

Paper, Thin Layer 및 Column Chromatography에 의한 요중의 Estriol, Estrone, Estradiol-17 β 의 분리 정량에 관하여

양 용 관 한 수 남

조 종 후

서울대학교 농과대학 수의학과

농촌진흥청 가축위생연구소

서 론

Estrogen은 주로 estriol, estrone, estradiol-17 β 로 구성되어 있으며 성숙난포와 황체에 의해서 생산되는 성 hormone으로 성기의 발달과 제2차 성장을 유도하며 유선의 성장과 기타 phospholipid, RNA 단백질의 합성에 관여하는 steroid로써 특히 발정주기와 임신의 유지를 위한 생물학적 효과를 나타낸다. 그러므로 생체내에서 estrogen의 생합성이 불균형일 때 불임증을 초래하는 원인이 된다. estrogen은 발정주기에 따라 혈중농도가 일정하게 유지되며 혈중농도에 따라 요중의 배설량에도 일정한 변화를 가져오므로 혈중 estrogen의 농도나 요중 estrogen의 배설량 측정은 생체내 estrogen의 대사를 연구하기 위해서 또는 불임의 진단을 위해서 극히 기초적인 문제이다. 이에 저자들은 앞으로 불임우에 대하여 연구하기 위한 기초로 Kritchevsky⁵, Axelord,¹ Mitchell 및 Davis⁷, Oakey⁹가 시도한 paper chromatography에 의한 분리 및 정량방법과 Brown³, Marrow⁶, Preedy 및 Aitken¹¹, Domeki¹⁴ 등이 시도한 column chromatography에 의한 분리 및 정량방법을 비교 실험하고 각 estrogen의 자외선 spectrum 및 형광에 대한 감도를 비교 실험하여 estrogen의 정량시험에 적용할 수 있는데 그 목적이 있다.

재료 및 방법

공시뇨 : 3세 이상의 임신한 젖소 5두에서 새벽에 1 liter를 채뇨하여 얼음에 넣어 즉시 실험실에 운반하여 분석하였으며, 나머지는 -20°C 냉동기에 보존하여 보존기간은 일주일을 초과하지 아니하였다.

복합 estrogen의 가수분해 : Preedy 및 Aitken¹¹의 방법을 적용하였다. 즉 공시뇨 340 ml에 농 HCl 60 ml를 가하고 환류냉각기를 부착하여 정확히 45분간

끓인 후 즉시 흐르는 물에 냉각시켜 보존하였다.

추출 : Ethyl ether 200 ml로 2회 추출한 다음 다시 100 ml로 1회 추출한 것을 합쳐 이하 Mitchell 및 Davis⁷의 방법에 의하여 추출해서 estriol fraction과 estrone 및 estradiol-17 β fraction의 둘로 나누었다(그림 1).

Thin Layer의 제작 : Merk 회사제품인 chromatography 용 silica gel G와 혼합한 다음 초자판상에 0.2 ml의 두께로 thin layer를 만든 후 105°C에서 1시간동안 활성화시켜 사용하였다.

Chromatography paper : Whatman chromatography paper 3 MM을 4×30 cm로 자른 후 metanol로 1일밤 침출시킨 후 풍건시켜 사용하였다.

Column의 제작 : 일본 기시다회사제 celite 545에 2배량의 농 HCl을 가하여 1일밤 방치시킨 후 증류수로 수세하여 염소이온이 검출되지 않도록 한후 105°C에서 건조시켰다(그림 2).

Estrogen의 thin layer chromatography 및 paper chromatography : Mitchell⁷법을 적용하여 estriol fraction의 전개를 위하여 stationary phase로써 methanol과 증류수를 1:1의 비율로 혼합하여 사용하였고, mobile phase로서는 benzen을 사용하였다. estrone 및 estradiol-17 β fraction의 전개를 위하여 stationary phase로써 methanol을 사용하였고, mobile phase로서는 petroleum ether를 사용하였다.

Spot의 확인 및 검출 : spot를 확인하기 위하여 10% phosphomolybdic acid 용액을 분무시켜 105°C의 건열기에서 5분간 가열시킨 후 청색으로 발색시키고 용출하고자 하는 여지는 발색된 spot와 일치하는 부분을 절취하여 10 ml의 ethyl ether로 3회 추출한 후 여과하여 사용하였다.

