

Literatuurstudie naar de mogelijkheid steroiden, somatotropine en prolactine te concentreren met behulp van affiniteitschromatografie.



Rijks-Kwaliteitsinstituut
VOOR LAND- EN TUINBOUWPRODUCTEN

Bornsesteeg 45
6708 PD WAGENINGEN
Postadres: Postbus 230
6700 AE WAGENINGEN
Telefoon 08370 - 19110
Telex 75180 RIKIL



Universiteit Twente
universiteit voor technische en
maatschappijwetenschappen

Postbus 217
7500 AE Enschede
Telefoon 053 - 899111
Telex 44200

Literatuurstudie naar de mogelijkheid steroiden, somatotropine en
prolactine te concentreren met behulp van
affiniteitschromatografie.

C.C.I. Balk

ir. E.R. Hensema

Universiteit-Twente, onderzoekgroep Materiaaltechniek/Biomedica.

februari 1988

RIKILT rapport 88.19

Deze literatuurstudie is uitgevoerd op de faculteit der Chemische
Technologie aan de Universiteit-Twente in samenwerking met het
Rijks-Kwaliteitsinstituut voor Land- en Tuinbouwprodukten (RIKILT).

Universiteit-Twente
Prof. dr. A. Bantjes
dr. T. Beugeling
dr. L. van der Does

RIKILT
dr. F. A. Huf
drs. R. Schilt

VERZENDLIJST

INTERN:

directeur

sectorhoofden

projectcoördinator

afdeling BFA (3x)

bibliotheek

EXTERN:

directie DLO

directie VKA (2x)

directie RVV

directie VD

directie RIVM

Universiteit Twente, prof. dr A. Bantjes (10x)

Holland Biotechnology, drs P.N.M. Koning en dr A.W.J. van Doorn

SVP, dhr W. van Gelder

VU, prof. dr U.A.Th. Brinkman

TUE, vakgroep Medische Chemie, prof. dr C.H.M.M. de Bruijn

1. SAMENVATTING.

Ondanks een wettelijk verbod bestaat de kans dat in de veeteelt groeihormonen, de zogenaamde anabole steroïden, gebruikt worden ter bevordering van de groei van slachtdieren.

Twee andere hormonen zijn prolactine en somatotropine die een grotere melkproductie teweegbrengen.

De mogelijkheid bestaat dat wegens mogelijke negatieve effecten op de volksgezondheid het gebruik van deze twee hormonen verboden zal worden.

Voor het aantonen van beide klassen hormonen in melk, bloed, e.d. zijn o.h.a. nog geen goede methodes beschikbaar. Voordat detectie of confirmatie plaats vindt moet het hormoon opgezuiverd worden.

In dit rapport zullen een aantal opzuiveringsmethoden met behulp van affiniteitschromatografie besproken worden die gevonden zijn met een computer-literatuursearch.

De search leverde een groot aantal alternatieven op.

De steroïden kunnen opgezuiverd worden door gebruik te maken van tomatine, antilichamen of carrier-eiwitten als ligand bij affiniteitschromatografie. **Een potentieel zeer interessante methode voor multiresidu analyse is affiniteitschromatografie met silica voorzien van tomatine liganden.** Vooral door de aanzienlijke verschillen in elutietijden zijn er goede vooruitzichten aanwezig voor een zeer selectieve scheiding. Bovendien bestaat er op de laboratoria van de Stichting voor Plantenveredeling te Wageningen veel ervaring en kennis op het gebied van tomatine en verwante verbindingen. Bij het toepassen van antilichamen zijn eveneens goede resultaten behaald. Naast een hoge recovery bleken de affiniteitskolommen meer dan 50 maal gebruikt te kunnen worden zonder dat ze achteruit gingen. Een nadeel van de antilichaam-toepassingen is dat het hier gaat om een monoresidu-analysemethode.

Opzuivering van prolactine en somatotropine kan plaats vinden op basis van commercieel verkrijgbare producten en op basis van antilichamen als ligand. Voordeel van de eerste methode is dat alle benodigdheden direct verkrijgbaar zijn, nadeel is vaak de bewerkelijkheid. Ook hier komt de antilichaam-methode goed naar voren.

2. INHOUDSOPGAVE.

1.	Samenvatting.....	2
2.	Inhoudsopgave.....	3
3.	Inleiding.....	4
4.	Onderzoekstrategie.....	5
.1.	Steroiden.....	5
.2.	Somatotropinen.....	5
5.	Affiniteitschromatografie.....	6
.1.	Het principe van affiniteitschromatografie.....	6
6.	Resultaten van de literatuurstudie ten aanzien van steroiden.....	8
.1.	Eenvoudige chemische verbindingen als ligand.....	8
.2.	Receptoren als ligand.....	10
.3.	Carrier-eiwitten als ligand.....	11
.4.	Antilichamen als ligand.....	11
7.	Resultaten van de literatuurstudie ten aanzien van de somatotropinen.....	14
.1.	Somatotropine opzuivering op basis van commercieel verkrijgbare producten.....	14
.2.	Antilichamen als ligand.....	16
8.	Conclusies.....	21
.1.	Steroiden.....	21
.2.	Somatotropine en prolactine.....	21
9.	Literatuur.....	23

3. INLEIDING.

Ondanks een wettelijk verbod bestaat de kans dat in de veeteelt groeihormonen, de zogenaamde anabole steroïden, worden gebruikt ter bevordering van de groei van slachtdieren^{1,4}. Om de naleving van de wet te controleren is er behoefte aan goede analysemethoden. In dit rapport zal gekeken worden of affiniteitschromatografie gebruikt zou kunnen worden als onderdeel van een bepalingmethode. Het verbod voor het gebruik van groeihormonen - in verband met mogelijke gevaren voor de volksgezondheid² - geldt voor lichaams-eigen en lichaamsvreemde hormonen.

Voorbeelden van lichaamseigen hormonen zijn: testosteron, oestradiol en progesteron.

Enkele voorbeelden van lichaamsvreemde hormonen zijn: de stilbenen (waaronder DES) en afgeleiden van testosteron zoals bijvoorbeeld nortestosteron en trenbolon.

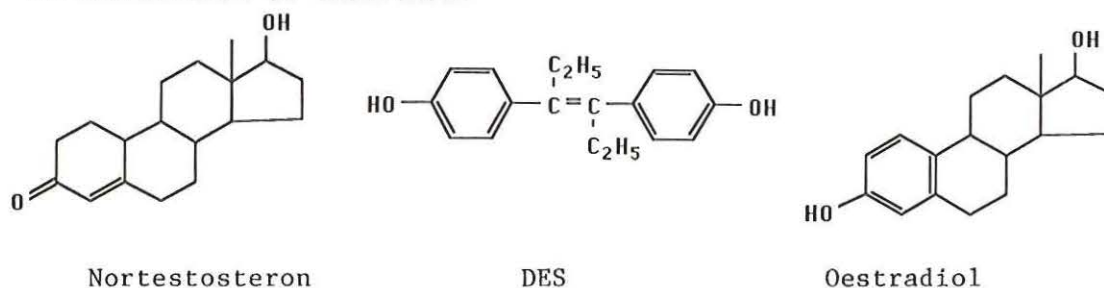


Fig. 1. Enkele voorbeelden van groeihormonen.

Tot ca. 1984 werd het als gevaarlijk beschouwde groeihormoon DES veelvuldig gebruikt. Door intensieve en grootschalige controle wordt DES bijna niet meer gebruikt in Nederland². Sinds 1984 worden echter andere anabolen in grote mate toegepast, veel gebruikt zijn: de lichaamsvreemde steroïden nortestosteron en medroxyprogesteron en de lichaamseigen steroïden oestradiol en testosteron³.

De aanwezigheid van deze steroïden kan men op het spoor komen via de zogenaamde "spuitplekken", waarin ze in relatief hoge concentratie voorkomen. Via een combinatie van een aantal scheidingsmethoden kunnen ze worden geïsoleerd waarna de steroïden vervolgens worden aangetoond door middel van gaschromatografie/massaspectrometrie.

Omdat deze methode kostbaar is en spuitplekken vaak moeilijk te vinden zijn bestaat er een dringende behoefte aan analysemethoden waarmee onder andere urine, bloed en/of vlees op de aanwezigheid van anabolica gecontroleerd kunnen worden. Hier zijn de concentraties van anabolica echter veel lager. Daarom zijn meer gevoelige methoden noodzakelijk zoals RadioImmunoAssay (RIA) en de minder gevoelige GasChromatografie in combinatie met MassaSpectrometrie (GCMS).

Voor het aantonen van nortestosteron is wel een RIA beschikbaar, maar vanwege de geringe concentratie van nortestosteron in bloed e.d. is bevestiging met GCMS niet in alle gevallen mogelijk². De wetgever verlangt echter twee onafhankelijke bepalingsmethoden waarmee het anabolicum wordt aangetoond.

