

ESTUDIOS PRELIMINARES PARA LA DETERMINACIÓN DE ESTRÓGENOS ESTEROIDALES POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA

*PRELIMINARY STUDIES FOR THE DETERMINATION OF
STEROIDAL ESTROGENS BY LIQUID CHROMATOGRAPHY*

RESUMEN

Los estrógenos esteroideos son hormonas secretadas por los seres humanos y animales para la regulación del sistema reproductivo. A su vez, han sido sintetizadas artificialmente para el consumo humano, siendo prescritas para el control natal, la regulación de estrógenos en mujeres, el tratamiento de diversos tipos cáncer, reducción de síntomas en la menopausia, prevención de la osteoporosis, desordenes neurológicos, etc. Entre tales compuestos están la estrona, el 17α -estradiol, el 17β -estradiol, el estriol y el 17α -etinilestradiol, siendo este último de origen sintético. En este trabajo, se presentan resultados preliminares para la puesta a punto de la cuantificación de estrógenos en formulaciones farmacéuticas mediante cromatografía de líquidos con detección fotométrica. Inicialmente, se extrajeron los principios activos de las formulaciones farmacéuticas en distintas condiciones experimentales, dependiendo de las características de la matriz. Posteriormente se filtraron e inyectaron en una columna cromatográfica de C_{18} para su separación en la modalidad de fase reversa con gradiente, usando distintas mezclas de CH_3CN/H_2O y CH_3OH/H_2O . De acuerdo con los resultados obtenidos, la fase móvil con CH_3CN presentó una línea base sin deriva, con picos cromatográficos simétricos y con mayor resolución que CH_3OH , debido a la mayor fuerza eluotrópica del disolvente. En contraste a publicaciones previas de otros autores que utilizan una separación isocrática, en este trabajo se reconocieron mayores ventajas en torno al uso de gradiente, debido a la distinta hidrofobicidad de los analitos abordados. Como conclusiones, se destaca que se eluyeron los distintos compuestos con tiempos de retención bien diferenciados, no sólo entre los propios analitos, sino respecto a otros principios activos presentes en las formulaciones

EDITH E. LÓPEZ MARTÍNEZ

ANTONIA MARTÍNEZ
LUÉVANOS

JUDITH AMADOR
HERNÁNDEZ

Facultad de Ciencias
Químicas, Unidad Sureste,
UAdeC.

Correspondencia
judith.amador@uadec.edu.mx
ORCID: 0000-0003-1873-024X

farmacéuticas.

Palabras clave: hormonas; análisis; formulaciones farmacéuticas; contaminantes emergentes.

ABSTRACT

Steroidal estrogens are hormones secreted by humans and animals to regulate the reproductive system. In turn, they have been synthesized for human consumption and prescribed for birth control, estrogen regulation in women, treatment of various types of cancer, reduction of menopausal symptoms, prevention of osteoporosis, neurological disorders, etc. Among such compounds are estrone, 17 α -estradiol, 17 β -estradiol, estriol, and 17 α -ethinylestradiol, the latter being of synthetic origin. This work presents preliminary results for the fine-tuning of estrogen quantification in pharmaceutical formulations by liquid chromatography with photometric detection. Initially, the active principles of the pharmaceutical formulations were extracted under different experimental conditions, depending on the characteristics of the matrix. Subsequently, they were filtered and injected into a C₁₈ chromatographic column for separation in the gradient reversed-phase mode, using different mixtures of CH₃CN/H₂O and CH₃OH/H₂O. According to the results obtained, the mobile phase with CH₃CN presented a drift-free baseline with symmetrical chromatographic peaks and higher resolution than CH₃OH due to the higher elutropic strength of the solvent. In contrast to previous publications by other authors using an isocratic separation, in this work, greater advantages were recognized around the use of gradient due to the different hydrophobicity of the analytes addressed. In conclusion, it is highlighted that the different compounds were eluted with well-differentiated retention times, not only among the analytes but also with respect to other active principles in the pharmaceutical formulations.

Keywords: hormones; analysis; pharmaceutical formulations; emerging contaminants.

