Identifizierung von Aldosteron bei der DC-Trennung mittels im RIA nicht störender Markierungssubstanzen*

G. Müller
Medizinische Universitätsklinik Würzburg (Direktor: Prof. Dr. K. Kochsiek)

Zusammenfassung:

Durch Einsatz inerter Markierungssubstanzen bei der chromatographischen Trennung auf Alufolien mit Fluoreszenzindikator läßt sich der Rf-Wert für Aldosteron aus Plasma- und Harnextrakten stets reproduzierbar festlegen. Anstelle von kaltem Markierungs-Aldosteron, das erst im Mikrogrammbereich im UV-Licht sichtbar gemacht werden kann und infolge Kontamination bei der anschließenden radioimmunologischen Bestimmung häufig hohe „Blankwerte" verursacht, werden zur Markierung der Aldosteronzone Coffein und Pyramidon verwendet. Beide Stoffe sind im UV-Licht sichtbar und weisen keine Kreuzreaktion mit dem Aldosteronantikörper auf.

Schlüsselwörter:

Aldosteron-Radioimmunoassay — Dünnschichtchromatographie — inerte Markierungssubstanzen

Summary:

Identifying aldosterone from plasma or urine extracts on thin layer foils with fluorescence indicator by unlabeled hormone used in the range of 500 ng often gives unacceptable high blank values in the following radioimmunoassay. Caffeine and pyramidon were applied as inert marker substances on the thin layer plates. Caffeine migrates with the aldosterone band (Rf = 0.28), pyramidon marks the cortisol zone. No cross reaction between the marker substances and the aldosterone antibody could be dedected.

Keywords:

Aldosterone radioimmunoassay — thin layer chromatography — inert marker substances

Einführung

Bei der radioimmunologischen Messung von Aldosteron aus Plasma und Urin muß, falls keine chromatographische Trennung vorausgeht, mit der störenden Interferenz anderer Steroide gerechnet werden. Dies trifft auch dann zu, wenn relativ spezifische Antikörper eingesetzt werden (1, 2, 3). Zur Trennung der Steroide wurden säulen-, papier- und dünnschichtchromatographische Verfahren vorgeschlagen (Übersicht bei 4). Die Dünnschichtchromatographie unter Verwendung von Platten mit Fluoreszenzindikator (5–7) erfordert dabei den geringsten apparativen und zeitlichen Aufwand. Hierbei wird zur Identifizierung der Aldosteronbande aus Plasma- und Urinextrakten separat mitgeführtes kaltes Aldosteron eingesetzt (5–7), das allerdings erst im Mikrogrammbereich (unter Nachweisgrenze 0,5 µg) im UV-Licht sichtbar gemacht werden kann. Der Nachteil dieses Vorgehens liegt darin, daß bei der Routinemessung trotz sorgfältiger Arbeitstechnik häufig hohe Blankwerte auftreten, die durch die hohen Konzentrationen des Markierungshormons auf der Platte zustande kommen. In Zonen der Extrakte von Normalplasmen (z. B. 10 ng/100 ml) liegt eine Aldosteron-Menge von nur ca. 100 pg vor. Verwendet man statt dessen inerte Pilotsubstanzen (Coffein, Pyramidon), so läßt sich dieser Nachteil sicher umgehen.

Methodik

Plasma- und Urinextraktion

a) Die Extraktion von 3–5 ml *Plasma* erfolgt nach Zugabe von 10 ml dest. Wasser, ca. 5000 cpm 1,2-^{3}H-Aldosteron (spezifische Aktivität 57 Ci/mmol, New England Nuclear) zur Bestimmung der Wiederfindung und 100 ml Dichlormethan p.A. (Merck) in Bechergläsern auf dem Magnetrührer über 1 Stunde bei Raumtemperatur. Nach Absaugen des oberen wäßrigen Anteils wird die Dichlormethanphase über einen Filter in 150 ml fassende, spitz zulaufende Schliffkolben überführt und mit dem Rotationsverdampfer (Büchi) bei 40 °C zum Trocknen eingeengt.

b) Bei der Messung des säurelabilen Aldosteron-18-Glukuronids werden die *Urinproben* zunächst 1 Stunde vorextra-

* Der Vortrag wurde gehalten auf dem Kongreß für Laboratoriumsmedizin 1981, Berlin

hiert (20 ml Urin, 20 ml Dichlormethan). Danach werden in 100 ml fassende Polystyrolbecher 5 ml vorextrahierter Urin, 5 ml Pufferlösung pH 1 (Glykokoll-Salzsäure, Merck) und 20 ml dest. Wasser gegeben und mittels konzentrierter Schwefelsäure auf pH 1 eingestellt. Nach Säurehydrolyse über 18 Stunden bei Raumtemperatur und Zugabe von 1,2-^{3}H-Aldosteron zur Wiederfindung (siehe a) erfolgt die Extraktion mit 40 ml Dichlormethan auf dem Magnetrührer. Die obere wäßrige Phase wird anschließend abgesaugt und das verbleibende Dichlormethan im Vakuum abgedampft.

