

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.
12. Jg. 1974, S. 128–133

Radioimmunologische Bestimmung von Aldosteron im Plasma¹⁾

Von F. Klumpp, R. Rössler und D. Klaus

Medizinische Poliklinik der Universität Marburg und Medizinische Poliklinik der Universität Tübingen

(Eingegangen am 10. August 1973/2. Januar 1974)

Herrn Professor Dr. med. F. Heni zum 65. Geburtstag

Es wird eine modifizierte radioimmunologische Methode für die Bestimmung der Aldosteronkonzentration beschrieben, für die 2 ml Plasma erforderlich sind. Die Aldosteron-Antikörper wurden vom Kaninchen gewonnen, die Extraktion des Aldosterons aus dem Plasma erfolgte mit Dichlormethan und anschließender Chromatographie in Benzol-Methanol-Wasser. Dabei trat ein Aldosteronverlust von im Durchschnitt 50% auf, der in jedem Ansatz durch Zusatz einer bekannten Menge von [1,2-³H] Aldosteron genau berechnet werden konnte. Der radioimmunologische Ansatz erfolgte mit einem 1:400 verdünntem Antiserum. Die Trennung von freiem und an Antikörper gebundenem [1,2-³H] Aldosteron wurde mit einer Kohle-Dextran-Suspension durchgeführt. Die Genauigkeit der Methode und die Wiederfindungsrate von zugesetztem Aldosteron wurden getrennt in 2 Laboratorien geprüft. Untersuchungen über die Kreuzreaktion der Antikörper mit anderen Steroiden zeigen, daß durch das angewandte Verfahren eine ausreichende Isolierung des Aldosterons stattfindet. Bei 35 Gesunden erhielten wir eine Plasma-Aldosteron-Konzentration von 154 ± 57 ng/l. Bei 3 Patienten mit unbehandeltem Morbus Addison war die Plasma-Aldosteron-Konzentration auf Werte unter 10 ng/l vermindert, bei 2 Patienten mit Aldosteron-sezernierenden Nebennierenrindenadenomen auf das 4–6fache erhöht.

Radioimmunassay of aldosterone in plasma

A radioimmunological method for the estimation of the plasma-aldosterone level in man, using 2 ml of plasma, is described. The aldosterone antibodies were obtained from rabbits. The aldosterone is extracted from plasma by dichloromethane. Subsequent chromatography is performed in benzene-methanol-water. The mean loss of aldosterone is 50%. The loss during the extraction procedure was exactly calculated by adding a known amount of [1,2-³H] Aldosterone to every sample before extraction. The radioimmunoassay was performed with an antiserum diluted 1:400. The separation of free and bound aldosterone was accomplished by a charcoal-dextran suspension.

The accuracy of the method, tested in 2 different laboratories lies below 18%. Tests on cross reaction of antibody with other steroids show that the method provides a sufficient separation of aldosterone. In 35 healthy persons we found an aldosterone plasma level of 154 ± 57 ng/l. In 3 untreated patients suffering from adrenal insufficiency the aldosterone plasma level was less than 10 ng/l and in 2 patients with aldosterone-producing adenomas of the adrenal gland it was 4–6 times higher than in normal persons.

Radioimmunologische Verfahren haben sich in der klinischen Chemie für die Bestimmung von Hormonen und Substanzen, die in Körperflüssigkeiten in kleinsten Konzentrationen vorliegen, einen festen Platz erobert. Auch für den Nachweis von Aldosteron im Plasma wurden radioimmunologische Verfahren (1, 2) entwickelt, deren Hauptschwierigkeit weniger in der radioimmunologischen Bestimmung von Aldosteron selbst, sondern in der Extraktion des Hormons aus dem Plasma und der Erfassung des dabei auftretenden Verlustes liegt. Ein Nachteil der von Bayard et al (1) angegebenen Methode besteht in der großen Plasmaausgangsmenge von 5 ml, die für die Bestimmung erforderlich ist und in der Schwierigkeit, den Verlust von Aldosteron in der Einzelprobe genau zu erfassen. Der Nachteil der Methode von Mayes (2) besteht beim immunologischen Ansatz in der ungenügenden Trennung von freiem und gebundenem Aldosteron durch Ammoniumsulfat. Wir haben daher eine Methode entwickelt, die die Vorteile beider angegebener Verfahren vereinigt und ihre Nachteile vermeidet.

Methodik

Herstellung der Antikörper nach Bayard et al (1)

Acetylierung des Aldosteron-21-monoacetat (3)

10 mg Aldosteron-21-monoacetat²⁾ wurden bei 37° C für 24 Stunden in einem Vakuumexsiccator, der CaCO₃-Granula enthält, mit 5 µl Essigsäureanhydrid (Merck Nr. 42) und 5 µl Pyridin (Merck Nr. 7460) inkubiert. Dabei findet eine Acetylierung statt und es entsteht Aldosteron-18-21-diacetat. Das Gemisch wird dann in 0,5 ml bidest. Wasser gelöst und mit 8 Vol-Teilen Dichlormethan und 8 Vol-Teilen bidest. Wasser gereinigt.