Voordat bevestiging met GCMS kan plaatsvinden dient de concentratie van het anabolicum verhoogd te worden. Een veelbelovende techniek hiervoor lijkt de affiniteitschromatografie.

Een nieuw hormoon is in opkomst voor gebruik in de veeteelt: Bovine Somatotropine (BST). Volgens de meest optimistische schattingen kan BST de melkproduktie tot 40% verhogen. Door een aantal grote chemische concerns (Eli Lilly, Monsanto, American Cyanamid en Upjohn) wordt veel geld uitgegeven aan onderzoek naar en de ontwikkeling van het produkt BST.

Somatotropine is een groeihormoon (GH) dat werkt als een anabole stof. Het is een peptidehormoon met 191 aminozuren ($M = 21.500$).

Ook prolactine is een hormoon dat een grotere ^wmelkproduktie teweegbrengt. Het is, net als somatotropine, een peptidehormoon echter met 198 aminozuren. Aangezien de onschadelijkheid verbonden aan het gebruik van somatotropine en prolactine op de volksgezondheid niet bewezen is bestaat de mogelijkheid dat het gebruik van deze stoffen verboden zal worden.

Voor het aantonen van beide peptiden in melk, bloed, e.d. is nog geen goede methode beschikbaar. Voordat detectie en confirmatie van deze peptide kan plaatsvinden moet het peptidehormoon opgezuiverd worden.

4. ONDERZOEKSTRATEGIE.

4.1. Steroiden.

Na een algemene inventarisatie van het probleem op het RIKILT bij dr. F. A. Huf en drs. R. Schilt hebben we ons verder verdiept in het probleem. Hierop volgde een eerste literatuurstudie/onderzoek aan de hand van materiaal aanwezig op Universiteit-Twente en het RIKILT.

De tot dan toe gevonden literatuur bleek niet toereikend waarna aan de hand van een computersearch in de Chemical Abstracts verder gezocht is.

De eerste search werd in Wageningen verricht aan de hand van een aantal trefwoorden, t. w. "testosteron", "estradiol", "oestradiol", "pro- gesteron", "nortestosteron", "steroid hormon" en "steroid" (groep 1), deze zijn gekruist met het trefwoord "affinity chromatog". Een tweede zoekactie werd uitgevoerd met groep 1 gekruist met de tref- woorden: "affinity" en "ligand". De gehele search leverde ca. 200 artikelen op. Na selectie leken 10 artikelen van toepassing. Deze artikelen werden aangevraagd.

Aan de hand van onder andere deze artikelen is dit verslag geschreven.

4.2. Somatotropine en prolactine.

Ook voor dit literatuur onderzoek is een computer search verricht, dit keer echter niet in Wageningen, maar op de Universiteit-Twente. Bij deze search werden de volgende trefwoorden gebruikt die op onderstaande wijze zijn gekruist:

- Somatotropine en affinity,
- Somatotropine of prolactine waarbij gezocht is naar review artikelen,
- Somatotropine of prolactine en affinity chromatography.

5. AFFINITEITSCHROMATOGRAFIE.

Zoals in de inleiding is opgemerkt is de concentratie van steroiden in bloed e. d, vaak te laag voor een bevestiging met GC-MS. Indien een goede methode ontwikkeld zou kunnen worden om steroiden door middel van affiniteitschromatografie te concentreren, zou voor de detectie een opstelling gebruikt kunnen worden zoals geschetst in fig. 2. De aangegeven werkwijze is bedacht door het RIKILT in samenwerking met de VU in Amsterdam en bestaat uit een affiniteitschromatografie-kolom, een High Performance Liquid Chromatography (HPLC) en een Ultraviolet absorptie Spectrometer. Op deze wijze zou dan achtereenvolgens het steroid geconcentreerd, gefractioneerd en geconfirmeerd kunnen worden m.b.v. GCMS.

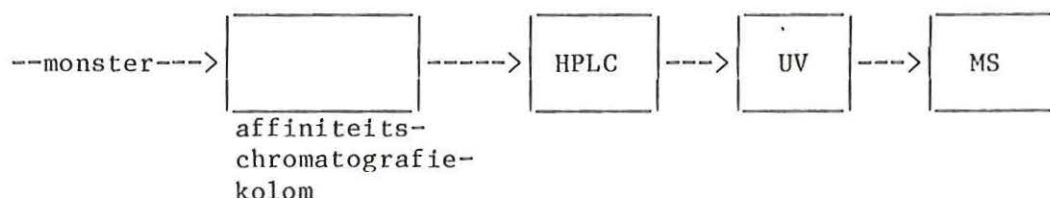


Fig. 2. Mogelijke werkwijze voor het concentreren en aantonen van steroiden in bloed, urine, e. d.

De dimensionering van de affiniteitskolom vond plaats bij de VU. In de volgende paragraaf zal nader worden ingegaan op het principe van affiniteitschromatografie en zullen de criteria worden besproken die gehanteerd moeten worden bij de concentrering van steroiden.

5.1. Het principe van affiniteitschromatografie.

Affiniteitschromatografie is een scheidingsmethode die gebaseerd is op specifieke en reversibele moleculaire interactie tussen twee stoffen^{6,7}. In de praktijk is affiniteitschromatografie een tweecomponentsysteem:

- * een produkt A in oplossing dat gezuiverd moet worden,
- * een produkt L, het Ligand, dat specifiek herkend wordt door produkt A. Het ligand is chemisch geïmmobiliseerd op een onoplosbare drager (de matrix).

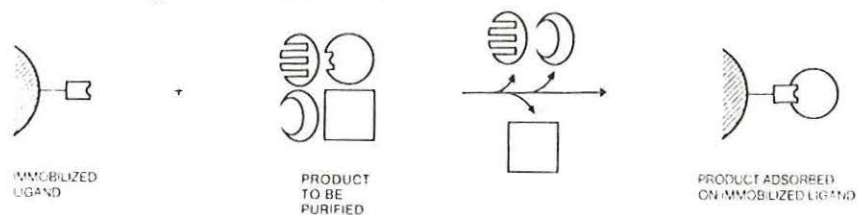


Fig. 3. Adsorptie van het te zuiveren produkt op het geïmmobiliseerde ligand⁸.

Produkt A is het te concentreren hormoon en bevindt zich in een oplossing die in contact wordt gebracht met de matrix. Produkt A adsorbeert vervolgens aan het ligand.

Bij kleine moleculen vertoont het ligand interactie met het hele molecuul, bij grotere moleculen is het waarschijnlijk dat slechts aangegrepen wordt op een actieve plaats op het molecuul (epitoom). Vervolgens wordt het steroid gedesorbeerd van het ligand door middel van een eluens of eventueel met een verdringend competitief agens.

Doordat affiniteitschromatografie berust op een zeer specifieke interactie tussen twee stoffen is het met behulp van deze techniek mogelijk, door een goede keuze van de ligand, een produkt A dat in zeer lage concentraties voorkomt op te zuiveren en te concentreren.

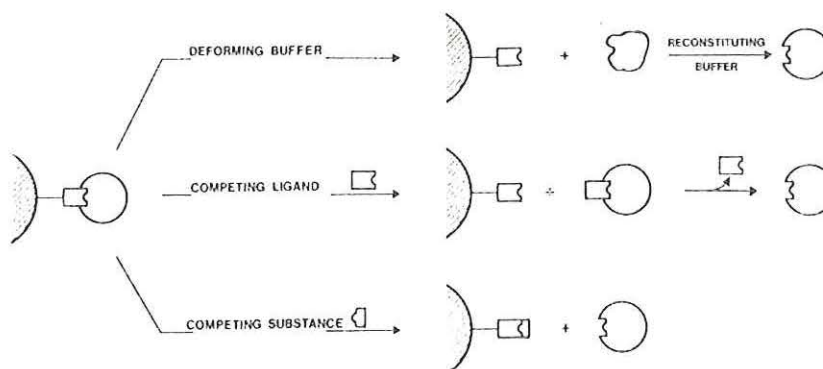


Fig. 4. Elutie van het te zuiveren produkt⁸.

Verschillende factoren zijn van invloed op het proces, waaronder:

- * de keuze van de matrix waaraan het ligand is bevestigd,
- * het al dan niet gebruik maken van een spacer,
- * de keuze van het ligand.

Om een steroid uit een oplossing te concentreren is een ligand nodig die met het steroid een specifieke interactie vertoont.

Ons doel is het vinden van een dergelijke ligand. Dit is gedaan aan de hand van een literatuuronderzoek. Een probleem dat zich hierbij voordoet is dat het op voorhand moeilijk te voorspellen is of een ligand interactie zal vertonen met de te concentreren stof. Het is dus zaak te zoeken naar een concreet voorbeeld in de literatuur waar een ligand gebruikt wordt dat in staat is een steroid of een soortgelijk molecuul te koppelen. Ook kan gezocht worden naar een ligand dat in staat is een molecuul te koppelen aan een actieve groep die ook voorkomt op het steroid.