Die Extraktion des freien Aldosterons erfolgt aus 30 ml Urin nach Zugabe der Wiederfindungsaktivität direkt mit 30 ml Dichlormethan.

Dünnschichtchromatographie

Die nach Extraktion und Trocknung verbleibenden Rückstände werden in 0,4 ml Äthanol und 0,6 ml Dichlormethan wiederaufgenommen und strichförmig (4 cm Breite) auf DC-Alufolien (Kieselgel 60 F 254, 20 × 20 cm, Schichtdicke 0,2 cm, Merck) im Abstand von 2 cm aufgebracht. Die Folien werden vor Gebrauch durch dreimaligen Lauf in Äthanol-Chloroform (50/50 v/v) vorgereinigt. Die Auftragung von Hand erfolgt mit Pasteurpipetten, an deren Spitze ein ausgezogener Polyäthylenschlauch angebracht ist. Auch hat sich für diese Zwecke ein bei uns entwickelter automatischer Multispotter bewährt, der eine strichförmige Auftragung in Serie ermöglicht. An den bezeichneten Punkten (Abb. 1) wird jeweils 1 Mikroliter einer gesättigten Coffein-Pyramidon-Lösung (100 mg Coffein und 50 mg Pyramidon in 10 ml 90%igem Äthanol) aufgebracht. Nach aufsteigender Chromatographie über eine Laufstrecke von 13 cm bei Raumtemperatur im System Benzol/Aceton/Wasser (60/40/0,4 v/v) (7) und Lufttrocknung der Folien werden die Indikatorsubstanzen im UV-Licht (254 nm) mit dem Bleistift markiert. Zu einer Geraden durch den Mittelpunkt der Coffeinflecken werden 2 Parallelen im Abstand von 0,5 cm (in Richtung Lösungsmittelfront) und 1 cm (in Richtung Startlinie) eingezeichnet. Die Aldosteronzone liegt immer innerhalb der durch die beiden Geraden begrenzten und in Abb. 1 schraffiert eingezeichneten Fläche. Das Kieselgel in diesem Bereich wird sorgfältig abgeschabt und das Aldosteron in 1,5 ml dest. Wasser mit 0,2% Äthylenglykoll für 60 Minuten unter Schütteln eluiert. Nach Abzentrifugieren (20 min, 4000 Upm) wird der Überstand abgehoben und daraus die Wiederfindungsrate von zugesetztem markierten Aldosteron ermittelt und die radioimmunologische Bestimmung durchgeführt.

Radioimmunologische Messung

Sie erfolgt nach den Angaben von Vecsei und Gless (4) unter Verwendung von 1,2,6,7-^{3}H-Aldosteron (spez. Aktivität 82 Ci/mmol, New England Nuclear) und eines Schaf-Antikörpers (dankenswerter Weise von Prof. Dr. P. Vecsei, Pharmakologisches Institut der Universität Heidelberg, zur Verfügung gestellt).

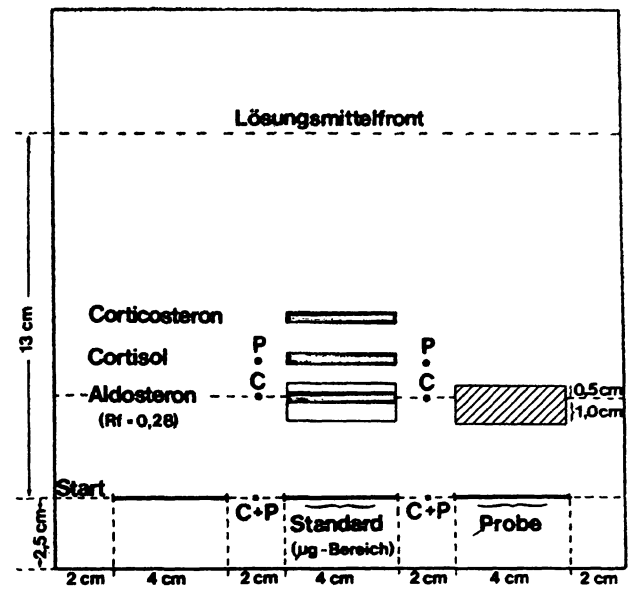

Abb. 1: Schema eines Aldosteronharn- oder Plasmaextraktes nach DC und Identifizierung im UV-Licht (254 nm). In der Mitte wurden zur Dokumentation Aldosteron, Cortisol und Corticosteron im Mikrogrammbereich mitgeführt. Schraffierter Bereich entspricht der Eluierungszone. C = Coffein; P = Pyramidon

