

*Journal of Chromatography*, 146 (1978) 273—281

*Biomedical Applications*

© Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam — Printed in The Netherlands

CHROMBIO. 179

## DIE BESTIMMUNG VON ALDOSTERON IN HARN UND PLASMA<sup>\*,\*\*</sup>

K. HERKNER, P. NOWOTNY und W. WALDHÄUSL

*I. Med. Univ. Klinik, Abteilung für klinische Endokrinologie, Wien (Österreich)*

(Eingegangen am 3. Februar 1978)

### SUMMARY

#### *Determination of aldosterone in urine and plasma*

The method described permits an exact and rapid determination of aldosterone in urine and plasma. The reliability of the method is based on the separation of aldosterone from contaminating steroids by thin-layer chromatography. The mobile phase used was: cyclohexane—ethyl acetate (20:80). The steroids were extracted by dichloromethane. Plasma was extracted directly, and urine after hydrolysis with sulfuric acid (pH = 1). Recovery before radioimmunological analysis of aldosterone was  $54.8 \pm 7.2$  (S.D.) % ( $n=40$ ) for urine samples, and  $39.1 \pm 4.4$  % ( $n=60$ ) for plasma samples. The coefficient of variation for multiple determinations of aldosterone was for urine 8.2% for low ( $n=10$ ) and 14.5% for high ( $n=10$ ) values; for plasma the respective values were 18.9% ( $n=10$ ) and 7.8% ( $n=10$ ). The sensitivity of the determination of aldosterone was for urine 0.04  $\mu\text{g}$  per 24-h volume ( $n=10$ ) and for plasma 4.4 ng per 100 ml ( $n=10$ ). The method avoids pitfalls due to the cross-reaction of anti-aldosterone serum with other materials.

### EINLEITUNG

Die bestimmung von Aldosteron aus biologischem Material erfolgt meist mit-

\*Durchgeführt mit Unterstützung des Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung Österreichs. Förderungsnummer-1783.

\*\*Folgende Trivialnamen wurden verwendet:  $11\beta,21$ -Dihydroxy-18-oxopregn-4-en-3,20-dion = Aldosteron; Androst-4-en-3,17-dion = Androstendion;  $11\beta, 17\alpha,21$ -Trihydroxypregn-4-en-3,20-dion = Cortisol;  $17\alpha,21$ -Dihydroxypregn-4-en-3,11,20-trion = Cortison;  $11\beta,21$ -Dihydroxypregn-4-en-3,20-dion = Corticosteron; 21-Hydroxypregn-4-en-3, 20-dion = Deoxycorticosteron;  $17\beta$ -Hydroxyandrost-4-en-3-on = Testosteron;  $3\beta, 17\alpha$ -Dihydroxypregn-5-en-20-on =  $17\alpha$ -Hydroxypregnenolon;  $17\alpha$ -Hydroxypregn-4-en-3, 20-dion =  $17\alpha$  Hydroxyprogesteron;  $3\beta$ -Hydroxypregn-5-en-20 = Pregnenolon; Prega-4-en-3,20-dion = Progesteron;  $17\alpha,21$ -Dihydroxypregn-4-en-3,20-dion = Deoxycortisol.

tels radioimmunologischer Analyse [1], wobei in den meisten Fällen eine Vortrennung der mit organischen Lösungsmitteln extrahierten Proben notwendig ist.

Die ersten quantitativen Analysen von Aldosteron wurden von Neher und Wettstein [2] unter Anwendung physikochemischer Methoden berichtet. Kliman und Peterson [3] verwendeten für die Aldosteronbestimmung die Doppelisotopenderivatmethode. Für die Aussagekraft der radioimmunologischen Aldosteronbestimmung ist, je nach Art der Vortrennung, die Spezifität des verwendeten Antikörpers von Bedeutung. Es wurden jedoch auch hochspezifische Antikörper für radioimmunologische Verfahren entwickelt, die die Erfassung von Aldosteron aus dem Rohextract ohne vorherige Chromatographie erlauben [4-6]. Trotzdem überwiegen heute Methoden, die vor der radioimmunologischen Bestimmung eine Reinigung des Extraktes durchführen, wobei überwiegend die Papierchromatographie [7] und die Säulenchromatographie [8,9] verwendet wurden. Auch Vortrennungen mittels Verteilungschromatographie nach Periodat-Oxydation [10], oder Dünnschichtchromatographie (DC) [11] sind bekannt.

