho-
ras.

Preparación de la mezcla homogénea de orinas de 24 horas:

Las muestras de orina que se utilizaron para prepa--
rar la mezcla se recolectaron de personas seleccionadas al a--
zar que asistieron al Laboratorio de Análisis Clínicos Servi--
cio Social Labastida y de personas ajenas a dicho Laboratorio
que se ofrecieron para poder llevar a cabo este estudio. Cada
muestra fué recolectada en frascos de vidrio adecuados para --
colectar la orina correspondiente a 24 horas. Dichos frascos -
fueron previamente preparados con preservador para evitar la -
descomposición de las muestras. Cada muestra fué refrigerada -
mientras se obtienen todas las orinas. Una vez recolectadas --
todas las muestras, se pasaron a un recipiente adecuado para -
mezclarse, se homogenizó por rotación vigorosa. Terminada la -
mezcla se tapó el recipiente y se llevó al congelador para ---
mantenerse así hasta que se fuera a utilizar. En el momento en
que se fué a utilizar la mezcla, se descongeló y se tomaron 12
porciones diferentes con un volumen adecuado para efectuar 9 -
determinaciones de cada porción. Estas porciones se colocaron

en frascos de vidrio con tapón esmerilado. Para obtener los resultados de las concentraciones de los 17-Cetosteroides, se sacó un volumen promedio de las orinas de 24 horas. Todas estas orinas utilizadas fueron de mujeres adultas.

A) METODO DE HYCEL.

Reactivos :

- 1) Acido sulfúrico
- 2) Hidróxido de sodio al 15 %
- 3) Eter de petróleo
- 4) Meta-Dinitrobenceno
- 5) Hidróxido de potasio 6 N
- 6) Metanol purificado
- 7) "Cortiset" estándar

Nota. Todos estos reactivos están contenidos en el "Set" Hysel.

Técnica :

- a) Pase 5.0 ml. de orina filtrada a un tubo de 25x 150 mm.
- b) Agregue 1.0 ml. de ácido sulfúrico para efectuar la hidrólisis. Mezcle por rotación.
- c) Tape con un tapón perforado el tubo. Introduzca el tubo en un baño de agua a ebullición por 15 minutos.
- d) En pequeños intervalos remueva el tubo y enfríelo a la temperatura ambiente en agua fría.
- e) Enfriada la muestra añada 20 ml. de éter refrigerado. Vuelva a tapar y agite por rotación vigorosa el contenido por 30 segundos. Emplee un agitador mecánico y agite por rotación 6 veces por 5 segundos hasta asegurar que la --

mezcla se haya completado y evitar la separación por fuerza --
centrífuga.

f) Permita que la capa se separe dejando reposar un poco la mezcla. Remueva suavemente el tubo y aspire la capa --
baja. No aspire la capa alta de éter.

g) Añada 5.0 ml. de hidróxido de sodio al 15 %. Tape y mezcle como en el paso (e). Remueva la capa baja de alcali --
como el el paso (f). Repita una vez más.

h) Filtre el extracto de éter con papel filtro Whatman # 1, recogiendo el filtrado en un tubo limpio.

i) Evapore el éter a sequedad en una cubierta de gas adecuada o en un "Vapo-Vent". No evapore en un cuarto abierto o sobre una plancha caliente o en un mechero. Debe hacerse en un baño de agua eléctrico.

Reacción de color :

a) Marque los tubos con P (problema), B (blanco) y -
St. (estándar).

b) Al tubo P y B añada 0.5 ml. de metanol purificado. En el tubo P procure que el residuo se disuelva completamente.

c) Al tubo St. añada 0.5 ml. del estándar.

d) A los tubos P, B, St. añada 0.5 ml. de meta-Dinitrobenzeno. Mezcle bien.

e) A interválos de 30 segundos, añada en sucesión a cada tubo 0.5 ml. de hidróxido de potasio 6 N. Después de la -
adición mezcle los contenidos de rotación.

f) Exactamente 30 minutos después de la adición del alcali al primer tubo, en interválos de 30 segundos en sucesión añada 8 ml. de agua destilada a cada tubo. Sacuda bien los tubos después de la adición.

g) 15 minutos después de la adición del agua lea en el Fotocolorímetro a una longitud de onda de 520 nm cada tubo en sucesiones de 30 segundos. Lea los tubos St. y P ajustando con el B a cero la Densidad Optica (100 % T).