Nach Eindampfen des Dichlormethans bleibt als Rückstand gereinigtes Aldosteron-18-21-diacetat zurück.

Herstellung eines Aldosteron-Albumin-Komplexes

Das aus 10-mg Aldosteron-monoacetat gewonnene Aldosteron-diacetat wurde mit 10 mg Natriumacetat (Merck Nr. 6268) und 5 mg Carboxy-methoxylamin-hemihydrochlorid (Cal-Biochem) versetzt. Das Gemisch wurde mit 5 ml Methanol für 18 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Das dabei entstandene Aldosteron-3-Carboxymethoxim-18-21-diacetat

¹⁾ Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft

²⁾ Der Firma Ciba. A.G., Grenzach/Baden danken wir für die Überlassung von Aldosteron und Aldosteron-21-monoacetat.

wurde in 20 ml bidest. Wasser gelöst und mit 200 ml Essigsäureaethylester (Merck Nr. 9623) extrahiert. Der Extrakt wurde im Rotationsverdampfer eingedampft. Zum mit 0,5 ml H₂O aufgelösten Rückstand wurden 100 mg Kaninchen-Albumin und 200 mg 1-Äthyl-3-(β -dimethylaminopropyl)-carbodiimidhydrochlorid, gelöst in 0,25 ml H₂O, hinzugefügt. Diese Carbodiimidierung ist für die Koppelung des Aldosterons an das Protein notwendig (4, 5). Das Gemisch wurde dann mit 5 ml bidest. Wasser verdünnt. Anschließend erfolgte eine 48stündige Dialyse gegen 20 l H₂O bei 4° C.

Immunisierung

Es wurde eine Emulsion des Protein-Steroid-Komplexes (110 mg) mit 5 ml Freund'schem Adjuvans hergestellt. Von dieser Emulsion injizierten wir jedem von 5 Kaninchen je 1 ml subcutan in den Nacken. Es erfolgten 6 Injektionen in 4 bis 5wöchigen Abständen.

Antikörpertestung

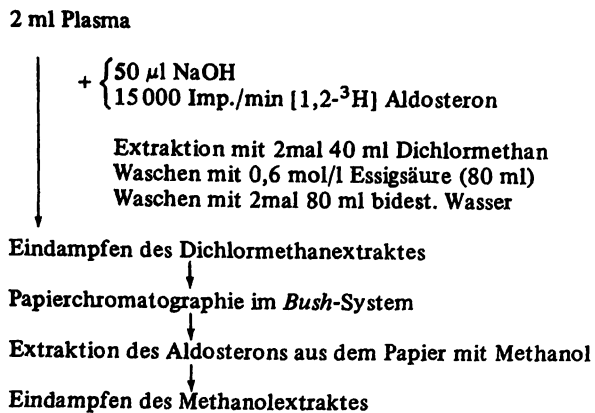
Die Testung der Kaninchenserum auf Antikörper gegen Aldosteron erfolgte ab der 4. Injektion. Nur bei einem von 5 Kaninchen wurden Antikörper erhalten, die erstmals 7 Tage nach der 4. Injektion festgestellt werden konnten und nach weiteren 2 Injektionen den höchsten Titer erreichten. Das Serum dieses Tieres wurde in 0,1 ml Portionen bei - 22° C aufbewahrt; der Antikörpertiter hat sich seit 18 Monaten nicht geändert.

Zur Prüfung der Kaninchenserum auf Antikörper wurden zunehmende Serumverdünnungen mit verschiedenen [1,2³H] Aldosteron-Mengen inkubiert ([1,2³H] Aldosteron, spezifische Aktivität von 50–52 Ci/mMol, Fa. Amersham, England). Die zugefügte [1,2³H] Aldosteronmenge, verdünnt in lysozymhaltigem (0,1%) 0,1 mol/l Tris-Acetatpuffer, pH 7,4, betrug 500, 1000, 1500, 2000 und 4000 Imp./min. Wir verwendeten Serumverdünnungen von 1:100, 1:400, 1:800 und 1:1600. Im Testansatz wurden 0,1 ml Serumverdünnung und 0,1 ml [1,2-³H] Aldosteron in einem Gesamtvolumen von 0,5 ml (aufgefüllt mit Tris-Acetatpuffer) für eine halbe Stunde bei Raumtemperatur und 2 Stunden bei 4° C inkubiert. Nach der Inkubation wurde eine Trennung mit 0,5 ml Kohle-Dextran-Suspension (400 mg Aktivkohle und 40 mg Dextran 70 in 100 ml Tris-Acetatpuffer pH 7,4) durchgeführt. Das nicht an Antikörper gebundene [1,2-³H] Aldosteron wird hierbei an die Kohle adsorbiert. Nach 10minütiger Kontaktzeit bei 4° C werden die Proben für 20 Minuten bei 4° C und bei 3000 g zentrifugiert. Der Überstand, d. h. die antikörpergebundene Fraktion des [1,2-³H] Aldosterons wurde im Flüssigkeitszintillationszähler (Fa. Packard) je 10 Minuten lang gezählt. Als Szintillationsflüssigkeit (10 ml je Probe) verwendeten wir anfangs Bray'sche Lösung, später Insta-Gel (Fa. Packard). Die stärkste Bindung erhielten wir bei einer Serumverdünnung von 1:400 und bei einer [1,2-³H] Aldosteronmenge mit einer Impulsrate von 1200 bis 1700 Imp./min, die etwa 8–10 pg markiertem Aldosteron entspricht. Die Bindung der zugefügten Aktivität betrug bei der genannten Verdünnung und Aktivität 50–70%. Bei stärkerer Verdünnung des Antiserums und bei höherer Aktivität des zugefügten [1,2-³H] Aldosterons war die maximale Bindung vermindert.

