

Zur quantitativen dünnschichtchromatographischen Bestimmung freier Gallensäuren

Von

B. FROSCH und H. WAGENER

Aus der II. Medizinischen Klinik und Poliklinik der Freien Universität Berlin (Direktor: Prof. Dr. G. Schettler)

(Der Schriftleitung zugegangen am 18. Mai 1963)

Es wird eine Methode zur quantitativen Bestimmung der dünn-schichtchromatographisch unvollständig zu trennen-den Desoxycholsäure und Chenodesoxycholsäure mittels Absorptionsspektrophotometrie beschrieben.

Deoxycholic and chenodeoxycholic acid, which can only be partially separated by thin layer chromatography, are determined quantitatively by absorption spectrophotometry.

Mit den bisher bekannten Verfahren zur Dünnschichtchromatographie freier Gallensäuren wird eine nur ungenügende Trennung der beiden Dihydroxycholansäuren 3 α -12 α -Desoxycholansäure (Desoxycholsäure = „DC“) und 3 α -7 α -Desoxycholansäure (Chenodesoxycholsäure = „CDC“) erzielt (1, 2, 3). Wenn auch mittels der von HAMILTON (4) und ENEROTH (5) angegebenen Lösungsmittelsysteme eine bessere Trennung der beiden Isomere erhalten wird, bleiben die Abstände zwischen den beiden Flecken der DC und CDC gering. Für eine quantitative Elution sind jedoch größere R_F -Wert-Unterschiede unerlässlich, falls nicht der direkte Nachweis durch solche Sprühreagenzien möglich ist, welche die nachfolgende quantitative Bestimmung nicht stören. Da bisher keine Färbefahren zur Lokalisation der Flecke auf der Dünnschichtplatte bekannt sind, welche die nachfolgende Reaktion der Gallensäure mit Schwefelsäure nicht stören, erfolgt die Lokalisation der erhaltenen Flecke zweckmäßig mit sog. Leitchromatogrammen. Gerade dieses Vorgehen macht größtmögliche R_F -Wert-Unterschiede erforderlich, da häufig trotz sorgfältiger Einhaltung der Versuchsbedingungen Schwankungen der R_F -Werte und damit z. B. elongierte Flecke auftreten. — Wir hielten es deshalb für zweckmäßig, die Desoxycholsäure und Chenodesoxycholsäure gemeinsam zu erfassen und eine Methode zu entwickeln, die quantitative Aussagen über den Anteil jeder einzelnen Dihydroxycholansäure gestattet. Dazu bedienten wir uns der Beobachtung, daß Dihydroxycholansäuregemische verschiedener Zusammensetzung für das betreffende Gemisch charakteristische Absorptionskurven ergeben.

Methodik

1. **Reagenzien:** Kieselgel G für Dünnschichtchromatographie, Fa. Merck; Essigsäure p. a.; Toluol p. a.; Schwefelsäure 65% (g/g); Phosphormolybdänsäure, 5proz. äthanol. Lösung.
2. **Geräte:** Ausrüstung zur Dünnschichtchromatographie der Fa. Desaga, Heidelberg. Agla-Mikrometerspritze der Fa. Bourrough-Welcome & Co., London. Spektralphotometer PMQ II der Fa. C. Zeiss, Oberkochen.

3. **Gallensäuren:** Cholsäure, Desoxycholsäure und Chenodesoxycholsäure (Fa. California Corporation for Biochemical Research, Los Angeles). Da diese Handelspräparate z. T. erhebliche Verunreinigungen enthielten, wurden sie säulenchromatographisch mittels der Phasenumkehr-Chromatographie nach NORMAN (6) bzw. GÄNSHIRT und Mitarbeitern (1) gereinigt. Das Eluat wurde dabei in 5 ml-Fractionen gesammelt und diese dünn-schichtchromatographisch analysiert. Entsprechende Fractionen wurden vereinigt und zum Teil nach dem Eindampfen nochmals umkristallisiert. Auf diese Weise wurden reine Chol- und Desoxycholsäure erhalten. Das Chenodesoxycholsäure-Präparat dagegen enthielt noch eine minimale, nur beim Auftragen größerer Mengen nachweisbare unbekannte Verunreinigung.