Cálculos :

$$\underline{\text{O. D. 17-KS}} \quad \times \quad V \times 15 = \text{mg. 17-KS por 24 horas}$$

$$\text{O. D. } \frac{\text{17-KS}}{\text{St.}}$$

Donde :

O.D. = Densidad óptica

17-KS = 17-Cetosteroides

V = Volumen total de orina en litros

15 = Concentración del estándar en mg. por litro

Valores Normales :

5 - 15 mg./24hs. en mujeres adultas

10- 20 mg./24hs. en hombres adultos.

B) METODO DE DREKTER, HEISLER, SEISM, PERSON Y MCGAVACK.

Reactivos:

- 1) Acido clorhídrico concentrado
- 2) Dicloroetileno. El cuál se sustituyó por Eter de petróleo.
- 3) Hidróxido sódico, en lentejas, para análisis. Se debe resguardar de la acción de la humedad y del anhídrido -- carbónico atmosférico.
- 4) meta-Dinitrobenceno al 1 % en alcohol etílico de 95°. Este debe ser puro. Para este caso se utilizó el mismo - del "Set" Hycel, el cuál ya viene purificado.
- 5) Hidróxido de potasio 8 N. Se debe conservar en - frasco de polietileno (56 gr. de hidróxido de potasio en --- 100 ml. de agua).
- 6) Alcohol etílico de 95°o absoluto y de 75° (excentos de cetonas u otras impurezas que se coloreen con el reac-- tivo de Zimmermann). Para preparar el alcohol de 75° se diluye con agua el de 95°.

Nota. Purificación del alcohol: Se toma 1 litro de - alcohol etílico y se añaden 4.0 gr. de clorhidrato de meta-fe-- nilenodiamina. Se conserva en la obscuridad durante una semana agitando de vez en vez. Se redestila en un aparato que sea -- completamente de vidrio, desechando las primeras porciones -- primera y última. En nuestro caso no hubo la necesidad de lle-- var a cabo la purificación ya que se consiguió el alcohol con un buen grado de pureza.

7) Solución testigo (estándar) :

Dehidroisoandrosterona 60mg.
Alcohol etílico1000ml.

Nota. Por dificultad para conseguirse la Dehidroiso--
androsterona sola, se utilizó la solución testigo del "Set" de -
Hycel ("Cortiset" estándar). El " Cortiset " estándar está cons-
tituido por Dehidroisoandrosterona en metanol.

Técnica :

Se debe recoger una muestra de orina de 24 horas, por
ejemplo, de 7 a 7 de la mañana. Como preservador puede utilizar-
se 1.0 gr. de sulfato de cobre anhidro en polvo fino, o bien, -
10 ml. de ácido clorhídrico concentrado, que se ponen con anti-
cipación en el frasco colector. Este último preservador fué el
que se utilizó. Se mide el volumen de la orina de 24 horas. Se
colocan 20 ml. de la muestra en un Erlenmeyer de 50 ml. con ta-
pa esmerilada. Se añaden 4.0 ml. de ácido clorhídrico concentra-
do y se coloca en un baño de agua a 100°C durante 10 minutos. -
Se enfría a continuación a la temperatura ambiente. Se añade un
volumen igual (20 ml.) de dicloroetileno (se sustituyó por éter
de petróleo) y se coloca el Erlenmeyer en el agitador Kahan du-
rante 10-15 minutos. Se deja en reposo y se extrae la capa su-
perior con una pipeta. Se toman unos 12-15 ml. de la capa de -
dicloroetileno (éter de petróleo) y se filtra a través de papel
filtro Whatman # 43 y se recogen en un Erlenmeyer de 50 ml. con
tapa esmerilada. En otro Erlenmeyer se coloca la misma cantidad

