

Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.
8. Jg., S. 368—373, Juli 1970

Untersuchungen zur Spezifität der fluorometrischen Bestimmung der 11-Hydroxycorticosteroide im Plasma

Von V. GRAEF und HJ. STAUDINGER

Aus dem Biochemischen Institut der Universität Gießen (Direktor: Prof. Dr. Hj. Staudinger)

(Eingegangen am 3. Mai 1970)

Die unspezifischen Fluorogene bei der fluorometrischen Methode zur Bestimmung der 11-Hydroxycorticosteroide aus Plasma wurden als Cholesterin, Cholesterinester und Triglyceride identifiziert. Es wurde festgestellt, daß die Zunahme der unspezifischen Fluoreszenz nach ACTH-Injektion durch einen Anstieg des Cholesterins im Plasma verursacht wird. Die unspezifischen Fluorogene lassen sich durch einfache Verteilung zwischen Wasser und Petroläther aus dem Methylenchlorid-Extrakt des Plasmas entfernen.

Studies on the specificity of the fluorometric determination of plasma 11-hydroxycorticosteroids

The non-specific fluorogens in the fluorometric method for the determination of plasma 11-hydroxycorticosteroids were identified as cholesterol, cholesterol esters and triglycerides. It was confirmed that the increase of non-specific fluorescence by ACTH is caused by cholesterol which also increases after ACTH injection. It is possible to remove the non-specific fluorogens by partition between water and petroleum ether.

Die Bestimmung der 11-Hydroxycorticosteroide im Plasma, also im wesentlichen des Cortisols und des Corticosterons, erfolgt in den meisten klinischen Laboratorien nach der Methode von DE MOOR (1) oder einer ihrer Modifikationen (2—7). Diese Methoden beruhen alle auf dem gleichen Prinzip: Der Methylenchlorid-Extrakt des Plasmas wird mit einer Schwefelsäure-Äthanol-Mischung (75:25 Vol/Vol) geschüttelt. Nach einer bestimmten Zeit, meist nach 5 oder 10 Min., wird die Fluoreszenz der Schwefelsäurephase gemessen. In früheren Untersuchungen (8) wurde gefunden, daß nach vollständiger Hemmung der Nebennierenrindentätigkeit durch gleichzeitige Gabe von Metopiron und Dexamethason im Plasma mit einer fluorometrischen Methode immer noch 11-Hydroxycorticosteroid-Werte von etwa 2 µg/100 ml bestimmt wurden. Es ist ferner bekannt, daß man bei der fluorometrischen Bestimmung der 11-Hydroxycorticosteroide im Plasma von Patienten mit Morbus Addison Werte von 2 µg/100 ml oder darüber erhält. NIELSEN und ASFELDT (8) haben eine große Anzahl von Plasmaproben mit unterschiedlichen Cortisolgehalten parallel nach der fluorometrischen und einer Doppelisotopenverdünnungsmethode untersucht und fanden mit der Fluoreszenzmethode doppelt so hohe Werte für die 11-Hydroxycorticosteroide. Die Differenz zwischen dem fluorometrisch bestimmten 11-Hydroxycorticosteroid-Gehalt und dem wahren Gehalt an Cortisol und Corticosteron wird durch sogenannte unspezifische Fluorogene verursacht, über deren chemische Natur man bisher nichts Genaues wußte. Da die Menge der unspezifischen Fluorogene proportional zum Cortisolgehalt des Plasmas zunimmt, hat man ihren Ursprung in der Nebennierenrinde vermutet und angenommen, daß es sich um Steroide handeln mußte. Es wurde eine große Zahl von Steroiden im Hinblick auf die Fluoreszenzreaktion untersucht (1, 8, 17), man hat aber nur vier Steroide gefunden, die eine nennenswerte

Fluoreszenz mit Schwefelsäure-Äthanol geben, nämlich Cortisol, Corticosteron, 20β-Hydroxycortisol und 21-Desoxycortisol. Die beiden letztgenannten Steroide sind im Plasma jedoch nur in sehr geringen Mengen enthalten, können also diese Störung nicht verursachen. Die Östrogene geben auch eine Fluoreszenz mit Schwefelsäure-Äthanol, sie sind jedoch im Methylenchlorid-Extrakt nicht mehr enthalten, da man sie durch Ausschütteln mit Natronlauge entfernt hat. Da die fluorometrische Bestimmung der 11-Hydroxycorticosteroide wegen ihrer einfachen Ausführung für die Klinik besonders gut geeignet ist, hat man versucht (9), die Spezifität durch rechnerische Korrekturen zu erhöhen. Um aber diese störenden Substanzen wirklich entfernen zu können, ist es notwendig, ihre chemische Struktur zu kennen. In der vorliegenden Arbeit wurden die sog. unspezifischen Fluorogene aus dem Plasmaextrakt isoliert und identifiziert.

