

CHROM. 5344

CHROMATOGRAPHISCHE TRENNUNG VON ÖSTRON, ÖSTRADIOL-17 β
UND ÖSTRIOL AN SEPHADEX G-10

H.-J. HORST

Klinik für Geburtshilfe und Gynäkologie des Rindes (im Richard-Götze-Haus) Tierärztliche Hochschule, Abteilung für angewandte Endokrinologie** , Hannover (B.R.D.)*

(Eingegangen am 5. März 1971)

SUMMARY

Chromatographic separation of oestrone, 17 β -oestradiol and oestriol on Sephadex G-10

A new assay is described to separate urinary oestrogens chromatographically. A 600 \times 12 mm Sephadex G-10 column ($V_t = 56.6$ cm³) was loaded with samples up to 200 ml. Oestrogens and a few other urinary ingredients were reversibly adsorbed by the gel matrix if the test sample was saturated with Na₂SO₄ and adjusted to pH 4.6 \pm 0.2. Almost all non oestrogenic urinary ingredients were eluted prior to the three sexual steroids which left the column in high purified fractions. As eluant a continuous non linear gradient was used produced by mixing a solution of 16 % Na₂SO₄ with 0.1 N NaOH. An automatic oestrogen determination could be achieved by fluorometry in a flow cell. Additional extractions with organic solvents were unnecessary. 91.3 % of the added radioactive oestrogens were discovered in the respective fractions.

EINLEITUNG

Schon nach dem Erscheinen der ersten Veröffentlichungen zur Technik der Gelfiltration¹⁻³ wurde deutlich, dass sich eine Reihe von Verbindungen während der Passage durch Sephadexsäulen anders verhielt, als es ihrem Molekulargewicht entsprach. In ganz besonderem Masse traf dies für aromatische Verbindungen zu, welche alle eine mehr oder weniger ausgeprägte Affinität zur stationären Phase zeigten.

BELING^{4,5} fand bei der Sephadexfiltration von Harnproben eine deutliche Retardation der Östrogenkonjugate. Von besonderem Interesse ist in den Arbeiten dieses Autors, dass eine Retardation nicht zu beobachten war, wenn die Östrogenkonjugate in destilliertem Wasser aufgelöst worden waren. Stärker als die Konjugate wurden die freien Östrogene retardiert⁶⁻⁸. Die Elutionsverzögerung war in diesem Falle auch bei den in destilliertem Wasser aufgelösten Östrogenen zu beobachten. Eine quantitative, reversible Adsorption der Östrogene war möglich, wenn die zu untersuchende Probe vor der Beladung der Säule mit NaCl oder Na₂SO₄ gesättigt wurde. Alle Östrogene einer 200 ml-Probe konnten auf diese Weise an eine geringe Menge Sephadex adsorbiert und anschliessend aus der Säule ($V_t = 15.7$ cm³) eluiert

* Direktor: Prof. Dr. E. AEHNELT.

** Leiter: Prof. Dr. E. GRUNERT.

werden⁹. Trotz stark variierender Probenvolumina (1.2–200 ml) blieb das Volumen der östrogenhaltigen Fraktion nahezu konstant. Östron, Östradiol und Östriol lagen zu Beginn der Elution zu einem idealen Startfleck konzentriert an der Säulenspitze vor, so dass ihre Auftrennung durch Gradientenelution denkbar erschien.

MATERIAL UND METHODIK

Reagenzien

Östron (3-Hydroxy-östra-1,3,5(10)-trien-17-on), Östradiol-17 β (Östra-1,3,5(10)-triene-3, 17 β -diol), Östradiol-17 α (Östra-1,3,5(10)-triene-3, 17 α -diol) und Östriol (Östra-1,3,5(10)-triene-3, 16 α , 17 β -triol): Schering AG, West-Berlin*. 6,7-Tritium-markiertes Östron, Östradiol-17 β und Östriol: Radiochemical Centre Amersham, England. Schwefelsäure (95–97 %), Na₂SO₄, NaOH, Äthanol, Eisessig, *p*-Nitrophenol, Tetrabromäthan, Hydrochinon: E. Merck AG, Darmstadt. Sephadex G-10: Pharmacia, Uppsala, Schweden. Aquasol: NEN Chemicals, Boston, U.S.A.