Column chromatography : 추출에 의하여 얻어진 estriol fraction과 estrone 및 estradiol-17 β fraction을 감압 건조시킨 후 ethanol 0.5 ml에 각각 용해시켜 이중 0.1 ml를 column 넣었다. estrone fraction을 위

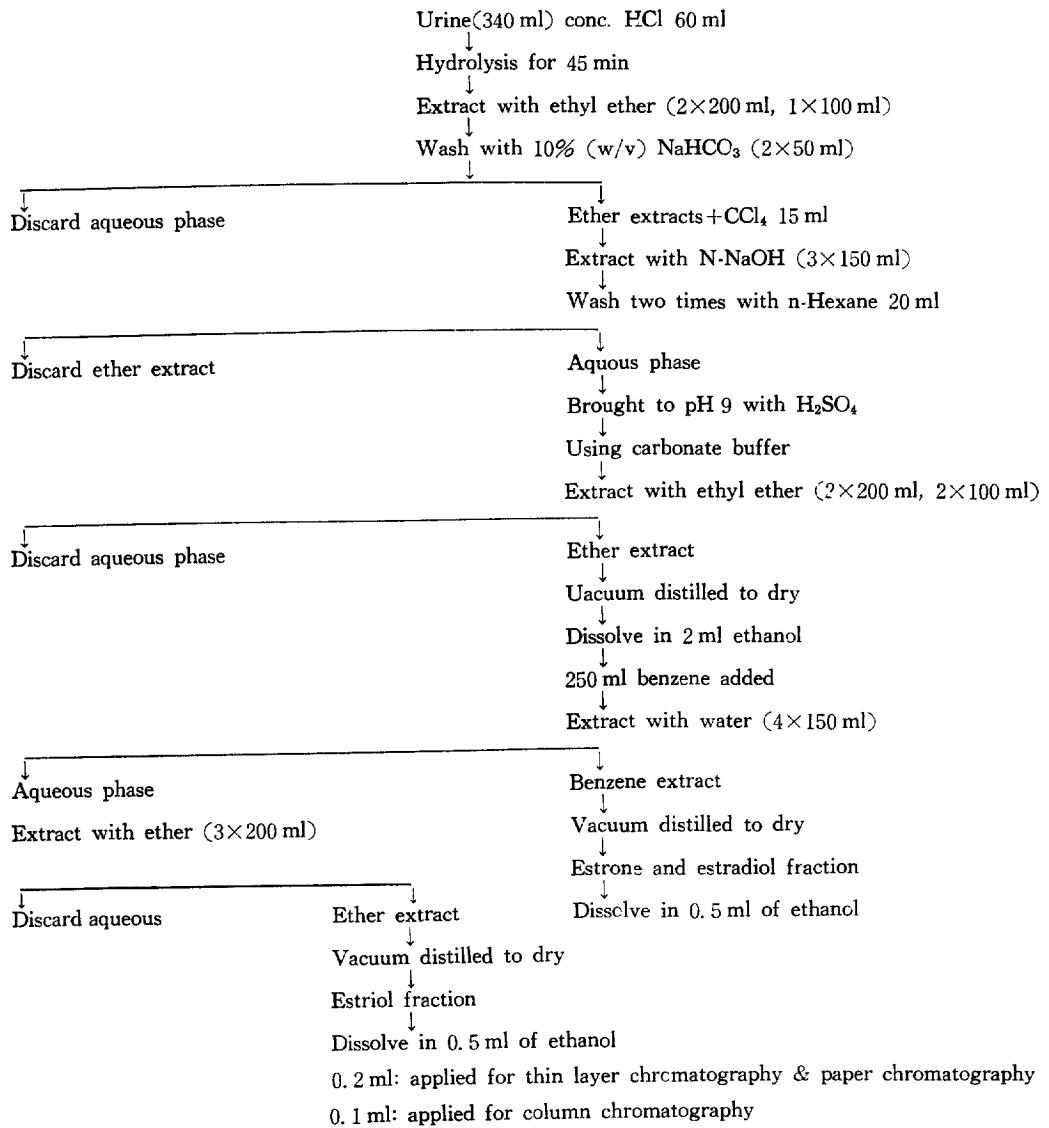


Fig. 1. Extraction of estrogen from urine of dairy cows, and their separation into estriol, estrone and estradiol-17 β fraction.

해서는 1차 mobile phase로 estradiol-17 β fraction은 2차 mobile phase로 estriol fraction은 3차 mobile phase를 사용 용출시켰다. 용출속도는 5초당 0.3 ml이며 한 시험관에 3 ml씩 용출시켰다.