In Voruntersuchungen konnte gezeigt werden, dass verschiedene Verfahren zur Bestimmung des Aldosterons zu unterschiedlichen Ergebnissen führen können [12]. Es wurde daher ein Analysengang gesucht, der ein exaktes und möglichst vollständiges Abtrennen des Aldosterons von anderen Steroiden ermöglicht und dadurch eine Störung des Radioimmunoassays durch möglicherweise kreuzreagierende Substanzen weitgehend ausschließt.

## MATERIAL

### (1) *Steroide*

(a) *Unmarkierte Steroide.* Aldosteron (A 6628; Sigma, St. Louis, Mo., U.S.A.),  $3\beta$ ,  $5\alpha$ -Tetrahydroaldosteron (Ikapharm 2601),  $3\beta$ ,  $5\beta$ -Tetrahydroaldosteron (Ikapharm 2606), 18-Hydroxy-Deoxycorticosteron (Q-1630; Steraloids, Pawling, N.J., U.S.A.) und 18-Hydroxy-Corticosteron (Ikapharm 1722).

(b) *Markierte Steroide.* Für die Untersuchung der Trenneigenschaften der einzelnen Laufmittel wurden die Steroide in tritiiertem Form zugesetzt und mittels eines Dünnschichtscanners (Berthold LB) auf den Platten lokalisiert. Tritiiertes Aldosteron wurde als Zusatz zu den Proben für die Bestimmung der Aufarbeitungsverluste verwendet. Folgende Steroide wurden nach vorhergehender DC-Reinheitsprüfung eingesetzt:  $[1,2\text{-}^3\text{H}]$  Aldosteron (50 Ci/mmol),  $[7\text{-}^3\text{H}]$  Androstendion (3 Ci/mmol),  $[1,2\text{-}^3\text{H}]$  Cortisol (50 Ci/mmol),  $[1,2\text{-}^3\text{H}]$ -Deoxycorticosteron (40 Ci/mmol),  $[1,2\text{-}^3\text{H}]$  Testosteron (50 Ci/mmol),  $[7\text{-}^3\text{H}]$ -Dehydroepiandrosteron (17 Ci/mmol),  $[7\text{-}^3\text{H}]$   $17\alpha$ -Hydroxy-Pregnenolon (10 Ci/mmol),  $[7\text{-}^3\text{H}]$   $17\alpha$ -Hydroxy-Progesteron (10 Ci/mmol),  $[7\text{-}^3\text{H}]$ -Pregnenolon (17 Ci/mmol),  $[1,2\text{-}^3\text{H}]$  Progesteron (50 Ci/mmol) (alle Radiochemical Centre, Amersham, Gross Britannien);  $1,2\text{-}^3\text{H}$ -Deoxycortisol (40 Ci/mmol, NEN).

### (2) *Diverses Material und Reagentien*

Alle Pipettierschritte erfolgten mit Brand-Pipetten. Polystyrolröhrchen (Nunc) wurden für die radioimmunologische Analyse verwendet.

$\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ , Cyclohexan und Essigsäureäthylester wurden in p.a.-Reinheitsgrad von der Fa. Merck (Darmstadt, B.R.D.) bezogen und ohne weitere Reinigung eingesetzt. Weitere Chemikalien: Bovine Serum Albumin (Calbiochem, Los Angeles, Calif., U.S.A.), Kieselgel-G Platten (20 × 20 cm; Merck), Dextran (Fluka, Buchs, Schweiz), Charcoal (Schwarz-Mann, Orangeburg, N.Y., U.S.A.), 2,5-Diphenyloxazolyl (PPO), 1,4-Bis-[2-(5-Phenyloxazolyl)]-Benzol (POPOP), Toluol (Packard, Downers Grove, Ill., U.S.A.), Triton X-100 (Serva, Heidelberg, B.R.D.).

