

CHROM. 6023

## Trennung von Östradiol- und Östriolepimeren

Die Trennung von Östrogenen mit Hilfe der Gelchromatographie ist in letzter Zeit von verschiedenen Autoren beschrieben worden. Hierbei zeichnen sich hinsichtlich der Trenntechnik zwei verschiedene Verfahrensweisen ab. Auf der einen Seite werden die Prinzipien der als Gelfiltration<sup>1-3</sup> bekannten Methode beibehalten: die Östrogene werden aus wässrigen Proben an die Gelmatrix adsorbiert und anschließend—ebenfalls im wässrigen Medium—fraktioniert eluiert<sup>4-7</sup>. Andererseits kann die Trennung der Östrogene in Sephadex LH-20-Säulen durch organische Lösungsmittelsysteme erfolgen<sup>8,9</sup>. Mit beiden Verfahren wurden bisher Östron, Östradiol-17 $\beta$  und Östriol getrennt.

Im Hinblick auf die Fertilitätsprobleme bei den Haustieren, bei denen Östradiol-17 $\alpha$  verbreitet ist, erscheint uns die Trennung von Östradiol-17 $\alpha$  und -17 $\beta$  durch ein einfaches Verfahren, wie es die Gelchromatographie darstellt, wünschenswert.

### Eigene Untersuchungen

*Material und Methoden.* In der vorliegenden Arbeit wurden die nachstehend aufgeführten Abkürzungen verwendet: E<sub>1</sub> = Östron (3-Hydroxy-oestra-1,3,5(10)-trien, 17-on)\*; E<sub>2 $\alpha$</sub>  = Östradiol-17 $\alpha$  (Oestra-1,3,5(10)-trien, 3,17 $\alpha$ -diol)\*; E<sub>2 $\beta$</sub>  = Östradiol-17 $\beta$  (Oestra-1,3,5(10)-trien, 3,17 $\beta$ -diol)\*; E<sub>3</sub> = Östriol (Oestra-1,3,5(10)-trien, 3,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -triol)\*; 16E<sub>3</sub> = 16-Epi-östriol (Oestra-1,3,5(10)-trien, 3,16 $\beta$ ,17 $\beta$ -triol)\*\*; 16,17E<sub>3</sub> = 16,17-Epi-östriol (Oestra-1,3,5(10)-trien, 3,16 $\beta$ ,17 $\alpha$ -triol)\*\*; 17E<sub>3</sub> = 17-Epi-östriol (Oestra-1,3,5(10)-trien, 3,16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -triol)\*\*.

*Packung und Beladung der Säulen.* Eine geeignete Menge Sephadex LH-20 wurde in destilliertem Wasser suspendiert und von Feinpartikeln befreit<sup>1</sup>. Die Säulen zur Trennung von Östriol, Östron und Östradiol-17 $\beta$  (9 × 250 mm) und zur Trennung von Östradiol-17 $\alpha$  und -17 $\beta$  (10 × 600 mm) packten wir bei 25° mittels eines aufgesteckten Trichters<sup>3</sup>. Besondere Sorgfalt erfordert die Packung der Säulen zur Trennung von Östriolepimeren, die bei 55° vorgenommen werden sollte. Alle Lösungen und die Sephadexsuspension sind zu entgasen, um eine Zerstörung der Gelpackung durch Blasenbildung auszuschliessen. Zur Kontrolle des Elutionsverhaltens wird eine Parallelsäule mit 10 bis 25  $\mu$ g der zu trennenden Östrogene in 10 bis 500 ml 0.15 M Azetatpuffer (pH 4.2) beladen. Bis zu 10% Äthanol können in der Probe enthalten sein. Auch 100 ml Harnproben von Hunden<sup>7</sup> können nach der Enzymhydrolyse<sup>1</sup> ohne Reinigung zur Östrogentrennung verwendet werden. Das Probenmaterial muss partikelfrei sein, um ein Verstopfen der Trennsäulen zu vermeiden. Die Elution der adsorbierten Östrogene wird mit 0.02 N NaOH bei einer Fließgeschwindigkeit von etwa 15 ml/Std. vorgenommen. Die Elutionskurven der als Phenolationen austretenden Östrogene werden im Uvicord II bei 254 nm aufgezeichnet. Zur Verstärkung des Ausschlages wird eine Rechteckzelle mit 10 mm Lichtweg eingesetzt (Hellma GmbH, Müllheim/Baden, B.R.D.) und die maximale Skalenspreizung des Schreibers ausgenutzt.

\* Schering AG, Berlin, B.R.D.

\*\* Ikapharm, Rama t-Gan, Israel.