de dicloroetileno (éter de petróleo), que servirá como blanco. Se añade a cada Erlenmeyer 3.0 gr. de lentejas de hidróxido de sodio y se colocan en el agitador Kahan durante 10 minutos. Se filtran las soluciones con papel filtro Whatman # 43 para separar los restos de lentejas de hidróxido de sodio y las sustancias insolubles. El embudo se debe cubrir con un papel estano o un vidrio de reloj para evitar la evaporación. En unos tubos de ensayo convenientemente rotulados se colocan 3.0 ml. de filtrado de dicloroetileno (éter de petróleo), tanto del problema como del blanco. Estas cantidades equivalen a 3.0 ml. de orina. En un baño de agua se evapora el filtrado a sequedad. Se enfrían y se añade a cada uno 0.1 ml. de alcohol absoluto. Se evapora a sequedad en un baño de agua, dejando que el alcohol refluya y lave el residuo, depositándolo en el fondo del Erlenmeyer. Los últimos vestigios de vapor del disolvente se eliminan con una corriente de aire suave. Se añade a cada Erlenmeyer 0.4 ml. de solución de meta-dinitrobenceno al 1% y 0.3 ml. de hidróxido de potasio 8 N. Se mezcla bien y se colocan los Erlenmeyer durante 25 minutos en baño de agua de 25°C. Se añade 3.0 ml. de alcohol de 75% a cada uno y se mezcla bien. Se efectúa la lectura midiendo la densidad óptica del problema en el fotocolorímetro utilizando filtro verde (520 nm), llevando a cero con el blanco.

Nota. El testigo se prepara simultáneamente con el problema y el blanco, colocando 3.0 ml. de la solución testigo (estándar) y se evapora el alcohol en un baño de agua. Se añade 0.4 ml. meta-dinitrobenceno y 0.3 ml. de hidróxido de potasio -

8 N, desarrollándose el color igual que se dijo para la muestra de orina. Se mide la densidad óptica.

Cálculos :

Cuando se utiliza un testigo (estándar) que contenga 0.06 mg. de Dehidroisoandrosterona por mililitro, y siempre que los 3.0 ml. del extracto equivalgan exactamente a 3.0 ml. de la muestra de orina, se puede utilizar la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{D.O. del testigo}}{\text{D.O. del problema}} \times 0.06 \times \frac{100}{3} = \text{mg. de 17-KS en 100ml. de orina.}$$

Volumen de la muestra de 24 horas en ml. \times mg. de 17-Cetosteroides en 1 ml. = mg. de la muestra.

Valores Normales :

Las cifras normales en los adultos es de:

10-30 mg. en 24 horas en hombres

5-15 mg. en 24 horas en mujeres.

B) METODO DE DREKTER, HEISLER, SEISM, PERSON Y McGAVACK MODIFICADO.

Este método es exactamente igual a la técnica B). Su modificación consiste en: 1) utilizar éter etílico, como solvente extractor, en lugar de éter de petróleo; y 2) utilizar 8.0 ml. del mismo alcohol.*

Para los cálculos se utiliza la misma fórmula. Los valores normales también son los mismos.

PREPARACION DE LA CURVA DE CALIBRACION.

Se tomó una solución patrón ("Cortiset") equivalente a 0.015 % (p/v), la cuál equivale a 15 mg./lt. de estándar.

A partir de esta solución se prepararon los siguientes estándares :

No.	Solución estándar (ml.)	Concentración equivalente mg/24 horas
1	0.0625	2.5
2	0.125	5.0
3	0.25	7.5
4	0.5	15.0

Los 2 métodos y la modificación se determinan por medio de la Reacción de coloración de Zimmermann. Al hacer la curva de calibración no hay necesidad de hacer las extracciones que se efectúan en cada uno de los métodos utilizados ya mencionados, por lo tanto, la reacción se lleva a cabo de la siguiente manera :

	ESTANDAR No.			
	1	2	3	4
Estándar (ml.)	0.0625	0.125	0.25	0.5
m-Dinitrobenceno (ml.)	0.5	0.5	0.5	0.5
Hidróxido de potasio 6N (ml.)	0.5	0.5	0.5	0.5
Agua destilada (ml.)	<u>8.4375</u>	<u>8.375</u>	<u>8.25</u>	<u>8.0</u>
	9.5000	9.500	9.50	9.5

Nota. Se corrieron 3 determinantes para cada estándar y el valor promedio de las lecturas se tomó como válido.

