

I. Medizinische Klinik (Direktor: Prof. Dr. U. Ritter) der
Medizinischen Hochschule Lübeck

Gleichzeitige enzymatische Bestimmung von ^{14}C -Glukose und ^{14}C -Fruktose in menschlichen Körperflüssigkeiten

D. O l t m a n n s und J. A d l u n g

Mit 3 Abbildungen und 2 Tabellen

(Eingegangen am 22. Oktober 1977)

Bei Untersuchungen des Fruktose-Metabolismus mit ^{14}C -markierter Fruktose ist, da ^{14}C -Fruktose im Körper schnell in ^{14}C -Glukose umgewandelt wird, eine isolierte Messung von ^{14}C -Fruktose und ^{14}C -Glukose im Serum erforderlich. Glukose und Fruktose lassen sich einfach von ihren anionischen Stoffwechselmetaboliten (4), aber bei begrenzter spezifischer Aktivität weder chemisch noch chromatographisch in ausreichender Menge voneinander trennen. Wir haben daher in Anlehnung an eine von Costello u. Mitarb. (2) beschriebene enzymatische Bestimmung von $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Glukose eine entsprechende Methode zur Bestimmung von $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Fruktose entwickelt. $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Glukose und $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Fruktose können dabei in einem Arbeitsgang nebeneinander isoliert erfaßt werden. Prinzip ist die Umwandlung von $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Fruktose in $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Glukose mit Phosphoglukoseisomerase (EC 5.3.1.9) und anschließende Umwandlung der gebildeten $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Glukose in Ribulose-5-Phosphat und $^{14}\text{CO}_2$. Meßgröße ist der Aktivitätsabfall nach Entfernung der gebildeten $^{14}\text{CO}_2$.

Material und Methoden

Reagenzien

Die verwendeten Reagenzien waren von analytischer Reinheit. Enzyme und Co-Enzyme wurden von der Firma Boehringer, Mannheim/Deutschland, bezogen:

1. Puffer-Reagenzien und Co-Enzyme:
Triäthanolamin-HCl (TRA) Puffer 0,9 mol/l, pH 7,4, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,2 mol/l, ATP 0,160 mol/l, NADP 0,120 mol/l, gelöst jeweils in TRA-Puffer; HCl 1 mol/l.
2. Enzyme:
Enzymgemisch von Hexokinase (HK) (EC 2.7.1.1) hochgereinigt, 140 IU/mg entsprechend 10 mg/ml und Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH) (EC 1.1.1.49), 140 IU/mg entsprechend 1 mg/ml im Verhältnis 2 : 1 (vol/vol). 6-Phosphoglukonat-Dehydrogenase (6PG-DH) (EC 1.1.1.44) 12 IU/mg entsprechend 10 mg/ml; Phosphoglukoseisomerase (PGI) (EC 5.3.1.9) 350 IU/mg entsprechend 2 mg/ml.
3. ^{14}C -markierte Substanzen (Radiochemical Center Amersham/England, über Firma Buchler, Braunschweig/Deutschland) $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Glukose 50 mCi/mmol, $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Fruktose 60 mCi/mmol.
4. Szintillator: Unisolve 1 (W. Zinsser, Frankfurt/Deutschland).

Tab. 1. Vorgehen: Enzymatische $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Fruktose- und -Glukose-Bestimmung.

| Reagenzien | Kontroll-zählröhren I | Inkubations-zählröhren II ($1\text{-}^{14}\text{C}$ -Glukose-Bestimmung) | Inkubations-zählröhren III ($1\text{-}^{14}\text{C}$ -Fruktose-Bestimmung) |
|--|-----------------------|--|--|
| Reaktionsgemisch: | | | |
| TRA | 0,6 | 0,6 | 0,6 |
| MgCl ₂ | 0,05 | 0,05 | 0,05 |
| ATP | — | 0,1 | 0,1 |
| NADP | — | 0,2 | 0,2 |
| Radioaktives Material | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| Enzyme: | | | |
| HK/G6P-DH | — | 0,02 | 0,02 |
| 6PG-DH | — | 0,02 | 0,02 |
| PGI | — | — | 0,02 |
| Inkubation: 6 h, 20°C, Schütteln | | | |
| HCl | 0,5 | 0,5 | 0,5 |
| $^{14}\text{CO}_2$ -Diffusion: 1 h Schütteln | | | |
| Aqua demin. | 3,0 | 3,0 | 3,0 |
| Unisolve | 9,0 | 9,0 | 9,0 |
| Radioaktivitäts-messung | | | |

