

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.
11. Jg. 1973, S. 99—106

Kritische Betrachtungen zur Bestimmung von Aldosteron und Renin¹⁾ beim Menschen²⁾

Von H. BREUER, H. KAULHAUSEN, W.-R. KÜLPMANN, LIESELOTTE NOCKE-FINCK und L. SIEKMANN

Aus dem Institut für Klinische Biochemie und Klinische Chemie der Universität Bonn

(Eingegangen am 18. September/6. Dezember 1972)

Herrn Prof. Dr. A. Gütgemann zum 65. Geburtstag gewidmet

Zur Bestimmung von Aldosteron im Urin sind zahlreiche Verfahren beschrieben worden, von denen die Doppelisotopenderivat-Methode zwar die aufwendigste ist, andererseits aber auch die zuverlässigsten Werte liefert. Kolorimetrische und fluorimetrische Methoden entsprechen nicht mehr den heutigen Ansprüchen, während gaschromatographische Verfahren — sofern die Urinextrakte genügend vorgereinigt wurden — für Routineuntersuchungen gut geeignet sind. Es werden einige Verbesserungen angegeben, welche die Empfindlichkeit und die Praktikabilität der gaschromatographischen Methode steigern.

Wegen der sehr geringen Konzentrationen von Aldosteron im Plasma (etwa 100 ng/l) stoßen Bestimmungen mit der Doppelisotopenderivat-Methode, der Gaschromatographie (Elektronen-Einfangdetektor) oder der Radioliganden-Methode auf erhebliche Schwierigkeiten. Hier bietet sich die radioimmunologische Bestimmung als Methode der Wahl an. Als Referenzmethode wird die Fragmentographie (kombinierte Gaschromatographie/Massenspektrometrie) beschrieben und empfohlen.

Die biologische Bestimmung der Reninaktivität im Plasma/Serum ist mit einem großen Zeit- und Arbeitsaufwand verbunden und wird in zunehmendem Maße von radioimmunologischen Methoden abgelöst. Die Empfindlichkeit der radioimmunologischen Bestimmung ist deutlich größer als die der biologischen Verfahren. Einige methodische Schwierigkeiten sind jedoch bei beiden Verfahren zur Reninbestimmung zu beachten, wie z. B. die Kinetik der Reninsubstrat-Renin-Reaktion, die Hemmung der Angiotensinasen und der Einfluß von Renininhibitoren. Darüber hinaus sind neben Körperhaltung und Natriumbilanz auch Veränderungen während des menstruellen Zyklus sowie der circadianen Rhythmus bei der Interpretation der Ergebnisse zu berücksichtigen.

Evaluation of methods for the determination of aldosterone and renin in man

Numerous methods have been described for the determination of aldosterone in urine; the double isotope derivative method though time-consuming, yields reliable results. Methods using colorimetry or fluorimetry do not fulfill the present requirements. Gas chromatographic methods are most suitable for routine determinations, provided the urinary extracts have been sufficiently purified. Some modifications are described which improve the sensitivity and practicability of the gas chromatographic method.

Since the concentration of aldosterone in plasma is very low (about 100 ng/l), determination by means of the double isotope derivative method, gas liquid chromatography (electron capture detector) or by the radioligand method have proved to be very difficult. Therefore, the radioimmunological determination of aldosterone in blood is the method of choice. As a reference method, fragmentography (combined gas chromatography/mass spectrometry) is described and recommended.

The biological determination of renin activity in plasma/serum requires more time and material than the radioimmunological determination and will therefore be succeeded by the latter. The sensitivity of the radioimmunoassay is significantly higher than that of the bioassay. However, in both procedures some methodological difficulties should be taken into account, e. g. the kinetics of the renin substrate-renin reaction, the inhibition of angiotensinases and the influence of renin inhibitors. Furthermore, in interpreting the results of the determination of renin activity, one has to consider postural changes, sodium balance, circadian rhythm and changes during the menstrual cycle.

Die Bestimmungen von Aldosteron und Renin nehmen heute in der endokrinologischen Funktionsdiagnostik einen bedeutenden Platz ein. Durch die Einführung radioimmunologischer und gaschromatographischer Methoden sind die technischen Voraussetzungen zur Durchführung dieser Bestimmungen wesentlich verbessert worden; dennoch dürfen die Schwierigkeiten, die in den einzelnen Methoden begründet sind, nicht übersehen werden. Aus der Fülle der angebotenen Verfahren sollen im folgenden nur diejenigen angegeben werden, die sich als zuverlässig und praktikabel erwiesen haben; dabei wird weniger Wert auf eine ausführliche Beschreibung als vielmehr auf eine kritische Beurteilung der einzelnen Methoden gelegt.

Methoden zur Bestimmung von Aldosteron im Urin Doppelisotopenderivat-Methode

Im Jahre 1960 haben KLIMAN und PETERSON (1) eine Doppelisotopenderivat-Methode zur Bestimmung von Aldosteron im Urin angegeben. Dieses Verfahren, das zweifellos einen relativ großen Aufwand erfordert, hat sich in jeder Weise in den letzten 10 Jahren bewährt; es gilt heute als Referenzmethode für die Bestimmung von Aldosteron im Urin und soll deshalb in seinen wesentlichen Schritten kurz beschrieben werden:

¹⁾ EC 3.4.4.15

²⁾ Auszugsweise vorgetragen von H. Breuer auf dem 18. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie am 2. März 1972 in Hannover.

1. Hydrolyse des 3-Oxo-Konjugats von Aldosteron bei pH 1 und Raumtemperatur für 14–16 h,
2. Zugabe von [4-¹⁴C]Aldosteron als endogenem Standard nach der Hydrolyse,
3. Extraktion mit Dichlormethan,
4. Reinigung des Extraktes durch Papierchromatographie,
5. Acetylierung des Extrakt-rückstandes mit tritiiertem Acetanhydrid,
6. dreimalige Papierchromatographie in verschiedenen Systemen,
7. Messung der ³H- und ¹⁴C-Aktivitäten im Flüssigkeits-Szintillations-Spektrometer.

Die untere Empfindlichkeitsgrenze dieser Methode liegt bei 10 ng Aldosteron.

Zu den einzelnen Punkten ist folgendes zu bemerken: Die Hydrolyse kann, entgegen den ursprünglichen Angaben (1), von 24 h auf 14–16 h verkürzt werden. Bei Urinen, die nicht sofort in frischem Zustand untersucht werden, sollte der interne Standard in Form von [4-¹⁴C]Aldosteron erst nach der Hydrolyse zugesetzt werden. Setzt man bei Urinen, die – aus welchen Gründen auch immer – nicht sofort verarbeitet werden können und durch Bakterien bedingte Zersetzungserscheinungen zeigen, den internen Standard vor der Hydrolyse zu, so können die Doppelbestimmungen erheblich voneinander abweichen.