Extraktion und Chromatographie des Aldosterons aus dem Plasma

Zu 2 ml Heparinplasma wurden etwa 15 000–17 000 Imp./min [1,2-³H] Aldosteron (entspricht etwa 100 pg Aldosteron) gelöst in Äthanol und 50 μ l NaOH hinzugefügt (Tab. 1). Diese Lösung wurde zweimal mit je 40 ml Dichlormethan extrahiert. Um das Aldosteron möglichst vollständig zu extrahieren, wird zweimal je 10 Minuten geschüttelt. Der Dichlormethan-Extrakt wurde anschließend einmal mit 70 ml 0,1 mol/l Essigsäure und zweimal mit 70 ml bidest. Wasser gewaschen. Der Dichlormethan-Extrakt wurde dann im Becherglas im Abzug eingedampft. Der Rückstand wurde in 1 ml Methanol aufgelöst und auf Chromatographiepapier aufgetragen (Nr. 2043 a mgl, Fa. Carl Schleicher und Schüll). Vor dem Auftragen des Methanolextraktes wurde das Papier mit Methanol gewaschen. Die Chromatographie wurde durchgeführt im Bush-System B₅ (Benzol:Methanol: Wasser Volumina = 20 ml + 10 ml + 10 ml). Die Dauer der

Tab. 1. Extraktion und Isolierung des Aldosterons aus dem Plasma

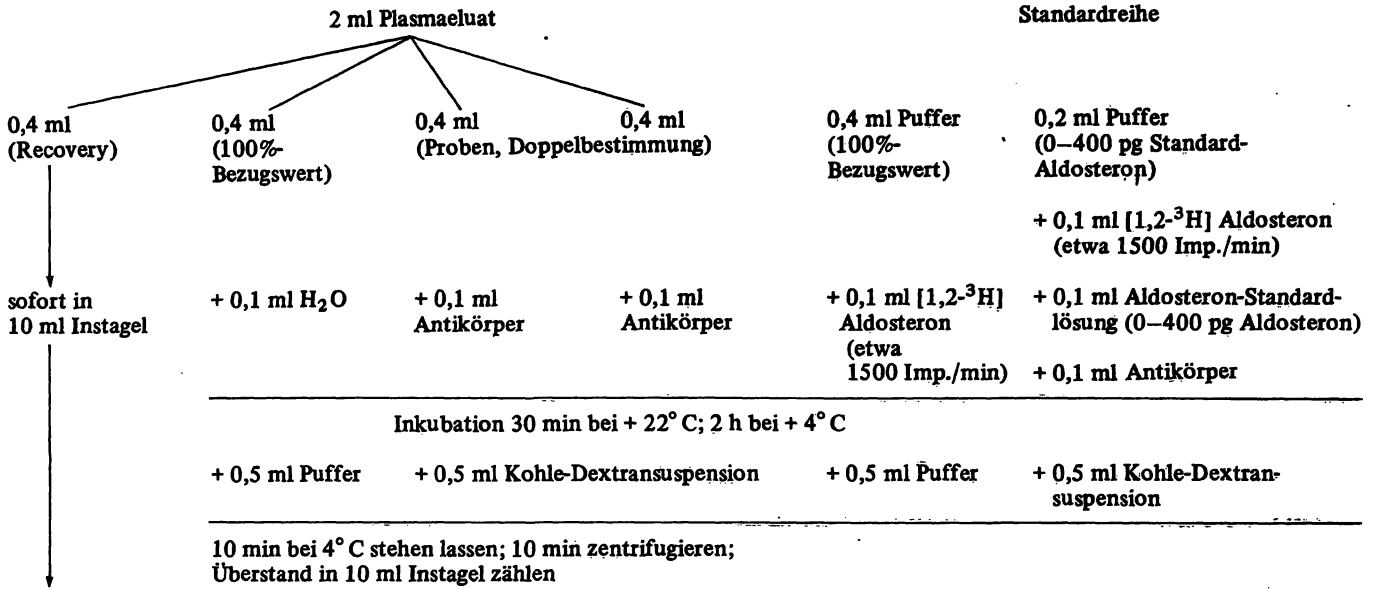


absteigenden Chromatographie betrug 6–8 Stunden bei Raumtemperatur (6, 7, 8). Der R_F-Wert für Aldosteron betrug in diesem System 0,35–0,37. Das zum Vergleich mitchromatographierte Cortisol hatte einen R_F-Wert von 0,22–0,25, Cortison 0,42–0,44. Das radioaktive Aldosteron wird nach der Chromatographie im Papierstreifenabtaster (Scanner der Fa. Packard) lokalisiert. (Bei gleichzeitiger Chromatographie von [1,2-³H] Aldosteron, Cortisol und Cortison kann gezeigt werden, daß die Aldosteron-Bande zwischen der Cortisol- und Cortison-Bande liegt, die im UV-Licht nach Besprühung des Papiers mit 15 proz. Phosphorsäure-Spray fluoreszieren). Nach der Lokalisation von Aldosteron mit Hilfe des Scanners wurden 3 cm des Aldosteron-Peaks ausgeschnitten. Das Papierstückchen wurde in 10 ml Methanol eluiert. Das Eluat wurde eingedampft, der Bodensatz wurde mit 2 ml 0,1 mol/l Tris-Acetatpuffer (pH 7,4 mit 0,1% Lysozym) aufgelöst. Hiermit erfolgt der radioimmunologische Ansatz: Im Verlauf der Extraktion und Chromatographie tritt ein Verlust von 50% auf, der bei der Berechnung berücksichtigt wurde.

Radioimmunologischer Ansatz und Herstellung der Standardkurve

Für den radioimmunologischen Ansatz (Tab. 2) wurden jeweils 0,4 ml des erhaltenen Eluates verwendet (Doppelbestimmung). Dies entspricht bei einem Verlust von 50% während der Isolierung des Aldosterons ungefähr einem Zehntel der zugefügten [1,2-³H] Aldosteronmenge. Der Schwankungsbereich des Gehaltes der Plasmaansätze an markiertem Hormon liegt zwischen 980 und 1890 Imp./min mit einem Mittelwert von 1570 \pm 230 Imp./min [1,2-³H] Aldosteron (siehe Tabelle 2a). Liegt