Spectrophotometry에 의한 각 estrogen의 정량 :

가) 각 표준 estrogen의 자외선 흡수곡선은 estrogen 50 μg 을 ethanol 매 ml에 용해시켜 ethanol blank로 하여 multipurpose recording spectrophotometer(MPS-sor Shimatzu) 210 m μ 에서 370 m μ 까지의 OD를 측정하였다. 나) 요즘 estriol의 정량은 여지 및 column

에서 용출된 각 용출액을 감압 전조시킨 후 3 ml의 ethanol에 용해시켜 ethanol blank로 하여 OD를 측정하였다.

Estrogen의 fluorometry : 가) 표준곡선은 ethanol에 용해시킨 각 표준 estrogen을 0.01 μg 에서 0.4 μg 까지 스크류캡 시험관에 취하고 감압전조시킨 후 농도별로 benzen-ethanol (9:1)의 비율로 혼합시킨 액의 0.1 ml에 용해시켜 90% H₂SO₄ 0.2 ml를 가하고 65% H₂SO₄를 다시 가하여 1.4 ml를 충분히 혼합시킨 다음 2시간 방치후 electronic photofluorometer (Coleman)로

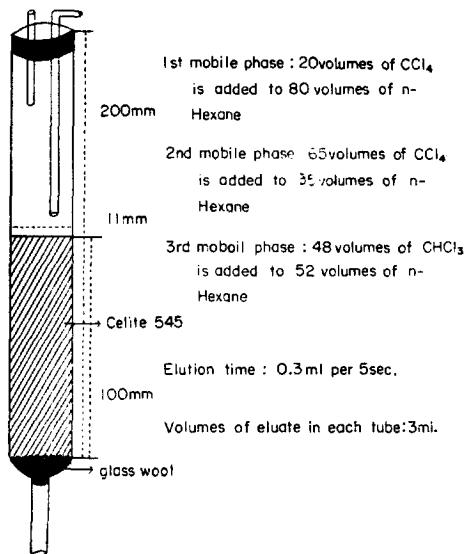


Fig. 2. Preparation of column for column partition chromatography

파장 480 m μ 에서 형광도를 측정하여 표준곡선을 만들었다. 나) 표준 estrone 및 estradiol-17 β 의 정량은 여지 및 column에서 용출된 각 용출액을 감압하에 전조시켜 benzen-ethanol 혼합물의 0.1 ml에 용해시켜 이하 표준 곡선의 작제법과 동일하게 처리하여 용출곡선을 만들고 각각 estrogen의 용출을 합쳐서 각각 estrogen을 정량하였다.

회수시험 : paper chromatography 및 column chromatography에 의한 estrogen의 분획중 estrogen의 회수율 시험을 위하여 각 estrogen 표준품 5 μ g을 정량시와 같이 처리했다.

결 과

추출 : 가수분해된 노중 estrogen을 ethyl ether에 의하여 추출하고 방해물질을 제거하기 위하여 알칼리에서 세척을 반복하는 것이 보통이나 방해물질을 더욱 제거하기 위해서 CCl_4 , n-hexane, toluene 등으로 반복세척에 의하여 비교적 순수한 추출액을 얻을 수 있었으며 이를 Mitchell법⁷⁾에 의하여 estriol fraction과 estrone 및 estradiol fraction으로 나누었을 때 좋은 결과를 가져오는 것이 확인되었다.

Estrogen의 thin layer 및 paper chromatography : 상온하에 estrogen을 전개시켰을 때 분리된 spot가

선명하지 못하였고 확산이 되어있어 완전하고 충분한 용제에 의한 포화가 필요하였다. 전개온도를 $32 \pm 0.5^\circ C$ 로 상승시켜 주었을 때 어떤 온도보다도 선명한 spot를 확인할 수 있었으므로 요즘 estrogen 추출물의 전개온도는 $32 \pm 0.5^\circ C$ 를 유지하도록 하였다. 그러나 모든 동일한 조건에서는 23 cm를 전개시키는데 paper chromatography는 5시간 30분 정도 걸리는데 반해 thin layer chromatography는 3시간 정도로 paper chromatography보다 전개시간이 짧았고 spot의 분리도 thin layer chromatography가 paper chromatography보다 우수하였다. thin layer chromatography 및 paper chromatography의 chromatogram은 그림 3과 같으며 각 estrogen의 Rf치는 표 1과 같다.