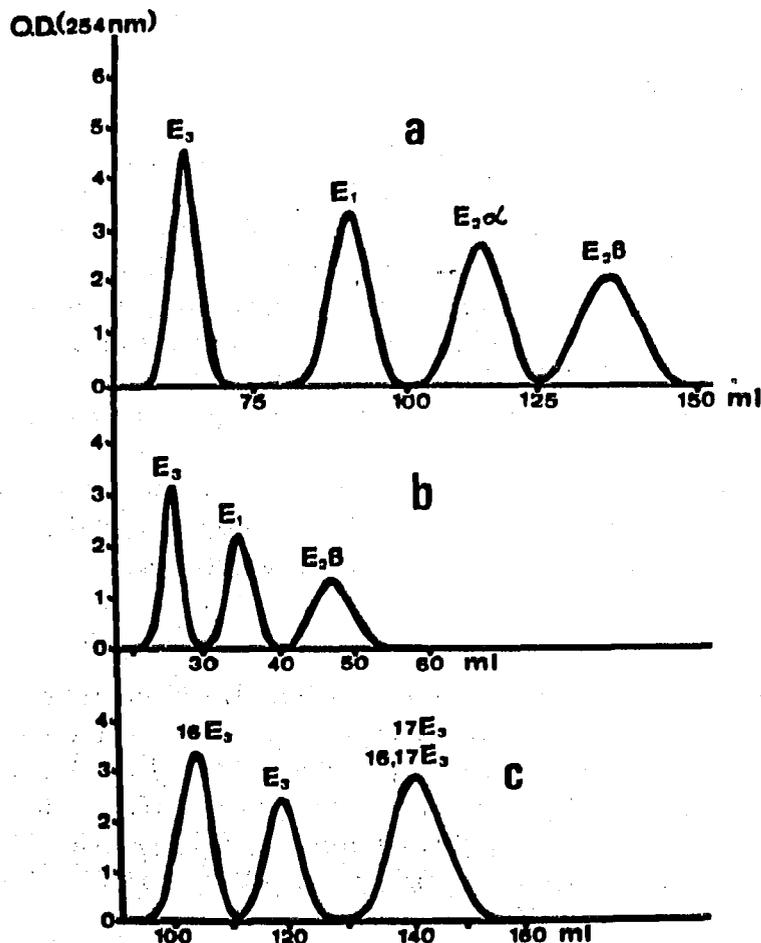


Fig. 1. Trennung von Östriol- und Östriolepimeren durch Gelchromatographie. (a) Trennung von Östriol, Östron, Östradiol-17 $\alpha$  und Östradiol-17 $\beta$ ; 10  $\times$  600 mm Säule, 25°. (b) Trennung von Östriol, Östron und Östradiol-17 $\beta$ ; 9  $\times$  250 mm Säule, 25°. (c) Trennung von Östriolepimeren; 10  $\times$  600 mm Säule, 55°.

*Trennung von Östriol, Östron, Östradiol-17 $\alpha$  und -17 $\beta$ .* Diese vier im Harn von Haustieren am häufigsten vorkommenden Östrogene werden in 10  $\times$  600 mm Sephadex LH-Säulen bei 25° getrennt (Fig. 1a). Die Probenzuführung erfolgt wie oben beschrieben in 0.15 M Azetatpuffer (pH 4.2). Extrakte aus organischen Lösungsmitteln werden erst in 4.5 ml 0.02 N NaOH aufgenommen und danach mit 0.5 ml 1.5 M Azetatpuffer (pH 4.2) auf pH 4.2 eingestellt. Zur Trennung der obengenannten Östrogene sind etwa 150 ml 0.02 N NaOH erforderlich.

*Trennung von Östriol, Östron und Östradiol-17 $\beta$ .* Diese drei Östrogene können in kleineren Sephadex LH 20-Säulen (9  $\times$  250 mm) bei 25° voneinander getrennt werden (Fig. 1b). Als Eluant verwenden wir ebenfalls 0.02 N NaOH. Zur Trennung sind etwa 55 ml erforderlich.

*Trennung von Östriol, 16-Epi-östriol und 17-Epi-östriol bzw. 16,17-Epi-östriol.* Drei der vier Östriolepimeren können an Sephadex LH 20 getrennt werden (Fig. 1c). Die Separation wird in einer 10 × 600 mm Säule bei 55° mit 160 ml 0.02 N NaOH vorgenommen.