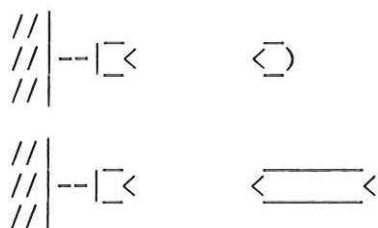


Fig. 5. Koppeling van twee verschillende produkten met een zelfde actieve groep aan hetzelfde ligand.

6. Resultaten van de literatuurstudie ten aanzien van steroiden.

In dit hoofdstuk worden de resultaten van de literatuurstudie besproken. Deze resultaten zijn aangevuld met mogelijke oplossingen en suggesties.

6.1. Eenvoudige chemische verbindingen als ligand.

In een artikel van Csiky en Hansson⁹ wordt de scheiding van steroiden beschreven, zij voeren deze uit door gebruik te maken van High Performance Liquid Affinity Chromatography (HPLC) met behulp van tomatine dat chemisch is gebonden aan de silicamatrix in de kolom.

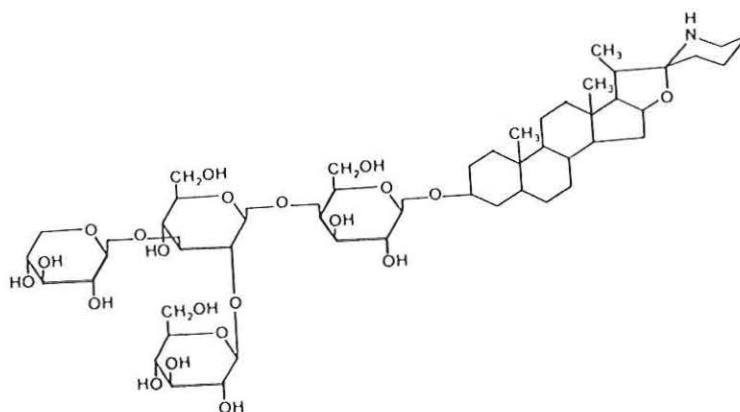


Fig. 6. Chemische structuur van tomatine

Zij koppelen tomatine aan epoxy-gesubstitueerde silica.

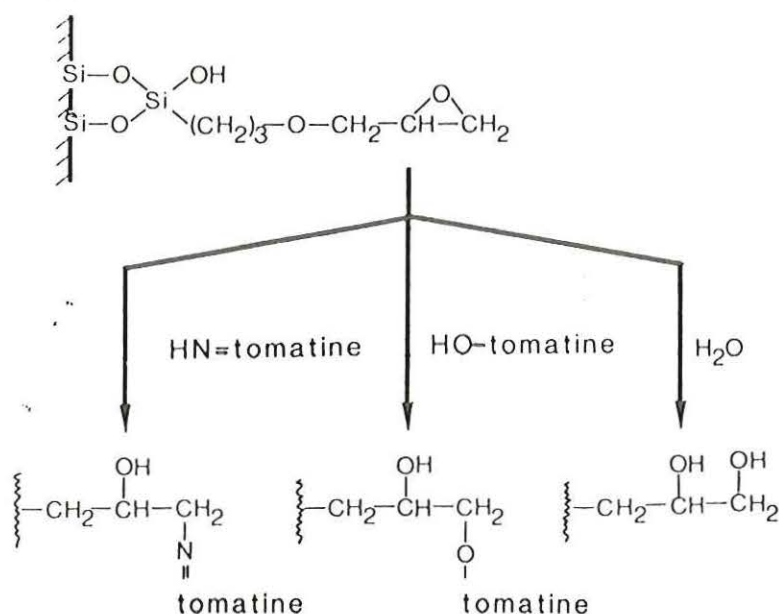


Fig. 7. Synthese van tomatine-silica.

Zij voerden deze koppelingssynthese als volgt uit:

Epoxy-gesubstitueerd silica (3,0 g) en tomatine (1,5 g) zijn gedroogd in vacuum bij 100°C gedurende een nacht, de stoffen zijn gemengd met 20 ml dioxaan en 1 ml borontrifluorideetheraat in een glazen ampul bij 21°C gedurende 40 uur. Het tomatine gesubstitueerde silica wordt vervolgens gefilterd en grondig gewassen met dioxaan, methanol, methanol/water, water, methanol, dioxaan, diethylether en wordt vervolgens gedroogd bij 100°C in vacuum.

Koppeling van tomatine aan epoxy-gesubstitueerd silica kan plaatsvinden door middel van hydroxylgroepen en de secundaire amine groepen van het tomatine borontrifluoride wordt gebruikt als katalysatoren om een hogere opbrengst te verkrijgen. Uit metingen bleek 60 μmol tomatine per gram gel gebonden te zijn. Epoxy-gesubstitueerd silica heeft ca. 880 μmol epoxy-groepen per gram silica. De auteurs verklaren deze lage koppelingsgraad door het optreden van sterische hindering door de grote tomatine moleculen en door de lage reactiesnelheid.

Zij gebruikten bij het doormeten van hun kolom de volgende referentie-oplossing: 4-cholesten-3-one (2,6 mg/ml), cholest-5-ene-3 β , 4 β -diol (2,5 mg/ml), 3- β -hydroxycholest-5-ene-7-one (6,8 mg/ml), cholest-5-ene-3 β , 7 β -diol (2,5 mg/ml) en cholesterol (16,3 mg/ml) opgelost in hexane/propanol (99,9/0,1) waarna de oplossing werd verdund met hexaan.

Voor de scheiding gebruikten zij een kolom (100 * 4,5 mm ID stainless steel) gevuld met 2,7 g tomatine silica. Zij geven de volgende scheidingscurve voor hun referentieoplossing.

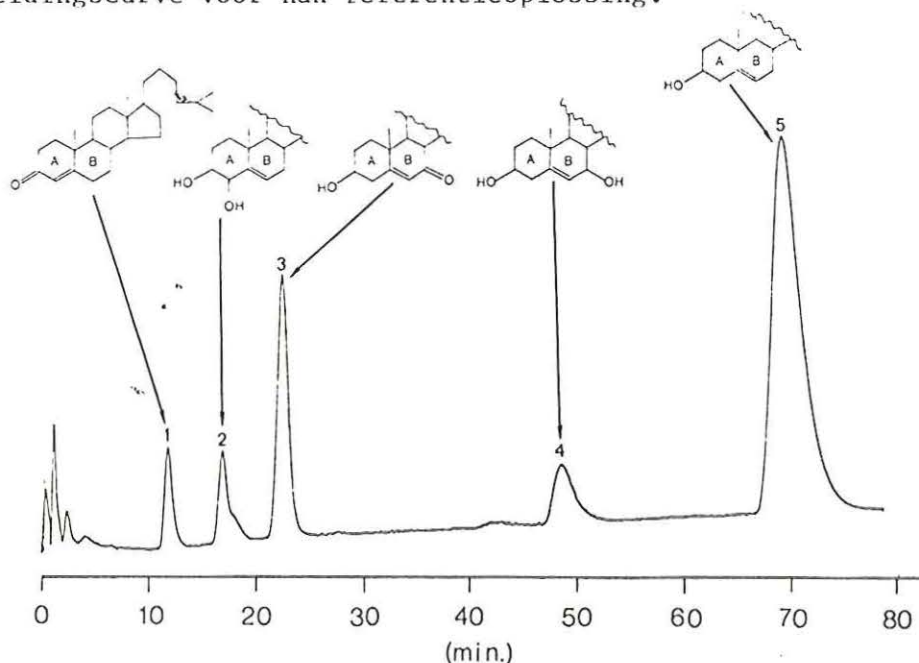


Fig. 8. Scheiding van steroiden d.m.v. silica-gebonden tomatine. De oplossing is een mengsel van 4-cholesten-3-one (1), cholest-5-ene-3 β , 4 β -diol (2), 3- β -hydroxycholest-5-ene-7-one (3), cholest-5-ene-3 β , 7 β -diol (4) en cholesterol (5). Eluent: n-hexane-cyclo-hexanol (98,5:1,5 v/v). De flow-rate bedroeg 1,0 ml/min. Detectie met UV-spectroscopie.

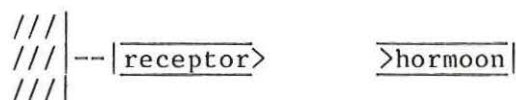
De auteurs zien voor de door hen ontwikkelde methode als toepassingsgebied de scheiding van sterolen uit een "crude" monster, meteen gevolgd door een tweede kolom voor de uiteindelijke scheiding.