die Ausbeute nach Chromatographie außerhalb dieses Bereichs, wird diese Probe nicht berücksichtigt. Zu diesen Proben wurden 0,1 ml von 1:80 verdünntem Antiserum zugegeben. (Endverdünnung des Antiserums in Inkubationsansatz 1:400). Die Proben wurden 30 Minuten bei Raumtemperatur und 2 Stunden bei 4° C inkubiert. Parallel dazu wurde die gleiche Menge des Plasmaeluates (0,4 ml mit 1500 Imp./min markiertem Aldosteron) ohne Antiserum in einem Gesamtvolumen von 1 ml zur Gewinnung des 100%-Bezugswertes angesetzt (siehe Tabelle 2). Zur Bestimmung der Recovery wurden 0,4 ml des Plasmaeluates ohne Antiserum sofort in ein Szintillationsgefäß gegeben. Zur Gewinnung der Standardkurve wurden bekannte Mengen von unmarkiertem Aldosteron (12,5 pg, 25, 50, 100, 200, 400 pg) mit 0,1 ml verdünntem Antiserum und 0,1 ml [1,2-³H] Aldosteron (1500 Imp./min) in einem Gesamtvolumen von 0,5 ml eine halbe Stunde bei Raumtemperatur und 2 Stunden bei 4° C inkubiert. Als 100%-Bezugswert diente ein Ansatz mit 1500 Imp./min [1,2-³H] Aldosteron ohne Antiserum in einem Gesamtvolumen von 1 ml. Nach der Inkubation wurden zu den Proben der Standardkurve und den Plasmaproben 0,5 ml Kohle-Dextranlösung zugefügt, jedoch nicht zu denjenigen Proben, die für die Gewinnung des 100%-Bezugswertes angesetzt wurden. Nach sorgfältigem Schütteln wurden die Proben

Tab. 2. Immunologischer Ansatz zur Aldosteronbestimmung



10 Minuten bei 4° C und 3000 g zentrifugiert. Die Aktivität im Überstand (an Antikörper gebundene Aktivität) und die Aktivität in den Proben für den 100%-Bezugswert sowie in den Proben des Plasmaeluates wurden im Flüssigkeitsszintillationszähler bestimmt (Zählung: 10 Minuten). Zur Herstellung der Standardkurve wurden die bei den einzelnen Aldosteronmengen gefundenen Werte in Prozent des 100%-Bezugswertes umgerechnet und auf Millimeterpapier aufgezeichnet. Entsprechend wurden für jede Plasmaprobe das prozentuale Verhältnis der gebundenen Fraktion gegenüber dem zugehörigen Plasmabezugswert errechnet und an der Standardkurve die entsprechende Menge Aldosteron in pg abgelesen. Aus der am Anfang des Plasma zugefügten [1,2-³H] Aldosteronmenge (zugefügtes Aldosteron in Imp./min), der Aktivität des für den immunologischen Ansatz verwendeten Eluates (Eluat-Aktivität in Imp./min), dem Plasmaausgangsvolumen (eingesetztes Plasma in ml) und dem in der Standardkurve abgelesenen Wert A (in pg Aldosteron) läßt sich dann die Aldosteronkonzentration in ng/l Plasma umrechnen nach der folgenden Formel:

$$\text{Aldosteronkonzentration (ng/l)} = \frac{\text{Aldosteron (pg)} \cdot \text{zugefügtes Aldosteron (Imp./min)}}{\text{Eluat-Aktivität (Imp./min)} \cdot \text{eingesetztes Plasma (ml)}}$$