I. INTRODUCCIÓN

Las hormonas son moléculas entre las que se encuentran péptidos, proteínas, derivados de aminoácidos y esteroides; se producen en ciertas glándulas y tejidos. Cuando las hormonas se enlazan a sus receptores, se activan enzimas y se desencadenan diversas reacciones a nivel celular. En consecuencia, tienen gran importancia a nivel biológico, ya que intervienen en procesos como la reproducción, diferenciación sexual, crecimiento y desarrollo, metabolismo, conducta, entre otros (Sociedad Europea de Endocrinología, 2023).

Entre ellas se encuentran las hormonas esteroideas, que pueden dividirse en cuatro grupos. Por un lado, se identifican las hormonas naturales, las cuales son secretadas por el organismo y también se sintetizan para su suministro a través de formulaciones farmacéuticas. En un segundo grupo se ubican las hormonas propias del organismo que son sintetizadas a partir de precursores naturales. También están las hormonas propias del organismo pero que son sintetizadas a partir de precursores no esteroideos. Finalmente, puede identificarse un cuarto grupo conformado por hormonas sintéticas. En el ser humano, las hormonas esteroideas se producen a partir del colesterol, ya sea que éste se haya incorporado mediante la ingesta de alimentos, o bien se produzca en el propio organismo; en cualquier caso, el colesterol es transformado en una serie de precursores que finalmente derivan en la síntesis endógena de distintas hormonas activas (National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine, 2020).

A su vez, las hormonas esteroideas se subdividen en estrógenos, progesterona, andrógenos, mineralocorticoides, glucocorticoides y vitamina D. En particular, los estrógenos son hormonas esteroideas identificadas como hormonas sexuales femeninas, producidas principalmente en los folículos dentro de los ovarios. La producción de estrógenos se incrementa en la pubertad y la edad reproductiva de la mujer; su disminución desencadena la transición hacia la menopausia y postmenopausia (Acconcia y Marino, 2018). En la Figura 1 se presentan estructuras químicas de estrógenos naturales y uno sintético.

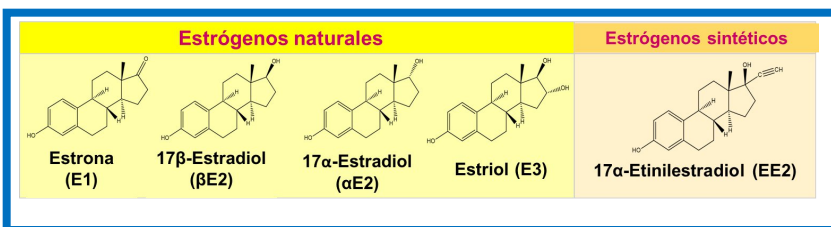


Figura 1. Estructuras químicas de estrógenos.

Actualmente, las hormonas esteroideas se ubican dentro de los contaminantes emergentes, debido a que su presencia cada vez mayor en ambientes acuáticos, alerta sobre repercusiones negativas en los ecosistemas y el propio ser humano. Debido a ello, la Comisión Europea ha determinado incluir 17β-estradiol y 17α-etinilestradiol en la lista de sustancias bajo vigilancia en materia de políticas de regulación de la calidad del agua (*Commission Implementing Decision* (EU) 2018/840, 2018).

Por un lado, se utilizan hormonas esteroideas sintéticas en gran escala para promover el crecimiento y ganancia muscular del ganado, el cual excreta tales sustancias a través de la orina. Dado que las aguas residuales de estos sitios rara vez son tratadas, los compuestos llegan a cuerpos de agua naturales como ríos, lagunas o corrientes subterráneas. Por otro lado, la prescripción de hormonas es cada vez mayor en hombres y mujeres, ya sea con fines anticonceptivos, o bien en tratamientos de fertilización, menopausia y andropausia. En tales casos, las aguas residuales con estrógenos llegan a las plantas de tratamiento de aguas residuales, cuyos procesos primarios y secundarios son ineficientes en su remoción, terminando nuevamente en ambientes acuáticos naturales (Bilal y col., 2021; Blazer y col., 2021; Ciślak y col., 2023).