R E S U L T A D O S

Resultados obtenidos de la Curva de Calibración.

La siguiente tabla representa los valores obtenidos para cada determinación de los estándares de la curva de calibración, expresados en Absorbancia (A, a 520 nm).

Estándar No.	Determinación			Media Aritmética
	1	2	3	
1	0.041	0.046	0.046	0.044
2	0.097	0.081	0.092	0.090
3	0.174	0.168	0.181	0.174
4	0.268	0.276	0.268	0.274

$$\bar{D}\bar{S} = 0.01099$$

$$\bar{V} = 8.73166 \%$$

Nota. Donde:

$\bar{D}\bar{S}$ = la desviación estándar promedio

\bar{V} = el coeficiente de variabilidad promedio en %.

GRAFICA DE LA CURVA DE CALIBRACION.

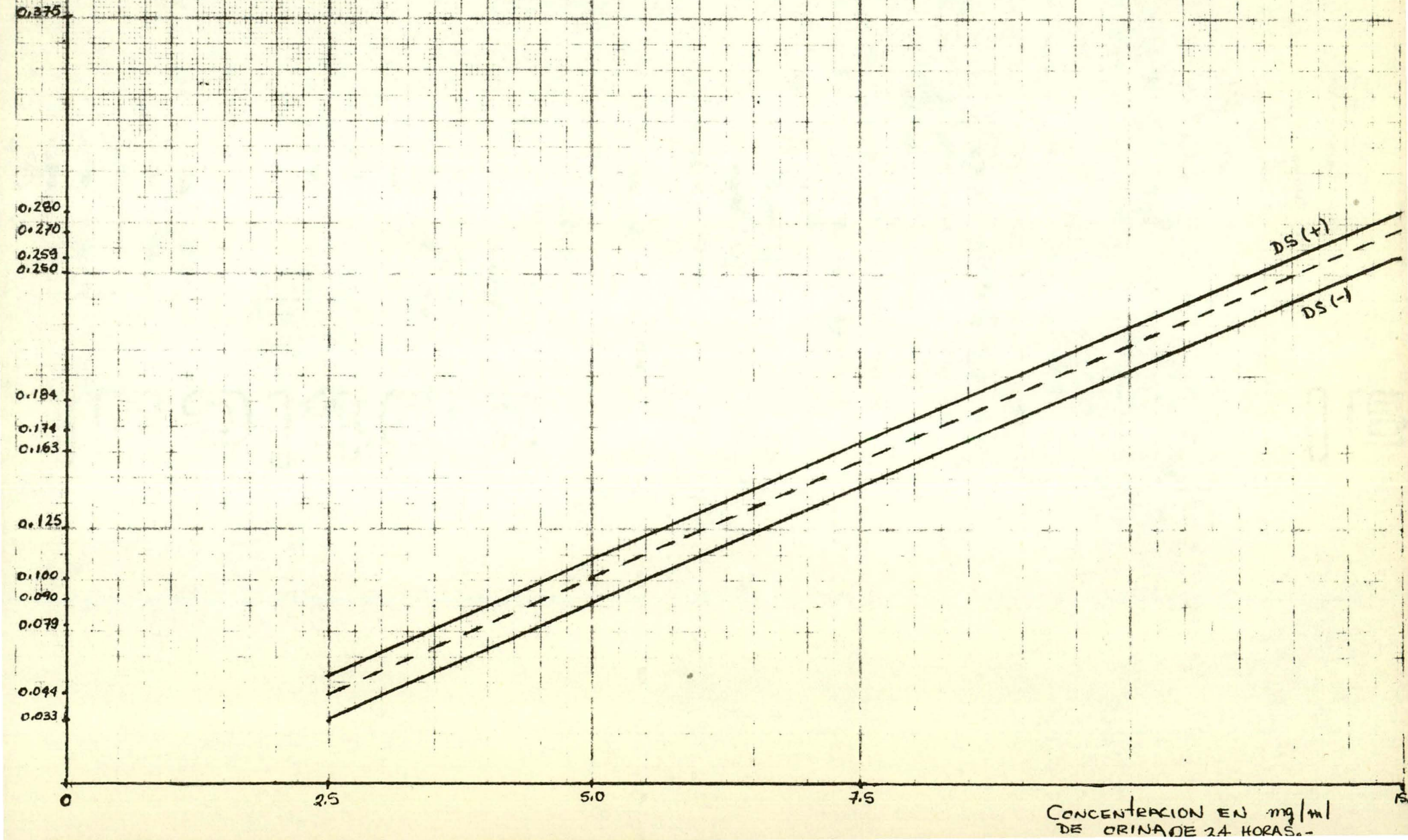


Diagrama que explica el Control de Calidad para la gráfica de la Curva de Calibración.

Estándar No.	Concentración equivalente en mg/24 hs.	A	DS (+)	DS (-)
1	2.5	0.044	0.05499	0.03301
2	5.0	0.090	0.10099	0.07901
3	7.5	0.174	0.18499	0.16301
4	15.0	0.270	0.28099	0.25901

$$\bar{DS} = 0.01099$$

$$\bar{V} = 8.73166 \%$$

Resultados obtenidos por el Método A) HYCEL.

Valores expresados en mg./24hs., obtenidos para 3 determinaciones de cada una de las 12 muestras en una mezcla de orina, con la técnica de Hysel.

Muestra No.	Determinación			Media
	1	2	3	Aritmética
1	5.0394	3.8273	5.5456	4.8041
2	6.8776	4.3024	4.5954	5.2584
3	4.5954	3.5919	5.0394	4.4089
4	5.0394	3.5919	3.1346	3.9219