Der Erfolg der quantitativen Acetylierung von Aldosteron hängt entscheidend von der Qualität des verwendeten Acetanhydrids sowie der strengen Einhaltung der Reaktionsbedingungen ab; insbesondere ist darauf zu achten, daß keine Hydrolyse stattfindet, die sich bei der sehr geringen Menge Acetanhydrid als deletr erweisen könnte.

Die Papierchromatographie trägt entscheidend zur Reinigung der Aldosteron-Fraktion bei und muß deshalb unter streng standardisierten Bedingungen durchgeführt werden; dazu gehören die Konstanthaltung der Temperatur bei 25°C, eine gleichmäßige und ausreichende Äquilibrierungszeit sowie die sorgfältige Reinigung des Papiers mit Methanol während 72 h. Ein besonders wichtiger Punkt ist die Reinigung aller Lösungsmittel.

Bei Beachtung dieser Kautelen liefert die Doppelisotopenderivat-Methode in den Händen eines geübten Analytikers zuverlässige Werte, die den heutigen Anforderungen der Qualitätskontrolle gerecht werden. Die Methode bleibt naturgemäß spezialisierten Laboratorien vorbehalten.

Kolorimetrische und fluorimetrische Methoden

Der relativ große Aufwand für die Doppelisotopenderivat-Methode zur Bestimmung von Aldosteron im Urin ist für zahlreiche Autoren Veranlassung gewesen, nach einfacheren Verfahren ohne Inanspruchnahme von Strahlungsmegerten zu suchen. Im Prinzip bestehen diese Methoden aus drei Schritten:

1. Extraktion der freien und hydrolysierten Steroid-Fraktion,
2. Reinigung und Auftrennung der Steroid-Fraktion durch Säulen-, Papier- und/oder Dünnschichtchromatographie und
3. Messung der Aldosteron-Fraktion mit Hilfe einer kolorimetrischen oder fluorimetrischen Farbreaktion.

Bereits 1956 haben NEHER und WETTSTEIN (2) ein semiquantitatives Verfahren zur Bestimmung der Aldosteronausscheidung im Urin beschrieben; dieses Verfahren hat als Suchtest zu den ersten, klinisch verwertbaren Aussagen geführt. Die in späteren Jahren mitgeteilten Methoden, die ebenfalls auf einer kolorimetrischen oder fluorimetrischen Endpunktbestimmung beruhen, sind – bei Anlegung strenger Maßstäbe – als nur bedingt brauchbar oder obsolet zu bezeichnen. Die geringen Aldosteronmengen im Urin lassen sich eben nur mit einem gewissen methodischen und apparativen Aufwand zuverlässig bestimmen; versucht man diesen zu umgehen, so muß man erhebliche Abstriche hinsichtlich der Richtigkeit, der Präzision und der Spezifität in Kauf nehmen. Diese Feststellung soll an folgendem Beispiel demonstriert werden: Hier wurde im selben Urin die Aldosteronkonzentration einmal mit der Doppelisotopenderivat-Methode, zum anderen mit einer kolorimetrischen Methode (Bildung des 2,4-Dinitrophenylhydrazons von Aldosteron- γ -lacton) bestimmt (3). Die Ergebnisse dieser vergleichenden Untersuchung sind in Tabelle 1 dargestellt. Im Normalbereich (bis etwa 24 μ g/24 h) betragen die Differenzen zwischen der Doppelisotopenderivat-Methode und der kolorimetrischen Methode –27 bis +260%. Es ist zu bemerken, daß die meisten mit der kolorimetrischen Methode erstellten Werte zu hoch liegen. Dies ist auf eine mangelnde Spezifität des Verfahrens zurückzuführen.

Gaschromatographische Bestimmung

Die ersten brauchbaren Verfahren zur Bestimmung von Aldosteron im Urin (nach Hydrolyse der Probe bei pH 1 für 24 h) wurden von BRAVO und TRAVIS (4) sowie von SALOKANGAS und ADLERCREUTZ (5) beschrieben. Bei beiden Methoden ist die Aufarbeitung der Urinprobe vor der gaschromatographischen Bestimmung von Aldosteron relativ einfach: Sie umfaßt lediglich eine einmalige Extraktion und eine einmalige Papierchromatographie. Anschließend wird die Aldosteron-Fraktion zum γ -Lacton oxidiert und dieses nach einer weiteren Extraktion gaschromatographisch quantitativ bestimmt. Zur Korrektur der Aufarbeitungsverluste wird als interner Standard ³H- oder ¹⁴C-markiertes Aldosteron zugesetzt. Beide Verfahren bieten den Vorteil der raschen Durchführbarkeit. BRAVO und TRAVIS (4) benötigen für 9 Analysen 16–24 h, während SALOKANGAS und ADLERCREUTZ (5) 20 Analysen pro Woche bewältigen. Allerdings sind bei der Qualitätskontrolle diese Verfahren der Doppelisotopenderivat-Methode unterlegen. Die Werte liegen

Tab. 1

Ausscheidung von Aldosteron im Urin des Menschen. Vergleichende Untersuchung mit der Doppelisotopenderivat-Methode (1) und mit einer kolorimetrischen Methode (3) unter Verwendung des 2,4-Dinitrophenylhydrazons des Aldosteron- γ -lactons

Lfd. Nr.	Urinvolumen [ml]	Aldosteronausscheidung im Urin [$\mu\text{g}/24 \text{ h}$]		Δ in %*
		Doppelisotopenderivat-Methode	Kolorimetrische Methode	
1	1140	1,9	5,5	+190
2	1340	2,6	9,4	+260
3	690	6,3	7,4	+17
4	1320	9,9	24,8	+150
5	1110	13,6	37,0	+174
6	1540	14,0	24,2	+73
7	1120	15,5	15,8	+2
8	700	21,9	16,0	-27
9	1020	23,3	50,0	+114
10	690	51,5	40,0	-22
11	1610	126,9	135,0	+6
12	820	244,0	200,0	-18

* Berechnet auf der Basis der Doppelisotopenderivat-Methode

häufig zu hoch (H. ADLERCREUTZ, persönliche Mitteilung), die Empfindlichkeit ist relativ gering (bei $1,6 \mu\text{g}/24 \text{ h}$ beträgt der Fehler 100% (5)). Als Folge der offenbar nicht ganz ausreichenden Vorreinigung wird ein relativ hoher Untergrund beobachtet, der die quantitative Auswertung der Peaks erschwert.