Zij besluiten hun artikel met de volgende opmerking: "The selectivity of the tomatine silica is most sensitive on differences around the 3beta-hydroxy position of the sterols, which is in accordance with other reports^{10,11} on tomatine selectivity."

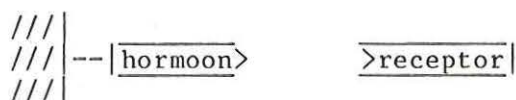
Deze methode lijkt ons ook geschikt voor het opzuiveren van andere steroiden door gebruik te maken van een hierboven beschreven kolom. Tomatine is een "eenvoudige" chemische verbinding die niet de nadelen kent die aan het gebruik van anti-lichamen kunnen kleven.

6.2. Receptoren als ligand.

Hormonen worden "herkend" door de aanwezigheid van receptoren op cellen. Receptoren zijn eiwitten die specifieke interactie vertonen met hormonen. Door een receptor als ligand toe te passen moet het mogelijk zijn hormonen selectief uit een oplossing te scheiden:



In de praktijk is deze methode alleen andersom toegepast; het hormoon wordt als ligand gebruikt voor selectieve scheiding van receptoren uit een oplossing^{6,12,13,14}:



In een artikel van Ross et al.¹⁵ wordt een methode beschreven om een hormoon en vitamine D die een carbonyl-functie hebben te koppelen aan een affiniteitsmatrix.

Voor het onderzoek naar vitamine D en steroiden kan het nodig zijn hun receptor eiwitten zuiver te verkrijgen. Dit kan via affiniteitschromatografie, waarbij het steroid of vitamine D het ligand zijn. De koppeling van het ligand aan de matrix kan ook door de dubbele band tussen C 10 en C 19 te functionaliseren, en dit te gebruiken om het molecuul covalent aan de matrix te binden. De functionalisatie wordt bereikt door het gebruik van Schwartz's reagens (bis(cyclopentadienyl)zirconium hydridochloride).

Hierna kan het gekoppeld worden d.m.v. NaCNBH₃. De methode werd gebruikt om steroid en vitamine D te koppelen aan Sepharose 4B.

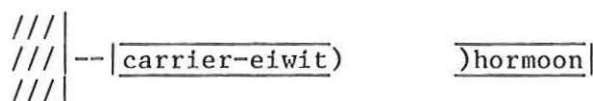
De kolom met vitamine D bond het receptor eiwit zeer goed, het probleem was echter wel dat het hierna niet geelueerd kon worden.

Hier moet nog aan gewerkt worden.

6.3. Carrier-eiwitten als ligand.

Hormonen komen meestal niet ongebonden in het bloed voor, zij zijn gebonden aan zogenaamde carrier-eiwitten. Deze eiwitten zorgen voor transport en bieden bescherming tegen afbraak van de hormonen. Zij vertonen een hoge affiniteit voor hun complementaire hormoon⁶ (dissociatie-constanten variëren tussen 10^{-7} en 10^{-16}). Een voorbeeld van een dergelijk hormoon is het Sex Hormon Binding Globulin (SHBG).

Op het RIKILT wordt onderzoek gedaan met SHBG als ligand:



In een artikel van Fisch et al.¹⁹ wordt een covalent gebonden carrier eiwit aan Sepharose gebruikt om testosteron te bepalen m.b.v. de competitieve eiwit binding methode. Om het eiwit-Sepharose complex te maken, neemt men Sepharose dat met CNBr geactiveerd is (Pharmacia) waaraan het carrier eiwit (uit menselijk serum) wordt gekoppeld.

Voor de bepaling wordt aan een monster met een te bepalen hoeveelheid testosteron (in plasma) een bekende hoeveelheid gelabeld hormoon toegevoegd, hieraan werd ook het eiwit-Sepharose complex toegevoegd. Het geheel werd op een filter gebracht, en gespoeld met buffer (0,05 M Tris-HCl, PH 7,4) waarmee het ongebonden hormoon wordt verwijderd. Hierna werd de radioactiviteit bepaald met een scintillatieteller waaruit de hoeveelheid testosteron berekend kan worden.

Het bleek dat de binding van het hormoon aan de gemodificeerde matrix specifiek was.

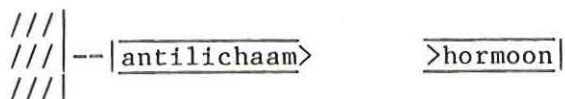
Deze methode wordt vaak andersom toegepast; een hormoon wordt als ligand gebruikt, en het carrier-eiwit dat zich in oplossing bevindt wordt gezuiverd^{6,16,17,18}:



6.4. Antilichamen als ligand.

Antilichamen zijn immunoglobulinen en worden vaak aangeduid als IgG, IgM of IgA, deze antilichamen kunnen binden (zeer specifiek reageren) met hun antigen⁶.

Ook antilichamen kunnen als ligand gebruikt worden; op deze wijze is onder andere oestradiol gezuiverd²⁰.



In een artikel van Glencross et al.²² wordt een simpele en efficiënte methode beschreven voor de extractie van oestradiol-17beta uit grote monsters runderplasma en melk door middel van affiniteitschromatografie. Deze methode is gebaseerd op covalent gebonden oestradiol-17beta antiserum aan Sepharose. Op deze wijze is men in staat oestradiol-17beta op een eenvoudige wijze op te zuiveren, nadat het oestradiol-17beta is geelueerd toonden de auteurs de aanwezigheid van oestradiol-17beta aan met Radio Immuno Assay (RIA).

Zij wekken het antiserum tegen 6-oxo-oestradiol-17beta, carboxy methyloxime, runderalbumine conjugaat²³ op in een gecastreerde mannelijke geit. Het antiserum was zeer specifiek voor oestradiol-17beta, met een 6% kruisingsreactie t.a.v. oestrone en minder dan 1% t.a.v. oestradiol-17alfa.

Het antiserum was covalent gebonden aan Sepharose 6B (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala Zweden) na activering met cyanogeen bromide²⁴. Na wassen met buffers werd Sepharose-gekoppeld-antiserum bewaard in 1 M ethanolamine, pH 9.0, gedurende 2 uur bij kamertemperatuur. Op deze wijze worden overgebleven reactieve plaatsen in de gel geblokkeerd. Het Sepharose gekoppelde antiserum wordt vervolgens gewassen met water en bewaard in een gelatine vrije buffer bij 4°C in het donker.

De specificiteit van het Sepharose gekoppelde antiserum is getest door [³H] oestradiol-17beta en [³H] progesteron op te lossen in water (10 ml) en vervolgens de radioactiviteit in het water (10 ml) en in het aceton-eluaat (3 ml) te meten. Het bleek dat [³H] oestradiol-17beta terugwinning (in de aceton) zeer hoog was (94,1%) terwijl [³H] progesteron niet werd gebonden aan het oestradiol-17beta antiserum.

Aan de hand van een aantal experimenten tonen zij aan dat hun methode goed werkt. Zij gebruikten deze methode voor het bepalen van de concentratie van oestradiol-17beta in plasma en melk waar zij m.b.v RIA concentraties aantoonden tot 2-3 pg/ml.

Zij merken verder het volgende op over de stabiliteit van hun Sepharose-gekoppelde antiserum: "In studies of the variation in the levels of oestradiol-17beta in plasma and milk, to be reported elsewhere, it has been confirmed that the columns of Sepharose-coupled antiserum were stable at room temperature for twelve months and after at least 50 times of repeated use."

Zij besluiten hun artikel met de volgende opmerking: "Although this new procedure has been developed for the assay of oestrogens in bovine plasma and defatted milk, it may be generally valuable in analytical and possibly preparative procedures in which a compound (e.g. hormone, vitamin, drug) is present in biological fluid in very low concentrations, provided that the appropriate antiserum is available."

In het artikel van Webb et al.²⁵ wordt een affiniteitschromatografie extractie procedure beschreven voor twee steroïden. Hierna wordt met een RIA het steroïd bepaald.

In deze affiniteitschromatografie procedure worden antilichamen als ligand gebruikt. Antilichamen tegen oestradiol en tegen testosteron werden in schapen opgewekt. Deze antilichamen werden dan gekoppeld aan een matrix van Sepharose 4B (Pharmacia), dat voordien met CNBr

geactiveerd is (Dit gebeurde volgens een methode die volgens de fabricant aangeraden wordt).

Voor extractie werd 500 μ l antilichaam-Sepharose toegevoegd aan 10 ml Q2 water en het monster met het te bepalen hormoon plus een bekende hoeveelheid radioactief gelabeld hormoon.

Dit werd gemengd door schudden, minstens 2 uur op kamertemperatuur, of overnacht op 4°C. De inhoud van elk buisje werd op een (voorgespoelde) gesinterde glaskolom uitgegoten en het water dat door de kolom was gelopen en geen hormoon meer bevatte werd weggegooid. De buisjes werden schoongespoeld met 7 ml water, dit werd ook op de kolom gegoten.