Methodik

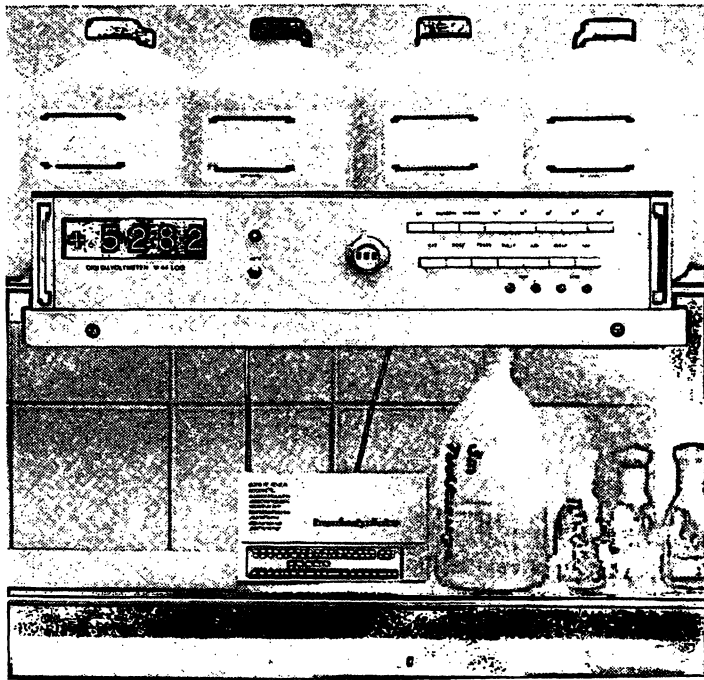
Reagenzien

Petroläther: Petroläther 40—60° p. a. (E. Merck) wird mit je 1/10 Vol. konzentrierter Schwefelsäure, Wasser, 8proz. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und dann dreimal mit je 1/10 Vol. Wasser ausgeschüttelt, über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und destilliert.

Methylenchlorid: 2 l Methylenchlorid werden mit 200 ml 0,1proz. Kaliumpermanganat-Lösung, mit 200 ml 1N NaOH und dreimal mit je 400 ml Wasser ausgeschüttelt. Nach 24stdg. Trocknen über wasserfreiem Calciumchlorid wird das Lösungsmittel destilliert.
Äthanol: 2 l Äthanol 95% (E. Merck) werden mit 2 g Natriumborhydrid destilliert. Das Destillat wird nochmals an einer Füllkörperkolonne destilliert.

Fluoreszenz-Gemisch: Unter Eiskühlung tropft man langsam unter Rühren zu 10 ml Äthanol 30 ml konz. Schwefelsäure. Die Mischung wird stets vor Gebrauch frisch angesetzt.
Fertigplatten Kieselgel F₂₅₄ (20 × 20 cm) für die präparative Schicht-Chromatographie (E. Merck).

WIE HALTEN SIE ES MIT DER ROUTINEARBEIT? BESSER, SIE HALTEN NICHTS DAVON.



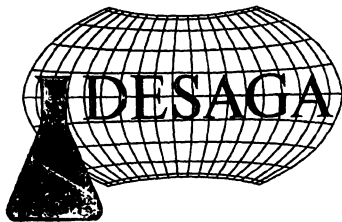
Es gibt genug Labors, die genug Mitarbeiter für Routinearbeiten haben. Wie sieht das bei Ihnen aus? Wir wollen Ihnen sagen, wie Sie bei Ihrer Arbeit in der klinisch-chemischen Analytik Zeit und Aufwand sparen können. Damit Sie und Ihre besten Mitarbeiter sich anspruchsvolleren Aufgaben zuwenden können. Arbeiten Sie mit unserem Digital-Voltmeter W 44 log. Sie können damit:

1. In drei Anwendungsbereichen messen. Die Werte von Transmission, Extinktion, Konzentration.
2. Fehler vermeiden. Beim Ablesen, beim Rechnen, beim Schreiben.
3. Und Ihre Arbeit vereinfachen. Durch automatisches Auswerten von Massenanalysen.

Genug Eigenschaften, die Ihnen nicht egal sein sollten.

Informieren Sie sich. Schreiben Sie an: Hartmann & Braun Digital GmbH
1 Berlin 12 · Bismarckstraße 107 · Telefon (0311) 3 11 31 · Telex 1-83783

H&B
DIGITAL *einfach*
digital
messen



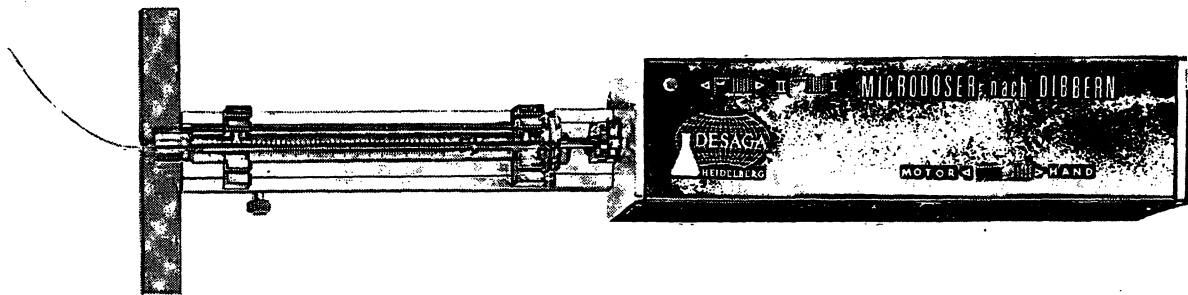
Weltmarke der
Dünnschicht-Chromatographie
und Elektrophorese

DESAGA MICRODOSER[®] nach DIBBERN

Das praktische Handgerät für Strich- oder Punktauftrag
in Dünnschicht- und Papier-Chromatographie
sowie Elektrophorese

einfach — schnell — bequem — genau

Universell einsetzbar auch für die Mikrodosierung



Neu zur Achema

Weitere Neuentwicklungen:

DESAGA FF 4 nach HANNIG,
trägerfreie Ablenkungs-Elektrophorese
VP-Kammern nach DE ZEEUW
zur dampfprogrammierten DC
RESOMAT Membran-Modell
nach DIBBERN
für gastro-enterale Resorption

TASOMAT — Vollautomat
für das TAS-Verfahren nach STAHL
UNIVERSAL DE-Kammer nach RADOLA
für isoelektrische Fokussierung
MIKROZONENSCHMELZEN
nach SCHILDKNECHT
Elektronisch gesteuerte Schlauchpumpen

Fordern Sie Informationsmaterial

DESAGA · 69 Heidelberg 1 · Postfach 407

Otto Spatz

Buchhandlung für Medizin und Grenzgebiete

besorgt Ihnen jedes lieferbare Buch aus
dem In- und Ausland und jede Zeitschrift
im Abonnement oder als Einzelheft.

