On the Determination of Aldosterone in a Small Amount of Various Biological Materials by Means of the Double Isotope Derivative Dilution Method and Thin Layer Chromatography

Kazuo ISHIBASHI

Laboratory of Endocrinology & Metabolism (Chief : Tatsuo Oda, M.D.)

2nd Department of Internal Medicine (Director : Professor Kenzo Oshima, M.D.)

Nihon University School of Medicine, Itabashi, Tokyo, Japan

The theoretical basis for isotope derivative assays was developed by Udenfriend and his associates (1950) with the use of the labeled pipsyl compounds for the analysis of amino acid.

Bojesen (1956) used the labeled pipsyl derivatives to determine plasma cortisol. Avivi et al. (1956) attempted to use tritium and C^{14} -labeled acetate derivatives for assay of aldosterone. The experiment was theoretically correct but failed because of incomplete purification, low specific activity of the tritium tracer, and the use of peripheral plasma.

Then, Ayres (1961), Tait (1961), Jones (1959) used the labeled steroids to assay corticosteroids. The double isotope derivative procedure was investigated by Kliman and Peterson (1959). They used the paper chromatography to purify aldosterone and aldosterone diacetate. The procedure of paper chromatography requires a complicated technique and is time consuming. Therefore, I have attempted to perform the isolation and determination of aldosterone by the method applying thin layer chromatography and double isotope derivative dilution assay.

I) Sampling and extraction (Fig. 1)

Urine samples for 24 hours of 3-5 rats were acidified to pH 1.0 and allowed to stand for 24 hours at 20°C. They were extracted five times with 0.2 vol. chloroform and the extracts were washed with 0.1 vol. 0.1N sodium hydroxide and distilled water. The combined extracts were evaporated to dryness in vacuum. Adrenal venous blood samples of dogs by J. Yoshizawa's method were extracted two times with 0.2 vol. chloroform, and fat disconnected itself from the extracts.

The materials of rat's adrenals were incubated by Saffran's method and incubated medium were extracted two times with 0.5 vol. chloroform; $1 \cdot 2 \cdot H^3$ aldosterone was added to each sample as an indicator before the extraction with chloroform. Following the extraction, the extracted materials were applied into the column chromatography.

II) Thin layer chromatography

The Yazawa (Japan) apparatus for thin layer chromatography was used, with Kieselgel-G (Merck) as absorbent. All the chromatographies were developed by the ascending techniques and the length of development was 10-14cm. The following solvent systems were used (Fig. 2):

System A Ethyl acetate (90); chloroform (10); water (1)

System B Methanol (10); chloroform (90); water (1)

System D Benzene (50); acetone (59); water (2)

System E Methal (20); Benzene (80); water (1)

In order to check the purification of aldosterone, the U.V. absorption spectra and sulfuric acid chromogen spectra were examined. It was fully recognized that the spectra of aldosterone exactly coincided with that of reference standard (Fig. 3).

III) Acetylation and distribution (Fig. 4)

After the purification and isolation by T.L.C. (system A, B, D), the residues were transferred with a small volume of methanol to an acetylation tube, and the extracts were dried in N^2 gas.

Anhydrous pyridine and $1 \cdot C^{14}$ acetic anhydride were added to each tube, and the tubes were covered by stoppers very tightly. The samples were incubated for 24 hours at $37^\circ C$. After acetylation, 2ml distilled water was added to each tube and left to stand for 1 hour. Then 5ml chloroform was added to each tube, and washed three times with 2ml distilled water, and the chloroform layer was taken in.

In order to confirm the complete acetylation, the acetylation product was compared with pure aldosterone on Infra-Red-Spectra (Fig. 6).

This showed complete acetylation. After acetylation, residues were developed two times on T.L.C. (system A.E.).

H^3/C^{14} ratio was constant (10:1) on two developments of T.L.C. Over-all recovery of this procedure was about 20%.

