

inflammatory response *in vivo* (Figure 2). There appears to be a good correlation between the presence of SRF and MIF in the same supernatant. This does not however indicate that MIF is solely responsible for the inflammatory reaction produced, since the culture supernatants will contain a number of different soluble factors.

Thus peripheral blood mononuclear cells, the cells that are presumably initially involved in the tuberculin reaction have been shown to produce an inflammatory factor and a factor inhibiting the migration of macrophages.

The production of migration inhibition factor in serum-free medium using cells from BCG-immunized guinea-pigs makes it unlikely that cytophilic antibodies are involved<sup>10</sup>. In addition, the lack of significant polymorphonuclear leukocyte infiltration in the supernatant induced skin reaction is against the involvement of antigen-antibody complexes.

<sup>10</sup> H. E. AMOS, B. W. GURNER, R. J. OLDS and R. R. A. COOMBS, Int. Arch. Allergy 32, 496 (1967).

## Localisation de dioctyl-phthalate sur les immunoglobulines G normales et sur celles de la maladie de Kahler

### Localization of Dioctyl-Phthalate on Normal Immunoglobulins G and on those of Kahler's Disease

FRANCE DE LA FARGE, J. MAGNY<sup>1</sup> et P. VALDIGUIE

Laboratoire de Biochimie, Faculté de Médecine de Rangueil, Chemin du Vallon, F-31400 Toulouse (France), et Laboratoires Associés de Recherches Agricoles, 271, Avenue de Grande-Bretagne, F-31300 Toulouse (France), 28 juillet 1975.

**Summary.** After having identified as dioctyl-phthalate (DOP), a plasticizer that comes out with fatty acids of normal immunoglobulins G (IgG) and of those of Kahler's disease, we found out that DOP is preferentially bound to the heavy chains of the IgG and is either missing from myeloma proteins or more abundant in them than in normal ones.

Le dioctyl-phthalate (DOP) est l'un des esters de l'acide phthalique utilisé comme plastifiant du chlorure de polyvinyle (PVC). Lors des plasmaphérèses, des poches en matière plastique sont utilisées dans le but de conserver le sérum prélevé. A l'occasion de travaux antérieurs, en analysant les acides gras (AG) des immunoglobulines G (IgG)<sup>2</sup>, des immunoglobulines A<sup>3</sup> et des fragments papainiques des IgG<sup>4</sup> de malades atteints de la maladie de Kahler, nous avons mis en évidence par chromatographie en phase gazeuse et identifié par spectrométrie de masse, un composé à temps de rétention élevé qui s'est avéré être du dioctyl-phthalate<sup>4</sup>. Nous avons pu établir que ce phthalate provenait principalement d'échantillons de sérum ayant été contenus dans du matériel en matière plastique. Nous exposons ici comment nous avons pu

déterminer une localisation du dioctyl-phthalate sur les IgG normales et myélomateuses.

**Matériel et méthodes.** Nous avons obtenu deux types de sérum d'une part en mélangeant des sérum normaux ne présentant aucune anomalie électrophorétique et d'autre part en isolant des sérum pathologiques par plasmaphérèse. Ces sérum sont conservés à -24°C dans des récipients en matière plastique. Parallèlement un lot de sérum a été maintenu dans les mêmes conditions dans des «vacutainers» en verre. A partir des différents sérum les protéines sont isolées par chromatographie sur résines échangeuses d'ions<sup>5</sup>. L'hydrolyse papainique est contrôlée par immunoélectrophorèse. Les fragments Fab et Fc de l'IgG sont ensuite purifiés par électrophorèse de zone<sup>6</sup> et par chromatographie d'affinité<sup>6</sup>. On vérifie la pureté des fragments par immunoélectrophorèse. Par chromatographie sur couche mince, après extraction lipidique<sup>7</sup> les acides gras libres ainsi que les triglycérides et les esters du cholestérol sont recueillis. Ces deux derniers sont saponifiés ce qui permet de séparer leurs acides gras. Les acides gras libres sont méthylés. Tous les acides gras sont alors analysés par chromatographie en phase gazeuse sur appareil Varian 1400 à ionisation de flamme. Leur identification s'effectue à l'aide de témoins analysés dans les mêmes conditions. Le DOP qui apparaît parmi les acides gras est authentifié par un étalon interne de

Tableau I. Teneurs en DOP de protéines normales et myélomateuses provenant de récipients en matière plastique; d'un sérum normal conservé dans du matériel en verre