Fordern Sie bitte kostenlos unseren Litera-
turkatalog zur „Analytica 70“ an.

Otto Spatz, 8000 München 15, Schillerstraße 51

Verlangen Sie bitte
bei Ihrem Buchhändler
unser neues Verzeichnis

Chemie und Grenzgebiete

Es informiert Sie
gründlich
über unsere Produktion



Walter de Gruyter & Co.
Berlin 30



CARL SCHLEICHER & SCHÜLL
3354 DASSEL

SELECTRON

- CA-Elektrophoresefolien, ein
ideales Trägermaterial für die
elektrophoretische Trennung
von Stoffgemischen
- Ultrahülsen und Apparaturen
zur Einengung eiweißarmer
Körperflüssigkeiten
- Filter mit
verschiedenen Porengrößen
zur Mikrofiltration

SELECTA

- Pulver, Streichsuspensionen,
Fertigplatten
und Fertigfolien zur
Dünnschichtchromatographie

Dünnschichtplatten 20 × 20 cm, mit einer 0,25 mm dicken Schicht Kieselgel HF₂₅₄ versehen, werden nach dem Ausziehen 3 Stdn. bei 110° im Trockenschrank aktiviert.

Extraktion des Plasmas: 20 ml Sammelplasma werden 1 Min. mit 40 ml Petroläther und anschließend zweimal mit je 40 ml Methylenchlorid ausgeschüttelt. Eine Trennung der Phasen erreicht man durch Zentrifugieren. Der Petroläther-Extrakt wird verworfen, die vereinigten Methylenchlorid-Extrakte schüttelt man einmal mit 20 ml 0,1N NaOH und zweimal mit je 20 ml Wasser aus, trocknet über wasserfreiem Natriumsulfat und verdampft das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer. Wenn größere Plasamengen aufgearbeitet werden sollen, extrahiert man das Plasma in Portionen zu je 20 ml.

Aufklärung der unbekanntenen Fluorogene

In einem Vorversuch wurde geprüft, ob sich nach dünn-schichtchromatographischer Auftrennung eines Plasma-extraktes einzelne Zonen mit den unbekanntenen Fluorogenen erkennen lassen. Dazu wurde der Extrakt von 5 ml Sammelplasma mit Methylenchlorid auf eine Dünnschichtplatte (Kieselgel HF₂₅₄) aufgetragen. Als Referenz trugen wir daneben je 2 µg Cortisol und Corticosteron auf und entwickelten die Platte im System Chloroform/Äthanol (95:5 v/v). Sodann wurde die Laufstrecke des Plasmaextraktes vom Start bis zur Front in einzelne Abschnitte unterteilt, wobei Cortisol, Corticosteron sowie eine unter der UV-Lampe blau und eine schwach gelb fluoreszierende Zone jeweils in ein Feld kamen. Wir schabten die Kieselgelschicht der einzelnen Abschnitte von der Platte ab und eluierten das Adsorbens zweimal mit je 2 ml Methanol. Zum Verdampfungsrückstand der Eluate gaben wir je 1 ml Fluoreszenz-Gemisch und 4 ml Methylenchlorid, schüttelten 30 Sek., saugten die obere Schicht ab und maßen die Fluoreszenz nach 10 Min. Tabelle 1 zeigt die Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Abschnitte abzüglich eines Plattenleerwertes. Man sieht, daß die unbekanntenen Fluorogene hauptsächlich in den Abschnitten 8,1—10,7 cm und 12,2—15,0 cm lokalisiert sind. Die Eluate dieser Abschnitte werden im folgenden als Fraktion 2 und Fraktion 1 bezeichnet.

Um größere Mengen dieser unbekanntenen Substanzen zu gewinnen, wurde der Extrakt von 100 ml Sammelplasma mit Methylenchlorid strichförmig auf eine präparative Schichtplatte aufgetragen. Nach zweimaliger Entwicklung im System Chloroform/Äthanol (95:5 v/v) zeigten sich unter der UV-Lampe (366 nm) die blau fluoreszierende Zone mit dem R_F -Wert 0,85 (Fraktion 1)

Tab. 1

Fluoreszenz der Fraktionen eines Extraktes von 5 ml Plasma nach Dünnschichtchromatographie in je 1 ml Fluoreszenz-Gemisch. Anregung 470 nm; Fluoreszenz 525 nm

Entfernung vom Start (cm)	Fluoreszenz (Skt.)	
16,4—17,6	4,5	
15,0—16,4	2	
12,2—15,0	79	auf DC-Platte blau fluoreszierend
10,7—12,2	37,5	
8,1—10,7	270	auf DC-Platte gelb fluoreszierend
6,2—8,1	15	
4,9—6,2	5	
3,5—4,9	17	Corticosteron
2,7—3,5	1	
1,4—2,7	100	Cortisol
0—1,4	6	

und eine bei Tageslicht gelb erscheinende Zone ($R_F = 0,60$), die unter der UV-Lampe schwachgelb fluoreszierte (Fraktion 2). Beide Zonen wurden ausgekratzt und mit Methanol eluiert.