4. **Dünnschichtchromatographie und spektrophotometrische Bestimmung:** Die Herstellung der mit Kieselgel beschichteten Platten erfolgte nach STAHL; allerdings bewährte sich uns ein Mischungsverhältnis von 30 g Kieselgel und 55 ml Aqua dest. Die lufttrockenen Platten wurden eine Std. bei 100° getrocknet und offen aufbewahrt. Als Lösungsmittelsysteme verwendeten wir Toluol: Eisessig: Wasser = 5:5:1 bzw. Toluol: Eisessig: Wasser = 7,5:12,5:1. Die Laufstrecke für das erste System betrug 12, für das zweite 16 cm. Die Substanzen wurden in äthanol. Lösungen mittels Agla-Mikrometerspritze punktförmig 2 cm über dem unteren Plattenrand aufgetragen. Die Laufzeiten betragen in der gesättigten Kammer bei 18° 2—3 Stdn. Nach dem Abdunsten des Lösungsmittels wurden an beiden Seiten der Platten durch Besprühen mit Phosphormolybdänsäurereagenz und Erwärmen auf 70° Leitchromatogramme entwickelt und aus der unbesprühten Plattenmitte die entsprechenden Kieselgelbezirke abgeschabt. Diese wurden in Zentrifugengläschen gebracht, mit genau 3 ml 65% (g/g) Schwefelsäure versetzt und 60 Min. bei 60° im Wasserbad erhitzt. Danach wurden die Gläschen 15 Min. bei 3000 U/Min. zentrifugiert und der klare Überstand zur photometrischen Bestimmung in 1 cm-Küvetten dekantiert. Die Ablesung erfolgte gegen Leerwerte, die aus flächengleichen, unbeladenen Schichtbezirken entsprechender R_F -Werte von jeder Platte bei gleicher Behandlung angesetzt wurden. Von jeder Probe wurde eine Absorptionskurve zwischen 370 und 395 μ aufgenommen.

Ergebnisse

Zur Herstellung von Eichkurven wurden von Cholsäure, Desoxycholsäure und Chenodesoxycholsäure Mengen zwischen 10 und 80 μ g aufgetragen und ihre Extinktion nach der oben beschriebenen Methode bei konstanter Wellenlänge ($\lambda = 385 \mu$) ermittelt. Für die untersuchten Gallensäuren ergibt sich eine lineare Beziehung zwischen Extinktion und aufgetragener Menge.

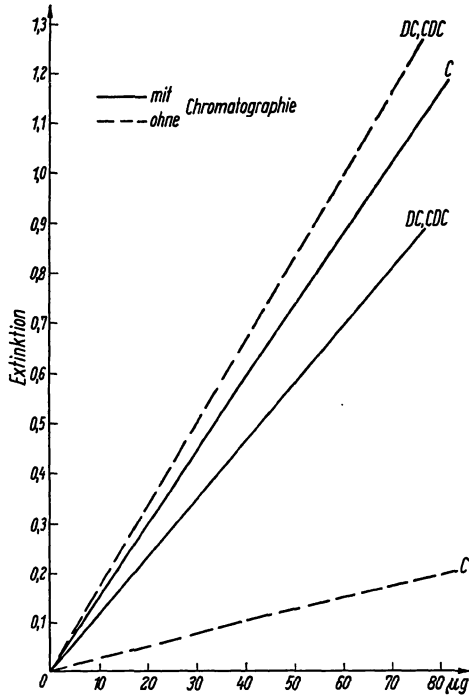


Abb. 1

Eichkurven für Cholsäure (C), Desoxycholsäure (DC) und Chenodesoxycholsäure (CDC) direkt und nach Dünnschichtchromatographie. Ordinate: Extinktion bei 385 m μ , Abszisse: eingesetzte Gallensäuremengen in μ g.

