

CHROM. 7303

Note

Dünnschichtchromatographie von Picogramm-Mengen von Oestradiol

K. POLLOW, R. SINNECKER und B. POLLOW

Institut für Molekularbiologie und Biochemie, Freie Universität Berlin, Arnimallee 22, 1 Berlin 33 (B.R.D.)

(Eingegangen am 19. November 1973)

In der modernen Sexualhormon-“Rezeptorchemie”, die sich mit der Charakterisierung der spezifisch bindenden Makromoleküle und ihrer physiologischen Bedeutung in Targetorganen der Sexualhormonwirkung befasst, wird mit ng- bzw. pg-Mengen von Steroidhormonen gearbeitet, um den natürlichen Hormongewebspiegeln zu entsprechen. Obwohl die Rezeptorproteine eine strenge Substratspezifität aufweisen, ist es unerlässlich, eine eindeutige Identifizierung des gebundenen Steroids vorzunehmen. Dazu bieten sich dünnschichtchromatographische Verfahren mit authentischen Referenzsubstanzen an. Das Problem, das sich bei der Dünnschichtchromatographie von ng- bzw. pg-Mengen von Steroidhormonen stellt, ist ein sicherer Ausschluss einer durch das Absorptionsmaterial möglichen Artefaktbildung von Steroidkörpern.

EXPERIMENTELLES

Material

Alle Reagenzien waren von p.a. Reinheitsgrad und wurden von Merck (Darmstadt, B.R.D.) bezogen. Benzol und Äthylacetat wurden über eine Vigreux Säule destilliert. Methanol wurde nach Behandlung mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin destilliert¹. [6,7-³H₂]Oestradiol-17 β (40 Ci/mMol; Radiochemical Centre, Amersham, England) wurde auf radiochemische Reinheit mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie nach Zusatz von 10 μ g nicht radioaktiv markierten Oestradiols in den Fliessmitteln Benzol–Äthylacetat (75:25) und Benzol–Methanol (19:1) geprüft. Der Reinheitsgrad war grösser als 98%. Die Radioaktivität wurde auf der Dünnschichtplatte mit dem Radiodünnschicht-Scanner II [Berthold/Frieseke, Karlsruhe, B.R.D.) detektiert.

Die Dünnschichtplatten, 20 \times 20 cm, beschichtet mit Kieselgel F₂₅₄, wurden von Merck bezogen.

Methoden

Standardprozedur. 0.1 μ Ci von [6,7-³H₂]Oestradiol (680 pg) wurden in 5 μ l Benzol–10% Äthanol punktförmig an der Startlinie aufgetragen. Anschliessend wurde die Dünnschichtplatte in einem mit Filterpapier ausgeschlagenen Glastrog in gesättigter Atmosphäre aufsteigend im Fliessmittel Benzol–Methanol (19:1) entwickelt.

Variation der Standardprozedur. (1) 0.1 μCi von $[6,7\text{-}^3\text{H}_2]\text{Oestradiol}$ wurden versetzt mit verschiedenen Mengen nicht radioaktiv markierten Oestradiols (1, 5, 10 μg) und chromatographiert wie beschrieben. (2) Die Kieselgelplatten wurden mit 5%iger wässriger $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ -Lösung durch aufsteigende Chromatographie gereinigt und anschliessend für 2 Std. an der Luft getrocknet. Danach wurde 0.1 μCi $[6,7\text{-}^3\text{H}_2]\text{-Oestradiol}$ (680 pg) in dem Fließmittel Benzol-Methanol aufsteigend chromatographiert.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Eisenionenbedingter intensiver Farbniederschlag bildet sich im Frontbereich der Dünnschichtplatte nach Berliner-Blau-Färbung, wenn die mit Kieselgel beschichtete Dünnschichtplatte mit methanolischer Salzsäure einmal aufsteigend chromatographiert wurde.