Hierna werd de antilichaam-Sepharose op de kolom gewassen met 20 ml water, dit is om het ongebonden steroïd te verwijderen. Overgebleven water werd verwijderd door een lichte overdruk aan te brengen. Het gebonden hormoon werd nu geelueerd met 3 ml methanol-water (90:10, v/v), enige positieve druk werd aangelegd om alles te verwijderen. Het eluaat werd drooggedampt (40°C), en daarna heropgelost in 1800 μ l fosfaat gebufferde zoutoplossing, die 0,1 % gelatine bevat (PBS-gel). Hierna werd er ten minste 20 minuten gemengd op 37°C. De recovery werd bepaald door de verhouding te nemen van het totaal aantal tellingen op een liquid scintillation teller, met een 500 μ l monster. De gemiddelde recovery voor testosteron was 81,4 %, en voor oestradiol-17 76,9%. Na gebruik werd overgebleven antilichaam-Sepharose heropgelost in 7 ml water, en de verschillende kolommen werden gepoold in een grotere glas gesinterde kolom. Het materiaal werd gerecycled door drie spoelingen met methanol en met water (om en om). Het materiaal bleek erg stabiel, en het werd minstens 50 maal over een twee-jarige periode gerecycled zonder verlies van bindings-activiteit. Het bleek later ook dat 50 μ l in plaats van 500 μ l antilichaam-Sepharose genoeg was voor de extractie, zodat het minder nodig is te recyclen.

Door de hoge antilichaam concentraties werden ook structuur-gelijke steroïden gebonden door zowel de testosteron als de oestradiol antilichaam-Sepharose. Dit is hier niet een probleem, omdat er na een specifieke RIA komt.

Het is natuurlijk mogelijk om verschillende antilichaam-Sepharoses te maken, met voor elk te bepalen steroïd een antilichaam, en deze te poolen. Na extractie en elutie worden de steroïden dan b.v. door HPLC van elkaar gescheiden en kunnen ze met GC/MS bepaald worden.

In het artikel van Nilsson et al.²⁶ wordt een methode beschreven om cortisol te concentreren d.m.v. affiniteitschromatografie. Door lage concentratie van b.v. cholecalciferol (vitamine D3) en 25-hydroxycholecalciferol (25-OH-D3) is verrijking van het monster nodig voordat een bepaling kan plaatsvinden. In dit artikel wordt een isolatietechniek hiervoor en voor retinol (vit. A) en cortisol beschreven. De voornoemde stoffen komen in het bloed voor gebonden aan een transporteiwit, en het hele eiwit-ligand complex wordt geadsorbeerd aan een matrix met antilichamen tegen de transporteiwitten.

Als matrix werd Sepharose 4B gebruikt, geactiveerd met CNBr (volgens de methode van de fabrikant Pharmacia). Hierna werd het antilichaam eraan gekoppeld. De gel werd in een kolom gestort en het monster werd opgebracht. Hierna werd met een buffer het gebonden complex weer geelueerd. Het complex werd dan met HPLC geanalyseerd.

In het geval van retinol is een antilichaam kolom meer dan 50 maal gebruikt, zonder dat er antilichaam-activiteit verloren ging. Ook in de gevallen van cortisol en vit. D3 konden de kolommen minstens dagelijks gedurende een periode van twee maanden gebruikt worden. De methode hier beschreven is waarschijnlijk ook toepasbaar voor andere componenten die in het bloed vervoerd worden door duidelijk beschreven carriereiwitten, zoals b.v. estradiol en testosteron (SHBG).

7. Resultaten van de literatuurstudie ten aanzien van de somatotropine en prolactine .

In dit hoofdstuk worden de resultaten van de literatuurstudie besproken. Deze resultaten zijn aangevuld met mogelijke oplossingen en suggesties.

7.1. Somatotropine en prolactine opzuivering op basis van commercieel verkrijgbare produkten.

Wagner et al.²⁷ beschrijven de isolering van een peptide groei-hormoon uit de Chum zalm (*Oncorhynchus keta*) hypofyse door middel van gel affiniteits- en ion exchange chromatografie. Het Groei Hormoon van de Chum zalm (CGH) heeft een molgewicht van 23.500 en een aminozuuropbouw die overeenkomt met die van gewervelde dieren. Zij verkregen het groeihormoon als volgt uit de hypofyse:

Routinematig werd 35 g bevroren hypofyse gehomogeniseerd in 70 ml ijskoud 0,003 M Tris-acetaat buffer bestaande uit 0,001 M fenyl-methylsulfonylfluoride (Sigma) of 1000 kallikrein inhibitor units/ml Trasylol (Boehringer-Mannheim) als protease inhibitor. De gehomogeniseerde oplossing werd op een pH van 8,5 gebracht m.b.v. 1 N NaOH en geroerd gedurende 3 uur bij 4°C. De gehomogeniseerde oplossing werd gecentrifugeerd bij 50.000 g gedurende 30 min, waarna het supernatant werd afgegoten en bewaard en waarna deze werd bestraald. De verschillende supernatanten werden bijeengevoegd en gefractioneerd m.b.v. een gecalibreerde 10*92 cm Sephadex G-75 kolom en behandeld met gehomogeniseerde buffer. De fractie met een molgewicht van 18.500-31.000 werd opgevangen (1500 ml) en door een kolom geleid bestaande uit concanavalin A-Sepharose (Con A) om de glycoproteïnen, die voornamelijk uit gonadotropische en thyrotropische hormonen bestaan, te verwijderen.

Hierna wordt het monster weer op de pH en de ionische condities gebracht die voor de toepassing van de Con-A kolom aanwezig waren m.b.v. 0,001 M $MnCl_2$, 0,001 M $MgCl_2$, 0,5 M NaCl, 0,04 M Tris HCl,

pH 7,7. Het Con-A effluent, welke ongebonden materiaal bevat, wordt met ammoniasulfaat tot 80% verzadigd, geroerd bij 4°C gedurende een nacht, en gecentrifugeerd bij 50.000 g gedurende 1 uur. De supernatant werd afgegoten en de pellet werd gedialyseerd gedurende 4 uur in 0,003 M Tris-acetaat met een pH van 8,1.

Het dialysaat werd gecentrifugeerd (50.000 g, 1/2 uur) en het supernatant werd over een gecalibreerde 5,0*92 cm Sephadex G-75 kolom geleid, deze was geequibreerd met 0,003 M Tris-acetaat met een pH van 8,1.

De fractie met een molgewicht van 18.500 tot 31.000 werd direct over een 1,6*50 cm DEAE-Bio-Gel (Bio-Rad) kolom geleid die was geequibreerd met dezelfde buffer. De kolom werd vervolgens gespoeld met enkele kolomvolumes buffer voordat een lineaire gradient met een volume van 600 ml werd toegepast (0,003 tot 0,09 M Tris-acetaat, pH 8,1).

Het CHG elueerde als 2 pieken, zie figuur 9.

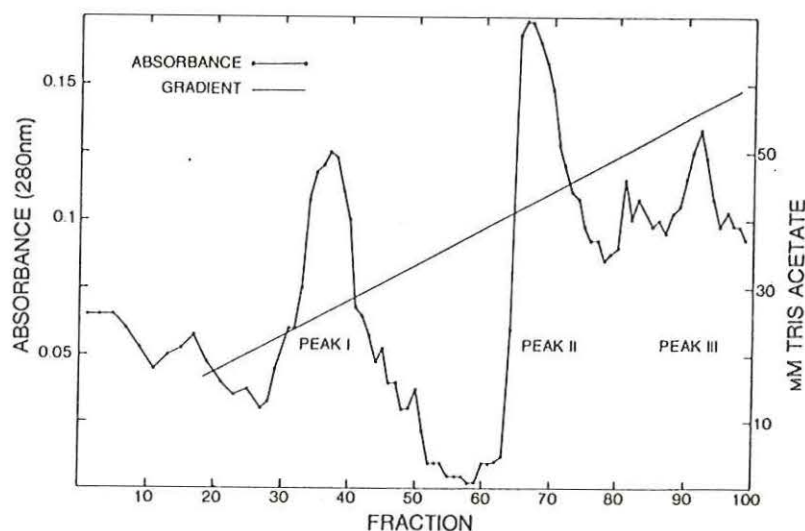


Fig. 9. Elutie-profiel van gewichtsfraction met een molgewicht van 18.500 tot 31.00 van de Chum zalm hypofyse na DEAE-Bio-Gel. Het groeihormoon elueerde tussen 0,025 en 0,045 M Tris-acetaat als twee pieken, I en II. (Pieken III is niet gekarakteriseerd).