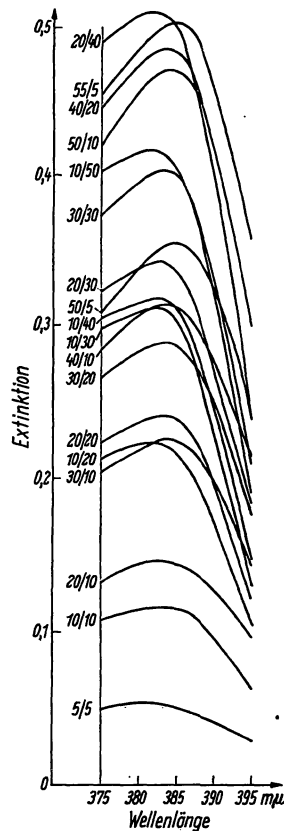


Abb. 2

Absorptionskurven verschiedener Desoxycholsäure/Chenodesoxycholsäure-Gemische zwischen 375 und 395 m μ .

Wie aus Abbildung 1 ersichtlich, haben Desoxycholsäure und Chenodesoxycholsäure bei 385 m μ identische Eichkurven, während die der Cholsäure einen steileren Anstieg aufweist. Auffällig ist, daß die aus nicht chromatographierten Testmengen erhaltenen Eichkurven sich umgekehrt verhalten, daß also die Eichkurve für Cholsäure den geringeren Anstieg aufweist. Der Cholsäuregehalt einer Lösung läßt sich durch Ablesung aus dieser Eichkurve leicht ermitteln. Die Eichkurven für Desoxy- und Chenodesoxycholsäure dagegen können nicht angewandt werden, da diese beiden Gallensäuren dünnschichtchromatographisch für eine quantitative Bestimmung nicht ausreichend getrennt werden. Zwar läßt sich von den Dihydroxycholansäuren eine gemeinsame Extinktion bestimmen, jedoch kann aus dieser nicht auf die Anteile der beiden Säuren geschlossen werden. Eine Extinktion von z. B. 0,155 (Tabelle 1)

Tab. 1
Extinktionen bei 385 m μ

	10 μ g	20 μ g	30 μ g
E _{385 mμ} DC	0,155	0,320	0,505
E _{385 mμ} CDC	0,155	0,232	0,500
E _{385 mμ} DC + CDC gemessen	0,115	0,238	0,400
E _{385 mμ} DC + CDC als Summe berechnet	0,310	0,643	1,005

entspricht zwar 10 μ g Desoxycholsäure oder auch 10 μ g Chenodesoxycholsäure, erlaubt aber *keine* Aussage über die Zusammensetzung des tatsächlich vorliegenden Gemisches. Vergleicht man nämlich die Extinktion gleicher Mengen von Desoxycholsäure und Chenodesoxycholsäure mit der verschiedener aus gleichen Mengen gebildeter Gemische der beiden Dihydroxycholansäuren (s. Tabelle 1), so ergibt sich, daß die Extinktion des Gemisches beider Gallensäuren nicht etwa die Summe der einzelnen Extinktionen darstellt. — Um dennoch zu einer quantitativen Aussage über die vorliegenden Mengen der beiden chromatographisch ungenügend getrennten Dihydroxycholansäuren zu kommen, haben wir ihre Absorptionskurven aufgenommen. Die Anteile von Desoxycholsäure und Chenodesoxycholsäure wählten wir so, daß beide Gallensäuren zusammen nicht mehr als 60 μ g ausmachen, zwischen 5 und 60 μ g jedoch in 5 μ g-Differenzen alle Kombinationen von Desoxy- und Chenodesoxycholsäure gemessen werden. Die 66 Kombinationen der beiden Gallensäuren wurden aus frisch bereiteten äthanol. Lösungen der Reinsubstanzen mittels Agla-Mikrometerspritze *zusammen* punktförmig aufgetragen und nach dem oben beschriebenen Verfahren entwickelt. Die Extinktionswerte jedes Gemisches wurden 4–6mal gemessen. Für die Darstellung der Absorptionskurven wurden die Mittelwerte benutzt. Einen Teil der Absorptionskurven zeigt Abbildung 2. Wir haben zugunsten einer besseren Übersicht darauf verzichtet, alle 66 Kurven darzustellen. Es muß jedoch

darauf hingewiesen werden, daß trotz der großen Zahl von Absorptionskurven keine identischen Kurvenpaare gefunden wurden, vielmehr alle Kurven charakteristische Merkmale aufweisen, die ihre Zuordnung zu aufgetragenen Substanzgemischen bekannter Zusammensetzung erlauben. Die einzelnen Absorptionskurven sind charakterisiert durch die Lage des Absorptionsmaximums, seinen Extinktionswert und durch den Anstieg zwischen 375 m μ und der Wellenlänge des Maximums.