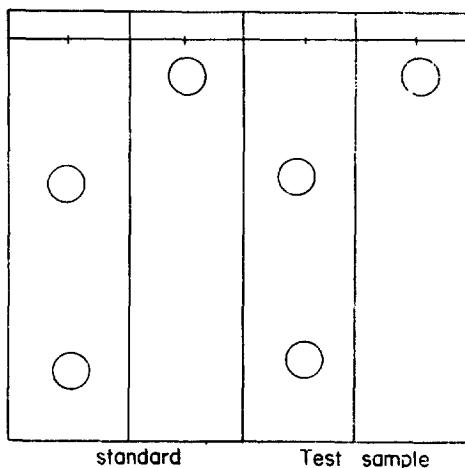


Fig. 3. Thin layer and paper chromatograms of estriol, estradiol-17 β and estrone fractions.

Table 1. Rf Values of Estriol, Estrone and Estradiol-17 β by Thin Layer Chromatography and Paper Chromatography

Estrogen	Method	Thin Layer Chromatography	Paper Chromatography
Estriol		0.89 ± 0.027	0.85 ± 0.018
Estrone		0.67 ± 0.022	0.60 ± 0.016
Estradiol-17 β		0.09 ± 0.014	0.078 ± 0.001

Estrogen의 자외선흡수 spectrum : 각 estrogen의 자외선흡수곡선은 그림 4와 같으며 흡수곡선으로 보아 그 성질이 대단히 유사하였다. 그림 5에서 보이는 바와 같이 estriol, estrone, estradiol-17 β [공-] 230

$m\mu$ (218 $m\mu$ ~238 $m\mu$)과 282 $m\mu$ (278 $m\mu$ ~292 $m\mu$)의 두 파장에서 최대 흡수를 보였으며 각 estrogen의 정량을 위하여 이 두 파장을 이용할 수 있음이 확인되었다. 이 두 파장에서의 검출감도를 시험하기 위하여 농도별 표준곡선을 작성하였고 그 결과 그림 5, 6, 7에서 처럼 282 $m\mu$ 보다는 230 $m\mu$ 에서 더 큰 흡수를 보였으며 검출감도 또한 높았다. 그러나 282 $m\mu$ 에서는 표준곡선이 직선인데 230 $m\mu$ 에서는 완만한 곡선을 형성하므로 실험오차를 가져올 우려가 많다. 검출감도는 두 파

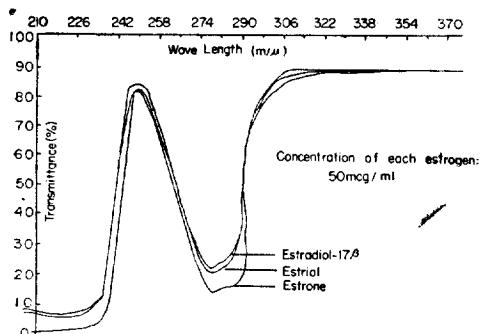


Fig. 4. Absorption spectra of estrogen.

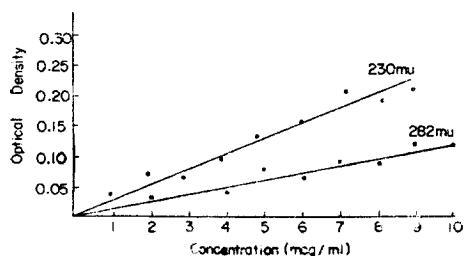


Fig. 5. Standard curve of estriol.

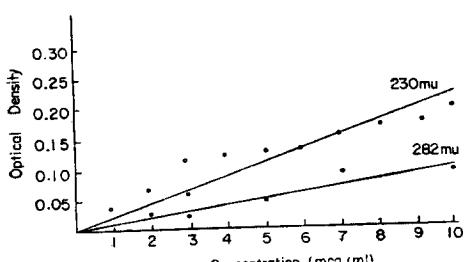


Fig. 6. Standard curve of estrone.

장에서 0.5~10 μ g의 농도를 조절하여 측정하는 것이 가장 좋았으며, 비교적 검출감도가 낮아 미량의 estrogen의 정량을 위해서는 적당하지 못하였다.

Estrogen의 형광도 : 각 estrogen의 농도별 형광도는 그림 8에서 보는 바와 같이 estradiol-17 β 가 가장 감도가 높았으며 다음은 estrone이었고 estriol은 대단히 낮아 특이적인 검출법이 되지 못하였다. 그러나 estradiol-17 β 과 estrone은 정량감도가 0.01 μ g 이었으며 0.01~0.152 μ g 사이의 농도에서 직선을 형성하였으므로 이 범위에서 측정하는 것이 가장 적합하였다.