En este trabajo, se presentan los resultados preliminares en el desarrollo de un nuevo método analítico por cromatografía de líquidos para la determinación de estrógenos en formulaciones farmacéuticas.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 INSTRUMENTACIÓN

Se usó un cromatógrafo de líquidos YL 9300, integrado por bomba

cuaternaria, degasificador a vacío, inyector manual y detector UV-Vis. La separación fue efectuada con una columna C₁₈ de ThermoScientific (150 x 4.6 mm, 5µm). El caudal de la fase móvil se fijó en 1mL/min. El volumen de inyección fue de 20 µL. El detector se configuró para el registro de la señal a 220 y 254 nm, con una velocidad de lectura de 50 Hz. El tiempo de equilibrio fue de 5 min y el tiempo de ejecución de 30 min.

2.2 MATERIALES

Todos los reactivos fueron al menos grado analítico. Los disolventes metanol (MeOH), acetonitrilo (ACN) y agua fueron grado HPLC, de TEDIA. También se usaron las formulaciones farmacéuticas Diane[®] de Bayer México (tableta con 2 mg de ciproterona / 0.035 mg de 17α-etinilestradiol), Primogyn[®] de Bayer México (tableta con 1 mg de valerato de estradiol), Ovestin[®] de Aspen (óvulo con 0.5 mg de estriol), Avixis[®] de Galderma (solución al 0.025% de 17α-estradiol) y Premarin[®] de Pfizer (tableta con estrógenos conjugados, entre ellos en 0.625 mg de estrona).

2.3 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Para la extracción del principio activo de las formulaciones farmacéuticas en tableta y óvulo, inicialmente se pulverizó cada muestra, para posteriormente trasvasarla cuantitativamente a un vaso de precipitados de 100 mL con 20 mL de MeOH y sonicarla por 15 minutos en un baño ultrasónico. Finalmente, el extracto se centrifugó, se tomó el sobrenadante y se trasvasó a un matraz volumétrico de 50 mL, completándose el volumen con MeOH. En el caso del fármaco con 17α-estradiol en solución, sólo se hizo una dilución 1:25 en MeOH.

2.4 SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA

Se desarrollaron distintos protocolos de separación, variando las proporciones de las fases móviles ACN/H₂O y MeOH/H₂O, dejando como métodos principales el A y el B. El método analítico A consistió de una fase móvil de ACN/H₂O: 0 min., 70 % ACN; 20-30 min., 100 % ACN (Figura 2a). El método analítico B consistió de una fase móvil de MeOH/H₂O: 0 min., 50% MeOH; 20-30 min., 100% MeOH (Figura 2b).

En ambos casos se analizaron todas las muestras por triplicado.

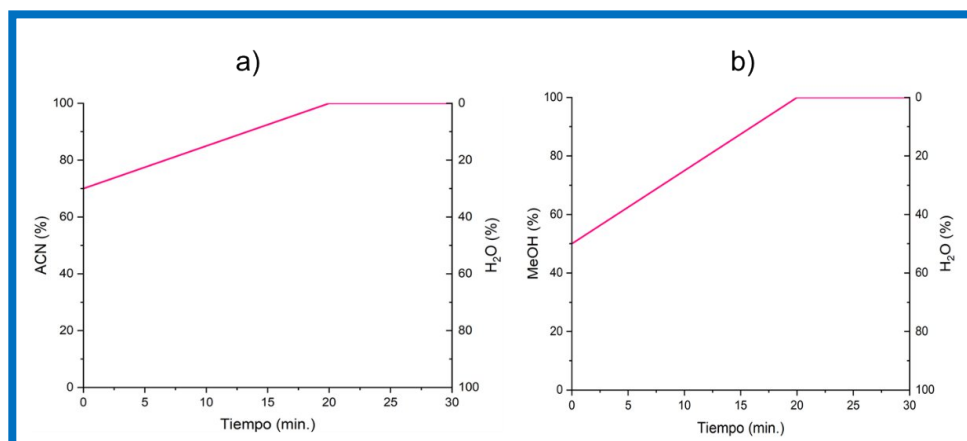


Figura 2. Métodos de separación a) A y b) B.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En general, los estrógenos son cuantificados por cromatografía de líquidos en fase reversa, debido a su naturaleza parcialmente polar, con log Kow entre 3 y 4, además de que las muestras de interés son mayormente acuosas (Merlo y col., 2023; Cortés-Bautista y col., 2024). Esta técnica le confiere gran selectividad al procedimiento analítico, debido a la separación intrínseca de los compuestos antes de su detección.