	AGL	AG extraits des TG	AG extraits des EC	AG totaux
IgG normale	—	28	11	13
IgG myélomateuse (Malade Sen...)	—	45,77	—	15
IgG myélomateuse (Malade Cap...)	28,5	18,7	12,9	20
Sérum normal	1,1	1,3	10,9	4,4

Les pourcentages de DOP sont déterminés par le calcul automatique, à l'aide d'un intégrateur Infotronics, des surfaces comparées des tracés caractéristiques des acides gras et du DOP sur les courbes chromatographiques. AGL, Acides gras libres; TG, triglycérides; EC, esters de cholestérol.

<sup>1</sup> Laboratoires associés de Recherches Agricoles, 271, avenue de Grande-Bretagne, F-31300 Toulouse, France.

<sup>2</sup> P. VALDIGUIE et A. FOURCADE, VIIèmes Journées Biochimiques Latines, Sta Margherita de Ligure, 23-26 mai (1963).

<sup>3</sup> Y. GOULLEY, M. L. SOLERA et P. VALDIGUIE, Path. Biol. 22, 567 (1974).

<sup>4</sup> F. DE LA FARGE, Thèse Pharm. Toulouse No. 75 (1975).

<sup>5</sup> G. BISERTE, J. LATURAZE et R. HAVEZ, Path. Biol. 9, 1673 (1961).

<sup>6</sup> G. W. LITMAN et R. A. GOOD, Biochim. biophys. Acta 263, 89 (1972).

<sup>7</sup> J. J. LEGRAND, Thèse Pharm. Toulouse No. 210 (1963).

Tableau II. Pourcentages de DOP dans les fragments Fab et Fc de deux protéines de personnes atteintes de la maladie de KAHLER

	Fragment Fab	Fragment Fc
Protéines S (Malade Sen...)	16,4	55,2
Protéines C (Malade Cap...)	8	54,8

DOP (Intersmat). Une ultime vérification est effectuée par couplage chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse (spectromètre de masse Finnigan) d'abord en ionisation électronique classique et enfin par réaction ion-molécule en ionisation chimique.

**Résultats et discussion.** Les acides gras identifiés sont les acides gras habituels des constituants biochimiques humains. Le fragment Fab contient de plus nombreux et de plus abondants acides gras que le fragment Fc, ce qui laisse penser que les acides gras seraient préférentiellement adsorbés sur les chaînes légères de l'IgG<sup>8</sup>. Le DOP apparaît sur le chromatogramme après les acides gras avec un temps de rétention supérieur à 1 h. Sa masse moléculaire, déterminée par ionisation chimique est 390. Nous avons ultérieurement démontré<sup>4</sup>, comme SATO<sup>9</sup>, qu'il ne s'agissait pas d'une souillure ou d'un artefact.

Le DOP est présent aussi bien dans les IgG normales que dans les IgG myélomateuses. Toutes les IgG myélomateuses ne contiennent pas de DOP, mais nous voyons, dans le Tableau I, que, lorsque ces IgG en renferment, les teneurs en ce phtalate sont plus élevées que dans les IgG normales.

Nous avons essayé, en particulier sur les sérum myélomateux de deux malades, de mettre en évidence la locali-

sation principale du DOP sur l'IgG. Il apparaît très nettement, dans le Tableau II, que le DOP est lié au fragment Fc, ce qui peut permettre de dire qu'il est préférentiellement attaché aux chaînes lourdes de l'IgG.

Nous avons dit plus haut que le DOP est un plastifiant. Sa liposolubilité a déjà été signalée par MARCEL et NOEL<sup>10</sup>, WESSMAN<sup>11</sup> a démontré qu'un autre phtalate, le diéthylhexyl-phtalate (DEHP), était susceptible de contaminer les protéines du sérum et en particulier les IgG, les transfusions apportant aux malades des quantités substantielles de DEHP.

Dans le Tableau I, nous constatons que, sauf dans les stériles, les pourcentages de DOP trouvé dans un sérum normal conservé dans des «vacutainers» en verre, sont inférieurs à ceux de DOP contenu dans des IgG normales et myélomateuses.

SMITH<sup>12</sup> et TURNER<sup>13</sup> ayant démontré la toxicité, à dose élevée, des plastifiants, la généralisation, en milieu hospitalier, du matériel à usage unique en matière plastique pourrait poser des problèmes.