IV) Counting

Phosphor reagent, 5ml, was added to the dry residue and the samples were assayed for tritium and C^{14} in a liquid scintillation counter. Tritium quenching was highest in the sample of rat's urine.

RESULTS (Tab. 1)

The aldosterone excretion rate of normal rat's urine was $0.01-0.06 \mu g/day$. The range of aldosterone values of adrenal venous blood of normal dogs was $0.013-0.018 g/ml$. The aldosterone production values following the incubation of rat's adrenals were $0.205-0.253 \mu g/100mg$. adrenal weight/12 hours.

SUMMARY

A new method using T.L.C. and double isotope derivative dilution assay for the determination of a small amount of aldosterone in various biological materials is reported. This method will be strongly recommended for its speediness, convenience and economy.

I wish to thank to Dr. Tatsuo Oda, Akio Ishii and Hideo Suzuki for the valuable suggestions and advices, and to Prof. Dr. Kenzo Oshima for his continuous encouragement in this study.

(pp. 1248~1253)

Double Isotope Derivative Dilution Method と Thin Layer Chromatography による微量生体試料に於ける Aldosterone の定量法について

日本大学医学部第二内科学教室 (指導: 大島研三教授)

石 橋 凱 夫

(昭和41年11月7日受付)

緒 論

Isotope derivative assay の理論は、1950年に Udenfriend¹⁾ が、labeled pipsyl compounds を用い、アミノ酸を分析することによつて発展させた。

Steroid に関しては、1956年 Bojesen²⁾ が labeled pipsyl derivative を用いて plasma cortisol を、次いで同じく1956年に、Avivi³⁾ が H³-labeled acetate と C¹⁴-labeled acetate を用いて aldosterone の assay を試みている。しかし試料の純化が不完全であつたこと、tracer の specific activity が低く、かつ生体試料として末梢血を使用した等の多くの問題点のため成功に至らなかつた。その後更に Ayres⁴⁾ (1957), Tait⁵⁾ (1961), Ulick⁶⁾ (1961), Jones⁷⁾ (1959) 等が labeled steroid を用いて steroid の assay を試みている。1959年 Kliman & Peterson⁸⁾ は、H³-labeled acetic anhydride と、C¹⁴-aldosterone diacetate を用いた double isotope derivative dilution method を考案した。これによると、犬副腎静脈血中 aldosterone については、0.001 μ g 程度の定量が可能であると報告している。なお彼等は corticoids 純化のため、paper chromatography を使用している。しかし paper chromatography は、当教室の小田⁹⁾、石井¹⁰⁾の経験からも、高度の熟練と長時間の展開を要するのが難点である。一方1965年当教室の鈴木¹¹⁾が発表した column chromatography と thin layer chromatography (以下 T.L.C) を応用した方法は、従来の paper chromatography に比し、その簡便さと卓越した分離能を示す点で生体試料からの aldosterone の分離定量に、充分活用されるべき方法と考えられる。著者はこの T.L.C の有用性に着目し、更にこれに、1-2-H³-aldosterone 及び 1-C¹⁴ acetic anhydride を用いた double isotope derivative dilution method を応用し、微量生体試料よりの aldosterone の分離定量にほぼ満足すべき結果を得たので報告する。

実 験 方 法

i) Sampling 及び Extraction

微量試料として rat 3~5匹の24時間尿、犬の副腎静脈血約 5 cc、rat 1~2匹の副腎を用いた。個々の sample についての aldosterone の抽出方法の概略を次に述べる (Fig. 1)。