Geräte

Präzisions-Chromatographierohre (12 × 600 mm), Fraktionensammler Ultrorac 7000. Peristaltische Pumpe, UV-Absorptiometer Uvicord II: LKB-Produkte AB, Stockholm, Schweden. Spektralphotometer (M4 Q III, PMQ II und ZFM 4): Carl Zeiss, Oberkochen. Durchflussküvette (0.5 ml): Hellma GmbH, Müllheim/Baden. 10 Zoll-Schreiber: Beckmann Instruments GmbH, München. Tri-Carb-Scintillationspektrometer, Modell 3022. Flüssigkeitsscintillationszähler (Mark I): Nuclear Chicago, U.S.A.

Östrogennachweis

- (a) Kober-Reaktion nach BAULD¹⁰;
- (b) Kober-Reaktion nach Ittrich¹¹;
- (c) Automatisierte Kober-Reaktion durch Mischen von Säuleneluat und Schwefelsäure im Verhältnis 1:2 mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe. Erhitzen im Durchfluss (20 Min., 100°) und Messung im Durchflussfluorimeter.

Trennung der Östrogene

Bekannte Aktivitäten von tritiummarkiertem Östron, 17 β -Östradiol und Östriol sowie je 1.25 μ g der jeweiligen nichtaktiven Verbindung wurden in 50 ml Harn einer nichttragenden Kuh aufgelöst, 8 g festes Na₂SO₄ in die Probe eingewogen und der pH-Wert mit Essigsäure auf 4.6 ± 0.2 eingestellt. Nach 20 Min. Zentrifugation bei 3000 U/Min. konnte die Säule mit dem Überstand der Probe beladen werden. Um eine vollständige Adsorption zu gewährleisten, war eine langsame Flussrate erforderlich (12.5 ml/cm²/Std.). Die Elution erfolgte mit einem kontinuierlichen exponentiellen Gradienten, der aus 50 ml 16 %iger Na₂SO₄-Lösung im Mischgefäß und etwa 400 ml 0.1 N NaOH im Vorratsgefäß erstellt wurde. Das Mischgefäß war mit der Säule durch einen Kapillarschlauch verbunden und behielt durch den Zustrom von 0.1 N NaOH durch einen zweiten Schlauch während der Elution ein konstantes Volumen.

* Die Hormonpräparate wurden uns in dankenswerter Weise kostenlos für unsere Versuche überlassen.

Versuche zur Östrogenadsorption

Zur Bestimmung der optimalen Bedingungen für die Östrogenadsorption wurden 2 Serien von Versuchen ausgeführt. In einer Serie kamen unterschiedliche Na_2SO_4 -Konzentrationen bei einem konstanten pH-Wert von 4,6 zur Anwendung (Fig. 3). In jedem Reagenzglas befanden sich $5 \mu\text{g}$ eines Östrogenmischtes (Östron-Östradiol- 17α -Östradiol- 17β -Östriol, 1:1:1:1) in 5 ml der betreffenden Natriumsulfatlösung. In jede Probe wurden 100 mg Sephadex G-10 eingewogen und 1 Std. lang geschüttelt. Anschliessend wurde das Sephadex abfiltriert und der Östrogengehalt des Filtrats mit einer Kober-Reaktion¹⁰ bestimmt. Die erhaltenen Werte (Fig. 3 und 4) repräsentieren jeweils 6-12 Probenansätze. 2 Leerwertbestimmungen und 2 Standards ohne Sephadex dienten in jeder Konzentrationsstufe zur Korrektur der erhaltenen Messwerte. Sinngemäss wurde die zweite Versuchsserie ausgeführt. Die Na_2SO_4 -Konzentration betrug hierbei in allen Proben 16 %, während der pH-Wert stufenweise von 2,5 bis 12,0 variierte (Fig. 4).

ERGEBNISSE

Bei der chromatographischen Auftrennung der dem Harn zugesetzten $6,7\text{-}^3\text{H}$ -markierten Östrogene erschien Östriol im Eluat von 175 bis 210 ml, Östron von 225 bis 265 ml und Östradiol- 17β von 275 bis 350 ml (Fig. 1). Die meisten Verunreinigungen der 50 ml-Probe verliessen die Säule von 27 ml ($=V_0$) bis 140 ml (Fig. 2). Die Wiederfindungsrate lag bei 91,3 %.