5	3.1346	4.3024	4.3024	3.9131
6	2.9082	4.3024	4.3024	3.8376
7	4.5466	6.8778	6.6023	6.0083
8	4.5466	5.0394	6.8776	5.4878
9	3.3611	3.8273	3.1346	3.4410
10	4.3024	3.8273	3.3811	3.8302
11	3.1346	3.1346	3.1346	3.1346
12	3.8273	4.3024	5.0394	4.3897

$$\bar{D}\bar{S} = 0.64825$$

$$\bar{V} = 14.00083 \%$$

Resultados obtenidos por el Método B) de DREKTER, HEISLER, SEISM, PERSON Y MCGAVACK.

Valores, expresados en mg./24hs., obtenidos para 3 determinaciones de cada una de las 12 muestras en una mezcla de -- orina, con la técnica de Drekter, Heisler, Seism, Person y McGavack.

Muestra No.	Determinacion			Media
	1	2	3	Aritmética
1	4.1989	4.9452	4.9452	4.6964
2	5.5322	5.2222	5.2222	5.3255
3	4.0885	3.6628	4.1989	3.9834
4	4.9452	6.0140	5.8444	5.6012
5	5.8444	5.6840	5.6840	5.7374
6	4.4389	4.6843	4.6843	4.6025
7	5.8444	5.0799	5.2222	5.3821
8	5.5322	5.8444	4.9452	5.4406
9	5.2222	5.3727	5.8444	5.4797
10	5.3727	4.4389	4.6843	4.8319
11	5.8444	4.5583	4.8174	5.0733
12	5.8444	4.3156	4.9452	5.0350

$$\bar{D}\bar{S} = 0.3285$$

$$\bar{V} = 6.46 \%$$

Resultados obtenidos por la Modificación del Método B") de DREKTER, HEISLER, SEISM, PERSON Y MCGAVACK.

Valores expresados en mg./24hs., obtenidos para 3 determinaciones de cada una de las 12 muestras en una mezcla de orina, con la técnica modificada de Dreker, Heisler, Seism, Person y McGavack.