Ergebnisse

Standardkurve

Die maximale Bindung der zugefügten [1,2-³H] Aldosteron-Aktivität betrug mit unserem Antiserum bei einer Endverdünnung 1:400 50–70%; bei Zugabe einer Aktivität von 1200–2000 Imp./min [1,2-³H] Aldosteron entsprechend der Aktivität der Plasmaeluate (Tab. 2 a) zeigen die Standardkurven einen gleichartigen Verlauf (Abb. 1). Die Standardkurve läßt sich durch Logit-Transformation mit Auftragen der Standardkonzentration des Aldosterons in logarithmischen Maßstab in eine Gerade umwandeln (9); (siehe Abb. 2). Im Bereich von 12,5 bis 200 pg erlaubt die Logit-Transformation eine höhere Ablesegenauigkeit.

Tab. 2a. Aktivität der Plasmaeluate (0,4 ml) nach Chromatographie

Probe Nr.	Imp./min	Probe Nr.	Imp./min
1	1400	13	1810
2	1890	14	1330
3	1695	15	1620
4	1780	16	1820
5	1420	17	1880
6	1460	18	1630
7	1260	19	1450
8	1580	20	1880
9	1800	21	1540
10	1315	22	1420
11	1660	23	1540
12	980	24	1650

$\bar{x} \pm s = 1570 \pm 230 \text{ Imp./min; } n = 24$

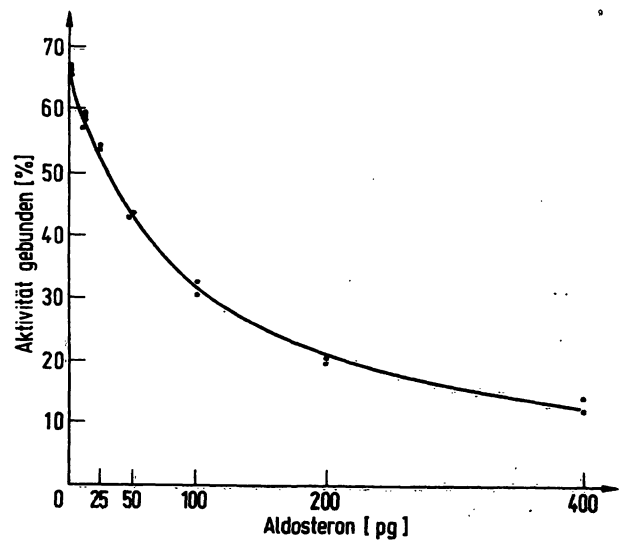


Abb. 1. Standardkurven bei einer Antiserumverdünnung von 1:400 und der zugefügten Aktivität von 1200 bzw. 2000 Imp./min [1,2-³H]-Aldosteron.

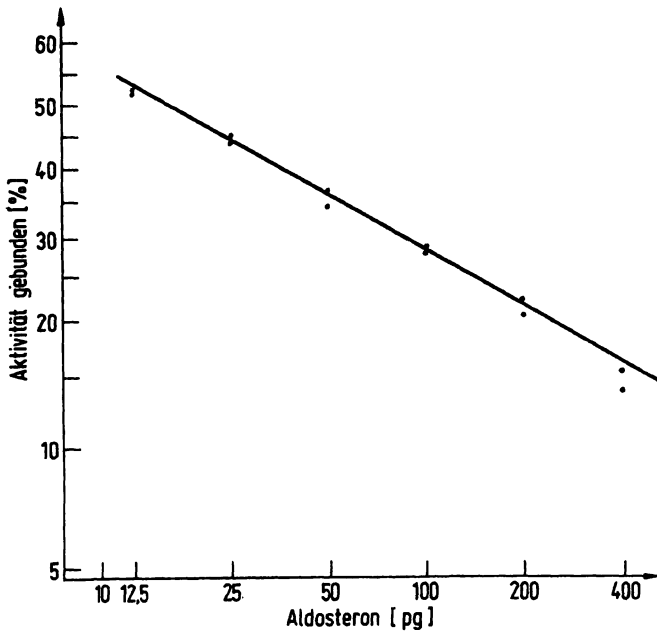


Abb. 2. Logit-Log-Transformation derselben Standardkurve

Empfindlichkeit, Richtigkeit und Präzision der Methode

Die Empfindlichkeit der Methode (Sensitivität) läßt die Bestimmung von 5 ng Aldosteron im Plasma als niedrigster von Null unterscheidbarer Konzentration zu. Die bei jeder Serie mitgeführten Leerwerte liegen unter 50 ng/l; der Einsatz eines reinen Papiereluats ergab 0 ng/l Aldosteron. Die Fehlerbreite des radioimmunologischen Ansatzes beträgt bei Doppelbestimmungen $\pm 11,8\%$. Die Fehlerbreite der gesamten Methode einschließlich der Aldosteronextraktion aus dem Plasma, die mit je 6 Ansätzen von bekannten Mengen nicht markierten Aldosterons (62, 5, 125, 250, 500 und 1000 pg) bestimmt wurde, ist mit $\pm 22\%$ etwas höher (Abb. 3).