Bei den Adsorptionsversuchen ergab sich ein Anstieg der Bindungskapazität des Sephadex G-10 mit steigender Salzkonzentration. Sie erhöhte sich von 45,5 % in den natriumsulfatfreien Proben auf 99,8 % in Gegenwart von 16 % Na_2SO_4 . Der pH-Wert beeinflusste die Adsorptionskapazität nur wenig. Bei Werten zwischen 2,5 und 12,0 resultierte eine Östrogenadsorption von 91 bis 100 %. Von pH 2,5 bis 7,5

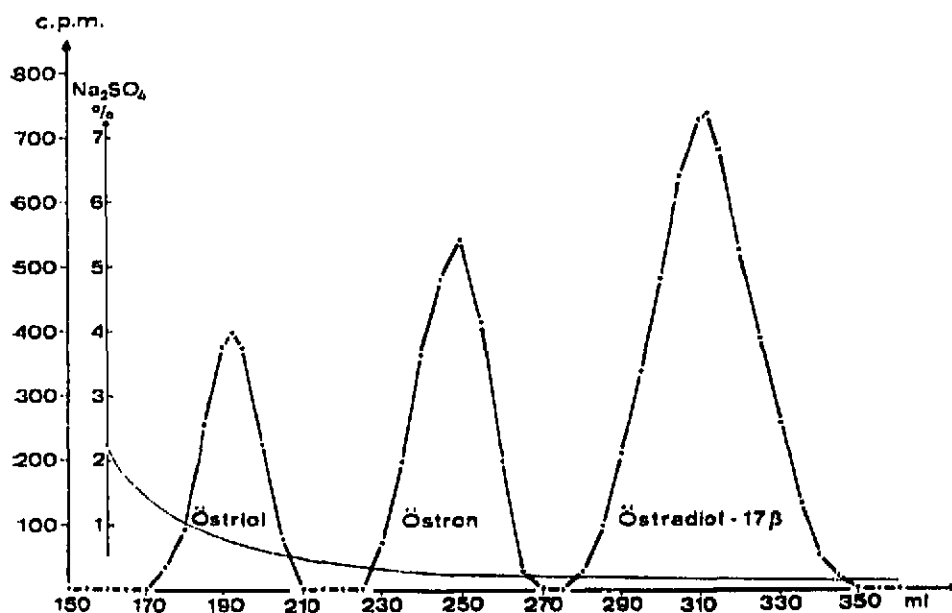


Fig. 1. Elutionskurve von tritiummarkiertem Östriol, Östron und Östradiol- 17β (Verhältnis 1:2:4), die in 50 ml Rinderharn aufgelöst wurden. Die Probe enthielt 16 % Na_2SO_4 und war auf pH $4,6 \pm 0,2$ eingestellt.