De uiteindelijke opbrengst van de groeihormoon uit de Chum zalm hypofyse lag tussen de 1 en 5mg/35 mg. De opbrengst was zeer variabel hetgeen te wijten was aan de zeer slechte staat waarin de hypofysen werden aangeleverd. Maar ondanks deze variabele opbrengsten werd er voldoende groeihormoon verkregen voor een bio-assay en karakterisering (hier niet opgenomen).

De beide pieken I en II zijn afkomstig van een en dezelfde stof, beide zijn immunologisch gelijk en beide zijn in staat groei bij forellen te bevorderen bij een dosis van 1 ug/g lichaamsgewicht. Pieken II wordt waarschijnlijk veroorzaakt door beschadigd groeihormoon veroorzaakt door slechte conditie van de hypofysen.

Sheth et al.²⁸ concentreren en zuiveren prolactine uit menselijk vruchtwater. Zij gebruiken hiervoor een 20-voudig concentraat van vruchtwater welke zij concentreren d.m.v. gel-filtratie op een Sephadex G-100 en Sephadex G-50 kolom d.m.v. affiniteitschromatografie op een Con-A Sepharose kolom gevolgd door Chromatofocussing met een pH gradient van 7-4.

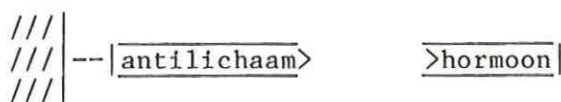
De eerste concentratieverhoging van prolactine vindt plaats op de Sephadex G-50 en G-100 kolom. De verkregen fracties worden gepoold, gedialyseerd tegen 0,1 M acetaat buffer (pH=6,1) en geconcentreerd waarna een tweede concentratieverhoging plaats vindt op de Con-A kolom. Deze kolom was geequibreerd met 0,1 M acetaat buffer die 1 M NaCl, 0,1 mM CaCl₂, 0,1 mM MnCl₂ en MgCl₂ bevat (pH=6,1). Het eiwit werd geeludeerd met dezelfde buffer met een snelheid van 60 ml/hr.

Materiaal dat achterbleef in de Con-A kolom werd gedesorbeerd met 2% alfa-methylmannoside.

Het prolactine-rijke materiaal werd verder gezuiverd m.b.v. chromatofocussing bij 4°C_{TM} (de chromatofocussing kit bevatte polybuffer exchanger-94 PBE_{TM} en polybuffer-74 (PB-74), Pharmacia). Met behulp van deze methode zijn de auteurs in staat prolactine 1050 maal te zuiveren. Deze is bepaald aan de hand van de toename van de specifieke activiteit die toenam van 0,039 units/mg naar 31,5 units/mg. Zij zuiverden prolactine op van 0,8 ± 0,5 ng/ug naar 900 ng/ug. Het oorspronkelijke monster bevatte 1000 mg proteïnen waarvan uiteindelijk 0,63mg proteïnen overbleef welke voor 90% uit prolactine bestond.

Ons inziens maken beide methoden een goede kans geschikt te zijn voor de opzuivering van BST.

7.2. Antilichamen als ligand.



In een artikel beschrijft Weintraub²¹ een methode voor de zuivering van Human Chorionic Somato-mamotropine (HCS) uit plasma en tumorextracten door middel van Sepharose gekoppeld antilichaam (tegen HCS). Op deze wijze is hij in staat gelabelde en ongelabelde hormonen d.m.v. affiniteitschromatografie te scheiden waarna hij ze aantoonde m.b.v. RIA.

Met deze methode is hij in staat uit grote volumina biologische en weefsel vloeistof HCS te concentreren met een recovery van 75 tot 80%, hetgeen resulteerde in een tot 500 voudige verlaging van de detectiegrens van HCS m.b.v. RIA. Op deze wijze was de auteur in staat HCS aan te tonen in plasma en tumorextracten bij een aantal patiënten met een gezwell in de luchtpijp hetgeen voorheen onmogelijk was.

Weintraub voerde zijn experimenten als volgt uit:

Ongelabeld HCS en met ^{131}I gelabeld HCS²⁹ werd gebruikt met een specifieke activiteit van 150-350 uCi/ug, deze laatste is gedeeltelijk gezuiverd met gelfiltratie op een Sephadex G-75 kolom. Antilichamen tegen HCS werden opgewekt in cavia's en geselecteerd om zowel de hoge affiniteit als hoge bindingscapaciteit. Het antiserum had een gemiddelde evenwichtsconstante van $1 \cdot 10^{11}$ L/M en een bindingscapaciteit van $3 \cdot 10^{-5}$ HCS per ml in oplossing.

Antilichamen en andere proteïnen (2-20 mg) werden gekoppeld aan 10 ml nat Sepharose 4B (Pharmacia) bij een pH van 8,0 gevolgd door activering m.b.v. cyanogeenbromide³⁰ (Eastman). Na de koppelingsreactie werd de Sepharose gewassen met tenminste 20 liter 0,5 Natriumbicarbonaat en 500 ml 6 M guanidine-HCl totdat geen antilichaam activiteit meer werd gedetecteerd in de wasvloeistof. De koppelingsefficiëntie bleek in alle gevallen groter dan 95%.

Elke 10 ml gesubstitueerd Sepharose werd in een kleine kolom (11,6*5 cm) gebracht. De kolom werkte met een flowrate van 30-60 ml/uur bij kamertemperatuur. Oplossingen werden over de kolom geleid, waarna deze werden gewassen met een 0,15 M NaCl - 0,01 M Natriumfosfaat oplossing met een pH van 7,4 totdat geen absorptie bij 280 nm werd gemeten. Stoffen die geabsorbeerd waren aan de kolom werden geeludeerd met 6 M guanidine HCl met een pH van 3,1 waarna het eluaat grondig werd gedialyseerd tegen 0,1 M Natriumacetaat met een pH van 7,4 bij 4°C voordat Radio Immuno Assay werd toegepast voor de detectie van het hormoon.

Wanneer een oplossing met HCS ^{131}I over een kolom met anti-HCS werd geleid bleek 8% van de radioactiviteit niet vertraagd te worden door de kolom terwijl de rest geabsorbeerd werd in de kolom en vervolgens geelueerd werd met 6 M guanidine HCl met een pH van 3,1. Ongelabeld HCS gedroeg zich overeenkomstig het radio-actieve HCS in de Sepharose kolom.

Een totale kolom blijkt een capaciteit te hebben van 300-400 ug HCS, hetgeen overeenkomt met 50-67% van de theoretische capaciteit van het gekoppelde antiserum.

Door het toepassen van deze voorzuiveringsstap voordat RIA wordt toegepast is de auteur er in geslaagd de detectiegrens van HCS te verleggen naar $1 \cdot 10^{-13}$ M in 100 ml plasma of weefsel extract. Dit betekent op z'n minst een honderdvoudige toename van de gevoeligheid t.o.v. de meeste conventionele RIA-bepalingen.

Kolommen met Sepharose anti-HCS zijn opnieuw te gebruiken voor langere perioden zelfs na herhaalde blootstelling aan 6 M guanidine HCl. De kolommen lieten een non-specifieke adsorptie van minder dan 1% zien voor het human-stimulating-follikel hormoon (FSH), het chorionische gonadotropine (HCG), hemoglobine, albumine en andere plasma proteïnen.

Volgens de auteur is de hierboven beschreven methode algemeen toepasbaar voor andere eiwitten. En deze methode is succesvol toegepast voor FSH, LH en HCG²¹.

Jonsdottir et al.³¹ beschrijven de zuivering van menselijk groeihormoon (HGH) uit onopgewerkt hypofyse-extract en lysaat van recombinant E. coli d.m.v. monoclonale antilichamen die gekoppeld zijn aan een vaste fase.

De auteurs maakten gebruik van geïmmobiliseerd monoclonaal antilichaam uit een muis (Mab3) voor de zuivering van HGH. Mab3 blijkt efficiënt te discrimineren tussen natuurlijk actief HGH en zijn gereduceerde S-carboxygemethyleerde vorm, welke een opmerkelijke verminderde receptor bindingsactiviteit bezit.

Mab3 is bereid volgens de methode van Jonsdottir et al.³², Mab3 werd gezuiverd uit ascitic fluid door middel van ion-exchange chromatografie met een DEAE Affi-Gel Blue (Bio-Rad) kolom. Gezuiverd Mab3 werd aan een door CNBr-geactiveerde Sepharose 4B (Pharmacia) kolom gekoppeld volgens de richtlijnen van de fabrikant. 7 mg Mab3 werd gekoppeld per ml gel, de koppelingsefficiëntie bleek 96%.