Untersuchung der in Fraktion 1 enthaltenen Stoffe

Wir dampften das Eluat von Fraktion 1 im Vakuum ein und trugen den Rückstand mit Methylenchlorid strichförmig auf eine präparative Schichtplatte auf, die 3 Stdn. im System Petroläther/Diisopropyläther (99:1 v/v) nach dem Durchlaufverfahren (11) chromatographiert wurde. Auf der Platte erschien eine breite, mattweiße Zone (etwa 4—9 cm von der Startlinie entfernt), die ausgekratzt und mit Methanol eluiert wurde. Der Verdampfungsrückstand des Eluates wurde durch Lösen in Chloroform von Kieselgel befreit. Nach Abdampfen des Chloroforms nahmen wir mit dem Rückstand ein IR-Spektrum auf (KBr-Preßtechnik). Maxima bei 1750 und 1175 cm^{-1} zeigten das Vorliegen von Esterbindungen an. Da eine Bande bei etwa 3500 cm^{-1} fehlte, konnte auf die Abwesenheit von Hydroxylgruppen geschlossen werden. Ein breites Maximum bei 720 cm^{-1} deutete auf die Anwesenheit einer längeren Kohlenstoffkette. Reines Cholesterinpalmitat gab ein ähnliches IR-Spektrum wie das von Fraktion 1. Mit einem Teil der zur IR-Spektroskopie verwendeten Substanz führten wir die Liebermann-Burchard-Reaktion (10) auf Cholesterin durch, die positiv ausfiel.

Um zu prüfen, ob sich Fraktion 1 in mehrere Zonen auftrennen läßt und ob sie noch weitere fluorogene Stoffe enthält, chromatographierten wir auf einer Dünnschichtplatte (Kieselgel HF, Petroläther/Diisopropyläther (99:1 v/v), Laufzeit 3 Stdn.) nebeneinander die aus je 20 ml Plasma gewonnene Fraktion 1 sowie reines Cholesterin-stearat. Der eine Teil der Platte mit einem Extrakt von Fraktion 1 und dem Cholesterin-stearat wurde mit einer Lösung von Antimon(III)-chlorid in Chloroform angesprüht. Nach 5 Min. Erhitzen auf 110° erschienen bei der aufgetrennten Fraktion 1 fünf rotgefärbte Flecken. Diese Substanzen werden im folgenden als 1/1 bis 1/5 bezeichnet. Das Cholesterin-stearat zeigte die gleiche rote Farbe. Es war so weit gelaufen wie der schnellste der fünf Flecken des Plasmaextraktes. Anhand der angefärbten Flecken wurden die 5 Zonen sowie der unter der UV-Lampe blau fluoreszierende Startfleck des nicht angesprühten Teiles der Platte mit der Fraktion 1 markiert, ausgekratzt und mit Methanol eluiert. Zu den Verdampfungsrückständen der Eluate gaben wir je 2 ml Fluoreszenz-Gemisch und bestimmten die Fluoreszenz nach 10 und nach 17 Min. (Tab. 2).

Das zur Trennung verwendete Lösungsmittelsystem Petroläther/Diisopropyläther (99:1 v/v) ist von ZÖLLNER und Mitarbeitern (12) zur Trennung der Cholesterinester des Plasmas angegeben worden. Das von uns erhaltene Chromatogramm hat nach Anfärben der Flecken mit Antimon(III)-chlorid das gleiche Aussehen wie ein Chromatogramm, das ZÖLLNER veröffentlicht hat. Auch die Farbintensität der fünf Zonen stimmt ungefähr mit den Angaben dieser Autoren überein, so daß

Tab. 2
Fluoreszenzintensitäten der nach Auftrennung von Fraktion 1 erhaltenen Fraktionen
Anregung 470 nm; Fluoreszenz 525 nm

Fraktion	Fluoreszenz (Skt.)		Laufstrecke auf dem Chromatogramm (cm)	Ester des Cholesterins
	nach 10 Min.	nach 17 Min.		
1/1	32	41	9,0	Palmitin- und Stearinsäure einfach ungesättigte Fettsäuren (Ölsäure) zweifach ungesättigte Fettsäuren (Linolsäure) dreifach ungesättigte Fettsäuren noch stärker ungesättigte Fettsäuren
1/2	35	67	8,2	
1/3	143	260	7,0	
1/4	81	125	5,2	
1/5	45	120	4,2	
1/6 (Start)	150	200	0	

es als sicher gelten kann, daß es sich bei den Fraktionen 1/1 bis 1/5 um verschiedene Ester des Cholesterins handelt. Die in Tabelle 2 angegebenen Fettsäureanteile der Cholesterinester sind der Arbeit von ZÖLLNER (12) entnommen. Die am Start verbliebene Fraktion 1/6 zeigte mit dem Schwefelsäure-Äthanol-Fluoreszenzgemisch auch eine recht starke Fluoreszenz, so daß wir Fraktion 1/6 weiter aufzutrennen und die darin enthaltenen Fluorogene zu identifizieren versuchten.