即ち、rat 尿は pH 1.0 にて24時間酸加水分解後、1/5 vol. の chloroform にて5回抽出を行ない、1/10 vol. の 1/10N NaOH にて2回洗滌後、1/10 vol. の distilled water にて2回洗滌した。犬の副腎静脈血は当教室の吉沢¹²⁾の方法にて約 5 ccを採血し、等量の distilled water にて溶血後、1/5 vol. の chloroform にて2回抽出を行い、石油エーテルにて脱脂する。rat 副腎は断頭後直ちに摘出し、Krebs-Ringer Solution 中にて被膜を剝離した後4等分し、Saffran¹³⁾の方法、即ち 95% O₂, 5% CO₂を通気しながら 37°C恒温槽中にて振盪30分間 preincubate し、その後 medium を交換して1時間 incubate し、再度 medium を交換して1時間 incubate した。次いで incubate medium を 1/2vol. の chloroform にて2回抽出後、石油エーテルにて脱脂した。いずれの場合も、chloroform による抽出直前に、1-2-H³-aldosterone を indicator として加えた。

Fig. 1. Double isotope derivative dilution assay of aldosterone in biological extracts

ii) Purification

以上の方法にて抽出した aldosterone を含む corticosteroids を, florisil column に吸着させ, その25% methanol chloroform fraction を採取して蒸発乾固後, system A, B, D の3つの T.L.C に順次展開し, aldosterone の単離純化を企つた. その際使用した T.L.C の各 system に於ける free corticoids 及び tetrahydrocorticoids の位置は Fig. 2 に示す通りである. 即ち aldosterone の system A に於ける Rf

Fig. 2. Rf values of free and tetrahydrocorticoids on T.L.C. in our systems

Fig. 3. Comparisons of the U.V. absorption spectra. The samples extracted from the adrenal vein blood are eluted from the combined system A and B.

Fig. 3'. Comparisons of sulfuric acid absorption spectra of the same materials shown in Fig. 3

値は 0.15~0.25, system B では 0.4~0.46, system D では 0.27~0.35であつた。尚 T.L.C. は, Kieselgel G を 250 μ の薄層とし, 全て上行性に 10~13cm 展開した。Fig. 3, 3' は以上の方法で純化単離して得た試料の硫酸クロモゲン吸収スペクトル及び紫外吸収スペクトルを, 各 reference standard のそれと比較したものである。Fig. 3, 3' に示す如く, 各試料の吸収スペクトルが, reference standard の吸収スペクトルと極めて良く一致し, 純化は満足すべき状態に達していると云えよう。

iii) Acetylation 及び Distribution

System A, B, D にて aldosterone を単離純化後, 乾渣を methanol にて acetylation tube に溶出し, 蒸発乾固後 1-C¹⁴ acetic anhydride 及び anhydrous pyridine 0.05ml を加え, silicagel blue を充填した乾燥管にて密栓し, 管壁を 5~6 回内容液にて洗滌し, 室温にて一昼夜放置して acetylation を行つた。次いで acetylation に加わらなかつた過剰の 1-C¹⁴ acetic anhydride を除去するため, 次の如き方法を用いた Fig. 4。即ち, distilled water 2ml を加え, 30分放置して 1-C¹⁴-acetic anhydride を acetic acid とした後, sodium bicarbonate を CO₂ の気泡の出なくなる迄加え, Thermomixer にてよく攪拌後, 1 時間室温にて放置し, その後 chloroform 5cc を加えて振盪後遠沈し, 水層を捨て, 2 cc の distilled water にて 3 回洗滌し遠沈後, 水層は捨てて chloroform 層のみを取る。尚 sodium bicarbonate は, 可成り過剰に加えても, pH8.5 程度の弱アルカリであるので, aldosterone diacetate には変化を来さない。尚, distribution に際して, sodium bicarbonate を使用した上記の方法以外に, 1/10N, NaOH distilled water のみにて試みた成績は Fig. 5 に示す如くである。即ち 1/10N NaOH では約 90% 近くが除去出来るが, pH11 程度の強アルカリの為, aldosterone diacetate に変化がくる可能性がある。又 distilled water のみでは 60% 程度の

Fig. 4. Principle of distribution

Fig. 5. Comparison on the elimination of 1-C¹⁴ acetic anhydride under the various conditions for distribution.