Vorgehen

Alle Bestimmungen erfolgten in Zählröhren, wie sie für die Flüssigkeitsszintillationsmessung üblich sind. Für jede Analyse waren 3 Ansätze (I = Ausgangsaktivität, II = ^{14}C -Glukose-Aktivität, III = ^{14}C -Fruktose-Aktivität) erforderlich. Der Leerwert (Gesamtaktivität) enthielt keine Enzyme und Co-Enzyme, die beiden Hauptwerte unterschieden sich durch die Zugabe von PGI für die Fruktose-Bestimmung (s. Tab. 1). Nach 6 Stunden Inkubation wurde die Reaktion durch Zugabe von HCl unterbrochen, die freigesetzte $^{14}\text{CO}_2$ durch anschließendes Schütteln entfernt. Die Ermittlung der Radioaktivität erfolgte nach Zugabe von Szintillator im Flüssigkeitsszintillationszählgerät.

Berechnung

Die Aktivität der im Ansatz enthaltenen ^{14}C -Glukose ergab sich aus der Differenz der Zählraten I-II, die für ^{14}C -Fruktose aus der Differenz II-III.

Ergebnisse

Vorversuche

In Vorversuchen wurden zunächst Enzymkonzentration und Inkubationszeit für eine Substrat- und Aktivitätskonzentration ermittelt, wie sie nach Infusion üblicher Mengen (0,75 g/kg/h, 20 μCi) im Serum zu erwarten waren. Bei einer Verdoppelung der von Costello u. Mitarb. (2) angegebenen Enzymkonzentration erwies sich eine Inkubationsdauer von 6 Stunden als ausreichend, längere Inkubationszeiten bis zu 24 Stunden erbrachten kein besseres Ergebnis. Die $^{14}\text{CO}_2$ -Freisetzung war spätestens nach einer Stunde vollständig. Da eine Hemmung der PGI durch das

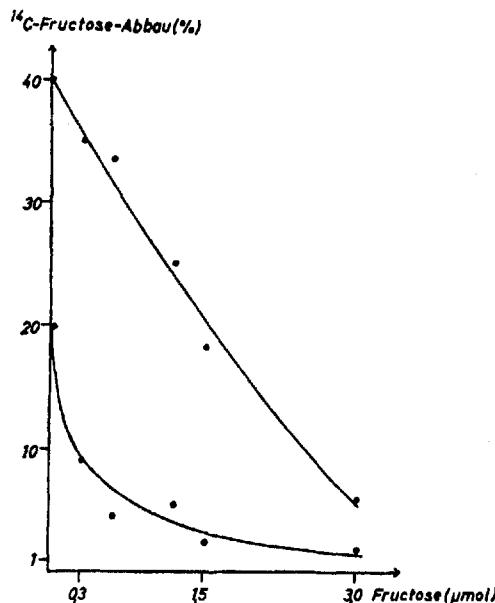


Abb. 1. 1-¹⁴C-Fruktose-Abbau durch Phosphoglukoseisomerase-Verunreinigung von normaler (ausgefüllter Punkt) und hochgereinigter (offener Punkt) Hexokinase (2,2 IU) bei steigenden Fruktose-Konzentrationen im Ansatz.

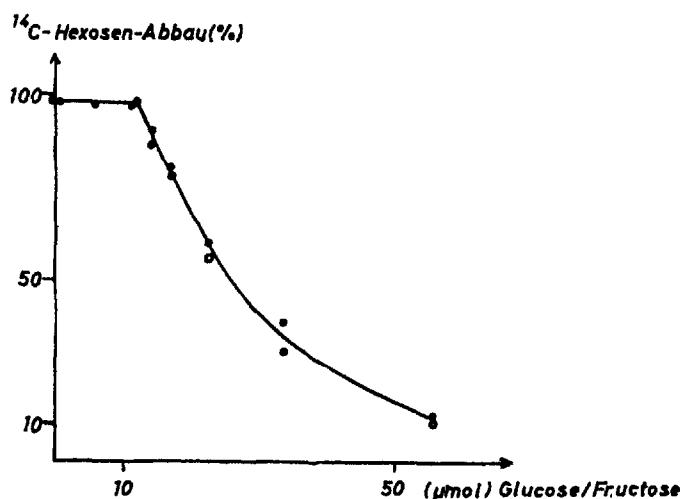


Abb. 2. Abbau von 1-¹⁴C-Glukose (geschlossener Punkt) oder 1-¹⁴C-Fruktose (offener Punkt) bei steigender Konzentration von Glukose oder Fruktose im wässrigen Reaktionsansatz.

während der Reaktion gebildetes Glukonat-6-phosphat (3) in unserem Ansatz nicht feststellbar war, konnten alle Ansätze, wie in Tabelle 1 angegeben, in einem Inkubationsgefäß und bei simultaner Zugabe von allen Enzymen und Co-Enzymen erfolgen. Nachdem sich gezeigt hatte, daß die bis vor kurzem handelsübliche Hexokinase (PGI 0,1 %) zu einem störenden Fruktose-Abbau von 18 bis 40 % führt, war allerdings die Verwendung einer hochgereinigten HK mit einer PGI-Verunreinigung von weniger als 0,003 % erforderlich (s. Abb. 1).