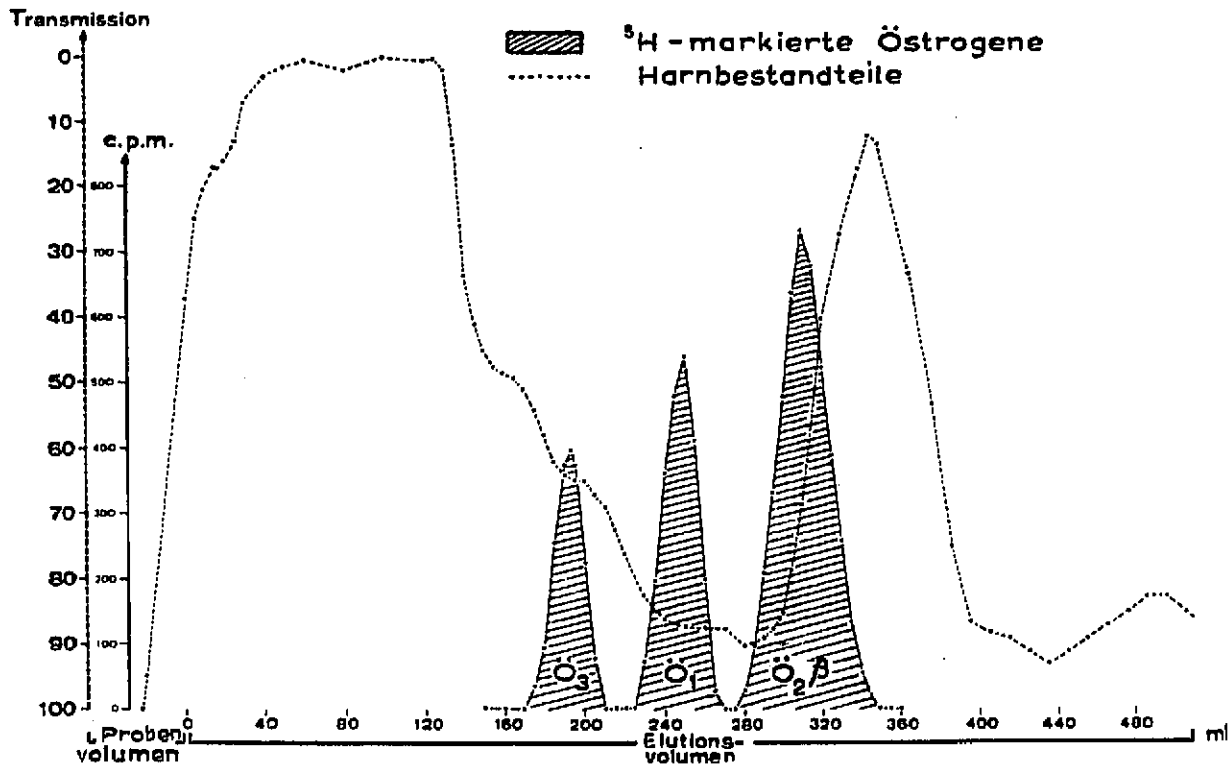


Fig. 2. Trennung der in 50 ml Rinderharn aufgelösten tritiummarkierten Östrogene von Harnbestandteilen, die UV-Licht von 280 nm absorbieren. Ö_3 = Östriol, Ö_1 = Östron, $\text{Ö}_2\beta$ = Östradiol-17 β .

waren, mit Ausnahme der Proben von pH 6.5, nur geringe Differenzen in der Adsorptionskapazität (95.6 bis 100 %, S.D. = ± 0.41 bis ± 3.38) zu beobachten. Stärkere Unterschiede (91 bis 99 %) zeigten sich bei den pH-Werten von 8.0 bis 12.0, jedoch wiesen die Werte einer pH-Stufe hier zum Teil grössere Streuungen auf (S.D. = ± 0.78 bis ± 7.51).

Weitere Versuche, die unter Optimalbedingungen (pH 4.6 ± 0.2 ; 16 % Na_2SO_4) ausgeführt wurden, zeigten eine 99 bis 100 %ige Adsorption an 100 mg Sephadex G-10 auch beim Vorliegen grösserer Östrogenmengen (50–100 μg). Die Östrogenkonjugate einer 5 ml Probe von einer hochtragenden Kuh konnten dagegen unter den gleichen Bedingungen nur zu etwa 25 % adsorbiert werden. Die Trennung von Östrogen-3-Methyläthern nach der hier für freie Steroide beschriebenen Methode gelang nicht.

DISKUSSION

Hydrophile Gele werden im allgemeinen zur Trennung von Stoffgemischen auf der Basis von Molekulargewichtsunterschieden verwendet^{12,13}. Auf Trennungsvorgänge, die der Molekularsieb- oder Ausschluss Theorie entsprechend verlaufen, üben Adsorptionserscheinungen einen störenden Einfluss aus. Zur Verhinderung der Adsorption wurden verschiedene Techniken entwickelt^{1,14}. Die Steroidadsorption liess sich am besten durch menschliches und tierisches Blutserum aufheben¹⁵, wobei eine Steroidbindung an das Serumprotein ausgeschlossen werden konnte.

