

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.
10. Jg. 1972, S. 322—325

Zur Gallensäureanalytik in zuckerhaltigen Leberhomogenaten¹⁾

VON U. LEUSCHNER, K. KABELITZ, H. J. WILDGRUBE UND W. ERB,

*Aus dem Zentrum der Inneren Medizin, Abteilung für Gastroenterologie
(Direktor: Prof. Dr. W. Siede) der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt/Main*

(Eingegangen am 27. November 1971/17. April 1972)

Die Analyse von Gallensäuren in glucosehaltigen Medien, wie sie für die präparative Differentialzentrifugation zur Auftrennung in subzelluläre Fraktionen von Zellhomogenaten verwendet werden, war bisher nicht möglich, da Mono- und Disaccharide bei der alkalischen Dekonjugation von Gallensäuren karamelisierten und saure Sterine verloren gingen. Deshalb wurde ein Verfahren entwickelt, durch Zugabe von *Saccharomyces cerevisiae* die Glucose enzymatisch abzubauen und anschließend die Gallensäuren zu bestimmen. Auf diese Weise gelang es, sowohl Gallensäuretestsubstanzen aus glucosehaltigem Medium als auch die sauren Sterine des homogenisierten Lebergewebes zu gewinnen und zu analysieren. Dabei muß für Cholsäure mit einem Verlust von etwa 35% gerechnet werden, während die Wiederfindungsrate aller anderen Cholansäuren zufriedenstellend war. Die beschriebene Methode stellt z. Z. das einzige Verfahren dar, Gallensäuren in glucosehaltigen Gewebshomogenaten zu bestimmen.

The analysis of bile acids in liver homogenates in the presence of glucose

The analysis of bile acids in media containing glucose (as used in the preparative differential centrifugation of subcellular fractions of cell homogenates) was previously not possible, because the mono- and disaccharides became caramelized during the alkaline deconjugation and the acidic sterols were thereby lost. A method was therefore developed, in which the glucose is degraded by *Saccharomyces cerevisiae*, followed by the determination of the bile acids. With the aid of this method, it was possible to analyze the acid sterols of liver homogenate and bile acid standards after their isolation from media containing glucose. Cholic acid showed a 65% recovery, but the recovery of all the other cholanic acids was satisfactory. This is currently the only method for the determination of bile acids in tissue homogenates in the presence of glucose.

Bei Leberkrankheiten und bei Störungen im enterohepatischen Kreislauf kann es zu Veränderungen des Gallensäuregehaltes im Blut, in der Leber und in der Galle kommen (1). Dies soll vor allem durch eine Beeinträchtigung der hepatischen Gallensäuresynthese verursacht werden (2, 3). Nach unseren heutigen Kenntnissen scheinen die noch weitgehend hypothetischen Syntheseschritte an unterschiedlichen Zellstrukturen abzulaufen, weshalb es uns interessant erschien, das Spektrum der sauren Sterine in subzellulären Fraktionen von Lebergewebe zu analysieren und Veränderungen durch Leberzellschädigungen näher zu bestimmen. Bei orientierenden Untersuchungen mußten wir jedoch feststellen, daß sich Gallensäuren in den wie üblich mit Saccharose- oder Glucoselösungen gewonnenen Fraktionen weder dünn- noch gaschromatographisch nachweisen ließen. Das Ziel unserer Arbeit war daher die Entwicklung einer Methode, die bei zufriedenstellender Auftrennung von Leberhomogenaten in subzelluläre Fraktionen eine quantitative Bestimmung von Gallensäuren ermöglicht. Zur Lösung dieses Problems gingen wir vom Leberhomogenat aus und verzichteten zunächst auf die Trennung in Organellenfraktionen.

Material und Methode

Leberhomogenat

Rattenleber (Wistar-Ratten, 150 g schwer, Fütterung mit Altromin-Standardfutter, Wasser ad libitum) wurde mit dem Homogenisator nach POTTER und ELVEJHEM in folgenden Medien bei 0—4° homogenisiert:

1. 0,25M Saccharose — 0,002M EDTA-Na-Lösung (4)
2. 0,44M Glucose — 0,002M EDTA-K-Lösung (5, 6)
3. dest. Wasser.