Bestimmung von $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Glukose

Allein eingesetzte Glukose wurde in einer Konzentration bis 11,11 μmol /Ansatz zu 98 % abgebaut (s. Abb. 2).

Bestimmung von $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Fruktose

Die Ergebnisse des Abbaus aus allein eingesetzter und zu $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Glukose isomerisierter $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Fruktose waren mit denen der Glukosebestimmung praktisch identisch (s. Abb. 2).

Gleichzeitige $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Fruktose- und $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Glukosebestimmung

In Gegenwart markierter Fruktose wurde auch bei Verwendung der hochgereinigten HK, bezogen auf die Fruktose-Gesamtaktivität, um 2 % (3 μmol Fruktose im Ansatz) bis zu 20 % (keine unmarkierte Fruktose im Ansatz) zu hohe ^{14}C -Glukose-Aktivität errechnet (s. Abb. 1).

Entsprechend dem Fehler, der aus der PGI-Verunreinigung der HK für die Glukosebestimmung resultierte, ergaben sich für die ^{14}C -Fruktose-Bestimmung in Gegenwart von Fruktosekonzentrationen, wie sie beim Menschen im Serum während Fruktoseinfusionen zu erwarten sind, eine um 2 % zu niedrige und bei Fehlen chemisch nachweisbarer Fruktose im Ansatz eine bis 20 % zu geringe Wiederfindung (s. Abb. 1).

Bei Zugabe von definierten $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Fruktose- und Glukose-Aktivitäten im wäßrigen Milieu, Serum und Urin (Doppelansätze) mit niedrigem und hohem Fruktose/Glukose-Gehalt betrug die Wiederfindung der eingesetzten Gesamtaktivität $97,4 \pm 0,14\%$ (s. Tab. 2).

Aus 10 Doppelbestimmungen errechnete sich ein Variationskoeffizient von 0,2 %.

Tab. 2. Wiederfindung von $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Fruktose und -Glukose bei a) niedrigem (0,3 μmol Fruktose; 1,0 μmol Glukose) und b) hohem (3,0 μmol Fruktose; 6,0 μmol Glukose) Hexosengehalt in 1,0 ml wäßrigem Milieu, Serum und Urin.

| | 1- ^{14}C -Fruktose | 1- ^{14}C -Glukose | Gesamtaktivität |
|------------------------|------------------------------|-----------------------------|-----------------|
| dpm vor Inkubation | 3963 | 46985 | 51000 |
| a) dpm nach Inkubation | 3564 | 46376 | 49670 |
| Wiederfindung (%) | 90 | 99 | 97 |
| b) dpm nach Inkubation | 3762 | 46040 | 49432 |
| Wiederfindung (%) | 95 | 98 | 97 |

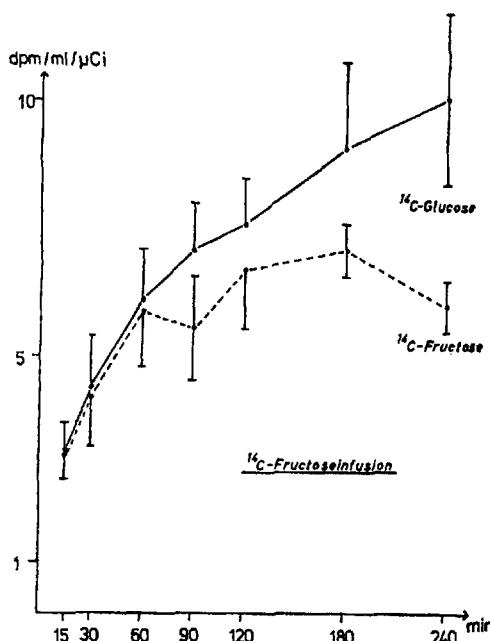


Abb. 3. Verhalten von $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Fruktose und -Glukose ($\text{dpm}/\text{ml}/\mu\text{Ci}$) im Serum von 4 Normalpersonen während 4stündiger Infusion von $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Fruktose.