Untersuchung der Fraktion 1/6

Aus etwa 30 ml Plasma wurde durch zweimalige Dünnschichtchromatographie die Fraktion 1/6 isoliert und auf einer Dünnschichtplatte (Kieselgel HF) im System Benzol/Methylenchlorid/Äthylacetat (3:1:1 v/v) rechromatographiert. Unter der UV-Lampe war ein grün fluoreszierender Fleck am Start und ein blau fluoreszierender Fleck mit dem R_F -Wert 0,79—0,86 erkennbar. Dieser Fleck erschien bei Tageslicht mattweiß. Er wurde ausgekratzt. Darauf stellten wir die Platte in eine Kammer mit Joddampf, worauf drei weitere Flecken erschienen (Tab. 3). Die Flecken wurden markiert und nach dem Abblasen der Joddämpfe ausgekratzt und mit Methanol eluiert. Tabelle 3 zeigt die durch Schwefelsäure-Äthanol induzierten Fluoreszenzen der Verdampfungsrückstände der Eluate.

Tab. 3
Aus Fraktion 1/6 nach Dünnschichtchromatographie isolierte Fraktionen

Frakt.	R_F	Jodfärbung bzw. Fluoreszenz auf der DC-Platte	Fluoreszenzintensitäten (Skt.) in Schwefelsäure-Äthanol
1/6/1	0,79—0,86	blau fluoreszierend	69
1/6/2	0,46	Jod: schwache Färbung	—
1/6/3	0,34	Jod: schwache Färbung	—
1/6/4	0,03	Jod: starke Färbung	36
1/6/5	0	grün fluoreszierend	54

Untersuchung der Fraktion 1/6/1

Durch Aufarbeitung und chromatographische Auftrennung von etwa 400 ml Sammelplasma wurde eine größere Menge der Fraktion 1/6/1 isoliert. Ein Teil davon diente zur Aufnahme eines IR-Spektrums. Offenbar besitzen die in dieser Fraktion enthaltenen Stoffe keine Hydroxylgruppen, da eine Bande bei etwa 3500 cm^{-1} fehlte. Maxima bei 1750 und 1128 cm^{-1} zeigen das Vorliegen von Esterbindungen an. Eine breite Bande bei 722 cm^{-1} beweist das Vorhandensein von längeren Kohlenstoffketten. Beim Eluieren fiel

ferner die fettige Konsistenz auf, so daß an Triglyceride gedacht werden konnte. Um dies zu beweisen, chromatographierten wir Fraktion 1/6/1 sowie authentischen Glycerin-trilaurinsäureester im System *n*-Hexan/Diäthyläther/Eisessig (90:10:1 v/v) auf einer Kieselgel-H-Platte. Nach Ansprühen mit einer 0,1proz. äthanolischen Lösung von 2', 7'-Dichlorfluorescein wurden ein starker unter der UV-Lampe fluoreszierender Fleck mit dem R_F -Wert 0,24 und ein sehr schwacher Fleck mit dem R_F -Wert 0,50 sichtbar. Der Glycerin-trilaurinsäureester hatte einen ähnlichen R_F -Wert (0,20) wie der starke Fleck von Fraktion 1/6/1 und gab nach Ansprühen mit 2', 7'-Dichlorfluorescein die gleiche gelbgrüne Fluoreszenz unter der UV-Lampe. Diese Versuche zeigen, daß es sich bei der Fraktion 1/6/1 im wesentlichen um Triglyceride handelt.

Untersuchung der Fraktion 2

Wir isolierten Fraktion 2 durch präparative Schichtchromatographie von Plasmaextrakt. Der nach Eluieren mit Methanol und Eindampfen des Eluates erhaltene Rückstand wurde zur Entfernung von Kieselgel in Diäthyläther gelöst. Diese Lösung filtrierten wir durch eine kleine Säule aus Aluminiumoxid (Akt. II), dampften das Eluat ein und nahmen mit dem Rückstand ein IR-Spektrum auf. Das Spektrum war ähnlich demjenigen von reinem Cholesterin, eine kleine Bande bei 1720 cm^{-1} schien von einer Verunreinigung her zu rühren. Fraktion 2 gab eine positive Liebermann-Burchard-Reaktion, hatte auf einer Kieselgelplatte (Chloroform/Äthanol 95:5 v/v) den gleichen R_F -Wert wie authentisches Cholesterin, gab nach Ansprühen der Dünnschichtplatte ebenso wie Cholesterin mit Antimon(III)-chlorid in Eisessig eine kirschrote und nach Besprühen der Platte mit Anisaldehyd-Schwefelsäure eine violette Färbung. Fraktion 2 wurde ferner mit Acetanhydrid-Pyridin acetyliert. Das Acetat hatte auf einer Kieselgelplatte den gleichen R_F -Wert (0,80) wie reines Cholesterin-acetat (System Chloroform/Äthanol [95:5 v/v]). Auf dieser Platte war unter der UV-Lampe der schwachgelb fluoreszierende Fleck vom Cholesterin-acetat getrennt und hatte noch den gleichen R_F -Wert wie vor der Acetylierung. Durch Einstellen der Platte in eine mit Joddampf gefüllte Kammer zeigte sich, daß dieser gelb fluoreszierende Stoff im Vergleich zum Cholesterin-acetat in sehr viel kleinerer Menge vorhanden war. Aus diesem Grunde wurde diese Substanz nicht näher untersucht.