De bindingscapaciteit werd bepaald door 1,4 mg gezuiverd HGH (Crescormon) te mengen met geïodeerd HGH (15.500 cpm) in een kolom met Mab3 Sepharose. Na het wassen werd gebonden HGH geeludeerd met 4 M KSCN. De radioactiviteit werd "flowthrough" gemeten terwijl de radioactiviteit van de geeludeerde fracties werd gemeten in een gamma scintillation counter (Packard Instrument Company). De bindingscapaciteit werd berekend uit de verhouding van de radioactiviteit die gebonden was aan de gel. De bindingscapaciteit bleek 0,45 mg HGH per ml gel welke is gemeten d.m.v. adsorptie en elutie van gezuiverd hypofyse HGH met sporen geïodeerd HGH.

De analyse en opzuivering voerden zij uit op een HPLC (Beckmann) uitgerust met mono Q kolom (Pharmacia) in 20mM Tris-HCl bij een pH van 8,0, waarbij een elutie gradient van 0-0,6 M NaCl werd gebruikt.

Door de intrinsieke eigenschappen van monoclonale antilichamen zijn ze geschikt voor immunoabsorbente opzuivering waarbij verschillende Mab's op efficiënte wijze zijn toe te passen voor de opzuivering van verschillende bioactieve stoffen.

De auteurs laten in hun artikel zien dat zuiver HGH kan worden verkregen uit hypofysen die HGH bevatten en E. coli recombinant lysaat, d.m.v. eenstaps affiniteitschromatografie gebaseerd op geïmmobiliseerd monoclonaal antilichaam.

In het artikel van R. Bartholomew et al.³³ wordt een methode beschreven om met monoclonale antilichamen stoffen te adsorberen en die vervolgens weer te elueren.

Een nadeel van adsorptiechromatografie was vaak dat de affiniteit tussen antilichaam en antigeen zo groot was, dat er drastische condities (lage pH, hoge concentraties chaotropen) nodig waren om het antigeen weer te elueren.

Het bleek nu dat een enkele aminozuur substitutie in het monoclonale antilichaam een grote verlaging van de affiniteit voor het antigeen betekende. Zo kan een relatief kleine verandering in de pH, waardoor waarschijnlijk aminozuren zoals histidine en lysine veranderen, een groot effect in de antilichaam-antigeen interactie teweeg brengen. Zulke wisselingen zullen niet opgemerkt worden in een populatie van polyclonale antilichamen, door hun heterogeniteit, maar wel bij de homogene monoclonale antilichamen.

Als voorbeeld worden monoclonale antilichamen tegen menselijk groeihormoon (HGH) gebonden aan polystyreen balletjes. Radio-actief gelabeld HGH werd geïncubeerd, hierna werd ongebonden hormoon weggewassen.

Vervolgens werd het hormoon gedesorbeerd bij variërende pH-omstandigheden. Het bleek dat, vergeleken met een controle antilichaam, het gebruikte monoclonale antilichaam bij slechts weinig lagere pH een groot verschil in affiniteit vertoonde, terwijl het controle antilichaam nog een grote affiniteit vertoonde. Zo is er ook een antilichaam gevonden dat "wisselt" bij licht basische condities. Deze methode lijkt zeer goed, en een efficiënte zuivering kan ermee uitgevoerd worden.

In het artikel van Hwang et al.³⁴ beschrijven zij een methode om prolactine via affiniteits chromatografie te zuiveren uit menselijk vruchtwater.

Aan een Sepharose 4B kolom werd met behulp van CNBr (Pharmacia) prolactine gekoppeld. Vervolgens werd er over de kolom serum opgewekt in konijnen tegen prolactine geleid, de antilichamen in het serum koppelden aan het prolactine.

Hierna werden de antilichamen weer geelueerd met 4 M. NaSCN in fosfaat-zout buffer (pH 7.4). De zo verkregen antilichamen werden gekoppeld aan tien ml Sepharose 4B.

Menselijk vruchtwater wordt over een kolom met het antilichaam-Sepharose geleid. Hierna word de kolom gewassen om ongebonden hormoon te verwijderen. Het wassen gebeurt met 0,1 M. Tris (pH 7,4). Hierna word het hormoon geelueerd met 4 M. natriumthiocyanaat. Er werden fracties opgevangen, en de eiwit concentratie werd bepaald door de absorptie bij 278 nm af te lezen, bijpassende fracties werden gepooled en onmiddellijk over een kolom van sephadex G-100 geleid. Hierna werden weer passende fracties gepooled.

Het bleek dat ongeveer 50 % van het prolactine in het vruchtwater adsorbeerde op de Sepharose kolom. Na gelfiltratie op de Sephadex kolom bleek dat de totale recovery ongeveer 20 % was. Het gezuiverde vruchtwater prolactine leek identiek met hypofyse prolactine.

In een patent van Pharmacia³⁵ wordt een methode beschreven om snel en makkelijk liganden in een oplossing te bepalen via een affiniteitsreactie. Hiertoe wordt een poreuze drager op een plaatje vastgelijmd. Aan dit poreuze dragermateriaal is een receptor voor het te bepalen ligand gekoppeld. Vloeistof wordt op het poreuze materiaal gedruppeld dat er ook weer uitgeperst kan worden. Als een voorbeeld word de bepaling van HGH beschreven.

Hiertoe worden kleine schijfjes wettex (D = 6,2 mm) geactiveerd met een 1 % CNBr-oplossing, hierna wordt er per schijfje 5 μ g schape-anti HGH- antilichaam aan gekoppeld. De schijfjes werden bewaard in een buffer (pH 7,4) op 4°C, voor gebruik werd de buffer verwijderd. De schijfjes werden 15 min. geincubeerd (23 °C) met 100 μ l HGH oplossing. Hierna werden de schijfjes gewassen door vijf keer 250 μ l zoutoplossing toe te voegen. Nu werd 100 μ l ¹²⁵I-anti HGH -oplossing toegevoegd (2 uur, 23 °C). Na wassen van de schijfjes werd de radioactiviteit gemeten met een gammateller. Het bleek dat met deze methode goede resultaten verkregen werden, en de incubatietijd was veel korter dan met de oude methode die papieren schijfjes gebruikte.

8. Conclusies.

8.1. Steroiden.

Alhoewel in de literatuur geen manier is beschreven voor de opzuivering van nortestosteron of andere lichaamsvreemde steroiden uit runderbloed, plasma, e.d. lijkt ons de conclusie gerechtvaardigd dat opzuivering van deze steroiden wel degelijk mogelijk moet zijn. De in dit rapport beschreven methoden voor de opzuivering van lichaamseigen steroiden zijn zeer waarschijnlijk ook toepasbaar voor lichaamsvreemde steroiden daar deze niet essentieel van elkaar verschillen.

De methode, waarbij gebruik wordt gemaakt van tomatine, chemisch gebonden aan een silicamatrix (paragraaf 6.1) lijkt zeer veelbelovend voor verder onderzoek. Deze methode biedt uitzicht op het beschikbaar komen van een zeer nuttige multiresidu analyse van steroïde anabolica. Bovendien is er reeds kennis aanwezig ten aanzien van de chemie van tomatine bij de Stichting voor Plantenveredeling te Wageningen, waarvan in verder onderzoek nuttig gebruik gemaakt kan worden.

Daarnaast kunnen biologische stoffen als ligand worden toegepast, zoals carriereiwitten en antilichamen, waarvan ons inziens de laatste de voorkeur verdient. Verscheidene auteurs zijn er in geslaagd op deze wijze een goede methode te ontwikkelen, waarbij meervoudig gebruik geen probleem bleek.

Glencross et al. beschrijven een methode voor de opzuivering van oestradiol-17-beta uit grote monsters runderplasma en melk. Deze methode is gebaseerd op covalent gebonden oestradiol-17-beta antiserum aan Sepharose 6B. Na opzuivering waren zij in staat concentraties aan te tonen tot 2 tot 3 pg/ml m.b.v. RIA. De antilichaam Sepharose kolommen bleken stabiel bij kamertemperatuur gedurende 12 maanden en konden tenminste 50 maal gebruikt worden.

Webb et al. beschrijven een methode voor de opzuivering van testosteron en oestradiol. De antilichamen tegen deze steroiden werden gekoppeld aan een matrix van Sepharose 4B. De gemiddelde recovery voor testosteron was 81,4 %, en voor oestradiol-17 76,9%. Het antilichaam Sepharose bleek erg stabiel, en werd minstens 50 maal over een twee-jarige periode gerecyceld zonder verlies van bindings-activiteit.

Nilson et al. beschrijven eenzelfde methode voor het concentreren van cortisol met behulp van antilichaam gekoppeld aan Sepharose 4B. Ook hier bleken de kolommen over een langere periode stabiel.

8.2. Somatotropine en prolactine.

In de literatuur zijn in principe twee methoden beschreven; een op basis van commercieel verkrijgbare produkten en een op basis van antilichamen.

Voordeel van de eerste methode is dat alle benodigdheden direct verkrijgbaar zijn, nadeel is de vaak de bewerkelijkheid.