Lebergewicht zu Suspensionsflüssigkeit jeweils 1:5.

Wiederfindungsversuche

Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate mit der unten dargelegten Methode wurden Parallelversuche mit den gleichen Suspensionsmedien durchgeführt, denen statt Lebergewebe Gallensäuren als Testsubstanzen zugesetzt wurden. Wir verwendeten hierzu Glycin- und Taurinkonjugate von Cholsäure, Chenodesoxycholsäure, Desoxycholsäure und Lithocholsäure (jeweils 10 mg/5 ml Suspensionsmedium; Testsubstanzen der Firma Appl. Science Lab. und Calbiochem, Reinheitsgrad gaschromatographisch kontrolliert).

Isolierung der Gallensäuren

Die Isolierung der Gallensäuren erfolgte gemäß dem in Abbildung 1 aufgeführten Analysengang.

Um vorhandene Proteine zu denaturieren und die Gallensäuren in Lösung zu bringen, werden die einzelnen Ansätze mit der vierfachen Menge absoluten Alkohols versetzt, zum Sieden erhitzt, und nach Abkühlen über Nacht (im Eisschrank) filtriert. Das Filtrat wird 3mal mit jeweils 50 ml heißen Äthanol nachgespült (8). Durch die anschließende Verteilung nach BLANKENHORN und AHRENS (7) (im Scheidetrichter 500 ml) in gleichen Volumenteilen von Äthanol-Wasser-Diäthyläther-Heptan läßt sich der größte Teil der Neutralfette eliminieren. Die am Rotations- evaporator (Büchi) eingedampfte wäßr. Äthanol-Phase wurde zur alkalischen Hydrolyse der konjugierten Gallensäuren mit 100 ml 5proz. Natronlauge versetzt und für 3 Stdn. bei 134° und 2,1 atü im Autoklaven erhitzt. Nach Abkühlen wird der Ansatz auf pH 2

¹⁾ Die Untersuchungen wurden mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft sowie die Harry- und Peter-Fuld-Stiftung durchgeführt.

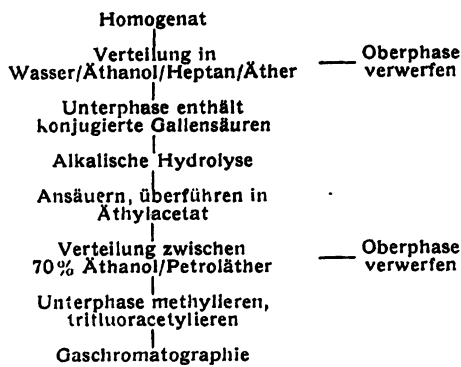


Abb. 1

Übersicht über die Aufarbeitung von Gewebshomogenaten zur gaschromatographischen Analyse (Einzelheiten im Text)

angesäuert. Hierauf erfolgt durch 3maliges Ausschütteln mit jeweils 50 ml die quantitative Überführung der Gallensäuren in Äthylacetat. Dieses Lösungsmittel wird durch mehrfaches Auswaschen mit bidest. Wasser (jeweils 50 ml) auf einen pH von 6 gebracht und anschließend im Rotations evaporator zur Trockene eingengt. Der Rückstand enthält die nunmehr freien Gallensäuren, daneben aber auch noch geringere Mengen Verunreinigungen, im wesentlichen freie Fettsäuren. Um diese zu eliminieren, wird der Extrakt in 50 ml 70proz. Äthanol fraktioniert aufgenommen und 3mal gegen jeweils 50 ml Petroläther (Kp 40—60°) ausgewaschen (9, 10). Nach erneutem Einengen wird der Extrakt in 8 ml Chloroform-Methanol 2:1 (v/v) aufgenommen, in ein Schliffcagezglas überführt und unter Stickstoff erneut eingengt.