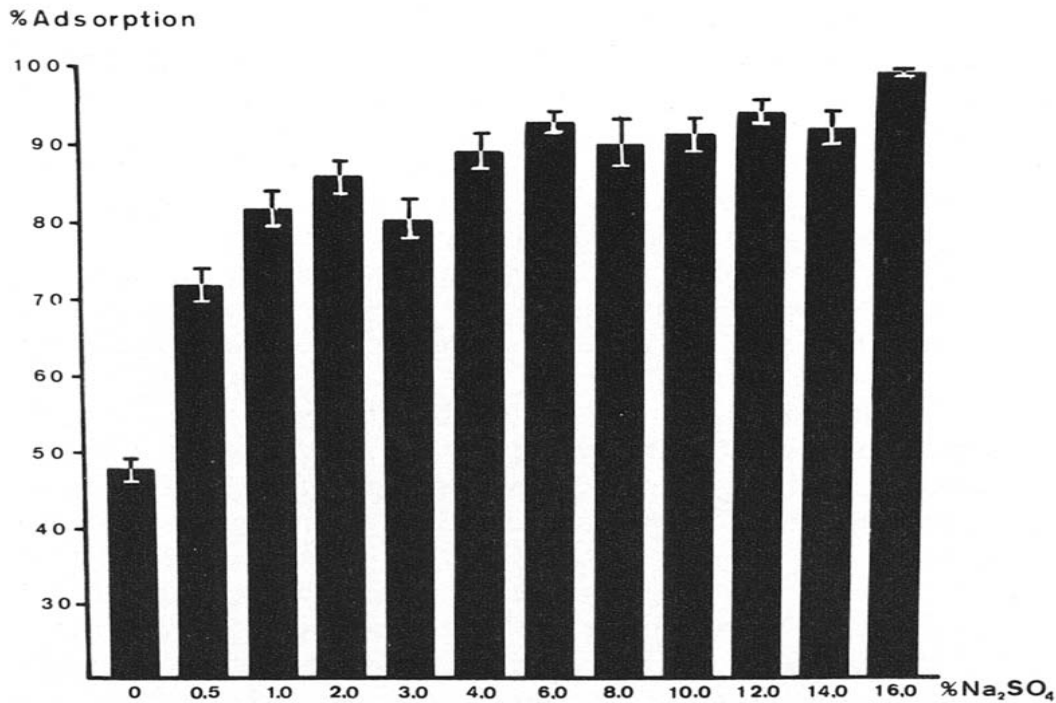


Fig. 3. Änderung der Adsorption von 5 µg eines Östrogengemisches (Östron-Östradiol-17α-Östradiol-17β-Östriol, 1:1:1:1) an 100 mg Sephadex G-10 in Abhängigkeit von der Na₂SO₄-Konzentration. Jede Probe wurde 1 Std. geschüttelt, dann filtriert und der Östrogengehalt des Filtrats bestimmt. Alle Proben wurden auf pH 4.6 ± 0.2 eingestellt. I = Standardabweichung.