Muestra No.	Determinación			Media Aritmética
	1	2	3	
1	3.5384	3.6497	3.4244	3.5375
2	3.6497	3.7628	3.5384	3.6503
3	3.6497	3.5384	3.6497	3.6126
4	3.6497	3.7628	3.5384	3.6503
5	4.1148	3.6497	3.7628	3.8424
6	3.4244	3.6497	3.5348	3.5375
7	4.4836	4.2376	4.3610	4.3607
8	4.7420	3.9987	3.9987	4.2464
9	4.7420	3.8772	3.9987	4.2059
10	3.7628	3.5384	3.9987	3.7666
11	3.9987	3.6497	3.7628	3.8037
12	3.6497	4.1148	3.9987	3.9210

$$\bar{D}\bar{S} = 0.2020$$

$$\bar{V} = 5.22 \%$$

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Los 2 métodos, así como la modificación son sencillos y utilizan reactivos y material que son de fácil adquisición.

En cuanto al tiempo necesario para efectuar las de -- terminaciones, en el método de Hycel es menor en comparación al otro método y a la modificación. Sin embargo, no creo que sea - muy importante ya que la diferencia es muy pequeña.

Comparando los coeficientes de variabilidad:

%	Método		
	A	B	B"
\bar{V}	-- 14.0	6.46	5.22

El error de la técnica de Hycel (A) reflejado por el coeficiente de variabilidad alto podría deberse al uso de tubos que tal vez no son muy adecuados al efectuar el proceso de evaporación.

En cuanto a la técnica (B) de Dreker, Heisler, Seism, Person y McGavack y su modificación (B") se muestra un coefi---- ciente de variabilidad menor en la modificación, por lo tanto es de suponer que la reproducibilidad de esta modificación es la -- más adecuada. Pero si se revisan las concentraciones obtenidas - en esta modificación, se observan muy bajas que podría deberse - a que la extracción no fue completa.

Por lo tanto, después de haber considerado todo lo anterior sugiero como la técnica más adecuada : la técnica (B) de

Drekter, Heisler, Seism, Person y McGavack, para ser establecida como una técnica de rutina en el Laboratorio de Análisis -- Clínicos Servicio Social Labastida U. de M.

R E S U M E N

En este estudio se hizo la comparación de 2 técnicas para la determinación de 17-Cetosteroides en orina de 24 horas; estas técnicas son: la de Hycel y la de Dreker, Heisler, Seism, Person y McGavack. Además se hizo una modificación de la técnica de Dreker, Heisler, Seism, Person y McGavack.

Se hizo una mezcla homogénea de orinas de 24 horas , efectuándose 36 determinaciones (12 muestras determinadas 3 veces cada una) por medio de cada técnica.

Se estudió para cada una de ellas las ventajas y desventajas; como tiempo, obtención de reactivos. Además se calculó la media aritmética, la desviación estándar y el coeficiente de variabilidad para cada una de ellas. Se analizaron los resultados, así como las ventajas y desventajas, eligiéndose la técnica de Dreker, Heisler, Seism, Person y McGavack para ser utilizada en el Laboratorio de Análisis Clínicos Servicio Social Labastida.- U. de M.

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

- 1.- HYCEL; Hycel Chemistry Methods. Hycel Inc., Houston, -
Lit. No. 5718. 1974.
- 2.- AIOUEL, FEDERICO L.; Manual de Análisis Clínicos. 3a.
Ed. Editorial Médica Panamericana, Buenos -
Aires, 400p. 1975!
- 3.- OSER, RERNARD L.; Hawk's Physiological Chemistry. --
14a. Ed. Mc-Craw-Hill Book Company, México,
315p. 1949.
- 4.- TIETZ, NORBERT W.; Química Clínica Moderna. 1a.Ed. -
Interamericana, Philadelphia, 536p. 1972.
- 5.- LYNCH, RAPHAEL, MELLOR, SPARE, INWOOD; Métodos de La
boratorio. 2a. Ed. Interamericana, México,
625p. 1972.
- 6.- BALLER, ACKERMANN, TORO; Clinical Laboratory Methods
8a. Ed. The C .V. Mosby Company, Saint Louis
518p. 1974.
- 7.- MURRAY, R.S.; Estadística. Mc Graw-Hill, México, ----
357p. 1969.

800200