Antes de abordar la separación cromatográfica de los estrógenos, fue necesario iniciar con la preparación de la muestra a partir de las formulaciones farmacéuticas. Después de una revisión bibliográfica en revistas especializadas, se encontró que en la mayoría de los casos los principios activos se extrajeron de las presentaciones comerciales con MeOH y tras someterse a sonicación durante un tiempo promedio de 15 min, estableciéndose éstas como las condiciones de trabajo (Sohrabi y col., 2010; Yilmaz y Kadioglu, 2017). Cabe destacar que, al utilizarse estos extractos enriquecidos con los analitos en la optimización de la separación, es posible anticiparse a la complejidad en composición de las muestras, ya que en diversas formulaciones los estrógenos están presentes con otros principios activos, de los cuales

habrá de garantizarse su separación.

Posteriormente, se exploraron diversos programas de composición de fase móvil, para reconocer las condiciones cromatográficas más adecuadas en la separación de los analitos presentes en las formulaciones farmacéuticas bajo estudio. Dos fases móviles se consideraron en este trabajo, usadas previamente por otros autores: MeOH/H₂O (Yoon y col., 2003; Yilmaz y Kadioglu, 2017) y ACN/H₂O (Guo y col., 2013; Deng y col., 2015). En ninguno de estos casos se consideró la modificación de la fase con un amortiguador o medio ácido, debido a que los pKa están alrededor de 10; es decir, de pH 8 hacia abajo -que son las condiciones que acepta la columna de C₁₈- los compuestos se encuentran en una sola forma química.

Como ejemplo, en la Figura 3 se muestran los cromatogramas registrados para la muestra que contiene 17 α -etinilestradiol; los cromatogramas (a), (b) y (c) se obtuvieron con fase móvil ACN/H₂O en distintas proporciones. Obsérvese en particular el cromatograma (c) que correspondió al método A (ACN/H₂O) y el cromatograma (d) al método B (MeOH/H₂O). Como puede apreciarse, la composición de la fase móvil influyó significativamente en los tiempos de retención y resolución alcanzada en la separación de los compuestos que acompañan al 17 α -etinilestradiol en la formulación farmacéutica. Por otro lado, la deriva registrada en el cromatograma (d) a 220 nm es significativa, debido a que el disolvente contribuye en cierta proporción a la señal y el cambio en composición es significativo, impidiendo que se alcancen condiciones de equilibrio en el sistema; menos evidente es ésta a 254 nm. Para esta formulación, el método A permitió alcanzar una resolución satisfactoria entre los picos, con tiempos de retención bajos, lo que reduce el tiempo total de análisis por muestra.



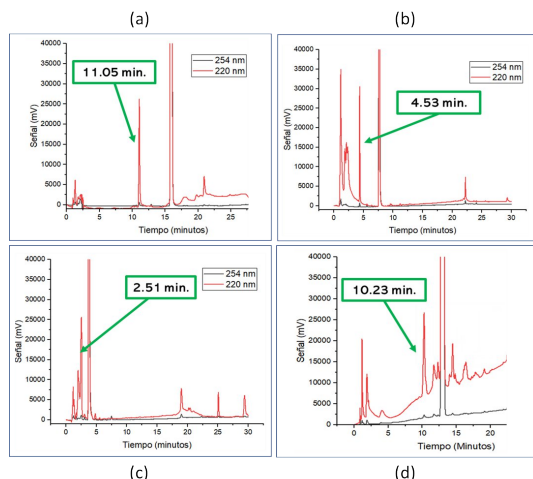


Figura 3. Cromatogramas de la formulación con 17 α -etinilestradiol bajo distintas condiciones de separación.