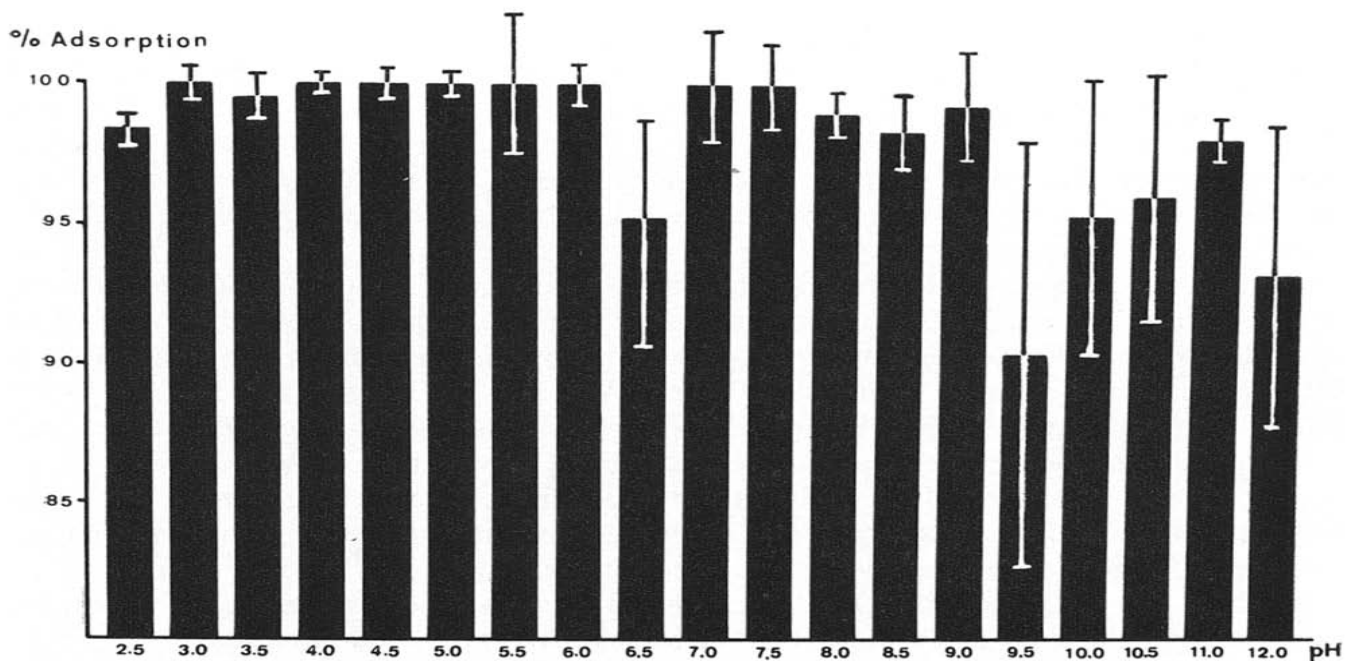


Fig. 4. Änderung der Adsorption von 5 µg eines Östrogengemisches (Östron-Östradiol-17α-Östradiol-17β-Östriol, 1:1:1:1) in Abhängigkeit vom pH-Wert. Alle Proben enthielten 16% Na₂SO₄. I = Standardabweichung.

In den hier vorliegenden Untersuchungen sollte im Gegensatz dazu eine möglichst feste, reversible Adsorption erreicht werden. Dieses gelang durch die Zugabe von entquellend wirkenden Elektrolyten wie NaCl oder Na₂SO₄. Da NaCl bei der automatischen Kober-Reaktion störte (Gasbildung) wurde das Verfahren auf Na₂SO₄ eingestellt. Es zeigte sich, dass sich die Affinität der Gelphase zu den Östrogenen mit steigender Salzkonzentration direkt proportional erhöhen liess. Aus Harnproben wurden ausser Östrogenen auch noch viele andere Verbindungen adsorbiert.

Obwohl in allen Sephadex G Typen Carboxylgruppen vorkommen, kann die Adsorption nicht mit einem Ionenaustausch erklärt werden. Ionenaustauscher wurden jedoch schon mit Erfolg zur Auftrennung einiger Östrogenkonjugate verwendet^{16,17}.

In früheren Experimenten konnten wir die Beobachtung machen, dass die Adsorption von Östrogenen und der Quellungs Zustand des Gels in einer Wechselbeziehung stehen. Wurde durch Zufügen von Na₂SO₄ die Ionenstärke der Probe erhöht, so kam es zu einer deutlichen Entquellung des Gels, wenn die Probenlösung in das Gelbett eindrang.

Man kann sich den Adsorptionsvorgang in vereinfachter Form etwa folgendermassen vorstellen. Wurde die mobile Phase einer mit Wasser oder verdünnter Natronlauge bereiteten Sephadexsäule durch die konzentrierte wässrige Lösung eines entquellend wirkenden Elektrolyten verdrängt, so kam es zu einer Dehydratation des Gels. Diese ist in ihrer Stärke von der Art der in die Säule eingeführten Ionen sowie von deren Konzentration abhängig. Die Verkleinerung der Hydrathülle, die die polymerisierten Dextranketten umgab, bewirkte ein stärkeres Hervortreten der lipophilen Eigenschaften der Gelmatrix. Somit wurden gelöste stark lipophile Stoffe wie z.B. Östrogene, die zu ihrem wässrigen Lösungsmittel ohnehin nur eine geringe Affinität aufweisen, leichter an das Sephadex adsorbiert.