Antisera gegen Aldosteron-Disuccinat (Lot 088, NIH) in einer Endverdünnung von 1:500,000 diente für die Bestimmung von Aldosteron im Harn. Antiserum gegen Aldosteron-Oxim (Institut für Pharmakologie der Univ. Heidelberg; PIH) in einer Endverdünnung von 1:500,000 wurde für die Bestimmung von Aldosteron im Plasma verwendet.

### (3) Arbeitslösungen

Boratpuffer (BP):  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (8.25), NaOH (2.70 g), aqua (dest.) ad 1000 ml. (pH = 8.0 mit HCl). Serum-Albumin-Borat-Puffer (BPSAM): Bovine Serum Albumin (10.0 g), Methiolat (0.1 g), BP ad 1000 ml (pH = 8.0 mit HCl-NaOH). Aldosteron-Standardlösung: 10  $\mu\text{g}$  Aldosteron pro ml Äthanol. Adsorptionslösung für die ungebundenen Steroide: (a) Radioimmunoassay von Aldosteron im Harn: Dextran (500 mg), Norit (500 mg), BP ad 100 ml (Suspension); (b) Radioimmunoassay von Aldosteron im Plasma: Dextran (100 mg/80 ml BPSAM) = "A"; Norit A (5.0 g/80 ml BPSAM) = "B". "A" und "B" werden im Verhältnis 3:1 gemischt. Szintillationslösung: POPOP (1.5 g) und PPO (55.0 g) werden in 3330 ml Triton X-100 und 6670 ml Toluol gelöst.

## METHODIK UND ERGEBNISSE

### (I) Aufarbeitung der Proben

(a) *Aldosteron-18-Glucuronid im Harn.* 0.5 ml des Tagesurines (24-Stunden-Menge; gesammelt mit 15 ml 6 N HCl) werden mit 1000 cpm [ $1,2\text{-}^3\text{H}$ ] Aldosteron für die Ausbeutekontrolle versetzt und bei pH 1 ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  konz.) 20 Stunden im Dunkel bei Zimmertemperatur hydrolysiert. Die Aldosteronextraktion erfolgt anschliessend mit 7.5 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Nach der Extraktion wird die organische Phase abgetrennt, und die  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  Phase einmal mit 0.5 ml eisgekühlter NaOH (0.1 N), sowie zweimal mit eiskaltem Wasser (dest.) gewaschen und über Watte filtriert. Der gewaschene Extrakt wird unter Stickstoff zur Trockene eingengt und in 50  $\mu\text{l}$   $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  resuspendiert, dünnschichtchromatographiert, die aldosteronhaltige Zone (1.5 × 1 cm) in der Folge von der Platte abgeschabt und mit 1 ml BPSAM eluiert. Aliquote dieses Eluates werden für die Bestimmung des Aufarbeitungsverlustes (200  $\mu\text{l}$ ) und für die radioimmunologische Bestimmung (3 × 100  $\mu\text{l}$ ) verwendet.

(b) *Aldosteron im Plasma.* 2 ml Heparinplasma werden mit 10 ml Wasser (dest.) und 1000 cpm [ $1,2\text{-}^3\text{H}$ ] Aldosteron versetzt und mit 100 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  extrahiert. Danach wird die organische Phase zur Trockene eingengt, in etwa 50  $\mu\text{l}$   $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  resuspendiert und der DC zugeführt. Die jeweilige Aldosteronzone (1.5 × 1 cm) wird von der Platte abgeschabt und mit 1.5 ml BPSAM eluiert.

Für die Erfassung der Aufarbeitungsverluste, sowie für die radioimmunologische Bestimmung werden je 400  $\mu$ l eingesetzt.