Eine Studie über die Präzision der Methode wurde durch vergleichende Bestimmungen von Plasmaproben in unseren beiden Laboratorien durchgeführt. Es ergab sich eine gute Übereinstimmung der Werte (Tab. 3). Die mittlere prozentuale Differenz der Einzelwerte betrug $\pm 17,7\%$ (10).

Kreuzreaktion mit anderen Steroiden (Spezifität der Methode)

Das von uns hergestellte und verwendete Antiserum weist eine Kreuzreaktion mit Corticosteron, Cortisol und Cortison auf. Die Reaktion dieser Steroide in 1000fach höherer Konzentration mit dem Antikörper zeigt Abbildung 4. Bei Annahme einer 50%igen Bindung von Aldosteron beträgt die Kreuzreaktion für Corticosteron 0,8% und für Cortisol und Cortison weniger als 0,1%.

Zur Bestimmung der Interferenz von Cortisol, Cortison und Corticosteron wurden 50 ng Corticosteron und Cortison sowie 250 ng Cortisol mit verschiedenen Men-

Tab. 3. Vergleichende Aldosteronbestimmung gleicher Plasma-proben in zwei verschiedenen Laboratorien.

Marburg [ng/l]	Tübingen [ng/l]	Differenz in %
430	376	12,5
107	107	0
580	350	39,7
220	170	22,8
117	158	26,0
270	294	7,0
149	169	11,8
638	606	5,0
198	173	12,8
342	488	30,0
542	457	15,6
267	266	0,1
163	217	24,8
263	240	8,8
165	152	7,8
107	55	48,6
180	134	25,5
168	212	20,7
46	64	26,3
370	275	25,5
196	197	0,5

Mittlere prozentuale Differenz der Einzelwerte $\pm 17,7\%$

gen von reinem Aldosteron (62,5, 125, 250, 500 und 1000 pg Aldosteron) extrahiert und chromatographiert. Abbildung 3 zeigt, daß eine Trennung des Aldosterons

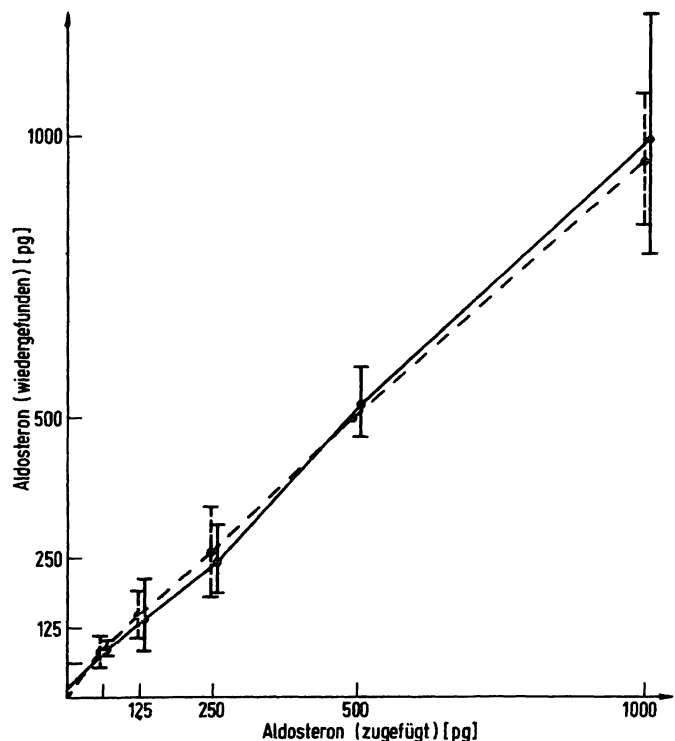


Abb. 3. Wiedergefundenes Aldosteron in pg nach Extraktion und Chromatographie von 62,5-100 pg Aldosteron bei gleichzeitiger Zugabe von 50 ng Cortison, 50 ng Corticosteron und 250 ng Cortisol. (Durchgezogene Linie: Wiedergefundenes Aldosteron in pg bei alleiniger Zugabe von Aldosteron; gestrichelte Linie: Wiedergefundenes Aldosteron in pg bei gleichzeitiger Zugabe von Cortisol, Corticosteron und Cortison). Die senkrechten Striche an den einzelnen Punkten entsprechen der Standardabweichung.

