

COD 11002 40 determinaciones
CONSERVAR A 15-30°C
Para diagnóstico "in vitro" únicamente

17-CETOSTEROIDES (Orina)

Cromatográfica - espectrofotométrica

ZIMMERMANN

FUNDAMENTO DEL MÉTODO

Después de una hidrólisis ácida, la orina se pasa a través de una resina neutra donde quedan adsorbidos los 17-cetosteroides. Una vez eliminados por lavado las interferencias hidrosolubles y las fenólicas, se eluyen los 17-cetosteroides y se determinan espectrofotométricamente por la reacción de Zimmermann.

CONTENIDO Y COMPOSICIÓN

- 11205 1 **Reactivo 1.** 10 mL. Hexametilentetramina 0,7 mol/L, azida sódica 0,5 g/L. Nocivo: evitar contacto con la piel y los ojos.
- 11206 1 **Reactivo 2.** 500 mL. Hidróxido potásico 1 mol/L en etanol 3,4 mol/L. Corrosivo: evitar contacto con la piel y los ojos.
- 11207 1 **Reactivo 3.** 240 mL. Etanol anhidro de grado analítico.
- 11208 2 **Reactivo A.** Para 20 mL. Polvo de m-Dinitrobenzenceno 60 mmol/L en etanol una vez reconstituido. Tóxico: no pipetear con la boca.
- 11209 1 **Reactivo B.** 130 mL. Hidróxido potásico 8 mol/L. Corrosivo: evitar contacto con la piel y los ojos.
- 11210 2 **Reactivo C.** 150 mL. Diclorometano. Nocivo: evitar contacto con la piel y los ojos.
- 11211 1 **Patrón de DHEA.** 5 mL. Deshidroepiandrosterona 1 mg/mL.
- 11102 2x20 **Microcolumnas.** Contienen resina neutra equilibrada.

CONSERVACIÓN

Reactivo 1 y Patrón de DHEA: Conservar a 2-8°C.

REACTIVOS AUXILIARES

— Acido clorhídrico concentrado (grado analítico)

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Reactivo A: Introducir el tapón que contiene el m-dinitrobenzenceno en el frasco, una vez quitada la cápsula y el obturador, presionar el botón rojo para liberarlo. Agitar hasta disolución completa. Estable 2 meses a 2-8°C.

MATERIAL ADICIONAL

- Fotómetro para lecturas a 520 nm (515-525)
- Baño termostatzable
- Baño de agua hirviente
- Centrífuga de sobremesa

MUESTRAS

Orina de 24 horas. Ajustar el pH entre 3-6 con ácido clorhídrico concentrado. Estable 7 días a 2-8°C. Centrifugar o filtrar antes de iniciar la determinación.

PROCEDIMIENTO

Hidrólisis de la muestra

1. Pipetear en un tubo de ensayo:

Muestra	5,0 mL
Ac. Clorhídrico conc.	1,0 mL
Reactivo 1	1 gota

2. Mezclar bien y sumergir el tubo en un baño de agua hirviente durante 10 minutos. Seguidamente enfriar con agua.

Separación cromatográfica

3. Destapar la columna y romper la lengüeta inferior. Bajar el disco superior hasta el nivel de la resina, evitando comprimirla, con ayuda de una varilla o extremo plano de una pipeta. Dejar pasar todo el sobrenadante, desechando el eluido.
4. Verter la orina hidrolizada en el interior de la columna. Desechar el eluido.

5. Añadir al tubo que contenía la orina 2-3 mL de agua destilada, agitar y verter en la columna. Desechar el eluido.
6. Añadir, sucesivamente, a la columna:

Reactivo 2	10,0 mL	Desechar el eluido
Agua destilada	2,0 mL	Desechar el eluido
Reactivo 3	4,0 mL	Recoger el eluido

7. Agitar bien el eluido para homogeneizarlo.

Colorimetría

8. Pipetear en tubos de centrifuga con tapón:

	Muestra	Blanco	Patrón
Eluido columna	1,0 mL	—	—
Reactivo 3	—	1,0 mL	1,0 mL
Patrón DHEA	—	—	25 µL
Reactivo A	0,5 mL	0,5 mL	0,5 mL
Reactivo B	1,5 mL	1,5 mL	1,5 mL

9. Agitar bien. Tapar e incubar a 25°C durante 25 minutos o en nevera (2-8°C) durante 60 minutos. Añadir a cada tubo:

Reactivo C	3,5 mL	3,5 mL	3,5 mL
------------	--------	--------	--------

10. Agitar bien y centrifugar a 3000 r.p.m. durante 5 minutos.
11. Leer la absorbancia (A) de la fase superior de la Muestra y del Patrón frente al Blanco a 520 nm (Nota 1). El color es estable durante al menos 30 minutos.

CÁLCULOS

A Muestra

$$\frac{A_{\text{Muestra}}}{A_{\text{Patrón}}} \times 20 = \text{mg/L 17-CETOS} \times \text{L orina/24 horas} = \text{mg/24 horas 17-CETOS}$$

A Patrón

UNIDADES SI:

$$\text{mg/L 17-CETOS} \times 3,47 = \mu\text{mol/L 17-CETOS}$$

$$\mu\text{mol/L 17-CETOS} \times \text{L de orina/24 horas} = \mu\text{mol/24 horas 17-CETOS}$$

VALORES NORMALES

Mujeres : 4 - 16 mg/24h - 13,9 - 55,5 µmol/24h

Hombres : 6 - 22 mg/24h - 20,8 - 76,3 µmol/24h

Estos valores se dan únicamente a título orientativo; es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios intervalos de normalidad.

CARACTERÍSTICAS DEL MÉTODO

- Recuperación : 90 ± 5 %
- Linealidad : hasta 240 mg/L
- Interferencias : Ocasionalmente, puede observarse un color pardo oscuro en el extracto final de alguna muestra, que puede dar origen a valores falsamente elevados. En tales casos, es recomendable corregir la absorbancia de la muestra utilizando la fórmula de Talbot: $A_{\text{corr.}} = (A_{520} - 0,6 \times A_{430}) / 0,73$

NOTAS

1. Si la fase superior presenta turbidez transferirlo a un tubo de centrifuga con tapón, añadirle una punta de espátula de sulfato sódico anhidro, agitar y dejar que se deposite o centrifugar.

BIBLIOGRAFÍA

Bradlow HL. Steroids 1968; 11: 265-272.

Zimmermann W. Z Physiol Chem 1935; 233:257-264.