Paper chromatography에 의한 각 estrogen의 농도측정 : paper chromatography에 의하여 전개시킨 spot를 용출하여 estriol은 자외선 흡수 spectrum에 의하여 230 $m\mu$ 에서 정량하고 estrone과 estradiol-17 β 은 형광증강법에 의하여 정량하였다. 임신뇨 각 5ml에 대한 성적은 표 2와 같으며 estradiol-17 β 이 340 ml 당 $33.6 \pm 3.36 \mu$ g 으로 가장 많았다. 다음은 estrone 340

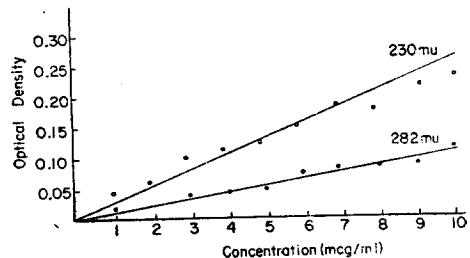


Fig. 7. Standard curve of estradiol

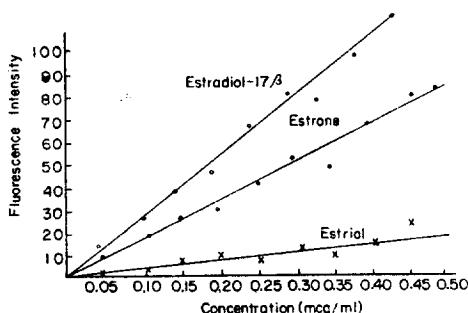


Fig. 8. Standard curve of estrogen in sulfuric acid solution.

Table 2. Concentration (μg) of Estriol, Estrone and Estradiol-17 β in Pregnant Dairy Cow urines by Paper Chromatography

Estrogen Sample No.	Estriol by Spectrophotometry	Estrone by Fluorometry	Estradiol-17 β by Fluorometry
1	18	32	35
2	16	33	38
3	18	27	32
4	20	30	34
5	21	31	29

ml 당 $30.6 \pm 2.3 \mu\text{g}$ 이고, estriol은 340 ml 당 $18.6 \pm 2.01 \mu\text{g}$ 으로 가장 적었다.

Column chromatography에 의한 estrogen의 농도

측정 : 그림 9, 10에서 보는 바와 같이 column chromatography에 의하여 용출된 각 분획을 흡광도 측정

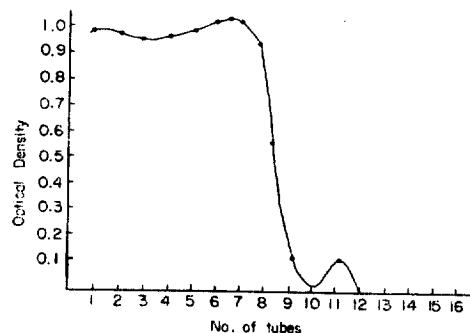


Fig. 9. Elution curve of estriol by column partition chromatography.

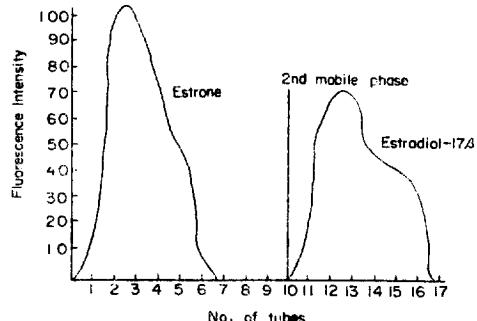


Fig. 10. Elution curve of estrone and estradiol-17 β by column partition chromatography.

Table 3. Concentration (μg) of Estriol, Estrone and Estradiol-17 β in Pregnant Dairy Cow Urines by Column Chromatography

Estrogen Samples No.	Estriol by Spectrophotometry	Estrone by Fluorometry	Estradiol-17 β by Fluorometry
1	21	35	39
2	19	37	41
3	23	30	35
4	25	34	40
5	29	36	48

에 의하여 확인하고 각 estrogen을 합쳐 estriol은 자외선 흡수광장에 의하여 $230 \text{ m}\mu$ 에서 정량하고, estrone과 estradiol-17 β 는 형광측정법에 의하여 정량하였다. 임신뇨 각 5례에 대한 성적은 표 3과 같으며 estradiol-17 β 이 340 ml 당 $38.6 \pm 2.3 \mu\text{g}$ 으로 가장 많았고 다음은 estrone으로 $4.4 \pm 2.73 \mu\text{g}$ estriol은 $23.4 \pm 2.01 \mu\text{g}$ 의 순서였다.