Einfluß einer ACTH-Injektion auf die Fraktionen des Plasma-Extraktes

Wir nahmen einer männlichen Versuchsperson (24 J.) nüchtern 10 ml Blut ab, injizierten anschließend i. v. 100 I. E. eines synthetischen ACTH-Präparates (DW-75 „Sandoz“) und nahmen 2 $\frac{1}{2}$ Stdn. später erneut Blut ab. Das Plasma vor und nach ACTH-Gabe wurde extrahiert, den Extrakt trennten wir dünnschichtchromatographisch (Kieselgel HF₂₅₄, Chloroform/Äthanol (95:5 v/v) auf und isolierten die Fraktionen 1 und 2 sowie Cortisol. Der Cortisolgehalt des Plasmas wurde anhand einer mitchromatographierten Cortisolmenge (1,06 µg) errechnet. Wir versetzten die einzelnen Proben mit je 2 ml Fluoreszenz-Gemisch und bestimmten die Fluoreszenz nach 10 Min. (Tab. 4).

Tab. 4

Fluoreszenzintensitäten der Fraktionen aus Plasma-Extrakt vor und 2 $\frac{1}{2}$ Stdn. nach ACTH-Injektion. Anregung 470 nm; Fluoreszenz 525 nm

Fraktion	vor ACTH		nach ACTH	
	Skt.	µg/100 ml	Skt.	µg/100 ml
Cortisol	360	12,9	1130	40,6
Fraktion 1 (Cholesterinester, Triglyceride)	375		370	
Fraktion 2 (Cholesterin)	790		2240	

Wie ersichtlich ist, nehmen Cortisol und Cholesterin nach ACTH zu, während die Fraktion 1, die Cholesterinester und Triglyceride enthält, etwa gleich bleibt.

Fluoreszenzmessung der einzelnen aus Plasma isolierten Fraktionen

Um festzustellen, wie stark die Fluoreszenz der einzelnen Fraktionen ist, trennten wir den Extrakt von 5 ml Plasma durch mehrmalige Dünnschichtchromatographie auf. Cortisol und Corticosteron wurden zusammen eluiert. Der Verdampfungsrückstand der Eluate wurde mit je 4 ml Methylenchlorid und 2 ml Fluoreszenz-Gemisch versetzt und 30 Sek. geschüttelt.

Tab. 5

Fluoreszenzmessung der Fraktionen des Extraktes von 5 ml Plasma. Anregung 470 nm; Fluoreszenz 525 nm

Fraktion	relative Fluoreszenz (Skt.)
Cortisol + Corticosteron	105
Cholesterin	107
Cholesterinester	40
Triglyceride	24
Fraktion 1/6/5	13

Nach Absaugen der oberen Schicht wurde die Fluoreszenz der unteren Phase nach 10 Min. gemessen (Tab. 5). 0,1 mg reines Cholesterin gab nach der gleichen Behandlung mit Fluoreszenz-Gemisch/Methylenchlorid und Messung nach 10 Min. eine relative Fluoreszenz von 106 Skt., die 30 Min. nach Reaktionsbeginn auf 166 Skt. angestiegen war. Die gleiche Menge verestertes Cholesterin (es wurde Cholesterin-stearat verwendet) gab nach 10 Min. eine Fluoreszenz von 19,5 Skt., die auf 29 Skt. nach 30 Min anstieg. Wenn man die nach 10 Min.

erhaltenen Fluoreszenzwerte zur Berechnung des Cholesteringehaltes des verwendeten Plasmaextraktes heranzieht, findet man, daß dieser Extrakt von 5 ml Plasma 0,1 mg freies und 0,2 mg verestertes Cholesterin enthielt. Das gleiche Ergebnis erhielten wir mit der Farb-reaktion auf Cholesterin von PEARSON (13). Der Petrolätherextrakt von 5 ml dieses Plasmas enthielt 0,105 mg Gesamt-Cholesterin, im Methylenchlorid-Extrakt waren 0,300 mg Gesamt-Cholesterin enthalten. 5 ml dieses Plasmas enthielten vor der Extraktion 11,6 mg Gesamt-Cholesterin.

Entfernung der unspezifischen Fluorogene aus dem Plasmaextrakt

Um die fluorometrische Bestimmungsmethode für 11-Hydroxycorticosteroide spezifischer zu machen, müssen Cholesterin, Cholesterinester und Triglyceride aus dem Methylenchlorid-Extrakt entfernt werden. Dazu versuchten wir, wie sich freies und verestertes Cholesterin einerseits und Cortisol andererseits bei der Verteilung zwischen Wasser und Petroläther sowie zwischen Wasser und Methylenchlorid verhalten.

Zu 150 µg Cholesterin und 50 µg Cholesterin-stearat gaben wir in einem Schliffreagenzglas 2 ml Wasser und schüttelten es zweimal mit je 5 ml Petroläther aus. Die wäßrige Phase wurde anschließend mit 10 ml Methylenchlorid ausgeschüttelt. Petroläther- und Methylenchlorid-Extrakt dampften wir ein und bestimmten darin nach PEARSON (13) Cholesterin. Der Petroläther-Extrakt enthielt 95% und der Methylenchlorid-Extrakt 5% des Cholesterins. Ebenso verteilten wir 0,3 µg Cortisol zwischen Wasser und Petroläther sowie anschließend zwischen Wasser und Methylenchlorid. Der Petroläther-Extrakt enthielt kein Cortisol. Durch Methylenchlorid ließen sich 80% des Cortisols extrahieren.

