

Inulinbestimmung in fluorocarbonhaltigen Emulsionen

Die Bestimmung von Inulin in fluorocarbonhaltigen Emulsionen kann mit Hilfe der herkömmlichen photometrischen Methoden nicht durchgeführt werden, weil die Lichtextinktion, wenn die zu untersuchende Flüssigkeit Fluorocarbon enthält, durch die Eigenabsorption dieses Stoffes verändert wird. Nach der hier beschriebenen Methode wird dieses Hindernis durch Ausfällung des Fluorocarbons und Bestimmung des Inulins im Überstand umgangen.

Methodik. 1. Herstellung einer Fluorocarbonemulsion. Auflösung von Inulin zu einer Konzentration von 0,3 g/100 ml in Ringer. 5 g Polyoxypropylenpolyoxyäthylen (Pluronic F 68) (Wyandotte Chemicals Corp. Wyandotte, Michigan) werden in 50–60 ml dieser Lösung gelöst und auf 100 ml Volumen mit derselben Flüssigkeit aufgefüllt. Zu 80 ml davon werden 20 ml Fluorocarbon FC 43 (3M Deutschland GmbH, Hilden) hinzugefügt und durch Beschallung emulgiert.

2. Bestimmung von Inulin. In ein Reagenzglas hintereinander einpipettieren und nach jeder Zugabe schütteln: a) 0,2 ml der Emulsion; b) 1,0 ml Alkohol abs.; c) 1,0 ml NaOH 0,1 N; d) 8,0 ml einer 0,5%igen $ZnSO_4$ -Lösung. Anschliessend 5 min lang bei 4000–5000 rpm zentrifugieren. 0,4 ml aus dem Überstand in ein 2. Reagenzglas

pipettieren; dazu 1 ml einer 0,1%igen alkoholischen Resorzinlösung und 3 ml 37%iger HCl geben. 8 min lang bei 80 °C inkubieren. Nach Abkühlung auf Zimmertemperatur wird in 1 cm dicken Küvetten gegen einen Leerwert bei 436 μ m abgelesen.

3. Bestimmung von Fluorocarbon. Eine 2. Emulsionsprobe wird in ein Reagenzglas pipettiert und mit Alkohol abs. und aqua dest. im Verhältnis 1:3:3 behandelt. Nach Zentrifugieren sammelt sich das in der Probe enthaltene Fluorocarbon auf dem Boden des Reagenzglases an.

Ergebnisse. Fluorocarbonbestimmung. In der Tabelle I werden die aus 10 Messungen gewonnenen Werte in absoluten Mengen und in % der zu erwartenden Volumina angegeben. Gemessen wurden Proben von jeweils 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 und 2,5 ml.

Inulinbestimmung. Die Inulinwerte aus 3 Serien mit jeweils 3 Proben, die durch Verdünnung der Emulsion mit H_2O im Verhältnis 1:1 bzw. 1:2 hergestellt wurden, sind in der Tabelle II zusammengestellt. Wird das in jeder Probe gefundene Inulin in absoluter Menge gegen das Volumen der wässrigen Phase in dem dazugehörigen Emulsionsanteil auf einem Koordinatensystem eingetragen, so erhält man eine durch das Koordinatenzentrum verlaufende Gerade (Figur). Die Inulinmenge in einer Standardprobe im Wasser (300 mg/100 ml) ohne Pluronic und ohne Fluorocarbon – jeweils Probe 4 der Tabelle II. – fällt auf dieselbe Gerade wie die Werte der Proben 1 bis 3 (Figur Δ).

Diskussion. Das Inulin und die anderen in der wässrigen Phase gelösten Stoffe können nur dann bestimmt werden, wenn diese Phase quantitativ erfasst wird. Durch die Behandlung der Emulsion mit Alkohol wird das emulgierte Fluorocarbon ausgefällt, und sein Volumen kann gemessen werden. Der Volumenanteil anderer in der wässrigen Phase enthaltener Stoffe wird dadurch nicht erfasst. Möglicherweise bewirkt der Alkohol die Fluorocarbon-Ausfällung, weil die Löslichkeit des Emulgators im Alkohol grösser ist als im Wasser¹. Die Lichtextinktion in den Emulsionsproben kann nach den üblichen photometrischen Methoden nicht bestimmt werden, weil

¹ L. R. SCHMOLKA, Fedn. Proc. 29, 1717 (1970).