Diskussion

Die von Costello u. Mitarb. (2) beschriebene Methode erlaubt Bestimmungen von $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Glukose bis zu einer Konzentration von 300 dpm im Ansatz bzw. in 0,1 ml Serum bei einer Glukosekonzentration von $0,41 \mu\text{mol}$. Für Untersuchungen am Menschen mit begrenzter Radioaktivitätsapplikation und erhöhten Glukosewerten im Serum war sie damit nicht ausreichend empfindlich. Durch Verdoppelung der Enzymkonzentration konnte ein vollständiger Abbau bis zu $11 \mu\text{mol}$ Glukose/Ansatz innerhalb von 6 Stunden erreicht werden. Die gleichzeitige Bestimmung von $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Fruktose beruht auf dem für die enzymatische Fruktosebestimmung bekannten Prinzip (1) der Umwandlung von Fruktose in Glukose durch Phosphoglukoseisomerase und Berechnung der Fruktosekonzentration aus einer Differenz. Auch bei Verwendung hochgereinigter Hexokinase war in Abhängigkeit von der spezifischen Aktivität der im Testansatz vorhandenen Fruktose ein unerwünschter Fruktoseabbau von 2 bis 20 % festzustellen. Eine vollständige und isolierte Hemmung der in der Hexokinase enthaltenen PGI, etwa mit Glukonat-6-Phosphat (3), ließ sich nicht erreichen. Bei hoher spezifischer Aktivität von Fruktose im Testansatz empfiehlt sich daher eine Korrektur der für $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Glukose und $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Fruktose ermittelten Werte. Bei den wesentlich niedrigeren spezifischen Aktivitäten, wie sie unter Fruktoseinfusionen am Menschen zu erwarten sind, ist der Fehler mit 2 %, bezogen auf die Gesamtfruktoseaktivität, zu tolerieren.

In der Abbildung 3 ist als Beispiel das Verhalten von $1-^{14}\text{C}$ -Fruktose und $1-^{14}\text{C}$ -Glukose im Serum bei 4 Normalpersonen unter einer Infusion von $1-^{14}\text{C}$ -Fruktose dargestellt.

Zusammenfassung

Beschrieben wird eine neue enzymatische Methode zur gleichzeitigen Radioaktivitätsbestimmung von $1-^{14}\text{C}$ -Glukose und $1-^{14}\text{C}$ -Fruktose. Prinzip ist die Umwandlung von $1-^{14}\text{C}$ -Fruktose in $1-^{14}\text{C}$ -Glukose mit Phosphoglukoseisomerase (EC 5.3.1.9) und anschließende Umwandlung der gebildeten $1-^{14}\text{C}$ -Glukose in Ribulose-5-phosphat und $^{14}\text{CO}_2$. Das Verfahren ist spezifisch, gut reproduzierbar und ergibt Wiederfindungsraten in wäßrigen und biologischen Flüssigkeiten von 97 % bis zu Glukose- und Fruktose-Konzentrationen von 11 mmol/l.

Summary

A new enzymatic method for simultaneous estimation of radioactivity of $1-^{14}\text{C}$ -glucose and $1-^{14}\text{C}$ -fructose is described. It is based on the isomerisation of $1-^{14}\text{C}$ -fructose to $1-^{14}\text{C}$ -glucose by phosphoglucoseisomerase (EC 5.3.1.9) and on its enzymatic removal as ribulose-5-phosphate and $^{14}\text{CO}_2$. The method is specific, reproducible, and gives over 97 % recoveries of glucose and fructose concentrations up to 11 mmol/l in aquos and biological solutions.

Literatur

1. Bernt, E., H. U. Bergmeyer, in: Methoden der enzymatischen Analyse (Bergmeyer, H. U., Hrsg), 3. Aufl., Bd. II, S. 1349 (Weinheim/Bergstr. 1974). –
2. Costello, J., J. M. Scott, E. Bourke, Analyt. Biochem. 46, 654–659 (1972). –
3. Racker, E., Mechanism in Bioenergetics, S. 207 (New York und London 1975). –
4. Reichard, G. A. jr., N. F. Moury jr., N. J. Hochella, A. L. Patterson, S. Weinhouse, J. Biol. Chem. 238, 495–501 (1963).

Anschrift der Verfasser:

Dr. med. Detlef Oltmanns, I. Medizin. Klinik der Med. Hochschule Lübeck,
Kronsforder Allee 71/73, 2400 Lübeck 1