Im Hinblick auf diese Nachteile erschien es wünschenswert, eine gaschromatographische Methode zur Bestimmung von Aldosteron im Urin auszuarbeiten, die eine bessere Zuverlässigkeit besitzt, ohne dabei wesentlich an Praktikabilität einzubüßen. Bei dieser Methode, über deren Einzelheiten an anderer Stelle berichtet wurde (6), wird der Urinextrakt einer eingehenderen Reinigung unterzogen. Nach einer Säulenchromatographie an Amberlite XAD-2 wird die Aldosteron-Fraktion zunächst einer eindimensionalen Dünnschicht-

chromatographie unterworfen; auf die Oxidation zum Aldosteron- γ -lacton erfolgt eine zweidimensionale Dünnschichtchromatographie. Die Proben werden mit Hilfe eines teilautomatisierten Feststoffeinfraß-Systems in den Gaschromatographen injiziert (Abb. 1). Dieses Verfahren hat den Vorteil, daß ein wesentlich größerer Anteil als bei der üblichen Flüssigkeitsinjektion auf die gaschromatographische Säule gebracht werden kann und somit die Empfindlichkeit erhöht wird; gleich-

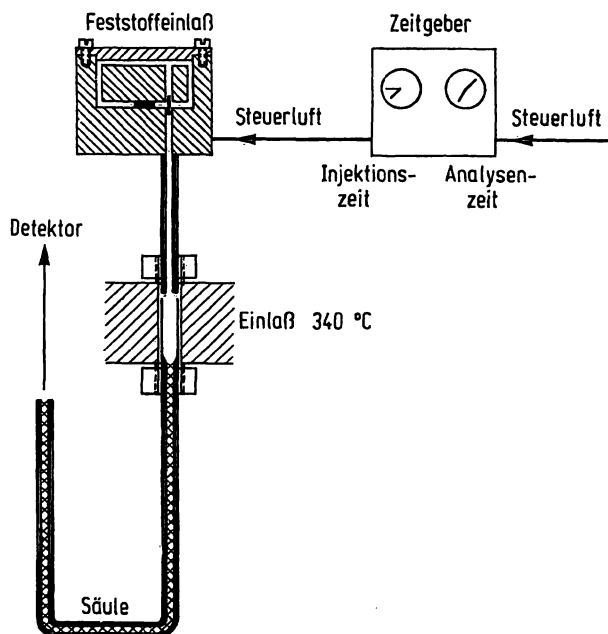


Abb. 1

Schematische Darstellung eines teilautomatischen Feststoffeinfraß-Systems. Die in Benzol/Äthanol gelösten Rückstände werden in Glaskapillaren aufgenommen. Nach dem Abdampfen des Lösungsmittels werden die Glaskapillaren in das Magazin des Feststoffeinfraßes eingesetzt. In einstellbaren Zeitabständen fallen die Kapillaren in den Einlaßabschnitt der gaschromatographischen Säule, wo die Verdampfung der Probe (Aldosteron- γ -lacton) bei 340°C erfolgt

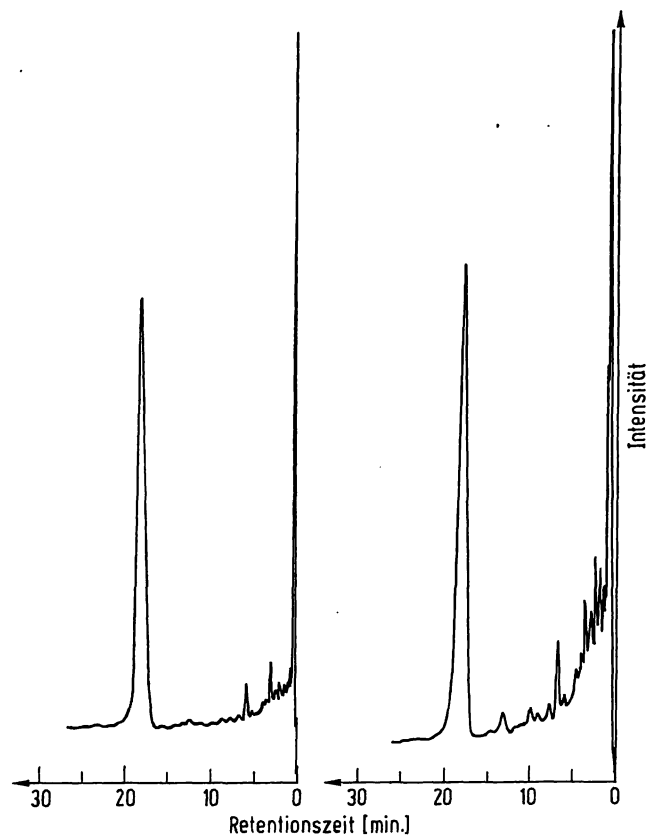


Abb. 2

Gaschromatogramme von 200 ng authentischem Aldosteron- γ -lacton (links) und einer aufbereiteten Urinprobe (rechts), die einer Menge von 80 ml entspricht. Experimentelle Bedingungen: 3% OV-3 auf Chromosorb WHP, Säulenlänge 1,80 m, Einlaßtemp. 340°C , Säulentemp. 227°C , Flammenionisationsdetektor 250°C . Gaschromatograph MikroTek MT 220. Die Gaschromatogramme wurden bei gleicher Empfindlichkeit aufgenommen

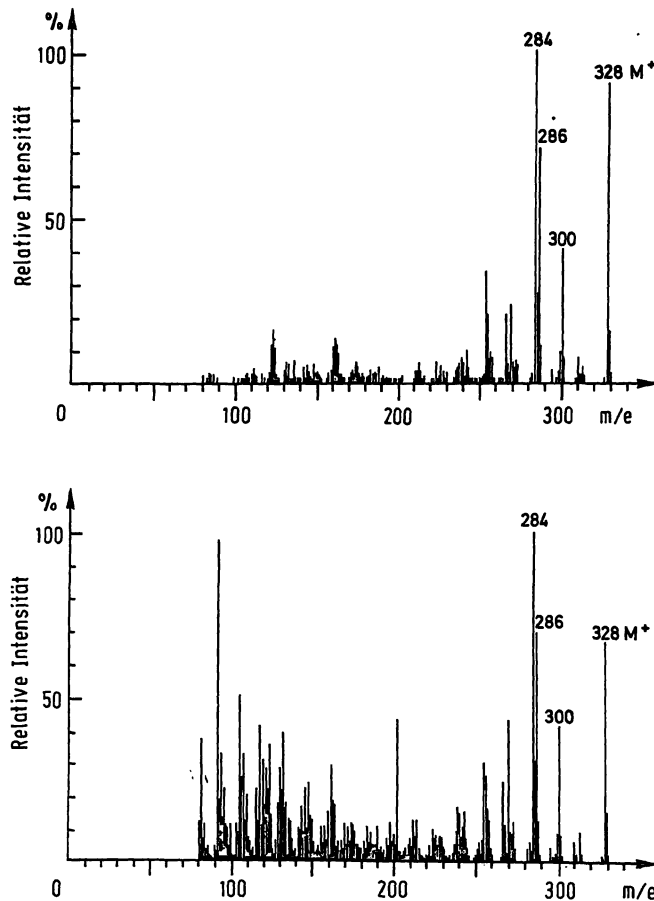


Abb. 3

Massenspektren von authentischem Aldosteron- γ -lacton (oben) sowie des gaschromatographischen Peaks der Aldosteron- γ -lacton-Fraktion aus einer aufgearbeiteten Urinprobe (unten). Die Aufnahmen erfolgten mit einem LKB 9000 Gaschromatograph/Massenspektrometer nach Gaschromatographie an OV-3 (3%); Temp. 230°C, Ionisierungsenergie 35 eV