Tabelle I

Probe Nr.	Vol. der Probe (ml)	Gefundenes Fluorocarbon (ml)	Erwartetes Fluorocarbon (ml)	%
1	0,5	0,100	0,100	100,0
2	1,0	0,195	0,200	97,6
3	1,5	0,293	0,300	97,8
4	2,0	0,395	0,400	98,9
5	2,5	0,490	0,500	98,0
6	0,5	0,100	0,100	100,0
7	1,0	0,200	0,200	100,0
8	1,5	0,298	0,300	99,5
9	2,0	0,395	0,400	98,7
10	2,5	0,495	0,500	99,0

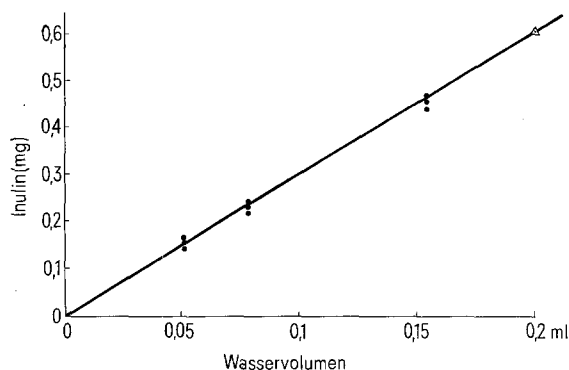
Tabelle II.

Serie	Probe Nr.	Extinktion X	Volumen der wässrigen Phase (ml)	Erwartete Inulinmenge (mg) In_E	Gefundene Inulinmenge (mg) In_G	$In_G/In_E \times 100$
I	1	0,120	0,1546	0,4638	0,4705	101,4
	2	0,064	0,0773	0,2319	0,2509	108,1
	3	0,041	0,0516	0,1548	0,1607	103,8
	4	0,153	0,2000	0,6000	0,6000	
II	1	0,144	0,1546	0,4638	0,4670	100,6
	2	0,071	0,0773	0,2319	0,2300	99,1
	3	0,046	0,0516	0,1548	0,1490	96,0
	4	0,185	0,2000	0,6000	0,6000	
III	1	0,160	0,1546	0,4638	0,4680	101,0
	2	0,079	0,0773	0,2319	0,2310	99,7
	3	0,052	0,0516	0,1548	0,1520	98,5
	4	0,205	0,2000	0,6000	0,6000	

Als Volumen der wässrigen Phase wird das theoretische zu erwartende Volumen der Emulsionsprobe nach Abzug der Fluorocarbon- und Pluronicvolumen angenommen. Die Inulinmenge wird mit Hilfe des Standards (Probe 4) der jeweiligen Serie errechnet. Die zu erwartende Inulinmenge wird aus der Inulinkonzentration und dem Volumen der jeweiligen Emulsionsprobe errechnet. Extinktion x: Mittelwert aus jeweils 2 am Photometer abgelesenen Extinktionswerten.

ein unbekannter Anteil des Lichtes durch das emulgierte Fluorocarbon absorbiert wird. Nach der Ausfällung dieses Stoffes mit dem Alkohol wurde zuerst versucht, das Inulin im Überstand zu bestimmen; es gelang jedoch nicht, weil der Alkohol auch das Inulin zur Ausfällung bringt, wenn wässrige Inulinlösungen damit in einem Verhältnis höher als 1:2 behandelt werden². Unter den

verschiedenen Verfahren, die zur Vermeidung der Inulin-ausfällung erprobt wurden, erwies sich als zuverlässigste die Zugabe von verdünnter NaOH³ oder NaOH mit ZnSO₄⁴ in den unter Methodik angegebenen Konzentrationen. Die weiteren methodischen Schritte mit dem Überstand stellen eine Modifikation des Verfahrens von HUBBARD und LOOMIS dar⁵.



Abszisse: Wasservolumen der Emulsionsproben. Ordinate: Inulinmenge der Emulsionsproben. Die Gerade wird durch Eintragung der Werte aus dem Volumen der wässrigen Phase und der Inulinmenge (Tabelle II) hergestellt. Δ Inulinmenge einer Standardprobe ohne Fluorocarbon und ohne Pluronic.