Paper chromatography와 column chromatography와의 성적 비교 : 표 4에서 보는 바와 같이 paper chromatography 또는 column chromatography 모두 임신뇨중 estrogen은 estradiol-17 β 가 가장 많았고, 다음이 estrone, estriol의 순서로 일치하였으며, 대체적

Table 4. Comparative Quantitation of Estriol, Estrone and Estradiol-17 β by Paper Chromatography and Column Chromatography ($\mu\text{g}/340 \text{ ml}$)

Estrogen Method Sample No.	Estriol		Estrone		Estradiol-17 β	
	P.C.*	C.C.**	P.C.	C.C.	P.C.	C.C.
1	18	21	32	35	35	39
2	16	19	33	37	38	41
3	18	23	27	30	32	35
4	20	25	30	34	34	40
5	21	29	31	36	29	38

* Paper chromatography ** Column chromatography

Table 5. Recovery of Standard Estrogen ($5 \mu\text{g}$) by Paper Chromatography and Column Chromatography

Method Recovery Estrogen	Paper Chromatography		Column Chromatography	
	Amount	Percent	Amount	Percent
Estriol	4.86	97.2	4.84	96.8
Estrone	4.61	92.2	4.69	93.8
Estradiol-17 β	4.71	94.2	4.72	94.4

으로 각 estrogen의 양은 column에 의한 분석치가 paper chromatography에 의한 분석치보다 많았으며 estradiol-17 β 는 5% 수준의 유의차와 그리고 estrone과 estriol은 1% 수준의 유의차를 보였다.

회수시험 : Paper chromatography 및 column chromatography 과정 중 회수율 시험을 위하여 각 표준 estrogen 5 μg 의 paper chromatography 및 column chromatography에 의한 회수율은 표 5와 같다.

고 촬

요중에 배설되는 estrogen은 대단히 미량일 뿐더러 요중에는 많은 방해물질이 있다. 따라서 순수한 estrogen을 추출할 수가 없으므로 이들을 제거하기 위하여 paper chromatography나 column chromatography 같은 특수한 과정을 거치지 않으면 안되며 이러한 과정에 의하여 미량을 다시 분획하여 분석하는 데에는 많은 오차를 수반하기 때문에 아직도 많은 문제점이 있다. paper chromatography나 column chromatography가 개발되기 전의 estrogen의 분획은 분쇄와 추출만의 과정을 거쳐 많은 방해물질과 함께 Kober 반응에 의하여 총 estrogen을 정량하여 왔는데 검출감도가 우수하나 방해물질로 인한 오차가 심하였으므로 Krivchevsky와 Kirk⁵⁾에 의하여 처음으로 paper chromatography가 시도되었다. 그리고 estrogen을 검출하기 위하여 Iodine phosphomolybdic acid, SbCl₃, silicotungstic acid 등이 사용될 수 있음을 알아내었다. 그러나 이를 발색제는 estrogen에 특이적인 것이 아니었으므로 다른 steroid 계의 hormone과 혼재할 때는 적용할 수 없음이 보고되었다. Engel⁶⁾등과 Veldhnis¹³⁾는 estrogen의 황산용액이 형광을 나타내는 것을 발견하고 혈중 estrogen의 정량에 적용하여 검출감도가 우수한 것을 확인하였다. Alexord¹¹⁾는 paper chromatography에 의하여 각 estrogen을 분리할 수 있음을 확인하고 이를 용출하여 형광법을 적용해서 정량하였다. Mitchell 및 Davis⁷⁾등은 사람의 태반조직 중의 estrogen을 분리하기 위하여 paper chromatography와 Folin-ciocalteus 시약을 적용하면 정량감도가 우수하다고 보고하였다. Bauld²⁾, Brown³⁾, Preedy 및 Aitken¹⁰⁾등은 column chromatography에 의하여 각 estrogen을 분획하였으며 각 분획에 대하여 Brown³⁾은 Kober 반응 Preedy 및 Aitken¹⁰⁾은 형광측정법에 의하여 가장 민족한 정량을 할 수 있었다고 보고하였다. 이후 paper chromatography 및 column chromatography에 의한 각 estrogen의 분획은 지금까