Neben Elektrolytlösungen führten auch andere Stoffe, wie z.B. Äthanol zu einer Entquellung des Gels, die ebenfalls eine sehr feste Östrogenadsorption bewirkte. Aus diesem Grunde konnte Äthanol, also ein gutes Östrogenlösungsmittel, nicht zur Elution verwendet werden. Wurde das entquollene Gel langsam wieder zur Quellung gebracht, so traten die Östrogene in der Reihenfolge ihrer pK-Werte wieder in die mobile Phase der Säule über. Hierbei stellte sich je nach dem Quellungsgrad ein Gleichgewicht zwischen Adsorption und Desorption ein.

Bei den stärker quellbaren Sephadex Typen kann die Elution der Östrogene mit Wasser erreicht werden. Bei Sephadex G-10 war die Adsorption jedoch so fest, dass erst die weitere Erhöhung der OH-Ionenkonzentration zu praktisch brauchbaren Elutionsvolumina führte. Mit destilliertem Wasser als Eluant wurden zu grosse Flüssigkeitsmengen benötigt.⁶ Wie pH-Messungen des östrogenhaltigen Eluats zeigten, wurden die Östrogene auch dann noch retardiert, wenn ihr pK-Wert so weit überschritten war, dass praktisch vollständige Dissoziation herrschen musste. Es kann angenommen werden, dass durch das Sephadex eine starke Verschiebung des Dissoziationsgleichgewichtes zugunsten der undissoziierten Form bewirkt wurde. Sieht man diese als allein adsorbierbar an, so kann die Ursache für die starke Elutionsverzögerung, die auch noch bei pH-Werten über 10.5 zu beobachten war, hierin vermutet werden. Die Abtrennung der übrigen Harnbestandteile von den Östrogenen war zwei verschiedenen Prinzipien unterworfen. Die Masse der höhermolekularen Stoffe sowie die meisten anorganischen Salze passierten die Säule ungehindert nach

dem Prinzip der Molekularfiltration und eluierten spätestens nach dem Durchfluss von $V_t + V_0$.

Alle Stoffe, die vollständig oder teilweise adsorbiert wurden, verliessen die Säule erst dann, wenn ein bestimmter pH-Wert oder ein bestimmter Quellungsgrad des Gels vorlag. Die Fig. 3 und 4 lassen erkennen, dass ein sinkender Salzgehalt und ein erhöhter pH-Wert die Elution in Gang setzten oder beschleunigten.

Da fast alle bei der fluorimetrischen Östrogenbestimmung störenden Harnbestandteile vor den Östrogenen eluierten, traten die Östrogene in einer sehr reinen Fraktion auf. Nach einer einfachen Reinigungstechnik^{7,8} wurde mit den trockenen Rückständen der an Sephadex G-10 aufgetrennten Östrogene die Kober-Reaktion nach ITRICH ausgeführt. In den Tetrabromäthanextrakten von 50 ml-Proben einer Kuh im normalen Zyklus konnten keine gefärbten Verunreinigungen wahrgenommen werden. Bei der automatischen Kober-Reaktion der Eluate von 5 ml-Proben erhöhte sich die Leerwertfluoreszenz von 5 % auf 6 %, wenn beim Vorliegen von $1.25 \mu\text{g}$ pro Östrogen 80–100 % des Schreiberausschlages erreicht wurden.

Die im Bereich des Östriol und Östradiol auftretende blassrosa Färbung des Eluats hatte keinen wahrnehmbaren Einfluss auf die Östrogenfluoreszenz. Nach unseren bisherigen Erfahrungen scheint es im Harn kaum Verbindungen zu geben, die einerseits gemeinsam mit den Östrogenen eluieren und andererseits bei der Kober-Reaktion stärker in Erscheinung treten.

Die hier beschriebene Methode zur Östrogentrennung an Sephadex G-10 wies gegenüber den bisher gebräuchlichen Verfahren einige wesentliche Vorteile auf. Am stärksten fiel die hohe Kapazität des Gels ins Auge. Es konnten grosse Proben ohne vorherige Reinigung eingesetzt werden, wobei eine Änderung des Elutionsverhaltens der Östrogene nicht wahrnehmbar war. Vom Zeitpunkt des Elutionsbeginns an gerechnet ergaben sich für stark unterschiedliche Probenvolumina identische Elutionskurven. Durch die Anreicherung der Östrogene während der Probenaufgabe scheint die Methode auch bei Probenmaterial mit geringem Östrogengehalt einsetzbar zu sein. Die hohe Wiederfindungsrate von 91.3 % dürfte sich hierbei ebenfalls positiv auswirken.