### *Ergebnisse und Diskussion*

Die Trennung der bei Haustieren wichtigen Östrogene Östriol, Östron, Östradiol-17 $\alpha$  und -17 $\beta$  gelingt in 10 × 600 mm Säulen aus Sephadex LH-20 bei einer Temperatur von 25° und 0.02 N NaOH als Eluant. Die Trennung der Fraktionen von Östradiol-17 $\alpha$  und -17 $\beta$  erfolgt zu mehr als 98%. Östriol und Östron sowie Östron und Östradiol-17 $\alpha$  sind in jedem Falle quantitativ voneinander getrennt. Die ersten 57 ml des Eluats enthalten keine Östrogene. Danach werden die vier Östrogene getrennt eluiert. Das Gesamteluat beträgt 150 ml. Die Elutionsdaten bleiben bei konstanter Temperatur und angemessener Elutionsgeschwindigkeit (etwa 15 ml/Std.) monatelang unverändert. Zur Prüfung der Trennqualität hat sich in unseren Versuchen die Verwendung eines UV-Photometers (Uvicord II, 254 nm) bewährt, das direkt mit dem Säulenausgang verbunden wird. Die Östrogene können so ohne zusätzlichen manuellen Aufwand registriert werden. Diese Technik kann nur bei Parallelsäulen angewandt werden, die mit Reinsubstanzen beschickt worden sind. Bei biogenem Material werden die Östrogene von anderen Verbindungen überlagert. Auch bei den in Azetatpuffer aufgenommenen Reinsubstanzen tritt vor der Elution der Östrogene ein unspezifischer Gipfel auf. Da nach Angaben des Herstellers das Gel nur bis etwa pH 10 stabil ist, kann es sich hierbei um Spuren von Hydrolyseprodukten des Sephadex handeln.

Die Spezifität der aufgezeichneten Kurven wird durch Fluorimetrie und Kolorimetrie<sup>6</sup> sowie durch Mobilitätsprüfung auf Kieselgel-Dünnschichtplatten hinreichend gesichert. Andererseits kann das Verhalten der Östrogene bei der Gelchromatographie zu ihrer Charakterisierung herangezogen werden. Die Wiederfindungsrate der zugeetzten Östrogene beträgt 95.5% bei urinfreien Standardproben und 85.6 bis 90.4 ( $\pm$  2.2 bis 2.7) bei Harnproben von Hunden<sup>7</sup>.

Die Auftrennung der in der humanmedizinischen Routinediagnostik wichtigen Östrogene (Östriol, Östron und Östradiol-17 $\beta$ ) kann in kleineren Sephadex LH 20-Säulen (9 × 250 mm) erfolgen. Nach einem Vorlauf von 22 ml erscheinen die drei Östrogene getrennt bis zum 55. ml. Dieser Trennprozess nimmt nur etwa 3½ Std. in Anspruch. Die Östriolfraktion kann bereits nach 2 Std. vorliegen. Dieses Verfahren ähnelt der Methode von VAN BAELEN *et al.*<sup>4</sup>; doch ist durch die Senkung des pH-Wertes der Probe die Östrogenadsorption verstärkt und erlaubt die Verwendung grosser Probenvolumina<sup>7</sup>. Durch die Erhöhung der OH-Ionenkonzentration des Elutionsmittels ist die Laufgeschwindigkeit der Östrogene erhöht. Trotz eines erheblich geringeren Elutionsvolumens (55 gegenüber 200 ml) erhält man eine gleichwertige Trennung der drei Östrogene (Fig. 1b).

Die Trennung von drei Östriolepimeren wird durch die Erhöhung der Säulentemperatur auf 55° in 10 × 600 mm Säulen erreicht. Hierbei befindet sich das Gel in einem geringeren Quellungszustand, wodurch die Retardation der Östrogene verstärkt wird. Da Östradiol-17 $\alpha$  und -17 $\beta$  nur sehr schwer bei dieser Temperatur eluiert werden können, empfiehlt sich die Vortrennung von Östriol, Östron und Östradiol-17 $\beta$  in einer 9 × 250 mm Säule.

Diese Untersuchung wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft sowie aus Forschungsmitteln des Landes Niedersachsen gefördert.

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

H.-J. HORST  
E. GRUNERT  
M. STOYE

- 1 C. G. BELING, *Acta Endocrinol., Suppl.*, 79 (1963).
- 2 W. EECHAUTE UND G. DEMEESTER, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 25 (1965) 480.
- 3 H.-J. HORST, *Zentralbl. Vet. Med.*, A 18 (1971) 93.
- 4 H. VAN BAELEN, W. HEVNS UND P. DE MOOR, *J. Chromatogr.*, 30 (1967) 226.
- 5 H.-J. HORST, *J. Chromatogr.*, 58 (1971) 227.
- 6 H.-J. HORST, *Math. Nat. Diss.*, Hannover, im Druck.
- 7 H.-J. HORST, E. GRUNERT UND M. STOYE, *Zentralbl. Vet. Med.*, im Druck.
- 8 G. MIKHAIL, C. H. WU, M. FERIN UND R. L. VAN DE WIELE, *Karolinska Symp. (II) : Steroid Assay by Protein Binding, Genf, 1970.*
- 9 B. E. P. MURPHY, *Karolinska Symp. (II) : Steroid Assay by Protein Binding, Genf, 1970.*

Eingegangen am 2. März 1972

\* Direktor: Prof. Dr. E. AEHNELT.

\*\* Abteilungsvorsteher: Prof. Dr. E. GRUNERT.

\*\*\* Direktor: Prof. Dr. K. ENICK.

*J. Chromatogr.*, 69 (1972) 395-398