Gaschromatographie

Unmittelbar vor der gaschromatographischen Analyse werden die Gallensäuren mit Diazomethan in 1 ml Äther methyliert und dann mit 1 ml Trifluoressigsäureanhydrid acetyliert (11, 12). Die Auftrennung der Gallensäuren (Abb. 2, 3) erfolgt an einem Gaschromatographen der Firma Packard, Serie 3500—3800. Säulenbedingungen 180:0,2 cm. Säulenfüllung: 3% QF 1 auf Gaschrom Q. Temperatur: 237°, Durchflußrate (N₂) 40 ml/Min. FID; Empfindlichkeit 3×10^{-10} — 1×10^{-10} .

Zur quantitativen Bestimmung dienen Cholestan-3 β -ol bzw. Lithocholsäure als innerer Standard.

Dabei wurde so vorgegangen, daß zuerst ein Chromatogramm ohne, und anschließend ein Chromatogramm mit innerem Standard geschrieben wurde. Dieses Vorgehen war speziell bei Verwendung von Lithocholsäure notwendig, weil diese sich regelmäßig in den Proben befand. Die Menge des zugegebenen inneren Standards wurde so bemessen, daß der entstehende Peak größenordnungsmäßig etwa denen der in der Probe enthaltenen Peaks entsprach. Bei Verwendung von konjugierten Testsubstanzen wurde der Taurin- bzw. Glycinanteil rechnerisch von der eingesetzten Gallensäuremenge abgezogen, da dieser durch die alkalische Hydrolyse eliminierte Teil des ursprünglich konjugierten Moleküls nicht mit in das Chromatogramm einging.

Entfernung der Glucose

Zum Abbau der Glucose verwendeten wir Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) der Firma Pleser (2g/100 ml Ansatz). Die Inkubationszeit betrug 48 Stdn. bei 37°. Der Abbau wurde mit der Glucoseoxidase-Peroxidase-Reaktion überprüft. Da wir keinen Wert auf den streng quantitativen Abbau der Glucose legten, sondern es uns nur auf eine weitgehende Beseitigung des Zuckers ankam, genügt es, daß mit diesem Verfahren Glucose nicht mehr nachweisbar ist. Der negative Ausfall dieser Probe beweist, daß weniger als 0,1 g Glucose in 100 g Ansatz enthalten sind. Diese Menge stört die weitere Aufarbeitung nicht mehr, was daraus zu ersehen ist, daß die Gallensäureextraktion aus Blutserum ohne Schwierigkeiten gelingt, obwohl das Serum Glucose in einer Konzentration von etwa 0,1 g/100 ml enthält.

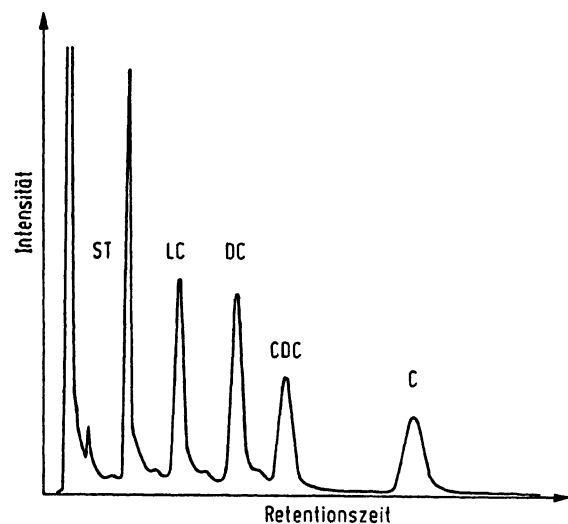


Abb. 2

Beispiel eines Gaschromatogramms von Gallensäuretestsubstanzen. Säule: 180 x 0,2 cm, 3% QF 1 auf Gaschrom Q, 100—120 mesh. Temp. 237°, Durchfluß 40 ml/Min. FID; Modell Packard, Serie 3500—3800. ST: Cholestan-3 β -ol (innerer Standard), LC: Lithocholsäure, DC: Desoxycholsäure, CDC: Chenodesoxycholsäure, C: Cholsäure