지 많이 활용되어 오고 있다. 즉 Nelson 및 Smith⁸⁾ 그리고 Randel 및 Mellin¹²⁾은 소의 요중 estrogen의 정량에 적용하고 Kober 반응과 형광측정법을 적용하여 민족스런 결과를 얻었다고 보고하였다. Domeki 및 Nakahara¹⁴⁾는 column chromatography와 형광측정법을 적용하여 소의 혈중유리 estrogen의 정량이 가능하였다고 보고하였다. 신속한 estrogen의 확인을 위하여 paper chromatography 대신 thin layer chromatography의 적용 가능성은 다른 분야에서 많이 활용되었으며 본 실험에서도 역시 paper chromatography보다 thin layer chromatography에 의한 분리가 더욱 간단히 그리고 선명한 spot가 확인되어 spot의 확인을 위해서는 thin layer chromatography가 좀더 우수한 방법으로 생각된다.

Paper chromatography에 의한 각 estrogen의 분획은 민족스럽지 못한 것으로 보였다. 즉 충분한 전래용제의 포화도와 높은 온도의 유지와 기타 충분한 조건에서도 불구하고 spot는 광범위하고 명백하지 못하였으며 이러한 점은 column chromatography에 의한 분획이 더욱 우수하게 하는 것으로 보인다. 그러나 column chromatography에 의해서도 완전히 방해물질을 제거치 못하였다. 이러한 점은 paper chromatography에 의한 estrogen의 양보다 column chromatography에 의한 양이 더 많이 정량되어 오차를 가져오는 원인이 될지도 모를 것을 암시하여 주기도 한다. 그러나 한편 column chromatography에 의한 estrogen의 분획을 위해서는 추출액을 대량 적용할 수 있고, 용출용매의 변경에 따라 각 estrogen의 분획이 완전했으며 조작이 paper chromatography에 비해 간단하였으므로 미량의 estrogen의 정량을 위해서는 paper chromatography보다 훨씬 적합한 것으로 생각된다. 용출된 각 estrogen의 정량을 위해서 Mitchell⁷⁾등은 자외선파장에서의 흡수곡선을 만들고 estriol, estrone, estradiol-17 β 가 각기 다른 흡수곡선을 보인다고 했으나 본 실험에서는 3종의 estrogen이 거의 일치하는 흡수곡선을 보였고 흡수곡선에 의한 각 estrogen의 구별이 안되었으며, 280 m μ 보다 230 m μ 에서 더욱 잘 흡수되어 검출감도가 높았다. 그러나 자외선파장에서는 검출감도가 낮아 요중 estrogen의 정량을 위해서는 적합하지 못한 것으로 생각된다. estrone과 estradiol-17 β 의 황산용액에서의 형광은 0.01 μg 에서부터 0.4 μg 까지 최적적선을 형성하였으며 자외선흡수법에 의한 검출감도 보다 월등하게 높았고 요중 estrogen의 정량을 위해서도 형광법이 더 우수한 것으로 생각된다. 그러나 estriol은 형

광도가 낮았고 estriol만을 위해서는 자외선흡수법을 적용시키는 것이 더 좋은 것으로 생각된다.

결 론

1. 요중에서 추출한 estrogen의 분리 및 검출을 위해서는 thin layer chromatography법이 paper chromatography법보다 phosphomolybdic acid에 의한 spot의 발색이 선명하였으며 thin layer chromatography 및 paper chromatography 모두 $32 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 에서 전개시키는 것이 가장 좋았고 23cm를 전개시키는데 thin layer chromatography는 3시간 paper chromatography는 5시간 30분이 소요되었다.

2. Thin layer chromatography에 의한 estriol, estrone 및 estradiol-17 β 의 Rf는 각각 0.89 ± 0.027 ; 0.67 ± 0.022 ; 0.09 ± 0.014 ;였으며 paper chromatography에 의해서는 각각 0.85 ± 0.018 ; 0.60 ± 0.016 ; 0.078 ± 0.001 로써 thin layer chromatography에 의한 Rf치가 paper chromatography에 의한 Rf치보다 약간 높았다.

3. 각 estrogen의 자외선흡수곡선은 거의 일치하였으나 $230\text{ m}\mu$ ($226\sim 234\text{ m}\mu$)과 $282\text{ m}\mu$ ($278\sim 290\text{ m}\mu$)의 두 파장에서 최대 흡수를 보였으나 $282\text{ m}\mu$ 보다 $230\text{ m}\mu$ 에서 더 큰 흡광도를 보였다.