Sheth et al. zijn in staat op deze wijze prolactine op te zuiveren van $0,8 \pm 0,5$ ng/ μ g naar 900 ng/ μ g. Het oorspronkelijke monster

bevatte 1000 mg proteïnen waarvan uiteindelijk 0,63 mg proteïnen overbleef welke voor 90% uit prolactine bestond.

Weintraub zuivert Human Chorionic Somato-mammotropine (HCS) uit plasma en tumorextracten door middel van Sepharose 4B gekoppeld antilichaam (tegen HCS). Met deze methode is hij in staat uit grote volumina biologische en weefsel vloeistof HCS te concentreren met een recovery van 75 tot 80%, hetgeen resulteerde in een tot 500 voudige verlaging van de detectiegrens van HCS m.b.v RIA. Kolommen met Sepharose 4B anti-HCS zijn opnieuw te gebruiken voor langere perioden zelfs na herhaalde blootstelling aan 6 M guanidine HCl.

Jonsdittir et al. zuiveren menselijk groeihormoon (HGH) op door middel van monoclonaal antilichaam gekoppeld aan Sepharose 4B. De auteurs stellen dat door de intrinsieke eigenschappen van monoclonale antilichamen ze geschikt zijn voor immunoabsorbente opzuivering waarbij verschillende monoclonale antilichamen op efficiënte wijze zijn toe te passen voor de opzuivering van verschillende bio-actieve stoffen.

Hwang et al. beschrijven een methode om prolactine te zuiveren uit menselijk vruchtwater door middel van een Sepharose 4B kolom waaraan prolactine antilichaam is gekoppeld. Zij bereikten een totale recovery van ca. 20%.

Deze methoden zijn zeer waarschijnlijk ook geschikt voor de opzuivering van BST mits het overkomstige antilichaam beschikbaar is.

Ons inziens komt ook hier de antilichaam methode goed naar voren.

9. LITERATUUR.

1. Studienamiddag hormonen, ministerie van volksgezondheid, rijksadministratief centrum Brussel, 11 dec. 1985.
2. Notitie hormonen, ministerie van landbouw en visserij, 27 feb. 1987.
3. R.W. Stephany, E.H.J.M. Jansen en J. Freudenthal, Een kwart eeuw onderzoek naar misbruik van anabolica bij slachtdieren: geen DES-illusie, tijdschr. diergeneeskd., 1985, Vol. 110, p. 17.
4. P.L.M. Berende en E.J. Ruitenbergh, Modifying growth: an example of possibilities and limitations, Domestication, conservation and use of animal resources, Elsevier Science publishers B.V. Amsterdam, 1983.
5. Interne analyse voorschriften nr. A 447, A 448, A 437 2^e oplage en A 272 3^e oplage, Rikilt Wageningen.
6. C.R. Lowe en P.D.G. Dean, Affinity chromatography, John Wiley and Sons, London, 1974.
7. P.D.G. Dean, W.S. Johnson en F.A. Middle (eds.), Affinity chromatography, a practical approach, IRL Press, Oxford, 1985.
8. Practical guide for use in affinity chromatography and related techniques, Ultrogel^R, Magnogel^R en Trisacryl^R IBF, Villeneuve-La-Garenne, 1983.
9. Csiky en L.Hanson, J. of Liquid Chromatography, 9(4), 875-886(1986).
10. J.J. Kabara, J.T. McLaughlin, C.A. Rigel, Anal. Chem. 33, 305 (1961).
11. G. Schultz, H. Samder, Z. Physical Chem. 308, 122(1957).
12. V. Sica, I. Parikh, E. Nola, G.A. Puca en P. Cuatrecasas, Affinity chromatography and the purification of estrogen receptors, J. Biol. Chem., 1973, Vol. 248(18), p. 6543-6558.
13. S. Ray, M. Salman, A.A. Ruiz, Ph.L. Stotter en G.C. Chamness, Androgen receptor affinity chromatography: synthesis and properties of 17 - epoxypropyldihydrotestosterone sepharose, J. Steroid Biochem., 1986, Vol. 24(6), p. 1111-1115.
14. S. Kobayashi, N. Tobioka, T. Samoto, M. Kobayashi, H. Iwase en A. Masaoka, Marginal utility of affinity chromatography using immobilized estradiol in the purification of human uterine estrogen receptor, Nippon Naibunpi Gakkai Zasshi, 1984, Vol. 60(2), p. 110-119.
15. F.P. Ross, W.R. Weckslar, W.H. Okamura en A.W. Norman, Synthesis of vitamin D analogues and their covalent binding to affinity chromatographic media, Proceedings of the workshop on vitamin D, 1979, 4 th., p. 89-95.
16. A.N. Smirnov, T.A. Shchelkunova, V.V. Egorova, I.G. Reshetova en E.I. Chernoburova, Purification of a special rat liver estrogen-binding protein by affinity chromatography on estradiol sepharose, Byull. Eksp. Biol. Med., 1984, Vol. 98(9), p. 377-380.
17. P. Fernlund en C.B. Laurell, A simple two-step procedure for the simultaneous isolation of cortico steroid-binding globulin and sex hormone-binding globulin from human serum by chromatography on cortisol sepharose and phenyl sepharose, J. Steroid Biochem., 1981, Vol. 14(6), p. 545-552.

18. O.A. Strelchenok, L.I. Survilo, O.V. Sviridov en A.A. Akhrem, Coadsorption of transcortin and sex-steroid binding protein on cortisol-sepharose, *Vestsi Akad. Navuk BSSR, Ser. Khim. Navuk*, 1983, Vol. (1), p. 70-76.
19. H.U. Fisch, V.Pliska, G.I. Tesser, R. Schwijzer en M. Zachmann, Simple assay of plasma testosterone using a covalent protein-sepharose complex, *Febs Letters*, 1973, Vol. 29(2), p. 127-131.
20. R.G. Glencross, S.A. Abeywardene, S.J. Corney en H.S. Morris, The use of 17 α -estradiol antiserum covalently coupled to sepharose to extract from biological fluids, *J. Chromatogr.*, 1981, Vol. 223(1), p. 193-197.
21. B.P. Weintraub, Concentration and purification of human chorionic somato-mammotropin (HCS) by affinity chromatography: application to radioimmunoassay, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1970, Vol. 39(1), p. 83-89.
22. R.G. Glencross, S.A. Abeywardene, S.J. Corney en H.S. Morris, *J. of Chromatography*, 223(1981) 193-197.
23. P.D.G. Dean, D. Exley en M.W. Johnson, *Steroids* 18(1971), 593.
24. A.E. Bolton, K.K. Dighe en W.M. Hunter, in E.H.D. Cameron, S.G. Hillier en K. Griffiths (Ed.), *Steroid Immunoassay; Proc. 5th Tenovus Workshop*, Cardiff 1974, Alpha Omega Publ. Cardiff, 1975, p. 257.
25. R.Webb, G.Baxter, D. McBride, G.D. Nordblom en M.P.K. Shaw, The measurement of testosterone and oestradiol-17 using iodinated tracers and incorporating an affinity chromatography extraction procedure, *J. Steroid Biochem.*, 1985, Vol. 23(6), p. 1043-1051.
26. B. Nilsson, L. Tejler en J-F. Dymling, Purification and quantitation of plasma protein bound vitamins and steroids by combined affinity and high-performance liquid chromatography techniques, *Chromatographic Science*, 1979, Vol. 12, p. 349-358.
27. G.F. Wagner, R.C. Fargher, J.C. Brown en B.A. McKeown, *Gen. Comp. Endocrinol.* 60, 27-34 (1985).
28. J.J. Sheth, S.B. Moodbidri, A.R. Sheth, S.S. Rao en M.H. Panthaki, *Indian Journal of Biochemistry en Biophysics*, 21 (1984) 89-92..
29. W.M. Hunter en F.C. Greenwood, *Nature*, 203, 1141 (1964).
30. P. Cuatrecasas, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 35, 531 (1969).
31. I. Jonsditter, B. Skoog, H.P.T. Ekre, B. Pavlu en P. Perlmann, *Mol. Cell. Endocrinol.* 46 (1968) 131-135.
32. I. Jonsditter, H.P.T. Ekre, B. Pavlu en P. Perlmann, *Mol. Immunol.* 20(1983), 871-876.
33. R. Bartholomew, D. Beidler en G. David, Immunoaffinity chromatography with monoclonal antibodies, *Protides of the biological fluids; proceedings of the colloquium*, 1982, Vol. 30, p. 667-670.
34. P. Hwang, J.B. Murray, J.W. Jacobs, H.D. Niall en H. Friesen, Human amniotic fluid prolactin. Purification by affinity chromatography and amino-terminal sequence, *Biochemistry*, 1974, Vol. 13, p. 2354-2358.
35. R.E. Axen et al., Method porous matrix and device for analytical biospecific affinity reactions, Patent, PCT Int. Appl. Wo 84/3150 A1, 16 aug. 1984.