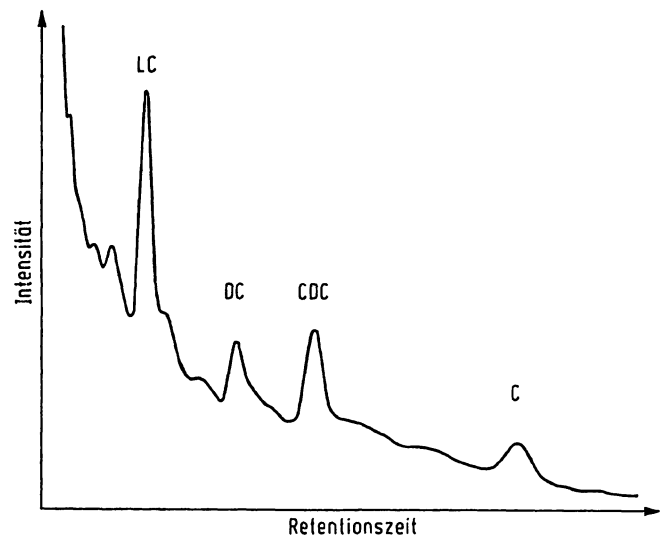


Abb. 3

Beispiel eines Gaschromatogramms von Gallensäuren im Lebergewebe (nach enzymatischem Abbau von Glucose). Säulenbedingungen wie bei Abbildung 2. LC: Lithocholsäure, DC: Desoxycholsäure, CDC: Chenodesoxycholsäure, C: Cholsäure

Ergebnisse

Nach Homogenisierung von Lebergewebe in Saccharose- oder Glucoselösungen ließen sich nennenswerte Mengen von Gallensäuren im Homogenat nicht nachweisen. Gleiche Ergebnisse erhielten wir nach der Zugabe isolierter Testsubstanzen zu saccharose- oder glucosehaltigen Suspensionsmedien. Diese mangelhafte Darstellbarkeit saurer Sterine hat nach unseren Untersuchungen folgende Ursache: die zur Spaltung der Konjugate durchgeführte alkalische Hydrolyse führt in den mit Zucker versetzten Proben zur Bildung einer zähen, schwarz-braunen Masse. Hierbei dürfte es sich um Karamelisierungsprodukte handeln.

Natürlich vorkommende Hexosen werden durch Hefe zu Äthanol und Kohlendioxyd vergoren. Nach enzymatischen Abbau der Glucose war es uns daher möglich, die in der Lösung enthaltenen Gallensäuren sowohl in

Tab. 1

Wiederfindungsrate (in % der eingesetzten Menge) von Gallensäuretestsubstanzen aus definierten Suspensionsmedien (10 mg Gallensäuren auf 5 ml Suspensionsmedium) gemäß der im Text angegebenen Präparationstechnik (\pm Standardabweichung) $n = 7$

Suspensionsmedium Testsubstanzen	Wasser-EDTA, pH 7,4 als		0,44M Glucose-EDTA, pH 7,4 als	
	Taurinkonjugat	Glycinkonjugat	Taurinkonjugat	Glycinkonjugat
Cholsäure	76,0 \pm 3,7	80,7 \pm 4,6	79,5 \pm 1,7	86,6 \pm 3,6
Chenodesoxycholsäure	70,2 \pm 4,5	65,1 \pm 4,0	76,2 \pm 2,2	68,5 \pm 3,1
Desoxycholsäure	91,5 \pm 4,8	85,8 \pm 4,5	90,8 \pm 4,4	80,3 \pm 5,4
Lithocholsäure	80,3 \pm 8,4	87,4 \pm 6,1	92,2 \pm 4,0	80,6 \pm 6,3

gewebefreien Testansätzen als auch im Leberzellhomogenat zur gaschromatographischen Analyse aufzubereiten.

Bezogen auf die Wiederfindungsrate von Testsubstanzen in Wasser-EDTA-Lösungen mit gleichem Säuregrad wie die Glucose-EDTA-Lösungen, ergaben sich nach Abbau der Glucose in den Testansätzen keine nennenswerten Unterschiede (Tab. 1). Der präparativ bedingte Verlust an Lithocholsäure- und Desoxycholsäurekonjugaten betrug durchschnittlich 10–15%, während die Wiederfindungsrate der Cholsäurekonjugate zwischen 80 und 85%, die der Chenodesoxycholsäurekonjugate zwischen 68 und 75% schwankte.