### (II) Die Dünnschichtchromatographie

Die Abtrennbarkeit des Aldosterons von verschiedenen Steroiden wurde in vier Laufmittelsystemen untersucht (Tabelle I). Als Prüfsubstanz dienten 13 willkürliche gewählte, tritiierte Steroide aus der Mineralo-, der Glucocorticoid- und der Androgenreihe. Die Lokalisation von Aldosteron in unbekanntem Harn- und Plasma proben erfolgte stets mittels eines parallel laufenden [ $1,2\text{-}^3\text{H}$ ]Aldosterons (10.000 cpm). Die Detektion der markierten Substanz wurde mit einem DC-Scanner (Berthold LB-2723) durchgeführt. Die Charakterisierung der einzelnen Steroide erfolgte mittels ihres relativen, auf Progesteron bezogenen  $R_F$ -Wertes ( $R_{Po}$ ).

Die beste Abtrennung von Aldosteron wurde mit dem System Cyclohexan-Äthylacetat (20:80) erzielt (WS-1; Fig. 1). In diesem Laufmittelsystem wurden auch Spironolacton ( $R_F = 0.45$ ;  $R_{Po} = 0.54$ ),  $3\beta$ ,  $5\alpha$ - und  $3\beta$ ,  $5\beta$ -Tetrahydroaldosteron, 18-Hydroxy-Corticosteron und 18-Hydroxy-Deoxycorticosteron ( $R_F = 0.0\text{--}0.015$ ;  $R_{Po} = 0.0\text{--}0.018$ ) ausreichend von Aldosteron ( $R_F = 0.08$ ;  $R_{Po} = 0.1$ ) getrennt. Die Ausbeute der extrahierten und dünnschichtchromatographierten Proben ( $\bar{x} \pm \text{S.D.}$ ) betrug für Harn  $54.8 \pm 7.3\%$  ( $n = 40$ ) und für Plasmaproben  $39.1 \pm 4.4\%$  ( $n = 60$ ).

### (III) Die radioimmunologische Bestimmung von Aldosteron

(a) Aldosteron im Harn. Die radioimmunologische Bestimmung von Aldoste-

TABELLE I

#### DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE VON STEROIDEN

Stationäre Phase; Kieselgel-G (0.25 mm),  $20 \times 20$  cm. Mobile Phase: WS-1 = Cyclohexan-Äthylacetat (20:80); WS-2 = Cyclohexan-Äthylacetat (45:55); WS-3 = Benzol-Aceton (75:25); WS-4 = Benzol-Aceton (50:50).

Steroid	System WS-1		System WS-2		System WS-3		System WS-4	
	$R_F$	$R_{Po}$	$R_F$	$R_{Po}$	$R_F$	$R_{Po}$	$R_F$	$R_{Po}$
Aldosteron	0.08	0.10	0.02	0.03	0.07	0.10	0.41	0.46
Cortisol	0.23	0.27	0.06	0.10	0.15	0.23	0.57	0.64
Corticosteron	0.24	0.28	0.06	0.10	0.24	0.36	0.66	0.74
Cortison	0.28	0.33	0.075	0.12	0.22	0.33	0.58	0.65
11-Deoxycortisol	0.48	0.57	0.22	0.36	0.35	0.53	0.69	0.77
Deoxycorticosteron	0.55	0.65	0.28	0.46	0.51	0.87	0.79	0.88
Testosteron	0.61	0.73	0.37	0.61	0.48	0.73	0.76	0.85
17- $\alpha$ -Hydroxy-Pregnenolon	0.75	0.89	0.46	0.76	0.46	0.70	0.75	0.84
Androstendion	0.76	0.90	0.46	0.76	0.63	0.96	0.82	0.92
Dehydroepiandrosteron	0.77	0.92	0.49	0.81	0.54	0.83	0.77	0.86
17- $\alpha$ -Hydroxy-Progesteron	0.80	0.95	0.46	0.76	0.54	0.83	0.78	0.87
Pregnenolon	0.83	0.98	0.59	0.98	0.55	0.84	0.80	0.89
Progesteron	0.84	1.00	0.60	1.00	0.65	1.00	0.89	1.00