4. Spectrophotometry에 의한 정량은 실험적으로 각 estrogen $1\sim 10\text{ g}$ 의 농도가 가장 적합하였고, estrone 및 estradiol-17 β 의 형광법에서는 $0.01\sim 0.4\text{ g}$ 의 농도가 가장 적합하였으나 estriol은 형광에 의한 정량감도가 좋지 않았다. estrone 및 estradiol-17 β 의 황산용액은 $480\text{ m}\mu$ 에서 강한 형광을 내었고 estriol은 형광이 약하였다.

5. 표준 estrogen의 paper chromatography 및 column chromatography에 의한 회수시험은 estriol이 각각 97.2%, 96.8%였고, estrone이 각각 92.2%, 93.8%, estradiol-17 β 는 94.2%, 94.4%이었다.

참 고 문 헌

- Axelord, L.R.: The quantitative separation of estrogens by paper partition chromatography. J. Biol. Chem. 1953. 201 : 59.
- Bauld, W.S.: Separation of oestrogens in urinary extracts by partition chromatography. Biochem. J. 1954. 59 : 294.
- Brown, J.B.: A chemical method for the determination of oestriol, oestrone and oestradiol in human urine. Biochem. J. 1955. 60 : 185.
- Engel, L.L., Slounwhite, W., R. Jr., Carter, P. and Nathanson, I.T.: The separation of natural estrogens by countercurrent distribution. J. Biol. Chem. 1950. 185 : 255.
- Kvitchevsky, D. and Kirk, M.R.: Detection of steroids in paper chromatography Arch. Biochem. Biophys. 1952. 35 : 346.
- Marlow, H.W.: Groups involved in the zimmermann and Kober reactions, J. Biol. Chem. 1950. 183 : 167.
- Mitchell, F.L. and Davis, R.E.: The isolation and estimation of the steroid oestrogens in placental tissue. Biochem. J. 1954. 56 : 690.
- Nelson, D.W. and Smith, E.P.: Urinary excretion of estrogenic compounds during estrus and gestation by the bovine as determined by three assay methods J. Dairy Sci., 1962. 51 : 135.
- Oakey, R.E.: The paper chromatography of oestrogens. J. Chromatog. 1962. 8 : 2.
- Preedy, J.R.K. and Aitken, E.H.: Column partition chromatography of estradiol-17, and estriol in phenolic extracts of urine: Fluorescence characteristics of interfering material. J. Biol. Chem. 1961. 236 : 1297.
- Preedy, J.R.K. and Aitken, E.H.: The determination of estrone, estradiol-17, and estriol in urine and plasma with column partition chromatography. J. Biol. Chem. 1961. 236 : 1300.
- Randel, R.E. and Mellin, T.N., Estergreen, V.L.: Urinary estrogen excretion rates during pregnancy in the bovine, J. Dairy Sci., 1968. 51 : 416.
- Veldhuis, A.H.: A chemical method for the determination of estrogens in plasma. J. Biol. Chem. 1953. 202 : 107.
- Domeki, I., Nakahara, T., Yamauchi, M. and Kambeawa, A.: Fluorometric determination of blood plasma free estrogens during estrous cycle in the cow. National Institute of Animal Health. 1972. 12 : 95.

**Studies on Separation, Detection and Quantitation of Estriol, Estrone, Estradiol-17 β
in Urine of Dairy Cows by Paper, Thin Layer and Column Chromatography**

Young Kwan Yang, D.V.M., M.S. and Soo Nam Han, D.V.M. Ph.D.

Department of Veterinary Medicine

College of Agriculture, Seoul National University

Jong Hoo Cho, D.V.M., M.S.

Institute of Veterinary Research, Office of Rural Development

Abstract

Thin layer, paper and column chromatography were compared for the separation, detection and quantitation of three kinds of estrogen in urine of dairy cows.

While thin layer chromatography utilizing silica gel was better for the detection of estrogens, column chromatography using celite 545 was preferable.

Spectrophotometry was compared with fluorometry for determination of estrone, estradiol-17 β and estriol eluted by paper chromatography and column chromatography.

Optical density of three standard estrogens showed almost same curve at maximum absorption wave length of 230 and 282m μ . However, the former showed a higher peak.

In fluorometry, the fluorescence intensity of estrone and estradiol-17 β were rather strong, when the estrogens were dissolved in sulfuric acid, and showed higher sensitivity than that of the spectrophotometry. However, in the case of estriol was exceptional.