Die Bestimmung des gleichen Gallensäuremusters in den mit 0,44M Glucose aufbereiteten Leberhomogenaten läßt nach enzymatischem Abbau des Zuckers Abweichungen zu den Ergebnissen der Testansätze erkennen (Tab. 2). Während wir für Cholsäure eine Wiederfindungsrate von 64% ermittelten, lagen die Verluste für die übrigen Gallensäuren niedriger: für die Chenodesoxycholsäure bei etwa 17%, für die Desoxycholsäure bei 14% und für die Lithocholsäure bei 6%.

Tab. 2

Gallensäuregehalt in Lebergewebe (μ g/g) nach Homogenisierung und Präparation in glucosefreiem und glucosehaltigem Suspensionsmedium $n = 7$

	Leberhomogenat in Wasser-EDTA-Lsg., pH 7,4	Leberhomogenat in 0,44M Glucose- EDTA-Lösung pH 7,4
Cholsäure	15,89	10,57
Chenodesoxycholsäure	24,87	20,57
Desoxycholsäure	12,14	10,39
Lithocholsäure	5,36	5,01

Diskussion

Untersuchungen über den Gallensäurestoffwechsel in der Leber beruhen meist auf dem Aktivitätsnachweis der an der Gallensäuresynthese beteiligten Enzyme und wurden an Gesamthomogenaten und Organellenfraktionen durchgeführt (3, 13–15). Um den Stoffwechsel saurer Sterine weiter abzuklären, haben wir den direkten Nachweis von Gallensäuren in den mit Saccharoselösungen gewonnenen subzellulären Fraktionen der Leber versucht. Dabei stellten wir fest, daß die Be-

stimmung des Gallensäurespektrums in zuckerhaltigen Lösungen nicht gelingt: die Isolierung der Cholsäuren aus Zuckerlösungen war mit keinem Lösungsmittel zufriedenstellend. Als zusätzlicher limitierender Schritt erwies sich die alkalische Hydrolyse, da es hierbei zur Karamelisierung des Zuckers kommt. Der Versuch, den Zucker an Stelle der Gallensäuren aus dem Homogenat zu isolieren, gelang mit den aus der Literatur bekannten Verfahren ebenfalls nicht (16), da diese Methoden gleichzeitig zu einem fast völligen Verlust saurer Sterine führen (17). Gleiche Schwierigkeiten gelten für Glucoselösungen, doch läßt sich das Monosaccharid leicht zu Äthanol und CO_2 abbauen, Produkte, die auf die weitere Analyse nicht mehr störend wirken.

Um zu prüfen, ob durch Glucose oder Hefezusatz strukturelle Veränderungen oder Verluste an Gallensäuren auftreten, haben wir vier der physiologisch bedeutendsten Gallensäuren in ihrer Bindung an Glycin und Taurin in zuckerhaltigen Testansätzen quantitativ bestimmt und die Ergebnisse mit den aus glucosefreien Ansätzen verglichen. Das gaschromatographisch ermittelte Spektrum zeigte in keinem Fall neue Metaboliten oder Dehydrierungsreaktionen, wie sie von bakteriellen Enzymen bekannt sind; die Wiederfindungsrate in zuckerhaltigen und -freien Testansätzen war nahezu identisch.