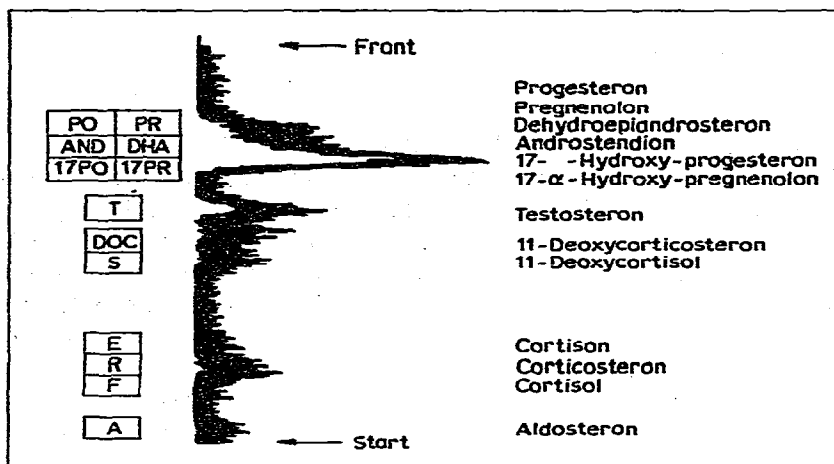


Fig. 1. Die Steroidtrennung im Laufmittelsystem: Cyclohexan-Äthylacetat (20:80).

ron in den Eluatzen (je 100  $\mu$ l; siehe Ia erfolgte dreifach in Polystyrolröhrchen. Die Eichkurve (Fig. 2) des radioimmunologischen Ansatzes umfasste die Absolutwerte 0, 20, 50, 100, 200, 400, 800 und 1000  $\mu$ g Aldosteron in äthanolischer Lösung. Das Standardmaterial wurde bei 40° in einem Vakuumtrockenschrank zur Trockene gebracht und danach in 100  $\mu$ l BPSAM aufgenommen. Anschliessend wurden 10,000 cpm [1,2-<sup>3</sup>H] Aldosteron in 100  $\mu$ l BPSAM und Antialdosterondisuccinatlösung (900  $\mu$ l; 1:500,000) im Eisbad zugesetzt. Der Ansatz wurde 30 min bei 30°, sowie 60 min bei 4° inkubiert, und die Inkubation anschliessend durch Zusatz von 500  $\mu$ l einer Tierkohle-Dextran-Suspension (siehe Material 3a) beendet. Die Proben wurden nach weiteren 10 min bei 3000 rpm und 4° zentrifugiert, der Überstand dekantiert und mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit in einem Flüssigkeitsszintillationszähler (Packard, Modell 2450) gemessen. Die Berechnung der Aldosteronexkretion von je 24 h erfolgte entsprechend:

$$\frac{x \cdot V}{A \cdot 5} \quad \mu\text{g Aldosteron pro 24 h}$$

wobei

$x$  = unkorrigierter Wert (ng pro 0.5 ml),  $V$  = Harnvolumen (ml pro 24 h) und  $A$  = Ausbeute (%).

**Aldosteron im Plasma.** Hier wurden jeweils Doppelwerte des BPSAM-Extraktes (je 400  $\mu$ l) aus der Aldosteronzone der DC eingesetzt. Die Messpunkte der Eichkurve (Fig. 2) wurden wie unter IIIa gehandhabt. Hier umfasste die Eichkurve die Mengen von 0, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 400, 800 und 1000  $\mu$ g Aldosteron absolut. Allen Proben wurde [1,2-<sup>3</sup>H] Aldosteron (300 cpm; 10  $\mu$ g) und Antialdosteron-Lösung (1 ml; 1:500,000) zugesetzt. Die Inkubationszeit betrug 15 h bei 4° und wurde durch Zusatz von 150  $\mu$ l der Tierkohle-Dextran-Lösung (siehe Material 3b) beendet. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie unter IIIa beschrieben. Die Aldosteronkonzentration im Plasma wurde berechnet als:

$$\frac{x \cdot 5}{A} = \text{ng Aldosteron pro 100 ml}$$

wobei

$x$  = unkorrigierter Wert (pg pro 2 ml) und  $A$  = Ausbeute (%).