zeitig wird die Praktikabilität gesteigert. Die quantitative Bestimmung erfolgt mit einem Flammenionisationsdetektor, wobei der relativ niedrige Untergrund die Auswertung erleichtert (Abb. 2). Die Spezifität der Methode kann aufgrund der massenspektrometrischen Untersuchung des Aldosterongipfels als befriedigend bezeichnet werden (Abb. 3); bei dieser Feststellung handelt es sich allerdings um eine qualitative Aussage zur Verifizierung einer quantitativen Methode. Die Richtigkeit des hier beschriebenen Verfahrens wurde durch Vergleich mit der Doppelisotopenderivat-Methode geprüft; bei Variationskoeffizienten zwischen 3,0 und 6,8% im Normalbereich (5–25 μ g) kann die Präzision als gut bezeichnet werden (6). In 4 Tagen können 10 Analysen durchgeführt werden. AAKVAAG (7), der eine vergleichbare Methode angegeben hat, erreicht bei etwa gleichem Zeitaufwand eine geringere Präzision mit Variationskoeffizienten von mehr als 10% für den Normalbereich und mehr als 20% bei erniedrigter Aldosteronausscheidung.

Methoden zur Bestimmung von Aldosteron im Blut Doppelisotopenderivat-, gaschromatographische und Radioliganden-Methoden

Die Bestimmung von Aldosteron im Blut trifft wegen der sehr geringen Konzentration (Größenordnung

100 ng/l Plasma) auf erhebliche Schwierigkeiten. Grundsätzlich besteht die Möglichkeit, mit der Doppelisotopenderivat-Methode Aldosteron auch im Blut zu bestimmen, jedoch scheint sich keines der bisher angegebenen Verfahren (vgl. l. c. (8)) durchgesetzt zu haben. Im allgemeinen wird 14 C-markiertes Aldosteron als interner Standard benutzt; wegen der relativ geringen spezifischen Aktivität müssen jedoch verhältnismäßig große Mengen von radioaktivem Aldosteron zugesetzt werden, so daß die Bestimmung des geringen Anteils an endogenem Hormon dadurch ungenau wird. Verwendet man dagegen wegen seiner höheren Aktivität tritiiertes Aldosteron als internen Standard und 14 C-markiertes Acetanhydrid zur Derivatbildung (9), so werden die Kosten einer Analyse unverhältnismäßig hoch — abgesehen davon, daß die Doppelisotopenderivat-Methode für Aldosteron im peripheren Blut an der untersten Grenze ihrer Empfindlichkeit arbeitet.

Auch gaschromatographische Verfahren sind von mehreren Autoren beschrieben worden (10, 11). Um eine genügende Empfindlichkeit zu erreichen, müssen Elektronen-Einfang-Detektoren benutzt werden, die allerdings sehr störanfällig sind. Darüberhinaus erwies es sich als notwendig, komplizierte Derivate von Aldosteron herzustellen, die — wie z. B. Tetrahydroaldosteron- γ -lactonheptafluorbutyrat — nur über drei getrennte Reaktionsstufen darzustellen sind (10).

Der Versuch, Aldosteron im Blut mit einer Radioligandenmethode (Proteinbindungsmethode) zu bestimmen, ist bisher fehlgeschlagen. Zur Bindung von Aldosteron wurde aus dem 10000 \times g-Überstand der Niere adrenaletomierter Ratten ein aldosteronbindendes Protein gewonnen, das allerdings auch mit Cortisol reagiert (12). Aus diesem Grunde ist vor Anwendung der Methode eine papierchromatographische Trennung der beiden Steroide erforderlich, die ihrerseits zu so hohen Leerwerten führt, daß eine quantitative Bestimmung von Aldosteron in biologischen Flüssigkeiten nicht möglich ist. Als weiterer Nachteil sei erwähnt, daß das aldosteronbindende Gewebsprotein stets frisch hergestellt werden muß (12).

Radioimmunologische Methoden

Im Gegensatz zur Radioliganden-Methode scheinen die radioimmunologischen Bestimmungen von Aldosteron im Blut brauchbare Werte zu liefern. Es ist deshalb anzunehmen, daß diese Verfahren aufgrund ihrer hohen Empfindlichkeit bald eine größere Verbreitung finden werden; dabei sollte man sich allerdings nicht darüber hinwegtäuschen, daß auch radioimmunologische Methoden erhebliche Schwierigkeiten bieten. Neben der sorgfältigen Aufarbeitung der Aldosteron-Fraktion aus dem Blut ist die Gewinnung empfindlicher und spezifischer Antikörper — ähnlich wie bei allen anderen radioimmunologischen Methoden — eine wesentliche Voraussetzung für die praktische Anwendbarkeit dieser Verfahren. Während MAYES et al. (13)

als Antigen Aldosteronoxim, gekoppelt mit Rinderserumalbumin, benutzen, verwenden BAYARD (14) et al. als Antigen ein Kupplungsprodukt zwischen Aldosteron-3-carboxy-methoxim-18,21-diacetat und Kaninchen-serumalbumin. In beiden Fällen erfolgt die Gewinnung der Antikörper durch Immunisierung von Kaninchen. Kreuzreaktionen mit C_{21} -, C_{19} - und C_{18} -Steroiden waren bei beiden Antikörpern entweder nur sehr gering oder nicht nachweisbar. Zur Trennung der freien von der gebundenen Aldosteron-Fraktion kann sowohl Florisil (14) als auch Ammoniumsulfat (12) benutzt werden. Bei Aldosteronkonzentrationen von 40, 180 und 510 ng/l Plasma ergaben sich Variationskoeffizienten von 14, 13,2 und 10,5%; der unspezifische Leerwert soll bei dem von BAYARD angegebenen Verfahren (14) 88 ± 55 pg pro Probe betragen. Nach MAYES et al. (13) sind 20 pg Aldosteron, die einem vorextrahierten, aldosteronfreien Plasma zugesetzt wurden, mit Sicherheit noch von Null zu unterscheiden ($p < 0,01$). Die bisherigen, mit den radioimmunologischen Methoden gewonnenen Ergebnisse sind erfolgversprechend.