Fig. 6. Comparison of infrared absorptionspectrum between aldosterone and aldosterone diacetate

除去であつた。次に以上述べた方法にて pure aldosterone を acetylate し、この acetylation products を Infra-Red-Spectra にて検討した (Fig. 6)。Fig. 6 では、pure aldosterone と acetylation products を比較対照して示した。即ち、pure aldosterone に認められる 3400 CM^{-1} の OH の吸収は、acetylation products には認められず、 2900 CM^{-1} の CH の吸収は、共に認められており、acetylation products には、 $1730\sim 1760\text{ CM}^{-1}$ に acetyl 基の吸収が認められ、 1650 CM^{-1} の炭素の共扼二重結合の吸収は共に存在し、更に 1230 CM^{-1} の acetylation による C-O-C のエーテル結合の吸収も、acetylation products には認められる。このように pure aldosterone は、上記の方法により完全に aldosterone diacetate に転換したと考えられる。次に以上述べた方法で得た aldosterone diacetate の単離を企てるため、T.L.C. にて展開する必要があるが、前述の分配操作で除去され得なかつた可能性のある僅かの I . C¹⁴ 酢酸、又は酢酸ソーダを、aldosterone diacetate の単離のための T.L.C. 展開時に完全に取り除くことが望ましい。この様な見地から、種々の T.L.C. system について検討したが、Fig. 7 に示す如く、酢酸に極性を示す T.L.C. system は発見されなかつた。しかし、比較的 system A に於て、aldosterone diacetate と一致する部分に C¹⁴ が少ないので、これを採用した。尚、acetylation 後の H³/C¹⁴ ratio は、1 回 (system A) の展開では 8 : 1、2 回 (system A + system E)、3 回 (System A + system E + system D) では各々 10 : 1 と一定の H³/C¹⁴ ratio を示した。この結果より著者は、acetylation 後の T.L.C 展開は、system A, E の 2 回ではほぼ満足すべきと考えた。

iv) Counting

最終展開に於て aldosterone diacetate と R_f 値が一致する部分をかき取り、methanol にて溶出後、

Fig. 7. Comparison on the development of I.C¹⁴ acetic anhydride under the various systems of T.L.C.

20mlの counting vial に取り、窒素ガスにて蒸発乾固後、Liquid Scintillation Counter にて channel ratio 法により測定した。測定条件は、monitor voltage 1400 volt, analyzer voltage 1350 volt, discriminator voltage は L_2 1.6 volt, L_3 1.9 volt にて測定した。尚計算式は Kliman & Peterson の式に準じた。

測定成績

測定値は Table 1 に示す如く、rat 1 匹につき24時間尿中 aldosterone 排泄量は、 $0.01\sim0.06\mu\text{g}$ であつた。Schwartz¹⁴⁾ (1964) 一派は5匹の rat を一群とし、Kliman & Peterson の方法にて測定し $0.045\sim0.07$

Table 1. Aldosterone values of each samples

Urinary aldosterone excretion in rats			
Number of Rats	Status	Aldosterone $\mu\text{g/day}$	
		Mean	Range
17	normal	0.03	$0.01\sim0.06$
25	goldblatts rats (after 1~2W)	0.107	$0.07\sim0.15$
Aldosterone values in adrenal venous blood of dogs			
Number of Samples	Status	Aldosterone $\mu\text{g/ml}$	
		Mean	Range
5	normal	0.016	$0.013\sim0.018$
Aldosterone production following the incubation of rat adrenal section			
Number of Samples	Status	$\mu\text{g}/100\text{mg}$ of adrenal weight/2hours	
		Mean	Range
5	normal	0.229	$0.205\sim0.253$

$\mu\text{g/day/rat}$ と報告している。犬の副腎静脈血では、 $0.013\sim0.018\mu\text{g/cc}$ であつた。Kliman & Peterson は $0.008\sim0.053\mu\text{g/min.}$ と報告している。rat 副腎では $0.205\sim0.253\mu\text{g}/100\text{mg}$ adrenal weight/2 hours であつた。