(c) *Die Beurteilung des analytischen Systems.* Die Wiederfinderate exogen zugesetzten Aldosterons ( $\bar{x} \pm \text{S.D.}$ ) betrug für Harnproben  $80.6 \pm 9\%$  ( $n = 32$ ) und für Plasma proben  $90.1 \pm 4.2\%$  ( $n = 13$ ). Die Präzision der Methode wurde durch zehnfache Bestimmung der Aldosteronkonzentration in jeweils zwei Ansätzen für verschiedene Hormonkonzentrationen geschätzt (Tabelle II). Der mittlere Variationskoeffizient (V.K.) der Harnaldosteronbestimmung betrug für den unteren Messbereich 8.2% und für eine hohe Aldosteronkonzentration 14.5%. Bei der Bestimmung des Plasmaaldosterons betrug der mittlere V.K. bei niedriger Aldosteronkonzentration 18.9%, bei mittlerer Aldosteronkonzentration 10.9% und bei hoher Aldosteronkonzentration 7.8%.

Die Empfindlichkeit ( $2 \text{ S.D.} \times 100/\bar{x}$ ) der Methode betrug dementsprechend für niedere Aldosteronwerte  $0.04 \mu\text{g}$  pro 100 ml (Harn), bzw.  $4.4 \text{ ng}$  pro 100 ml (Plasma) und für den oberen Messbereich  $0.48 \mu\text{g}$  pro 100 ml (Harn), bzw.  $21.5 \text{ ng}$  pro 100 ml (Plasma).

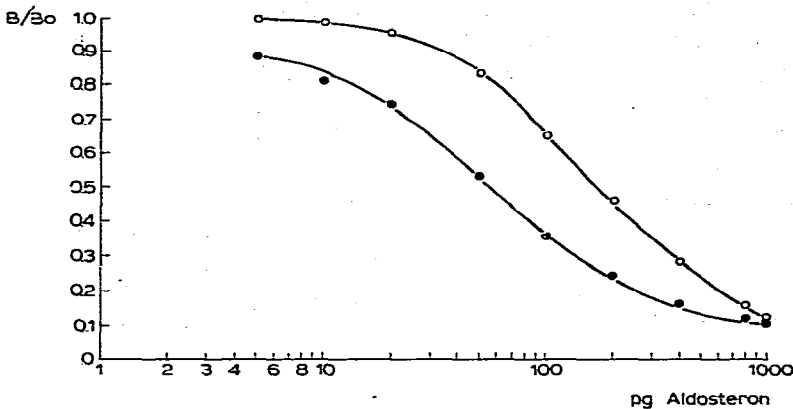


Fig. 2. Verlauf der Eichkurven für Aldosteron bei Verwendung des Antikörpers gegen (●) Aldosteron-Oxim (PIH; Plasma) und (○) Aldosteron-16,21-Disuccinat (NIH, LOT).

## TABELLE II

### ERGEBNISSE DER BESTIMMUNG VON ALDESTERON IN HARN UND PLASMA

Aldosteron im Harn ( $\mu\text{g}$ pro 100 ml)		Aldosteron im Plasma (ng/ml)	
Ansatz	$\bar{x} \pm \text{S.D.}$ ( $n = 10$ )	Ansatz	$\bar{x} \pm \text{S.D.}$ ( $n = 10$ )
A1	$1.77 \pm 0.21$	A1	$141.0 \pm 13.0$
2	$1.53 \pm 0.26$	2	$134.7 \pm 8.5$
B1	$0.29 \pm 0.02$	B1	$22.1 \pm 3.4$
2	$0.21 \pm 0.02$	2	$18.5 \pm 1.2$
		C1	$11.0 \pm 2.7$
		2	$12.8 \pm 1.7$

Die Kreuzreaktion der verwendeten Antikörper gegen Aldosteron-Disuccinat (NIH, Lot 088; Harn) und Aldosteron-Oxim (PIH; Plasma) mit verschiedenen im Plasma in höherer Konzentration vorkommenden Steroiden und deren Tetrahydroverbindungen ist in Tabelle III zusammengestellt. Eine starke Kreuzreaktion von Anti-Aldosteron-Oxim mit Tetrahydroaldosteron ist erkennbar.