Gaschromatographisch-massenspektrometrische Bestimmung

Die kombinierte Gaschromatographie/Massenspektrometrie hat sich als ein empfindliches und hochspezifisches Verfahren zur quantitativen Bestimmung kleiner Steroidkonzentrationen in Körperflüssigkeiten bewährt (15, 16). Bei dieser Technik dient das Massenspektrometer als selektiver Gaschromatographie-Detektor. Im Gegensatz zu dem üblichen Vorgehen werden keine vollständigen Massenspektren aufgezeichnet, sondern lediglich die Intensitäten des Molekülions oder eines charakteristischen Fragmentions kontinuierlich registriert (Fragmentographie). Man erhält auf diese Weise Gaschromatogramme, bei denen ausschließlich solche Substanzen als Peaks angezeigt werden, die in ihrem Massenspektrum ein entsprechendes Molekül- oder Fragmention aufweisen. Es versteht sich von selbst, daß diese Art der Substanzanzeige sehr viel spezifischer arbeitet als jeder bisher bekannte konventionelle Gaschromatographie-Detektor. Aufgrund ihres massenspektrometrischen Verhaltens sind bestimmte Derivate — wie z. B. die Heptafluor-

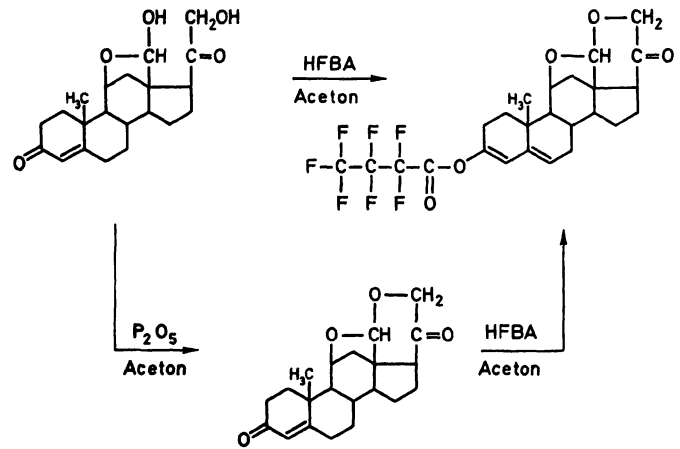


Abb. 4

Darstellung des Aldosteron-Vollacetal-Heptafluorbutyrats

I = Vollacetal von Aldosteron

II = Heptafluorbutyrat des Vollacetats von Aldosteron

HFBA = Heptafluorbuttersäureanhydrid

buttersäureester — für die quantitative Bestimmung von Steroiden besonders gut geeignet. Die Molekülionen dieser Verbindungen treten mit relativ großer Intensität auf; in der Regel ist der Molekülpeak der „base peak“, d. h. der höchste Peak des Spektrums. Bei dem Versuch, ein geeignetes Heptafluorbutyrat von Aldosteron darzustellen, wurde eine neue Verbindung erhalten, bei der es sich überraschenderweise um das Heptafluorbutyrat des Aldosteron-Vollacetals handelt (Abb. 4).

Diese Verbindung kann direkt durch Behandlung von Aldosteron mit Heptafluorbuttersäureanhydrid in trockenem Aceton als Lösungsmittel erhalten werden (17). Aus dem Massenspektrum des neuen Aldosteronderivates (Abb. 5) ist deutlich erkennbar, daß der Molekülpeak ($m/e = 538$) gleichzeitig auch der „base peak“ ist.

Das Verfahren zur Bestimmung von Aldosteron im Blut mit Hilfe der Gaschromatographie/Massenspektrometrie umfaßt folgende Schritte:

1. Chromatographie der Plasmaprobe (10–15 ml) an Amberlite XAD-2,
2. Zusatz von $[4-^{14}C]$ Aldosteron als internen Standard,
3. Verteilung zwischen Benzol und Wasser,
4. dünn-schichtchromatographische Reinigung der Aldosteron-Fraktion,

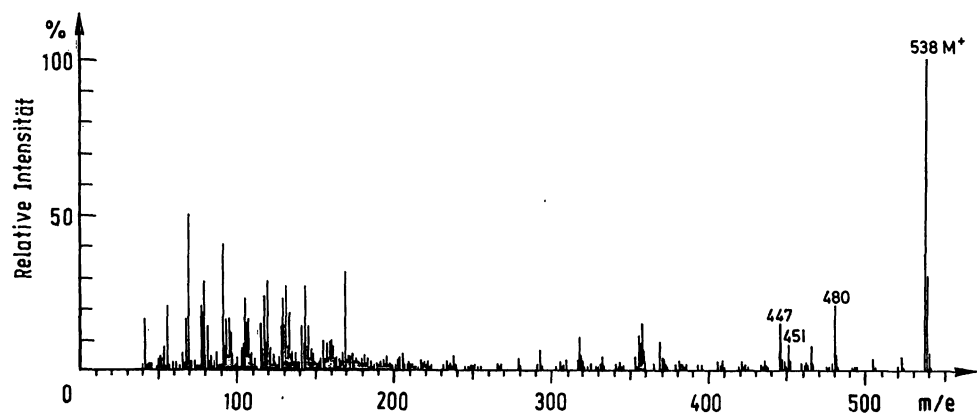


Abb. 5

Massenspektren des Aldosteron-Vollacetal-Heptafluorbutyrats. Die Aufnahme erfolgte mit einem LKB 9000 Gaschromatograph/Massenspektrometer nach Gaschromatographie an OV-1 (1%); Temp. $230^{\circ}C$, Ionisierungsenergie 35 eV

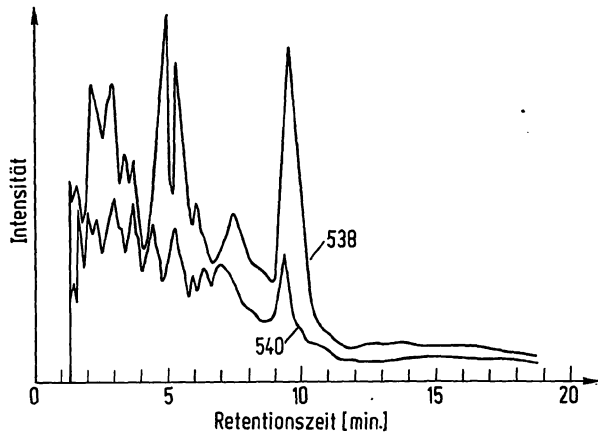


Abb. 6

Bestimmung von Aldosteron im Plasma des Menschen. Gaschromatogramme der 3-Enolheptafluorbutyrate der Vollacetale von Aldosteron ($m/e = 538$ für natürliches Aldosteron und $m/e = 540$ für $[4-^{14}C]$ Aldosteron). Die Aufnahmen erfolgten mit einem Gaschromatograph/Massenspektrometer LKB 9000

5. Bildung des 3-Enolheptafluorbutyrats des Aldosteron-Vollacetals und

6. gaschromatographisch-massenspektrometrische Bestimmung des Aldosteronderivates.