Da es sich um eine säulenchromatographische Methode handelte, bei der grössere Flüssigkeitsmengen benötigt wurden, konnte die Elution mit den üblichen Geräten automatisiert werden. Steht ein Durchflussfluorimeter zur Verfügung, so ist es möglich, auch die Bestimmung vollautomatisch auszuführen. Als nachteilig muss das recht hohe Elutionsvolumen von 35–75 ml pro Östrogen angesehen werden. Hierdurch wurde bei der automatischen Durchflussbestimmung die Empfindlichkeit gegenüber anderen Methoden herabgesetzt. In urinfreien Standardproben ergaben $0.125 \mu\text{g}$ eines Östrogens jedoch noch einen Wert von 30 % des Schreiber-Vollausschlages. Die Elution einschliesslich der vollautomatischen Aufzeichnung der Elutionskurven nimmt etwa 24 Std. in Anspruch.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wird eine neue Methode zur chromatographischen Auftrennung von Harnöstrogenen beschrieben. Eine 600×12 mm Sephadex G-10 Säule ($V_t = 56.6 \text{ cm}^3$) konnte mit Proben bis zu 200 ml beladen werden. Hierbei wurden die Östrogene sowie einige andere Harnbestandteile reversibel an die Gelmatrix adsorbiert, wenn das

Probengut vorher mit Na_2SO_4 gesättigt und auf $\text{pH } 4.6 \pm 0.2$ eingestellt wurde. Fast alle nichtöstrogenen Harnbestandteile wurden vor den drei Sexualsteroiden eluiert, welche die Säule in hochgereinigten Fraktionen verliessen. Als Eluant diente ein kontinuierlicher exponentieller Gradient aus 16 %iger Na_2SO_4 -Lösung im Mischgefäss und 0.1 N NaOH im Vorratsgefäss. Die Östrogenbestimmung konnte vollautomatisch in einem Durchflussfluorimeter ausgeführt werden. Extraktionen mit organischen Lösungsmitteln waren nicht erforderlich. 91.3 % der zugesetzten radioaktiven Östrogene wurden in den betreffenden Fraktionen wiedergefunden.

LITERATUR

- 1 B. GELOTTE, *J. Chromatogr.*, 3 (1960) 330.
- 2 J. PORATH, *Biochim. Biophys. Acta*, 39 (1960) 193.
- 3 J. PORATH UND P. FLODIN, *Nature*, 13 (1959) 1657.
- 4 C. G. BELING, *Nature*, 192 (1961) 326.
- 5 C. G. BELING, *Acta Endocrinol. (Copenhagen), Suppl.*, 79 (1963).
- 6 H. VAN BAELEN, W. HEYNS UND P. DE MOOR, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 27 (1967) 1065;
J. Chromatogr., 30 (1967) 226.
- 7 W. EECHAUTE UND G. DEMEESTER, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 25 (1965) 480.
- 8 W. EECHAUTE, G. DEMEESTER UND I. LEUSEN, *Ann. Endocrinol.*, 26 (1965) 363.
- 9 H.-J. HORST, *Zentralbl. Vet. Med. A*, 18 (1971) 93.
- 10 W. S. BAULD, *Biochem. J.*, 56 (1954) 426.
- 11 G. ITRICH, *Zentralbl. Gynäkol.*, 82 (1960) 429.
- 12 H. DETERMANN, *Chimia*, 23 (1969) 94.
- 13 A. POLSON UND W. KATZ, *Biochem. J.*, 112 (1969) 387.
- 14 H. SPITZY, H. SKRUBE UND K. MÜLLER, *Mikrochim. Acta*, 2 (1961) 296.
- 15 C. W. BURKE, *Biochim. Biophys. Acta*, 187 (1969) 564.
- 16 R. HOBKIRK, P. MUSAY UND M. NILSEN, *Steroids*, 14 (1969) 191.
- 17 R. HOBKIRK UND M. NILSEN, *Steroids*, 14 (1969) 533.

J. Chromatogr., 58 (1971) 227-234