考 案

i) Counting についての問題点

放射能測定に際しての問題点は、放射能崩壊による統計的誤差の他に、測定効率がある。殊に H^3 の場合は C^{14} に比して β 線のエネルギーが低いため、single photon phenomenon が起る可能性が多く、この現象は quenching が大きい程大である。chemical quenching は測定試料調製の際の注意により、ある程度防ぎ得るが、尿色等の色素による quenching は、rat 尿採取の際糞便混入する点からも、これの完全な除去は極めて困難であると思われる。この点に関しては、Okita G.T.¹⁵⁾ (1956) 等が人尿について、尿色が H^3 に対して $78\sim100\%$ の quenching を示すことを報告している。著者も rat 尿40ccの chloroform 抽出物が、50%以上の quenching を示すことを確認した。著者の経験からも、double isotope dilution derivative method を尿中 corticosteroids の定量測定に応用するには、colour quenching の除去に今後尚一層の努力と工夫を要するものと思われる。instrument error も問題になるが、著者は同一試料3回繰り返し測定し、計数誤差が5%以内になる様にした。この様な instrument error と quenching error を合せると、20

%内外の誤差を考えねばならないが、これは動物実験の場合、許容される誤差範囲であると考える。

ii) 回収率について

全経過に於ける indicator (1-2-H³ aldosterone) の回収率は約15~20%であつた。尚 acetylation 前までの回収率は平均80%であつた。TH. J. Benraad¹⁶⁾ (1965)等は、T.L.C と paper chromatography を併用して行つた結果、全回収率は約20%と報告している。

結 論

以上私は T.L.C. と double isotope derivative dilution method を併用し、更に distribution の過程で独自の方法を考案し、微量生体試料中の aldosterone の定量が可能であることを確認した。これは Kliman & Peterson に基づく従来の方法に比し、更に正確迅速且つ簡便であり、特に従来困難であつた微量生体試料についての微細な変動も、追求することが可能となり、極めて有利な方法である。

本論文の要旨は昭和40年4月第38回日本内分泌学会総会にて発表した。

本稿を撰筆するにあたり御指導頂いた大島研三教授に深謝し、直接御教示を戴いた小田立男講師、石井昭郎講師に感謝すると共に日夜御協力を戴いた鈴木英生博士を始め当内科代謝班員各位に謝意を表します。

文 献

- 1) UDENFRIEND, S. : J. Biochem. 187:65, (1950).
- 2) BOJESSEN, E. & DEGN, H. : Acta Endocrin., 37:541, (1961).
- 3) AVIVI, P., SIMPSON, S.A., TAIT, J.F. : Proc. IInd Radioisotope Confer., vol. 1, Oxford, (1954).
- 4) AYRES, P.J. et al : J. Biochem., 65:639, (1957).
- 5) TAIT, J.F. et al : J. Clin. Invest., 40:72, (1961).
- 6) ULICK, S. : J. Biol. Chem., 236:680, (1961).
- 7) JONES, K.M. et al : Acta Endocrin., 30:321, (1959).
- 8) KLIMAN, B. & PETERSON, R. E. : J. Biol. Chem., 235:1639, (1960).
- 9) 小田立男 : 日本医事新報, 1729 : 37, (1957).
- 10) 石井昭郎 : 日大医誌, 17:1710, (1958).
- 11) 鈴木英生 : 日本内分泌学会雑誌, 50:1358, (1965).
- 12) 吉沢基一郎 : ホルモンと臨床, 8 : 2, (1960).
- 13) SAFFRAN, M. & SCHALLY A.V. : Endocrin., 56, 523, (1955).
- 14) SCHWARTZ, J., VELLY, J. : Canad. Med. Assoc. J., 90:243, (1964).
- 15) OKITA, G.T. : Nucleonics, 14 : 76, (1956).
- 16) TH. J. BENRAAD and P.W.C. KLOPPENBORG : Clin. Chim. Acta., 12:565, (1965).