Sin duda, la muestra más compleja fue el fármaco con estrona y estrógenos conjugados, cuyos cromatogramas se presentan en la Figura 4; mientras que con el método A (ACN/H₂O) todos los compuestos salieron con tiempos de retención muy cercanos (Figura 4a), sin lograrse su separación, con el método B se alcanzó una resolución satisfactoria (Figura 4b). En este caso, la gran fuerza eluotrópica del ACN provocó que los compuestos fueran desorbidos con gran facilidad de la fase estacionaria, resultando en su salida rápida de la columna, con tiempos de retención muy cortos y cercanos al tiempo muerto. En contraste, a través del método B y con MeOH (de menor fuerza eluotrópica que ACN), se obtuvo una separación satisfactoria de los distintos compuestos, con picos simétricos y sin deriva de la línea base.

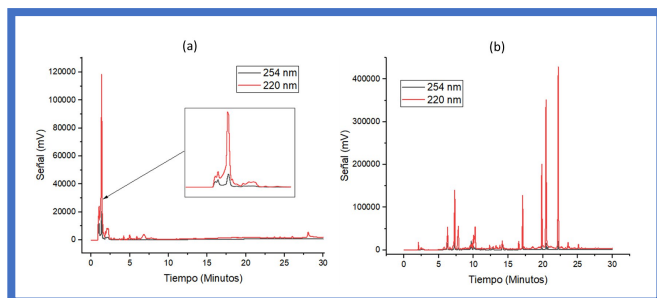


Figura 4. Cromatogramas del fármaco con estrona y estrógenos conjugados separados a través del método (a) A y (b) B.

Finalmente, en la Tabla 1 se presentan los tiempos de retención de los estrógenos, separados a través de los métodos A y B; puede apreciarse que en ambos casos el tiempo de retención se incrementa de acuerdo con el siguiente orden: $E3 < E1 < EE2 < \alpha E2 < \beta E2$, lo cual obedece a mínimas diferencias en su estructura química por grupos funcionales polares (Figura 5). Se destaca que a través de ambos métodos los tiempos de retención fueron menores a 20 minutos, lo cual asegura una velocidad de análisis aceptable. Por otro lado, también es importante mencionar que ambos métodos son con gradiente, a diferencia de otros autores que reportan condiciones isocráticas, ya sea con MeOH (Yoon y col., 2003; Yilmaz y Kadioglu, 2017) o con ACN (Deng, 2015). Al igual que Guo y col. (2013), en las distintas separaciones ejecutadas se pudo alcanzar una mejor resolución con gradiente, especialmente cuando se trató de compuestos con grandes diferencias en cuanto a estructura química, como la ciproterona y el 17 α -etinilestradiol.

Tabla 1. Tiempos de retención de los estrógenos en los métodos A y B.

Sustancia	Tiempo de retención en método A (minutos)	Tiempo de retención en método B (minutos)	Presentación comercial
Estriol (E3)	1.17	4.98	Ovestin®
Estrona (E1)	1.42	7.32	PREMARIN®
17 α -Etinilestradiol (EE2)	2.51	10.23	Diane®
17 α -estradiol (α E2)	2.55	10.66	AVIXIS®
17 β -estradiol (β E2)	8.02	19.25	PRIMOGEN®

IV. CONCLUSIONES

Los estrógenos contenidos en distintas formulaciones farmacéuticas se separaron satisfactoriamente por cromatografía de líquidos en fase reversa, utilizando una columna convencional de octadecilsilíce. Ya sea con fase móvil a base de MeOH o ACN, el estrógeno con menor tiempo de retención fue el estriol, debido a su carácter más hidrofílico, al ser el único que presenta dos grupos hidroxilo en los carbonos 16 y 17. Por otro lado, los tiempos de retención de todos los compuestos

fueron menores en la fase con ACN que con MeOH, dado que el primero de estos disolventes tiene mayor fuerza eluotrópica desde la perspectiva de fase reversa. Aunque los tiempos de retención con el método B (MeOH/H₂O) fueron significativamente mayores que con el A (ACN/H₂O), el primer caso ofreció mayores ventajas en la separación de la estrona y estrógenos conjugados que le acompañan; en el resto de las formulaciones, el método A permitió separar satisfactoriamente los principios activos presentes. Finalmente, se destaca que el registro de la señal a 220 nm ofreció mayores ventajas en términos de sensibilidad que a 254 nm, por lo cual será seleccionada en futuros experimentos.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al CONAHCYT por la beca otorgada a EELM (CVU: 2002326).