Auf Grund dieser Versuche bestimmten wir die 11-Hydroxycorticosteroide des Plasmas nach folgender Methode, bei der die störenden Fluorogene weitgehend entfernt werden. 2 ml Plasma wurden in einem großen Reagenzglas mit Schliff mit 12 ml Methylenchlorid 30 Sek. geschüttelt. Nach Absaugen der oberen Schicht wurde der Methylenchlorid-Extrakt mit 2 ml 0,1N NaOH und 5 ml Wasser gewaschen. 10 ml der Methylenchlorid-Lösung wurden in ein Schliffreagenzglas pipettiert und am Rotationsverdampfer eingedampft. Zum Rückstand gaben wir 2 ml Wasser, schüttelten zweimal mit je 5 ml Petroläther und anschließend mit 12 ml Methylenchlorid aus. Nach Trocknen über Natriumsulfat wurden 10 ml der Methylenchlorid-Lösung in ein neues Schliffreagenzglas überführt und mit 4 ml Fluoreszenz-Gemisch 30 Sek. geschüttelt. Nach Absaugen der Methylenchlorid-Schicht wurde die Fluoreszenz der unteren Phase nach 10 Min. gemessen (Anregung 470 nm; Fluoreszenz 525 nm). Ein Cortisol-Standard, der zur Berechnung diente, wurde in der gleichen Weise wie das Plasma behandelt.

In Tabelle 6 sind die nach der Methode von DE MOOR und nach der neuen Methode erhaltenen Werte für die

Tab. 6
Plasma-11-Hydroxycorticosteroide nach der Methode von DE MOOR
und nach der neuen Methode

Methode von DE MOOR 11-Hydroxycorticosteroide ($\mu\text{g}/100\text{ ml}$)	Neue Methode 11-Hydroxycorticosteroide ($\mu\text{g}/100\text{ ml}$)
5,0	2,5
6,0	1,6
9,0	8,5
10,0	6,0
11,0	8,5
11,9	7,3
12,0	9,0
13,0	11,5
13,6	10,6
14,0	12,8
16,0	13,5
19,0	18,0
24,2	14,3

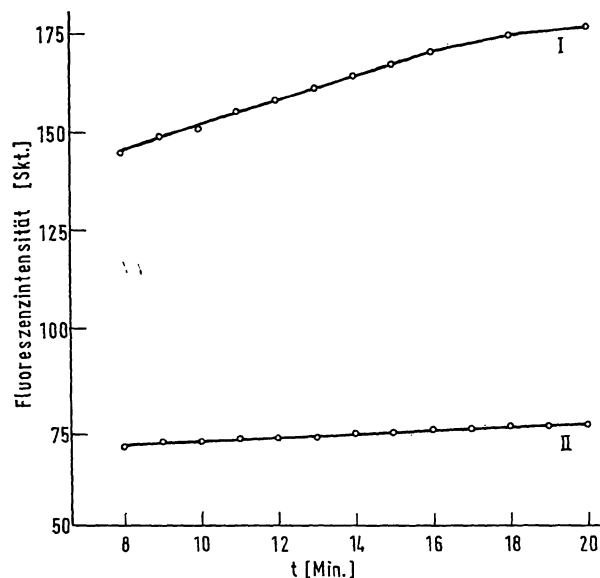


Abb. 1
Zeitlicher Verlauf der Fluoreszenz eines Plasmaextraktes nach der
Methode von DE MOOR (I) und nach der neuen Methode (II) in 1 ml
Schwefelsäure-Äthanol (75:25 v/v). Anregung 470 nm; Fluoreszenz
525 nm

11-Hydroxycorticosteroide von mehreren Plasmaproben gegenübergestellt. Die ersten beiden Plasmen stammen von Patienten, bei denen der Verdacht auf Morbus Addison bestand. Das Plasma einer weiteren Versuchsperson wurde nach beiden Methoden extrahiert. Die Fluoreszenz des Schwefelsäure-Äthanol-Extraktes wurde bis 20 Min. nach Zugabe des Fluoreszenz-Gemisches verfolgt. Wie Abbildung 1 zeigt, nimmt die Fluoreszenz bei dem nach DE MOOR erhaltenen Extrakt viel stärker zu als bei dem nach der neuen Methode erhaltenen Extrakt.

Diskussion

Schon DE MOOR und Mitarbeiter (1) stellten fest, daß bei der fluorometrischen Bestimmung der 11-Hydroxycorticosteroide im Plasma noch andere Substanzen mitbestimmt werden, die man unspezifische Fluorogene genannt hat. Diese Autoren fanden im Plasma von 26 Versuchspersonen, denen man zur Hemmung der Cortisolsekretion Dexamethason gegeben hatte, $4,3\ \mu\text{g}$ 11-Hydroxycorticosteroide/100 ml Plasma, d. h. 25% der

Menge, die vor Suppression im Plasma bestimmt wurde. Über die Natur der unspezifischen Fluorogene war bisher nichts Genaues bekannt. FRANKEL (14) vermutete, daß zwei oder mehr Arten von Fluorogenen für diese Störung verantwortlich zu machen sind. RUDD (15) vertrat die Ansicht, daß diese Störfluoreszenz hauptsächlich durch Di- und Triglyceride hervorgerufen werden könnte. Wir haben nun nachgewiesen, daß es sich bei diesen unspezifischen Fluorogenen im wesentlichen um Cholesterin, Ester des Cholesterins mit verschiedenen Fettsäuren und Triglyceride handelt. Diese Substanzen wurden durch IR-Spektren, durch spezifische Farbreaktionen, durch dünnschichtchromatographischen Vergleich mit den authentischen Verbindungen und durch Derivatbildung nachgewiesen. Wir konnten zeigen, daß nur ein sehr kleiner Teil des im Plasma enthaltenen freien und veresterten Cholesterins in den Methylenchlorid-Extrakt gelangt. Durch die als Vorreinigung gedachte Extraktion des Plasmas mit Petroläther gehen nur 0,9% des im Plasma enthaltenen Gesamt-Cholesterins in die organische Phase. Durch anschließende Methylenchlorid-Extraktion werden weitere 2,6% des Plasma-Gesamt-Cholesterins extrahiert, die eine Erhöhung der fluorometrisch bestimmten 11-Hydroxycorticosteroid-Werte verursachen.