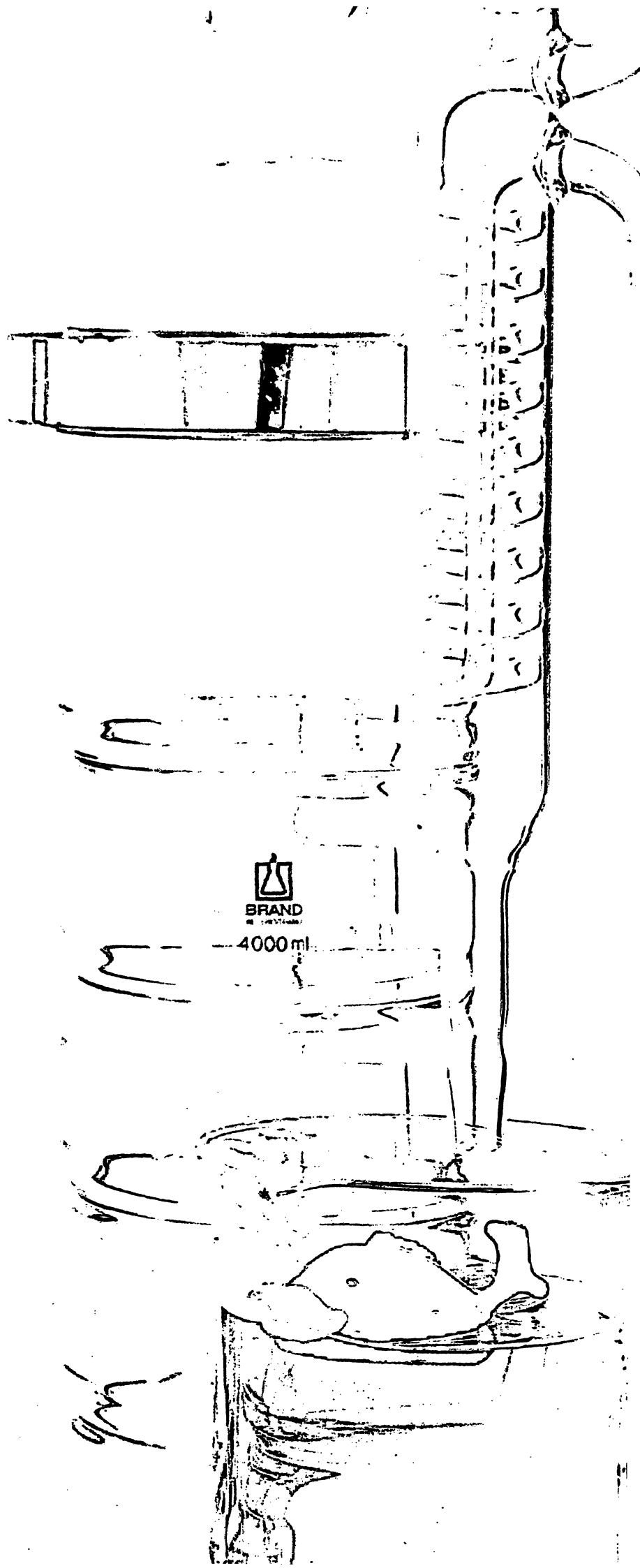
Bei der Präparation mit zuckerhaltigen Leberhomogenaten mußten wir für Cholsäure und Cholsäurekonjugate einen Verlust von etwa 35% hinnehmen; für die übrigen Cholsäuren waren die Verluste wesentlich geringer (6%–17%). Daraus folgt, daß allein die Kombination des konzentrierten Monosaccharides mit dem Lebergewebe zu einem Verlust an Gallensäuren führt. Möglicherweise ergeben sich intermolekulare Wechselwirkungen zwischen Proteinen, Glucose und Gallensäuremolekülen, die mit unseren Lösungsmitteln nicht getrennt werden können. Der größte Verlust bei der Cholsäure, einer Trihydroxycholansäure, und der geringste Verlust bei Lithocholsäure, einer Monohydroxycholansäure, ist auffällig, aber ebenfalls nicht sicher deutbar.

Unter Hinweis auf einen derartigen über den präparativ bedingten Fehler hinausgehenden Verlust halten wir die hier beschriebene Methode zur Analyse des Gallensäurespektrums in zuckerhaltigen Leberzellhomogenaten für geeignet.

Nur ein Fisch aus Zelluloid

würde sich in diesem
Wasser wohlfühlen.
Es enthält weder Wasser
zum Atmen noch
Mineralsalze oder andere
"lebenswichtige
Verunreinigungen".
Es ist hochreines Wasser
aus dem Bidestillator
von Brand.