Summary. A method for the quantitative determination of inulin in fluorocarbon emulsions is presented. It consists in the precipitation of the fluorocarbon with ethyl alcohol, and colorimetric determination of the inulin in the supernatant after hydrolysis of the polysaccharide and reaction with resorcin.

G. RUEDAS⁶

Physiologisches Institut der Universität, Universitäts-Krankenhaus Eppendorf, Martinistrasse 52, D-2000 Hamburg 20 (BR Deutschland), 2. Juli 1973.

² W. B. WEIL, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 80, 103 (1952).

³ M. SOMOGYI, J. biol. Chem. 86, 655 (1930).

⁴ R. P. WHITE and F. E. SAMSON, J. Lab. clin. Med. 43, 475 (1954).

⁵ R. S. HUBBARD and T. A. LOOMIS, J. biol. Chem. 145, 641 (1942).

⁶ Mit Unterstützung der Stiftung Volkswagenwerk.

A Radioimmunoassay for Deoxycorticosterone in Human Peripheral Plasma Using Sephadex LH-20 Chromatography

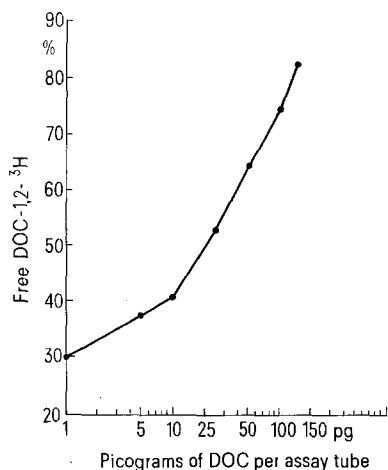
A radioimmunoassay for measurement of deoxycorticosterone (DOC) in human plasma, which is accurate, precise, sensitive and relatively simple, has been developed.

DOC is an active steroid hormone produced by the adrenal cortex which promotes the reabsorption of sodium by the renal tubule and diminishes sodium concentration of sweat, saliva and intestinal secretions. Clinical reports have noted DOC overproduction in some disease processes¹⁻³. Excessive DOC is produced in some adrenal disorders caused by elevated ACTH or by

neoplasia, and may lead to hypertension and hypokalemia.

Various methods have been developed based on the double isotope technique for measurement of DOC secretion and excretion in man⁴; however, excessive volumes of plasma (10–30 ml) are required. A sensitive competitive binding assay for DOC was reported⁵; and DOC was detectable in 40% of normal people. A DOC radioimmunoassay involving extraction of 2–3 ml of plasma with dichloromethane and purification by paper chromatography has been published recently. Radioimmunoassay is carried out after elution through silica gel^{6,7}. This technique has proven to be tedious. A short, simple radioimmunoassay for plasma DOC with adequate accuracy, sensitivity and specificity to measure levels of DOC in human peripheral plasma is described below. This method involves extraction with dichloromethane and purification by Sephadex LH-20 column chromatography followed by radioimmunoassay.

Preparation of DOC-3-(O-carboxymethoxy)-oxime (DOC-3-oxime) conjugate and production of antisera was previously reported by our laboratory⁸.



A typical standard curve for DOC. The percent free of DOC-1,2-³H is plotted as a function of the amount of unlabeled DOC.

¹ E. G. BIGLIERI, J. clin. Endocr. 25, 884 (1965).

² E. G. BIGLIERI, M. SHAMBELAN and P. E. SLATON, J. clin. Endocr. 29, 1090 (1969).

³ M. I. NEW and M. P. SEAMAN, J. clin. Endocr. 30, 361 (1970).

⁴ C. J. ODDIE, J. P. COGHLAN and B. S. SCOGGINS, J. clin. Endocr. Metab. 34, 1039 (1972).

⁵ R. D. BROWN and C. A. STROTT, J. clin. Endocr. 32, 744 (1971).

⁶ V. H. T. JAMES, M. L. ARNOLD, A. E. RIPPON and M. MARIE, J. Endocr. 25, 15 (1972).

⁷ M. L. ARNOLD and V. H. T. JAMES, Steroids 18, 789 (1971).

⁸ A. CHUNG, D. BARTOS, F. BARTOS, D. GRETTIE and A. CASTRO, Clin. Res. 20, 177 (1972).