Nous recherchons actuellement différentes voies de contamination par les phtalates telles que le sang transfusé et stocké dans des récipients en PVC et l'ingestion d'aliments<sup>9</sup> contenus dans des emballages en matière plastique.

<sup>8</sup> V. NICOLIC, J. VITIC, R. RUVIDIC, B. STOJAKINOVIC et C. RADONJIC, Jugoslav. physiol. pharmac. Acta. 5, 201 (1969).

<sup>9</sup> E. SATO, S. UEMATSU, M. UCHIDA, T. FUKUCHI et Y. AKAHORI, Chem. Pharm. Bull. 22, 1933 (1974).

<sup>10</sup> Y. L. MARCEL et S. P. NOEL, Lancet 1, 35 (1970).

<sup>11</sup> J. WESSMAN et G. RIETZ, J. Chromatogr. 100, 153 (1974).

<sup>12</sup> C. C. SMITH, Archs. indust. Hyg. 7, 310 (1953).

<sup>13</sup> J. H. TURNER, J. C. PETRICCIANI, M. L. CROUCH et S. WENGER, Transfusion, Philad. 14, 560 (1974).

## Auto-Oxidation of Hemoglobin in Plasma

M. FURLAN and H. BACHOFEN

Hämatologisches Zentrallabor und Pneumologische Abteilung, Inselspital, CH-3010 Bern (Switzerland), 25 June 1975.

**Summary.** The rate of auto-oxidation of human hemoglobin to methemoglobin was measured in plasma at 37°C. Half-lives of hemoglobin were found to be 20 h, 12 h and 7 h at the oxygen tensions of 126, 57 and 23 mm Hg, respectively.

Hemoglobin, which is released from erythrocytes into plasma during an episode of intravascular hemolysis, will rapidly bind to a specific protein, called haptoglobin, and the resulting complex will be taken up by the liver<sup>1</sup>. When the binding capacity of haptoglobin is exhausted, free hemoglobin will either be cleared through the kidney<sup>2</sup>, or it will be irreversibly oxidized<sup>3,4</sup>. The resulting methemoglobin readily dissociates, and its ferriheme groups will be attached to two serum proteins -- hemopexin and albumin<sup>5</sup>.

It has long been known that hemoglobin is slowly oxidized in solutions containing dissolved oxygen, and that the rate of oxidation is enhanced by low pH<sup>6,7</sup>, high ionic strength<sup>6</sup>, organic phosphates<sup>8</sup> and low oxygen pressure<sup>8,9</sup>. The purpose of this study was to re-examine the rate of oxidation at different tensions of oxygen, but under conditions resembling those in circulating plasma.

**Materials and methods.** Oxyhemoglobin was prepared from hemolysates of stored adult human blood<sup>10</sup>, and dialyzed against several changes of 0.9% NaCl (final

concentration 100 mg/ml). This solution was added to a normal CPD-plasma at a concentration of 1000 mg/100 ml (pH 7.25 at 37°C,  $P_{CO_2}$  41 mm Hg). Incubations were performed in rotating tonometers at 37°C<sup>11</sup>. Gas mixtures contained 3.5, 8.5 and 19.0% oxygen, in addition to

<sup>1</sup> M. BISSELL, L. HAMMAKER and R. SCHMID, Blood 40, 812 (1972).  
<sup>2</sup> W. LATHEM, J. clin. Invest. 38, 652 (1959).

<sup>3</sup> O. BODANSKY, Pharmac. Rev. 3, 144 (1951).

<sup>4</sup> U. MÜLLER-EBERHARD, New Engl. J. Med. 283, 1090 (1970).

<sup>5</sup> H. F. BUNN and J. H. JANDL, J. biol. Chem. 243, 465 (1968).

<sup>6</sup> J. BROOKS, Proc. R. Soc., Ser. B. 109, 35 (1931).

<sup>7</sup> A. MANSOURI and K. H. WINTERHALTER, Biochemistry 12, 4946 (1973).

<sup>8</sup> A. MANSOURI and K. WINTERHALTER, Biochemistry 13, 3311 (1974).

<sup>9</sup> J. BROOKS, Proc. R. Soc., Ser. B. 118, 560 (1935).

<sup>10</sup> A. ROSSI FANELLI, E. ANTONINI and A. CAPUTO, J. biol. Chem. 236, 391 (1961).

<sup>11</sup> L. E. FARHI, J. appl. Physiol. 20, 1098 (1965).