TABELLE III

KREUZREAKTIONEN (%) EINIGER STEROIDE MIT DEN VERWENDETEN ALDOSTERON-ANTISERA

Antikörper gegen		
Steroid	Aldosteron-Disuccinat	Aldosteron-Oxim
Cortisol	<0.01	<0.1
Cortison	0.06	<0.1
Corticosteron	<0.01	<0.1
Deoxycortisol	0.06	<0.1
Deoxycorticosteron	<0.01	<0.1
3 $\beta$ , 5 $\alpha$ -Tetrahydroaldosteron	1.00	7.0
3 $\beta$ , 5 $\beta$ -Tetrahydroaldosteron	0.20	7.0
Tetrahydrocortisol	<0.01	<0.1
Tetrahydrocortison	<0.01	<0.1
Tetrahydrodeoxycortisol	<0.01	<0.1
Tetrahydrodeoxycorticosteron	<0.01	<0.1

## DISKUSSION

Die kovalente Bindung von Steroiden im Sinne eines Haptens an ein Trägerprotein ermöglichte es, Steroiden antigene Eigenschaften zuzuordnen [13]. Die radioimmunologische Bestimmung von Aldosteron verwendet die auf diese Weise gewonnenen Antikörper unterschiedlicher Spezifität als Trägerprotein des analytischen Systems, wobei der Mehrzahl der beschriebenen Methoden eine Vorreinigung der zu untersuchenden Proben durchgeführt wird [7–11]. Die Vorreinigung der Proben erscheint vor allem deswegen notwendig, weil die sogenannte Spezifität eines Antikörpers chemisch gesehen geringe Aussagekraft besitzt und nur bekannte Kreuzreaktionen ausschliessen kann. Da die Spezifität eines Antikörpers in der Mehrzahl der Fälle durch Beschreibung von Kreuzreaktionen mit handelsüblichen Steroiden festgestellt wird, bleibt jedoch unberücksichtigt, dass möglicherweise auch isomere Steroidformen, artverwandte Moleküle, unbekannte Metaboliten oder exogene Substanzen, wie Arznei- und Lebensmittel mit dem Antikörper reagieren und damit zu falschen Messwerten führen können. In diesem Sinn fand sich bei dem verwendeten Antikörper gegen Aldosteron-Oxim eine starke Kreuzreaktion mit beiden isomeren Tetrahydroaldosteronen. Ebenso wurden bei Bestimmung von Aldosteron in biologischem Material mit verschiedenen Antikörpern unterschiedliche Messwerte für die untersuchten Proben beobachtet, die durchwegs höher lagen als die nach chromatographischer Reinigung gefundenen Werte [12]. Zudem ist auch zu be-

achten, dass ein und dasselbe kreuzreagierende Material in Abhängigkeit von der jeweiligen Antikörperbindung zu erheblichen Unterschieden der gewonnenen Messwerte führt [14].

Die vorliegende Methode der Aldosteronbestimmung versucht die Aussagekraft des radioimmunologischen Indikatorsystems unabhängig von einer allfälligen Kreuzreaktion des verwendeten Antikörpers mit anderen Substanzen, durch eine genaue Beschreibung des Steroidverhaltens in dem dem Radioimmunoassay vorgeschalteten Reinigungsschritt zu verbessern. Die Anwendung einer derartigen Modifikation des analytischen Systems ist stets dann zu fordern, wenn eine absolute Aussage über das Verhalten eines einzelnen Steroids, z.B. von Aldosteron, in biologischem Material gemacht werden soll. Auf diese Weise wird die Gefahr einer Verfälschung der Messergebnisse durch Fremdeinflüsse herabgesetzt, und eine Optimierung der analytischen Verhältnisse erreicht. Der analytische Aufwand ist vertretbar und erlaubt die Aufarbeitung von 80 Proben je Arbeitswoche und Arbeitskraft.