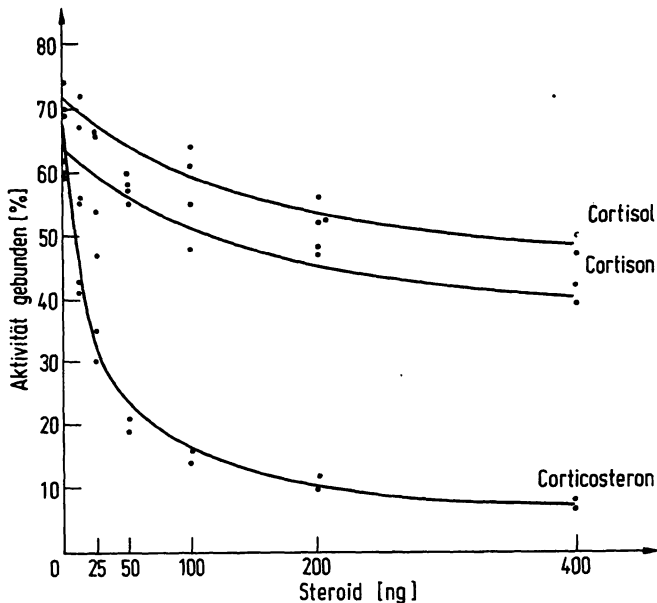


Abb. 4. Kreuzreaktion des Antiserums mit 0-400ng Cortison, Corticosteron und Cortisol.

von den ebenfalls mit dem Antikörper reagierenden Steroiden, die im Plasma in wesentlich höherer Konzentration vorliegen, durch die Chromatographie gewährleistet ist.

Kritische Punkte des Verfahrens

Bei der Durchführung der Methode ist generell zu beachten, daß immer dann, wenn während der Bestimmung Aldosteron in Lösung vorliegt, die angegebenen Zeiten genau eingehalten werden müssen und alle Proben gleichmäßig behandelt werden. Während der Extraktion des Aldosterons aus dem Plasma ist ein sorgfältiges, gleichmäßiges Schütteln und eine exakte Trennung der beiden Phasen notwendig. Während des radioimmunologischen Ansatzes muß die Inkubationszeit der Proben exakt eingehalten werden. Kritisch ist die Kontaktzeit bei Zugabe der Kohle-Dextran-Suspension bei 4°C, die genau 10 Minuten betragen muß. Für den immunologischen Ansatz wurden Plastikröhrchen statt Glasgefäße benutzt. Die Impulszählung erfolgte ebenfalls in Plastikgefäßen, die nur einmal verwendet wurden. Das Antiserum darf nicht mehrmals eingefroren und wieder aufgetaut werden. Dagegen kann man das verdünnte Antiserum ebenso wie die Aldosteron-Standardlösungen etwa 1 Woche lang bei +4°C aufbewahren.

Normalwerte

Bei 35 Gesunden lag die radioimmunologisch bestimmte Plasmaaldosteron-Konzentration zwischen 70 und 250 ng/l. Der Mittelwert betrug 154 ± 57 ng/l (Tab. 4). Zwischen männlichen und weiblichen Probanden ergab sich kein signifikanter Unterschied. Die Werte wurden morgens 2-4 Stunden nach dem Aufstehen bei ambulanten Personen (Studenten und Klinikpersonal) ermittelt. Es bestand keine Kostbeschränkung.

Tab. 4. Aldosteronkonzentration im Plasma bei 35 gesunden Probanden (Mittelwert $154,3 \pm 57,2$ ng/l)

Gesunde (männlich)		Gesunde (weiblich)	
	[ng/l]		[ng/l]
H. G.	160	D. L.	200
E. N.	173	B. F.	90
O. K.	71	V. G.	157
E. S.	134	B. L.	267
N. E.	175	M. M.	211
B. E.	114	R. H.	181
M. E.	183	R. S.	150
R. S.	184	S. D.	162
V. O.	72	U. Z.	166
R. I.	245	H. F.	149
K. E.	72	B. R.	79
F. B.	86	E. Sch.	111
T. B.	250	C. S.	78
O. S.	202	T. Sch.	204
R. O.	92	K. O.	85
G. R.	117	S. C.	234
R. G.	235	R. R.	150
E. R.	163		

$\bar{x} \pm s = 154 \pm 57$ ng/l

Aldosteronkonzentration im Plasma bei Morbus Addison und aldosteronsezernierenden Adenomen

Bei 3 Patienten mit unbehandelter Nebennierenrindeninsuffizienz war die radioimmunologisch bestimmte Aldosteronkonzentration im Plasma auf Werte unter 10 ng/l vermindert. Zwei Patienten mit operativ und histologisch bestätigten aldosteronsezernierenden Nebennierenrindenadenomen wiesen eine Plasmakonzentration von 640 bzw. 920 ng/l auf (Tab. 5).

Tab. 5. Plasmaaldosteronkonzentration bei Patienten mit Morbus Addison und aldosteronbildenden Nebennierenrinden-Adenomen.