Ergebnisse und Diskussion

Die radioimmunologische Konzentrationsbestimmung von Aldosteron in Plasma und Urin ist auch bei Einsatz relativ spezifischer Antikörper problematisch. Trotz nur geringer Kreuzreaktionen solcher Antiseren können jedoch kreuzreagible Steroide aufgrund ihrer im Vergleich zu Aldosteron sehr hohen Konzentrationen zu falsch hohen Meßergebnissen führen, sofern keine chromatographische Trennung vorangeht. Nowotny et al. (3) haben anhand vergleichender Plasmaanalysen mit und ohne Dünnschichtchromatographie unter Verwendung von 5 käuflichen Antiseren und von 2 Kits nachweisen können, daß bei fehlender chromatographischer Trennung die Werte um 30–500% höher lagen. Auch bei Vergleichsmessungen der Aldosteron-Glukuronid-Ausscheidung fanden sich häufig erhöhte Werte, wenn keine Chromatographie vorausgegangen war (1, 2). In eigenen Untersuchungen wurde die Aldosteron-18-Glukuronid-Ausscheidung bei 7 Kontrollpersonen mit der beschriebenen Methode und alternativ ohne Chromatographie unter Verwendung

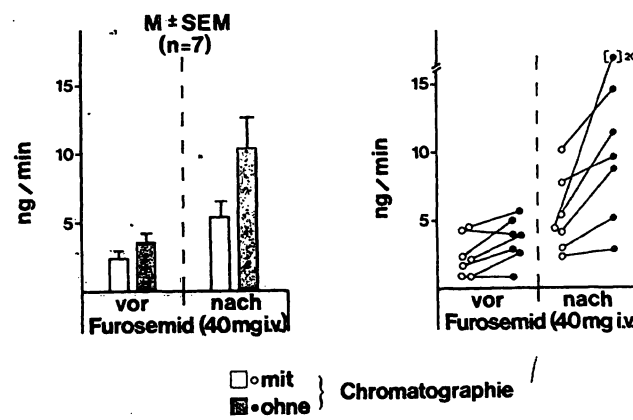

Abb. 2: Einzelmeßpunkte und Mittelwerte der Aldosteron-18-Glukuronid-Ausscheidung im 2 Std.-Urin jeweils vor und nach 40 mg Furosemid i.v. mit und ohne Chromatographie

eines spezifischen Oxim-Antikörpers bestimmt (Abb. 2). Dabei zeigte sich, daß die ohne Chromatographie ermittelten Werte unter Basalbedingungen (2,39±1,44 bzw. 3,49 ±1,62 pg/min, M±SD, $p < 0,05$) im Mittel um 30%, unter Stimulationsbedingungen, d. h. im höheren Konzentrationsbereich sogar um 50% höher lagen (5,24±2,76 bzw. 10,35 ±5,95 pg/min, $p < 0,05$).

Unter den möglichen Trennverfahren erfordert die Dünnschichtchromatographie auf Folien mit Fluoreszenzindikator den geringsten zeitlichen und apparativen Aufwand. Die Festlegung des Rf-Wertes von Aldosteron aus Plasma- und Urinproben mit inerten Pilotsubstanzen wie Coffein und Pyramidon, die nicht mit dem Aldosteronantikörper reagieren, bietet folgende Vorteile:

1. Die Rf-Werte (0,28) von Aldosteron und Coffein stimmen im Fließmittelgemisch Benzol/Aceton/Wasser (60/40/0,4) überein. Der Pyramidonfleck liegt am Unterrand der Cortisolzone (Abb. 1). Wie Untersuchungen mit unterschiedlichen Aldosteronkonzentrationen und die Anfertigung von Radiochromatogrammen ergeben haben, liegt die Aldosteronbande der Proben stets in der in Abb. 1 schraffiert eingezeichneten Toleranzzone, selbst dann, wenn sich die Laufcharakteristik durch Verschmutzungen an der Auftragszone geringfügig ändert. Bei dieser Verschmutzung handelt es sich um Chromogene, die vor allem bei der Extraktion von konzentrierten und bilirubinhaltigen Urinen anfallen.