Wie aus Abbildung 6 hervorgeht, werden zwei Gipfel aufgezeichnet; dabei handelt es sich um die Molekülionen des natürlichen Aldosteronderivates ($m/e = 538$) sowie des radioaktiv markierten Aldosteronderivates ($m/e = 540$). Die Aufzeichnung der beiden verschiedenen Peaks ist durch die Verwendung eines Multiple Ion Detector möglich (15). Die Berechnung der Aldosteron-Konzentration erfolgt durch den Vergleich der beiden Peak-Höhen; hierbei ist zu berücksichtigen, daß $[4-^{14}C]$ Aldosteron, das als interner Standard zugesetzt worden ist, etwa 8% an unmarkiertem Aldosteron enthält, auf die entsprechend korrigiert wird.

Die gaschromatographisch-massenspektrometrische Bestimmung ist zwar apparativ aufwendig, hat aber dafür den Vorteil der hohen Spezifität einer physikalisch-chemischen Methode. Sie kann deshalb als Referenzmethode für die Bestimmung von Aldosteron im Blut angesehen und empfohlen werden. Diese Feststellung erscheint im Hinblick auf die radioimmunologische Bestimmung von Aldosteron im Blut wichtig, da diese noch in der Entwicklung befindlichen Verfahren einer weiteren Kontrolle durch geeignete Referenzmethoden bedürfen, bevor sie einen breiteren Eingang in die klinisch-chemische Routinediagnostik finden.

Methoden zur Bestimmung der Reninaktivität im Plasma und Serum

Biologische Methoden

Die erste Methode, mit deren Hilfe die genaue Bestimmung der Reninaktivität im Plasma möglich war, wurde 1964 von BROWN et al. (18) angegeben. Dieses Verfahren ist sehr aufwendig, so daß seine Anwendung auf wenige Laboratorien beschränkt blieb. 25 ml Heparinplasma werden 48 h bei pH 7,0 dialysiert. Das Dialysat wird nach Filtration über eine DEAE-Cellulose-Säule gereinigt und die so gewonnene Plasmarenin-

Fraktion einer erneuten 24 h-Dialyse bei pH 3,0 unterworfen. Dabei fällt das endogene Reninsubstrat aus. Nach Dialyse bei pH 5,7 wird das dann gefriergetrocknete Filtrat mit exogenem Reninsubstrat (Rinderplasma) 0, 3, 6 und 12 h bei 37°C inkubiert. Dabei entsteht Angiotensin II, das im Rattenblutdruckversuch mit Hilfe des „Bracket Assay“ quantitativ bestimmt wird. Wegen der zahlreichen Aufarbeitungsschritte beträgt die Wiederfindung bei der Methode nach BROWN et al. (18) für zugesetztes Renin weniger als 40%. Auch andere Verfahren, bei denen exogenes Reninsubstrat (aus Plasma vom Rind, Schwein, Kaninchen, Schaf oder der Katze) mit dem in der Plasmaprobe vorhandenen Renin inkubiert wird, konnten sich hauptsächlich wegen der Schwierigkeiten bei der Gewinnung von heterologem Reninsubstrat nicht allgemein durchsetzen (18–23).

Das Problem der Präparation von heterologem Reninsubstrat, das vielfach aus dem Plasma nephrektomierter Tiere gewonnen wird, entfällt bei denjenigen Verfahren, bei denen das endogene Reninsubstrat während der Inkubation umgesetzt wird (22, 24–27).

Die am häufigsten angewandte Methode wurde von BOUCHER et al. (24) beschrieben. 10 ml eines auf pH 5,5 eingestellten EDTA-Plasmas werden 3 h bei 37°C inkubiert; dabei wird das freigesetzte Angiotensin an Dowex adsorbiert. Durch Ammoniumacetat wird das Angiotensin wieder freigesetzt und seine pressorische Aktivität im Rattenblutdruckversuch gemessen. Die Wiederfindung von zugesetztem Angiotensin liegt zwischen 70 und 80%, wobei die Fehlerbreite bei Doppelbestimmungen mit $\pm 20%$ angegeben wird (28). Um einen unkontrollierten Umsatz von endogenem Reninsubstrat auszuschalten, ist es notwendig, das Blut schon bei der Abnahme sofort im Eisbad zu kühlen. Auch muß daran gedacht werden, daß bei manchen Plasmaproben kein Substratberschu vorhanden ist und infolgedessen die Zeit-Umsatzkurve nicht linear verläuft. Mit dem Fehlen einer Reaktion nullter Ordnung ist besonders dann zu rechnen, wenn der Renin-gehalt in der zu untersuchenden Probe deutlich erhöht, die Reninsubstratkonzentration dagegen erniedrigt ist, wie z. B. bei Patienten mit dekompensierter Lebercirrhose. Im übrigen hat sich gezeigt, daß durch den Zusatz von EDTA zum Blut nicht nur die „Angiotensinasen“, sondern auch das „converting enzyme“ gehemmt wird; aus diesem Grunde kann die Umwandlung von Angiotensin I in Angiotensin II von Probe zu Probe verschieden sein, was die Interpretation des Rattenblutdruckversuches erheblich erschwert. Neben der hier beschriebenen Makromethode haben BOUCHER et al. (29) auch ein Mikroverfahren angegeben, das weniger als 1 ml Plasma benötigt und infolgedessen häufigere Verlaufskontrollen gestattet.

Radioimmunologische Methoden

Seit 1969 werden in zunehmendem Maße zur Bestimmung der Reninaktivität im Plasma radioimmunologische Verfahren beschrieben (30–35) und angewandt, die gegenüber den biologischen Methoden den

Vorteil des geringeren Zeit- und Arbeitsaufwandes haben. Das Prinzip der radioimmunologischen Bestimmung der Reninaktivität sei am Beispiel der Methode nach HABER et al. (30) kurz erläutert:

1. Mit EDTA versetztes Blut wird in eisgekühlte Röhrchen eingefüllt,
2. Zentrifugation bei $+4^{\circ}\text{C}$ und Inkubation von 0,5 ml Plasma bei 37°C für 3 h, wobei Dimerkaprol (BAL) und 8-Hydroxychinolinsulfat zur Hemmung des „converting enzyme“ und der „Angiotensinasen“ zugesetzt werden,
3. Äquilibrierung des 1:20 verdünnten Inkubates bei 4°C für 24 h mit $[^{125}\text{J}]$ Angiotensin I und einem Antiserum,
4. Trennung des freien und des gebundenen Angiotensin I mit Dextran/Charcoal bei 4°C ,
5. Messung der Radioaktivität des gebundenen $[^{125}\text{J}]$ Angiotensin I im Überstand und
6. Berechnung der Reninaktivität nach Vergleich mit einer Standardkurve.