#### ZUSAMMENFASSUNG

Die beschriebene Methode ermöglicht eine genaue und rasche Bestimmung von Aldosteron im Harn und Plasma. Die Zuverlässigkeit der Bestimmung ruht auf der Abtrennung des Aldosterons von Verunreinigungen und anderen Steroiden mittels Dünnschichtchromatographie im Laufmitteln Cyclohexan-Äthylacetat (20:80). Aus dem Plasma werden die Steroide direkt, aus dem Harn nach Hydrolyse mit Schwefelsäure (pH = 1) mit Dichlormethan extrahiert.

Die Ausbeute des Analysenganges nach der Vorreinigung und vor der radioimmunologischen Bestimmung des Aldosterons beträgt  $54.8 \pm 7.3$  (S.D.) % ( $n = 40$ ) für Harnproben, und  $39.1 \pm 4.4\%$  ( $n = 60$ ) für Plasmaproben. Der Variationskoeffizient (V.K.) beträgt für wiederholte Bestimmung von Aldosteron im Harn im unteren Messbereich 8.2% ( $n = 10$ ) und für hohe Werte 14.5% ( $n = 10$ ). Für Plasma Bestimmungen sind die entsprechenden Werte des V.K. 18.9% ( $n = 10$ ) und 7.8% ( $n = 10$ ). Die Empfindlichkeit der Analysen im unteren Messbereich beträgt für Aldosteron im Harn  $0.04 \mu\text{g}$  pro 24-h Volumen ( $n = 10$ ) und im Plasma  $4.4 \text{ ng}$  pro 100 ml ( $n = 10$ ). Der Analysengang vermeidet die Gefahr der fälschlichen Bestimmung von mit dem Antikörper im radioimmunologischen System kreuzreagierenden Substanzen (Steroide).

#### REFERENCES

- 1 P. Vecsei und K.H. Gless, Aldosteron Radioimmunoassay, Enke, Stuttgart, 1975.
- 2 R. Neher und A. Wettstein, J. Clin. Invest., 35 (1956) 800.
- 3 B. Kliman und R.E. Peterson, J. Biol. Chem., 235 (1974).
- 4 W. Vetter, H. Vetter und W. Siegenthaler, Acta Endocrinol., 74 (1974) 548.
- 5 W. Vetter, H. Vetter und W. Siegenthaler, Acta Endocrinol., 74 (1974) 558.
- 6 Pham-Huu-Trung, T. Marie und P. Corvol, Steroids, 24 (1974) 587.
- 7 F. Bayard, J.Z. Beitins, A. Kowarski und C.J. Migeon, J. Clin. Endocrinol., 31 (1970) 1.
- 8 T. Ito, J. Woo, R. Haning und R. Horton, J. Clin. Endocrinol., 34 (1972) 106.



- 9 W. Waldhäusl, H. Haydl und H. Frischauf, *Steroids*, 20 (1972) 727.
- 10 R.W. Farmer, D.H. Brown, P.Y. Howard und F.L. Fabre, Jr., *J. Clin. Endocrinol.*, 36 (1973)1.
- 11 K. Parth, H. Zimprich und R. Brunel, *Acta Endocrinol.*, 81 (1976) 330.
- 12 K. Herkner, P. Nowotny und W. Waldhäusl, *W. Klin. Wschr.*, 88 (Suppl. 1) (1975) 29.
- 13 B.F. Erlanger, F. Borek, S.M. Beiser und S. Lieberman, *J. Biol. Chem.*, 228, (1957) 713.
- 14 T.P. Jowett, J.D.H. Slater, R.D. Piyasema und R.P. Ekins, *Clin. Sci. Mol. Med.*, 45 (1973) 607.