2. Weiterhin gestattet die Verwendung von Coffein und Pyramidon eine Aussage über die Trennqualität des Fließmittels. Eine mangelhafte Trennung der Steroide, meist Ausdruck einer Alterung des Laufgemisches, läßt sich dadurch erkennen, daß Coffein- und Pyramidonflecken aneinanderrücken.

3. Der Zusatz von kaltem Aldosteron ist entbehrlich.

Die mittlere Wiederfindungsrate von zugesetztem markierten Aldosteron betrug für Plasma 48,8±7,7% (M±SD, n = 55) und für Urin 47,5±9,5% (n = 100).

Für gesunde Kontrollpersonen (n = 55) wurde unter Basalbedingungen (12stündige Ruhelagerung, uneingeschränkte Natriumzufuhr, keine Medikamenteneinnahme, Blutabnahmen zwischen 8 Uhr 30 und 9 Uhr 30) eine mittlere Plasmaaldosteron-Konzentration von 9,1 ±3,9 ng/100 ml ermittelt. Die Ausscheidungswerte von Aldosteron-18-Glukuronid (n = 57) und von freiem Aldosteron (n = 43) lagen bei 10,8±5,1 bzw. 0,184±0,067 µg/24 Std. (Abb. 3).

Die vorstehende Arbeitspraxis hat sich in unserem Laboratorium bei der routinemäßigen Aldosteronbestimmung ebenso wie bei Bearbeitung wissenschaftlicher Fragestellungen seit über 5 Jahren bewährt.

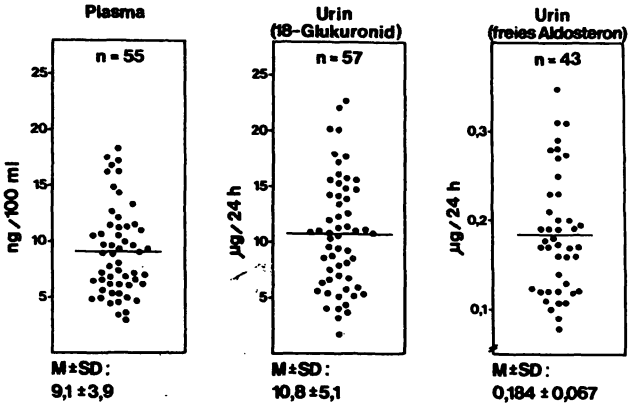

Abb. 3: Einzelmeßpunkte und Mittelwerte für Plasma-Aldosteron, 18-Glukuronid und freies Aldosteron im Urin bei gesunden Kontrollpersonen

Schrifttum:

1. ABDELHAMID, S., WALB, D., VECSEI, P.: Radioimmunologische Bestimmung von Renin, Angiotensin und Aldosteron. Med. Welt 27, 2008 (1976).
2. CONNOLLY, T. M., VECSEI, P., HAACK, D., KOHL, K.-H., ABDELHAMID, S., AMMENTI, A.: Aldosterone diagnosis in hypertension: comparative evaluation of radioimmunoassays for urinary aldosterone and 18-OH-corticosterone. Klin. Wochenschr. 56 (Suppl. I), 173 (1978).
3. NOWOTNY, P., NOWOTNY, E., WALDHÄUSL, W.: Vergleichende Untersuchungen zur Problematik der Aldosteronbestimmung. Vortrag Jahrestagung der Österreichischen und Deutschen Gesellschaft für Klin. Chemie, Salzburg, März 1979.
4. VECSEI, P., GLESS, K.-H.: Aldosteron-Radioimmunoassay. Stuttgart, Enke 1975.
5. GERDES, H., STAIB, W.: Eine Methode zur dünnschichtchromatographischen Isolierung und fluorometrischen Bestimmung von Aldosteron im menschlichen Harn. Klin. Wochenschr. 43, 789 (1965).
6. HELBER, A., KAUFMANN, W.: Radioimmunologische Methode zur Aldosteronbestimmung im Urin. Klin. Wochenschr. 51, 1164 (1973).
7. HILFENHAUS, M.: Evaluation of radioimmunoassay for aldosterone in urine and plasma of rats. J. Steroid. Biochem. 8, 847 (1977).

Anschrift des Verfassers:

Dr. med. Gerhard Müller
Medizinische Universitätsklinik
Josef-Schneider-Straße 2
D-8700 Würzburg

□