Eine typische Standardkurve für den Bereich von 0,05 bis 0,8 ng Angiotensin I ist in Abbildung 7 wiedergegeben. Aufgrund der hohen Spezifität des Antikörpers für das Dekapeptid Angiotensin I sind die methodischen Schwierigkeiten bei der Bestimmung der Reninaktivität offenbar geringer als bei radioimmunologischen Bestimmungen von Steroidhormonen. Die Empfindlichkeit der radioimmunologischen Bestimmung, die ohnehin schon größer als die der biologischen Verfahren ist, kann durch Erniedrigung des pH-Wertes von 7,4 auf 5,5 während der Inkubation noch gesteigert werden (36).

Schwierigkeiten und Probleme

Sowohl den biologischen als auch den radioimmunologischen Verfahren zur Bestimmung der Reninaktivität im Plasma sind methodische Schwierigkeiten gemeinsam, von denen die wichtigsten im folgenden aufgezählt seien:

1. Auch bei hohen Reninaktivitäten muß sichergestellt sein, daß Substratsättigung vorliegt, da sonst zu niedrige Werte gemessen werden.

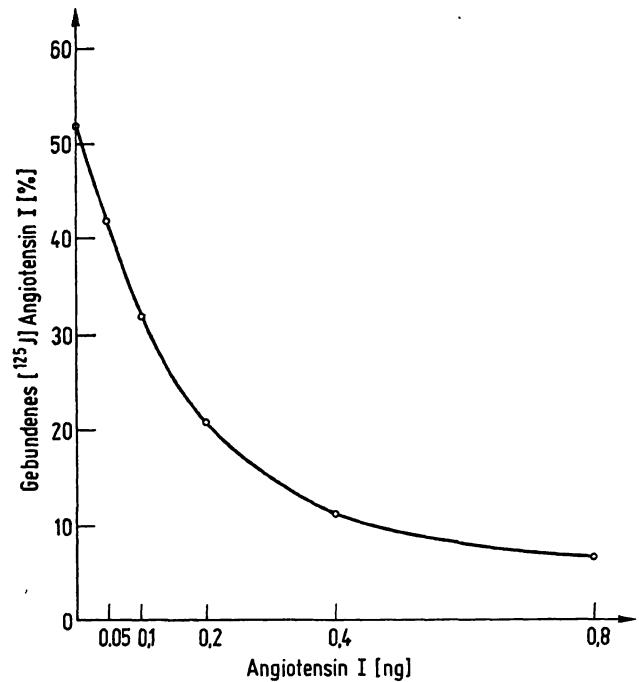


Abb. 7

Standardkurve zur Bestimmung von Angiotensin I unter Verwendung einer radioimmunologischen Methode. Es wird die Menge des am Antikörper gebundenen $[^{125}\text{J}]$ Angiotensin I gemessen

2. Die Hemmung der in der Plasmaprobe befindlichen Angiotensinasen sollte vollständig sein, damit das während der Inkubation freigesetzte Angiotensin nicht vor der Endpunktbestimmung inaktiviert wird.
3. Eine genaue Kontrolle der Temperatur ist wegen des hohen Q_{10} -Wertes der enzymatisch katalysierten Angiotensin-Freisetzung erforderlich.
4. Auch die Frage des Vorkommens von Reninhibitoren in der Plasmaprobe ist zu prüfen. Als Beispiel sei genannt, daß Heparin einen hemmenden Einfluß auf die Reninsubstrat-Renin-Reaktion *in vitro* hat (37), wobei der Mechanismus dieser Hemmung noch unbekannt ist (37, 38). Infolgedessen muß in heparinisierten Plasmaproben mit falschen Werten gerechnet werden.

Bei der Interpretation der Werte für die Reninaktivität im Plasma sind, wie zahlreiche Untersuchungen der letzten Jahre gezeigt haben, die Körperhaltung, die

Tab. 2
Reninaktivität im Plasma bei Normalpersonen unter verschiedenen Bedingungen

Bedingung	Reninaktivität im Plasma	Zahl der Bestimmungen	Einheiten	Autoren
Nüchtern, liegend, morgens	182 ± 15	16	ng Angiotensin/100 ml*	
Körpererhaltung und Ernährung unkontrolliert	309 ± 43	14	ng Angiotensin/100 ml*	(39)
Frühstück: 40 mmol Na^+ , 4 h Orthostase	371 ± 24	10	ng Angiotensin/100 ml*	
Blutentnahme 16.00 Uhr	400	6	ng Angiotensin/100 ml*	(41)
Blutentnahme 8.00 Uhr } liegend, 10 mmol Na^+ /24 h	800	6	ng Angiotensin/100 ml*	
Follikelphase	20	4	R. E.**	
Zeitpunkt der Ovulation	29	4	R. E.**	(42)
Lutealphase	34	3	R. E.**	
Schwangerschaft (16.—41. Woche)	$124 (60—220)$	13	R. E.**	

* Inkubationsdauer 3 h (vgl. 24)

** Eine Renineinheit (R. E.) ist diejenige Reninaktivität in 0,5 ml Serum, die unter Zusatz von 0,2 ml Reninsubstrat (Katzenplasma) während einer 20stdg. Inkubation bei 37°C 1 ng Angiotensin II freisetzt

Natriumbilanz und der circadiane Rhythmus zu berücksichtigen (39, 40). In Tabelle 2 sind einige Werte für die Reninaktivität im Plasma in Abhängigkeit von den genannten Faktoren aufgeführt. Schon bei 2 bis 4st ndiger aufrechter Körperhaltung sind die Reninwerte ähnlich erhöht wie nach natriumarmer Ernährung; andererseits kommt es nach Natriumbelastung zu einer Abnahme der Werte. Nach den bisher vorliegenden Angaben ist die Plasmareninaktivit t tagsüber höher als nachts; der Anstieg scheint in den frühen Morgenstunden zu erfolgen (41). Schließlich sei noch erwähnt,

daß die Reninaktivität während des menstruellen Zyklus schwankt, wobei während des Zeitpunktes der Ovulation und in der Mitte der Lutealphase Maxima zu beobachten sind; in der Schwangerschaft sind die Reninwerte ebenfalls erhöht (42).