Die Fluoreszenz einer Lösung von reinem Cortisol in Schwefelsäure-Äthanol erreicht ihr Maximum nach 5 Min. und bleibt dann konstant. Beim Corticosteron wird das Maximum nach 10–15 Min. erreicht, danach ändert sich die Fluoreszenz nicht mehr. Es ist schon früher beobachtet worden (8), daß die Fluoreszenz eines Plasma-Extraktes bis 20 Min. nach Zugabe des Fluoreszenz-Gemisches ständig ansteigt. Dieser Anstieg wurde auch von uns beobachtet. Er wird durch im Plasma-Extrakt enthaltenes Cholesterin und dessen Ester verursacht. NIELSEN und ASFELDT (8) bestimmten bei einer Versuchsperson, bei der die Cortisol-Synthese durch Gabe von Metopiron und Dexamethason blockiert war, $0,8\ \mu\text{g}$ Cortisol in 100 ml Plasma. Gleichzeitig gab man der Person dann ACTH und fand, daß sich der Cortisolgehalt des Plasmas, nach einer Doppellisotopen-Methode bestimmt, $2\frac{1}{2}$ Std. danach noch nicht geändert hatte, während die fluorometrisch bestimmten 11-Hydroxycorticosteroide von $2,1\ \mu\text{g}/100\text{ ml}$ (zum Zeitpunkt der ACTH-Gabe) auf $6,0\ \mu\text{g}/100\text{ ml}$ ($2\frac{1}{2}$ Std. nach ACTH-Gabe) angestiegen waren. Um festzustellen, wodurch dieser Anstieg verursacht wird, gaben wir einer Versuchsperson 100 I. E. ACTH i. v. und stellten fest, daß Cortisol $2\frac{1}{2}$ Std. nach Injektion auf das 3,1fache und das freie Cholesterin des Plasma-Extraktes auf das 2,8fache des Ausgangswertes angestiegen waren. Also rührt der Anstieg der unspezifischen Fluoreszenz nach ACTH-Belastung vom Cholesterin her. Nach DAVIS und GARREN (16) wird, wie ihre Untersuchungen an Ratten gezeigt haben, die Aktivität der adrenalen Cholesterin-esterase durch ACTH erhöht. Dabei entsteht aus Cholesterinestern, die ein Depot für Steroidsynthesen darstellen, das freie Cholesterin. Da Cholesterin eine starke Fluoreszenz mit Schwefelsäure-

Äthanol gibt, ist es also verständlich, daß die unspezifische Fluoreszenz nach ACTH-Gabe ansteigt. Wenn man das Plasma nach DE MOOR (1) extrahiert, den Methylenchlorid-Extrakt dann eindampft und den Rückstand zwischen Wasser und Petroläther und sodann zwischen Wasser und Methylenchlorid verteilt, werden

die störenden Fluorogene entfernt. Durch diese einfachen Maßnahmen läßt sich die Spezifität der Methode ganz erheblich verbessern.

Wir danken Herrn ALBERT BRÜSTLE und Herrn FRANZ HÄUSER für ihre Mitarbeit.

Literatur

1. DE MOOR, P., O. STEENO, M. RASKIN und A. HENDRIKX, *Acta endocr.*, K'hn 33, 297 (1960). — 2. MATTINGLY, D., *J. Clin. Path.*, London 15, 374 (1962). — 3. VAN DER VIES, J., *Acta endocr.*, K'hn 38, 399 (1961). — 4. BRAUNSBURG, H. und V. H. T. JAMES, *J. Endocrin.* 25, 309 (1962). — 5. STEWART, C. P., F. ALBRECHT-RECHT und L. M. OSMAN, *Clin. chim. Acta (Amsterdam)* 6, 696 (1961). — 6. RUDD, B. T., J. M. COWPER, N. CRAWFORD, *Clin. chim. Acta (Amsterdam)* 6, 680 (1961). — 7. STAHL, F., I. HERTLING und G. KNAPPE, *Acta biol. med. germ.* 10, 480 (1963). — 8. NIELSEN, E. und V. H. ASFELDT, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 20, 185 (1967). — 9. STAHL, F. und G. DÖRNER, *Acta endocr.*,

K'hn 51, 175 (1966). — 10. LIEBERMANN, C., *Ber. dtsh. chem. Ges.* 18, 1803 (1885). — 11. GRAEF, V. und HJ. STAUDINGER, *diese Z.* 5, 314 (1967). — 12. ZÖLLNER, N., G. WOLFRAM und G. AMIN, *Klin. Wschr.* 40, 273 (1962). — 13. PEARSON, S., S. STERN und T. H. MCGAVACK, *Analytic. Chem.* 25, 813 (1953). — 14. FRANKEL, A. I., B. COOK, J. W. GRABER und A. V. NALBANDOV, *Endocrinology* 80, 181 (1967). — 15. RUDD, B. T., P. SAMPSON und B. N. BROOKE, *J. Endocrin.* 27, 317 (1963). — 16. DAVIS, W. W. und L. D. GAREN, *Biochem. biophys. Res. Commun.* 24, 805 (1966). — 17. ABRAHAM, R. und HJ. STAUDINGER, *diese Z.* 2, 16 (1964).

Prof. Dr. Hj. Staudinger
63 Gießen
Friedrichstr. 24