Mehr darüber auf der
nächsten Seite



RUDOLF BRAND
LABORGERÄTE UND
VAKUUMPUMPEN
698 WERTHEIM/MAIN
POSTFACH 310

BISTABIL-Wasserbidestillator

Erstmals eine Glockenbodenkolonne zur Reinigung des Dampfes

◀ Rückstands- und pyrogenfreies Destillat (Leitfähigkeit ca. $1 \mu\text{S}$, pH -Wert 6,5–6,9)

Beheizung mit Edelstahlelektroden

◀ Keine Wassermangelsicherung erforderlich, lange Lebensdauer

Ständiges Spülen des Verdampfers

◀ Verringerter Wartungsaufwand

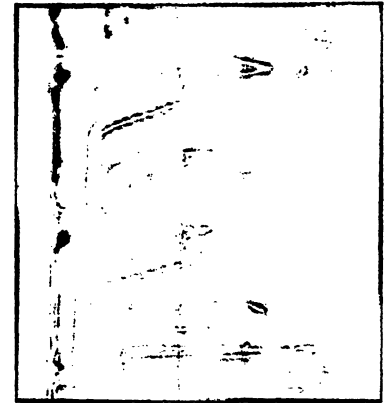
Abwärme wird zum Vorheizen des Verdampfers mitbenutzt
Günstige Abstimmung des Kühlsystems

◀ Niedriger Strom- und Wasserverbrauch

Einfach und robust im Aufbau
Niedriger Anschaffungspreis

◀ Kosten- und Zeitersparnis

BRAND-GERÄTE
WEIL DIE
RENTABILITÄT
ENTSCHEIDET



COUPON

Hier konnte Ihnen natürlich nur eine Übersicht über einige wichtige Eigenschaften dieser Geräte gegeben werden. Wenn Sie aber diesen Abschnitt mit einer, notfalls unfrankierten, Postkarte an uns schicken, lassen wir Ihnen gerne weitere Informationen zukommen über:

BISTABIL-WASSERBIDESTILLATOR

BRAND Fabrik für Laborgeräte 6980 Wertheim-2

Literatur

1. WILDGRUBE, H. J. und U. LEUSCHNER, im Druck. — 2. CAREY, J. B., Bile salts and hepato-biliary disease. In: Diseases of the liver. Ed. Leon Schiff, 3rd ed. Lippincoll Philadelphia (1969). — 3. SCHERSTÉN, T., Scand. J. Gastroenterol. 2, 49 (1967). — 4. SEDGWICK, B. und G. HÜBSCHER, Biochim. biophysica Acta, Amsterdam 106, 63 (1965). — 5. HOGEBOOM, G. H., W. C. SCHNEIDER und G. E. PALLADE, J. biol. Chemistry 172, 619 (1948). — 6. LEUSCHNER, U. und H. J. WILDGRUBE, im Druck. — 7. BLANKENHORN, D. H. und E. H. AHRENS, J. biol. Chemistry 212, 68 (1955). — 8. HASLEWOOD, G. A. D., Bile salts. Barnes and Noble, New York; Methuin, London (1967). — 9. GRUNDY, S. M., E. H. AHRENS und T. A. MIETTINEN, J. Lip. Res. 6, 397 (1965). — 10. SCHREIBER, J., W. ERB, H. J. WILDGRUBE und E. BÖHLE, Gastroenterologie 8, 230 (1970). — 11. SJÖVALL, J., C. R. MELONI und D. A. TURNER, J. Lip. Res. 2, 317 (1961). — 12. SJÖVALL, J., Acta chem. Scand. 16, 1761 (1962). — 13. BREMER, J., Acta chem. Scand. 9, 268 (1955). — 14. EKDAHL, P. H., A. GOTTFRIES und T. SCHERSTÉN, Advances in Tracer Methodology, New York 3, 313 (1966). — 15. MINATO, A., S. HIROSE und T. OGISO, Chem. Pharm. Bull. 17, 1498 (1969). — 16. LANG, K. und G. SIEBERT, Aufarbeitung von Geweben und Zellen. In: Hoppe-Seyler/Thierfelder. Handbuch der Physiologischen Analyse. 10. Aufl. II. Bd., Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1955). — 17. LEUSCHNER, U., H. J. WILDGRUBE, E. REBER und W. ERB, Histochemie 29, 178 (1972).

Dr. U. Leuschner, cand. med. K. Kabelitz,
Dr. H. J. Wildgrube, Priv.-Doz. Dr. W. Erb
Zentrum der Inneren Medizin der
Johann Wolfgang Goethe-Universität,
6000 Frankfurt/M., Theodor-Stern-Kai 7