M. Addison		Aldosteron-bildendes Nebennierenrinden-Adenom	
	[ng/l]		[ng/l]
1. F. G.	10	1. O. G.	920
2. A. B.	9	2. G. B.	640
3. R. D.	7		

Diskussion

Das von uns für die radioimmunologische Bestimmung von Aldosteron entwickelte Verfahren kombiniert die Vorteile der von Bayard et al (1) und von Mayes et al (2) angegebenen Methoden. Die Extraktion des Aldosterons aus dem Plasma erfolgte mit Dichlormethan, die Trennung von anderen Steroiden (Cortisol, Corticosteron) durch Papierchromatographie in Benzol-Methanol-Wasser. Der dabei eintretende Aldosteronverlust von im Durchschnitt 50% wurde dadurch genau erfaßt und bei der Berechnung eliminiert, daß jedem Ansatz vor der Chromatographie eine bekannte Menge von markiertem Aldosteron zugesetzt wurde. Für den

radioimmunologischen Ansatz wurde Tris-Acetatpuffer von pH 7,4 mit Lysozym und für die Trennung von freiem und gebundenem Aldosteron Kohle-Dextran verwandt.

Die von uns nach der Methode von Bayard et al (1) vom Kaninchen gewonnenen Antikörper gegen Aldosteron zeigen eine ausreichende Spezifität, wiesen aber, wie auch schon von Bayard (1) sowie Mayes (2) gezeigt, eine Kreuzreaktion mit Corticosteron, Cortison und Cortisol auf. Durch die Papierchromatographie konnte Aldosteron gut von diesen störenden Steroiden getrennt werden. Das gewonnene Antiserum wies in einer Verdünnung von 1:400 eine Bindung von 50–70% Aldosteron auf.

Die Methode erlaubt den Nachweis von Aldosteron aus einer Plasamenge von 2 ml. Die Empfindlichkeit der Methode gestattet den Nachweis von 50 ng/l Aldosteron im Plasma. Zur Bestimmung noch niedrigerer Aldosteron-Konzentrationen ist der Einsatz einer größeren Plasamenge erforderlich. Die Bestimmung dauert insgesamt 8 Tage. Von einer Med.-techn. Assistentin können pro Tag 8 Bestimmungen durchgeführt werden.

Voraussetzung für eine gute Reproduzierbarkeit der Werte ist die Beachtung einer Reihe von kritischen Punkten bei der Durchführung der Methode, die noch

mehr Sorgfalt als andere radioimmunologische Hormonbestimmungen erfordert und besonders die Extraktion des Aldosterons aus dem Plasma betrifft. Bei vergleichenden Untersuchungen über die Reproduzierbarkeit der Werte in 2 Laboratorien mit dem gleichen Antiserum ergab sich, daß die mittlere prozentuale Differenz der Einzelwerte bei 18% lag.

Bei 35 Gesunden erhielten wir vormittags nach 2–4 stündiger aufrechter Körperhaltung eine mittlere Aldosteronkonzentration im Plasma von 154 ± 57 ng/l. Diese Werte liegen geringfügig höher als die von Mayes et al (2) sowie Bayard et al (1) gefundenen Werte (122 bzw. 132 ng/l). In Ruhelage findet sich unter Normalkost ein niedrigerer Wert, den Mayes (1) und Bayard et al (3) mit 13 bzw. 74 ng/l bestimmten.

Bei 3 von uns untersuchten Patienten mit Morbus Addison war die Aldosteronkonzentration im Plasma auf Werte unter 10 ng/l vermindert. Bei 2 Patienten mit Aldosteron-sezernierendem Adenom der Nebennierenrinde fand sich eine auf das 4–6fache erhöhte Aldosteronkonzentration im Plasma.

Danksagung

Den Med.-techn. Assistentinnen Frl. Peter und Frau Gaco sagen wir für ihre exakte und fleißige Mitarbeit herzlichen Dank.

Literatur

1. Bayard, F., Beitins, J. Z., Kowarski, A. & Migeon, C. J. (1970), *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **31**, 1–6.
2. Mayes, D., Furuyama, S., Kem, D. C. & Nugent, C. A. (1970), *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **30**, 682–685.
3. Bayard, F., Beitins, J. Z., Kowarski, A. & Migeon, C. J. (1970), *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **31**, 507–510.
4. Goodfriend, T. L., Levine, I. & Fasman, G. D. (1964) *Science* **144**, 1344–1346.
5. Gocke, D. J., Gerten, J., Sherwood, L. M. & Laragh, J. H. (1969), *Circulat. Res.* **24–25**, Suppl. 1, 131–146.
6. Hais, J. M. & Macek, K. (1958), *Handbuch der Papierchromatographie* 1. Aufl., Jena VEB Gustav Fischer Verlag.
7. Bush, J. E. (1961), *The Chromatographie of Steroids* Pergamon Press, Oxford.
8. Neher, R. (1959), *Chromatographic Reviews* (Lederer, M., ed.), vol. 1, p. 99–192, Elsevier Publishing Company, Amsterdam.
9. Rodbard, D., Bridson, W. & Rayford, P. L. (1969), *J. Lab. Clin. Med.* **74**, 770–781.
10. Rössler, R., *Habilitationsschrift* 1973, Tübingen.

Dr. Friedrich Klumpp
Prof. Dr. D. Klaus
355 Marburg/L.
Medizinische Poliklinik
Robert Koch Straße 7

Priv. Doz. Dr. R. Rössler
74 Tübingen
Medizinische Poliklinik
Liebermeisterstraße 14