Danksagung

Die eigenen Untersuchungen wurden durch Sachbeihilfen der Stiftung Volkswagenwerk und der Deutschen Forschungsgemeinschaft ermöglicht.

Literatur

1. KLIMAN, B. & PETERSON, R. E. (1960), *J. Biol. Chem.* **235**, 1639–1648. — 2. NEHER, R. & WETTSTEIN, A. (1956), *J. Clin. Invest.* **35**, 800–805. — 3. TREIBER, L. R. (1972), *Clin. Chim. Acta* **38**, 171–181. — 4. BRAVO, E. L. & TRAVIS, R. H. (1967), *J. Lab. Clin. Med.* **70**, 831–840. — 5. SALOKANGAS, A. & ADLERCREUTZ, H. (1968), *Ann. Med. Exp. Fenn.* **46**, 158–164. — 6. KÜLPMANN, W. R., SIEKMANN, L. & BREUER, H. (1972), *Acta Endocr. (Kbh.) Suppl.* **159**, 34. — 7. AAKVAAG, A. (1971), *Clin. Chim. Acta* **34**, 197–206. — 8. COGHLAN, J. P. & BLAIR-WEST, J. R. (1967), In „Hormones in Blood“ (C. H. GRAY and A. L. BACHARACH, eds.) 2. Ed., Vol. 2, p. 391–488, Academic Press, London u. New York. — 9. PETERSON, R. E. (1964), In „Aldosterone“ (E. E. BAULIEU und P. ROBEL, eds.) p. 145, Blackwell Scientific Publications, Oxford. — 10. NICOLIS, G. L. & GABRILOVE, J. L. (1969), *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **29**, 1519–1525. — 11. FABRE, L. F., FENIMORE, D. C., FARMER, R. W., DAVIS, H. W. & FARRELL, G. (1969), *J. Chromatogr. Sci.* **7**, 632–638. — 12. ROBINSON, R. G. & FANESTIL, D. D. (1970), *Acta Endocr. (Kbh.) Suppl.* **147**, 275–288. — 13. MAYES, D., FURUYAMA, S., KEM, D. C. & NUGENT, C. A. (1970), *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **30**, 682–685. — 14. BAYARD, F., BEITINS, I. Z., KOWARSKI, A. & MIGEON, C. J. (1970), *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **31**, 507–510. — 15. SIEKMANN, L., HOPPEN, H.-O. & BREUER, H. (1970), *Z. Anal. Chem.* **252**, 294–298. — 16. HOPPEN, H.-O., SIEKMANN, L. & BREUER, H. (1970), *Z. Anal. Chem.* **252**, 299–304. — 17. SIEKMANN, L., SPIEGELHALDER, B. & BREUER, H. (1972), *Z. Anal. Chem.* **267**, 377–381. — 18. BROWN, J. J., DAVIS, D. L., LEVER, A. F., ROBERTSON, J. I. S. & TREE, M. (1964), *Biochem. J.* **93**, 594–600. — 19. KAULHAUSEN, H., FILLMANN, B. & BREUER, H. (1970), *diese Z.* **8**, 254–258. — 20. GOULD, A. B., SKEGGS, L. T. & KAHN, J. R. (1966), *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **15**, 1802–1813. — 21. LEE, M. R., COOK, W. F. & MCKENZIE, J. K. (1966), *Circ. Res.* **19**, 260–268. — 22. SKINNER, S. L. (1967), *Circ. Res.* **20**, 391–402. — 23. POULSEN, K. (1968), *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **21**, 49–61. — 24. BOUCHER, R., VEYRAT, R., DE CHAMPLAIN, J. & GENEST, J. (1964), *Canad. Med. Ass. J.* **90**, 194–201. — 25. DE VITO, E. & FASCILOLO, J. C. (1965), *Acta Physiol. Lat.-Amer.* **15**, 129–137. — 26. PICKENS, P. T., BUMPUS, F. M., LLOYD, A. M., SMEBY, R. R. & PAGE, I. H. (1965), *Circ. Res.* **17**, 438–448. — 27. AIDA, M., MAEBASHI, M., YOSHIMAGA, K. & ICHINOHE, F. (1965), *Tohoku J. Exp. Med.* **87**, 35–39. — 28. KLAUS, D. & HEIZMANN, A. (1968), *diese Z.* **6**, 1–6. — 29. BOUCHER, R., M NARD, J. & GENEST, J. (1967), *Canad. J. Physiol. Pharmacol.* **45**, 881–890. — 30. HABER, E., KOERNER, T., PAGE, L. B., KLIMAN, B. & PURNODE, A. (1969), *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **29**, 1349–1355. — 31. BOYD, G. W., ADAMSON, A. R., FITZ, A. E. & PEART, W. S. (1969), *Lancet* **I**, 213–218. — 32. HOLLEMANS, H. J. G., VAN DER MEER, J. & KLOOSTERZIEL, W. (1969), *Clin. Chim. Acta* **24**, 353–357. — 33. GIESE, J., J RGENSEN, M., NIELSEN, M. D., LUND, J. O. & MUNCK, O. (1970), *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **26**, 355–367. — 34. LEHFELDT, D. C. & HUTCHENS, T. T. (1971), *Amer. J. Clin. Path.* **55**, 513–522. — 35. COHEN, E. L., GRIM, C. E., CONN, J. W., BLOUGH, W. M. Jr., GUYER, R. B., KEM, D. C. & LUCAS, C. P. (1971), *J. Lab. Clin. Med.* **77**, 1025–1038. — 36. R SSLER, R., HORNEF, W., KLAUS, D. & SIMSCH, A. (1971), *Klin. Wochenschr.* **49**, 870–876. — 37. LINDSTAEDT, H., SCHMIDT, H., KAULHAUSEN, H. & BREUER, H. (1972), *diese Z.* **10**, 512–515. — 38. SEALEY, J. E., GÄRTEN, J. N., LEDINGHAM, G. G. & LARAGH, J. H. (1967), *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **27**, 699–705. — 39. COHEN, E. L., CONN, J. W. & ROVNER, D. R. (1967), *J. Clin. Invest.* **46**, 418–428. — 40. KLAUS, D., HEIZMANN, A. & SADOWSKI, P. (1967), *Deut. Med. Wochenschr.* **92**, 2114–2120. — 41. GORDON, R. D., WOLFE, L. K., ISLAND, D. P. & LIDDLE, G. W. (1966), *J. Clin. Invest.* **45**, 1587–1592. — 42. KAULHAUSEN, H., SCHMIDT, H., LINDSTAEDT, H. & BREUER, H. (1972), *diese Z.* **10**, 151–155.

Prof. Dr. H. Breuer
Inst. f. Klin. Biochemie u. Klin. Chemie
5300 Bonn 1
Venusberg