REFERENCIAS

- Acconcia, F. y Marino, M. (2018). *Steroid hormones: synthesis, secretion, and transport* en A. Belfiore y D. LeRoith (Eds.), *Principles of endocrinology and hormone action*. (pp. 43–72). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-319-44675-2_4
- Bilal, M., Barceló, D. y Iqbal, H.M.N. (2021). Occurrence, environmental fate, ecological issues, and redefining of endocrine disruptive estrogens in water resources. *Science of The Total Environment*. 800: 149635. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149635>
- Blazer, V.S., Gordon, S., Jones, D.K., Iwanowicz, L.R., Walsh, H.L., Sperry, A.J. y Smalling, K.L. (2021). Retrospective analysis of estrogenic endocrine disruption and land-use influences in the Chesapeake Bay watershed. *Chemosphere*. 266: 129009. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.129009>
- Ciślak, M., Kruszelnicka, I., Zembrzuska, J. y Ginter-Kramarczyk, D. (2023). Estrogen pollution of the European aquatic environment: A critical review. *Water Research*. 229: 119413. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2022.119413>
- Commission Implementing Decision (EU) 2018/840. (2018). *Decision establishing a watch list of substances for Union-wide monitoring in the field of water policy*

pursuant to Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council and repealing Commission Implementing Decision (EU) 2015/495 (notified under document C(2018) 3362). <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32018D0840>

- Cortés-Bautista, S., Molins-Legua, C. y Campíns-Falcó, P. 2024. Miniaturized liquid chromatography in environmental analysis. A review. *Journal of Chromatography A*. 1730: 465101. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2024.465101>
- Deng, J., Tang, K., Zhu, S., Ma, X., Zhang, K., Song, Y., Li, X., Li, Q., Liu, Z. y Zhou, K. (2015). Competitive Degradation of steroid estrogens by potassium permanganate combined with ultrasound. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 12: 15434–15448. <https://doi.org/10.3390/ijerph121214995>
- Guo, F., Liu, Q., Qu, G., Song, S., Sun, J., Shi, J. y Jiang, G. (2013). Simultaneous determination of five estrogens and four androgens in water samples by online solid-phase extraction coupled with high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1281: 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.01.044>
- Merlo, F., Profumo, A. y Speltini, A. (2023). Sample treatment for the determination of steroid hormone contaminants in water samples: Analytical greenness assessment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 169: 117393. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2023.117393>
- National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine (2020). *Reproductive steroid hormones: synthesis, structure, and biochemistry* en D.R. Mattison, R.M. Parker y L.M. Jackson (Eds.), *The clinical utility of compounded bioidentical hormone therapy: a review of safety, effectiveness, and use.* (pp. 75-90). The National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/25791>
- Sociedad Europea de Endocrinología. (2023). *Por qué las hormonas son importantes...* [Página WEB]. <https://www.eese-hormones.org/media/dslddhub/ehd-infograp hic-spanish-new-v3.pdf>
- Sohrabi, M.R., Abdolmaleki, P. y Esmaeili, E.A. (2010). Simultaneous spectrophotometric determination of cyproterone acetate and ethinyl estradiol in tablets using continuous wavelet and derivative transform. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 77: 107–111. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2010.04.034>
- Yilmaz, B. y Kadioglu, Y. (2017). Determination of 17 β -estradiol in pharmaceutical preparation by UV spectrophotometry and high-performance liquid chromatography methods. *Arabian Journal of Chemistry*. 10: S1422–S1428. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.04.018>

Yoon, Y., Westerhoff, P., Snyder, S. A. y Esparza, M. (2003). HPLC-fluorescence detection and adsorption of bisphenol A, 17 β -estradiol, and 17 α -ethynyl estradiol on powdered activated carbon. *Water Research*. 37: 3530–3537. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(03\)00239-2](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(03)00239-2)