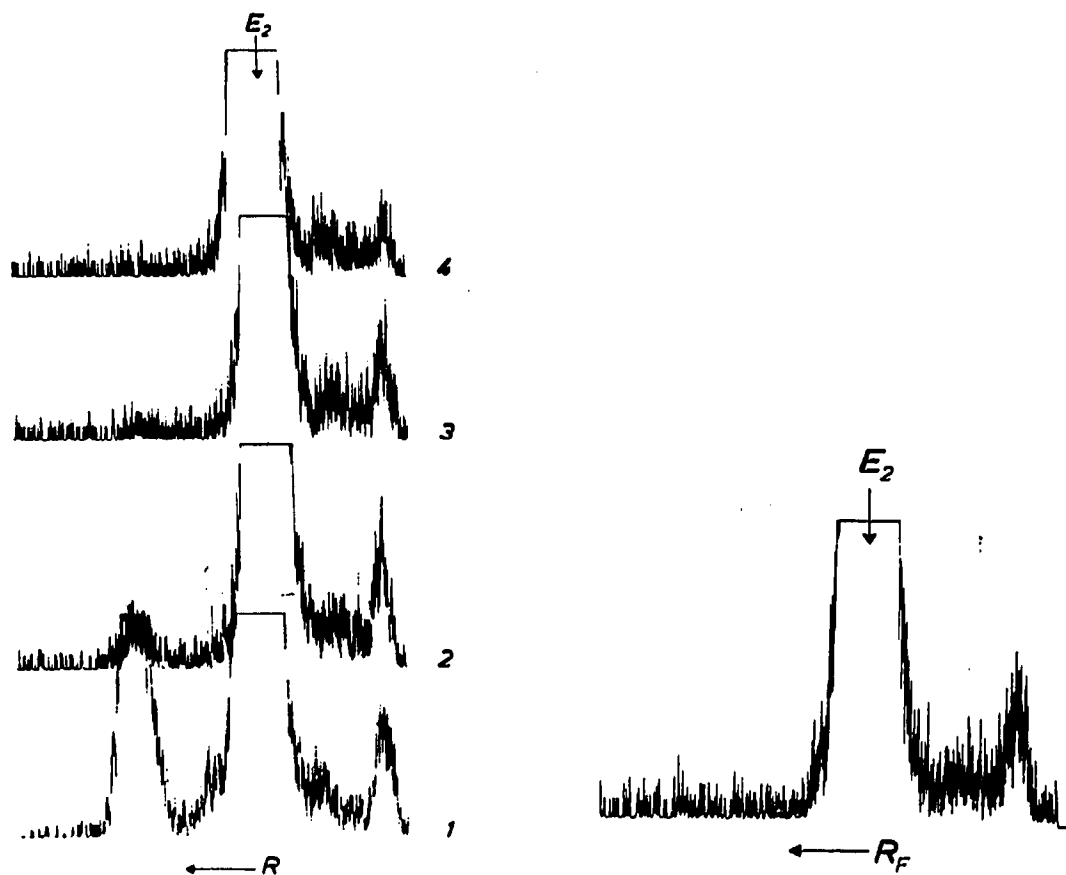


Fig. 1. Dünnschichtchromatographie auf Kieselgelplatten von $[6,7\text{-}^3\text{H}_2]\text{Oestradiol}$ (1=0,1 μCi = 680 pg) bzw. nach Zusatz von "kaltem" Oestradiol (2= +1 μg , 3= +5 μg , 4= +10 μg). Laufmittel: Benzol-Methanol (19:1). E_2 = Oestradiol.

Fig. 2. Dünnschichtchromatographie von $[6,7\text{-}^3\text{H}_2]\text{Oestradiol}$ (0.1 μCi =680 pg) auf Kieselgelplatten, die mit wässriger Pyrophosphatlösung vorgewaschen wurden. Laufmittel: Benzol-Methanol (19:1). E_2 = Oestradiol.

Die Fig. 1 zeigt das Artefaktmuster, wenn —wie unter *Standardprozedur* beschrieben— 680 pg [6,7-³H₂]Oestradiol aufsteigend chromatographiert wurden. Der Oestradiol-“peak” stellt sich von den Zersetzungsprodukten im Radiodünnschichtchromatogramm isoliert dar. Einige der Artefakte sind in der gewählten mobilen Phase weniger, andere mehr polar. Die Artefakte wurden nicht identifiziert. Durch Zusatz von “kaltem” Oestradiol zu den 680 pg ³H-markierten Oestradiols wird die Artefaktbildung zurückgedrängt bzw. völlig verhindert.

Die Fig. 2 demonstriert, dass nach Reinigung des Kieselgels mit 5%iger wässriger Natriumpyrophosphatlösung die Bildung von unspezifischen Zersetzungsprodukten von Oestradiol bei Einsatz von 680 pg Oestradiol verhindert wird.

Da Pyrophosphat mit Eisenionen stabile Komplexe bildet —also einen maskierenden Effekt besitzt— und die Fe²⁺/Fe³⁺-Ionen Austauschkatalysatoren gegenüber Sauerstoff darstellen, ist es wahrscheinlich, dass für die hier beschriebene Art der Artefaktbildung von Oestradiol die Eisenionenkontaminierung des Kieselgels verantwortlich ist.

Dass Luftsauerstoff bei der Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel von pg- bzw. ng-Mengen von Oestradiol die Artefaktbildung fördert, wurde jüngst von Doerr² gezeigt. Durch Zugabe von milden Reduktionsmitteln [Phenol, Mercaptoäthanol] zur mobilen Phase konnte Doerr die unspezifische Artefaktbildung verhindern.

Da von anderen Autoren³⁻⁸ bekannt ist, dass Lösungsmittelverunreinigungen in Gegenwart von Kieselgel Steroidzersetzungsprodukte bilden, wurde auf p.a. Reinheitsgrad der organischen Lösungsmittel geachtet.

Die dargestellte Methode der Vorreinigung von Kieselgeldünnschichtplatten mit wässriger Pyrophosphatlösung bietet sich als ein einfaches Verfahren zur artefaktfreien Dünnschichtchromatographie von pg-Mengen von Steroidhormonen an.

LITERATUR

- 1 I. E. Bush, *The Chromatography of Steroids*, Pergamon, Oxford, London, 1961, p. 348.
- 2 P. Doerr, *J. Chromatogr.*, 59 (1971) 452.
- 3 B. P. Lisboa, *Methods Enzymol.*, 15 (1969) 154.
- 4 A. I. Frankel und A. V. Naltandou, *Steroids*, 8 (1966) 749.
- 5 D. R. Idler, N. R. Kimball und B. Truscott, *Steroids*, 8 (1966) 865.
- 6 D. R. Idler und D. A. Horne, *Steroids*, 11 (1968) 909.
- 7 J. Attal, S. M. Hendeles, J. A. Engels und K. B. Eik-Nes, *J. Chromatogr.*, 27 (1967) 167.
- 8 F. A. Vandenheuvel, *J. Lab. Clin. Med.*, 69 (1967) 343.