Voraussetzung für die Brauchbarkeit der beschriebenen Absorptionskurven zur Ermittlung der Zusammensetzung eines unbekanntes Dihydroxycholsäuregemisches ist die Reproduzierbarkeit der Extinktionswerte. Zu diesem Zweck analysierten wir verschiedene Gemische von Desoxychol- und Chenodesoxycholsäure mehrfach. Als Beispiel zeigt Tabelle 2 die Mittelwerte

Tab. 2

Mittelwerte und Standardabweichungen der Extinktionen eines Gemisches von 30 μ g DC und 25 μ g CDC aus 10 Messungen berechnet

Wellenlänge (m μ)	Extinktion (Mittelwert)	Standardabweichung \pm	Standardabweichung in \pm % des Mittelwertes
375	0,301	0,0041	1,23
380	0,321	0,0041	1,23
381	0,324	0,0036	1,16
382	0,326	0,0039	1,27
383	0,328	0,0042	1,38
384	0,328	0,0041	1,34
385	0,327	0,0041	1,34
386	0,324	0,0050	1,62
387	0,318	0,0054	1,72
388	0,309	0,0064	1,87
389	0,298	0,0076	2,26
390	0,282	0,0076	2,14

und Standardabweichungen eines Gemisches aus 30 μ g Desoxycholsäure und 25 μ g Chenodesoxycholsäure, welches 10mal dem gesamten Arbeitsgang unterworfen wurde. Die somit für jede gemessene Wellenlänge aus 10 abgelesenen Werten ermittelte Standardabweichung liegt zwischen \pm 0,0036 und \pm 0,0076 und beträgt 1,16 bis 2,26% der im Bereich von 0,282 bis 0,328 gefundenen Extinktionen. Die Streuung ist demnach im absteigenden Teil der Absorptionskurve etwa doppelt so groß als im Bereich des Kurvenanstiegs und des -gipfels. — Die gefundene Beziehung zwischen maximaler Extinktion und Kurvenanstieg für alle untersuchten Dihydroxycholsäuregemische ist der Abbildung 3 zugrunde gelegt. Auf der Abszisse wurden die jeweiligen maximalen Extinktionen, auf der Ordinate die Differenzen aus der Extinktion des jeweiligen Absorptionsmaximums und der Extinktion bei 375 m μ aufgetragen.

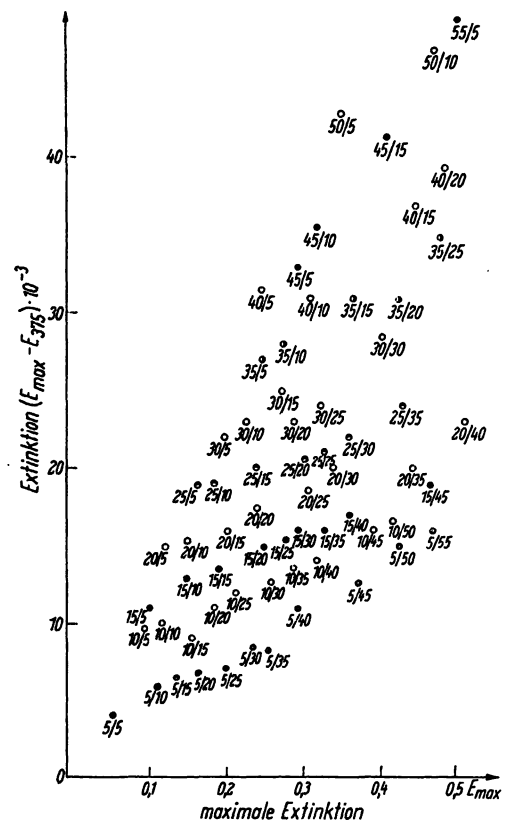


Abb. 3

Beziehung zwischen maximaler Extinktion und der Differenz aus maximaler Extinktion und der Extinktion bei 375 m μ für 66 zwischen 5 und 60 μ g in 5 μ g-Differenzen kombinierten Desoxycholsäure/Chenodesoxycholsäure-Gemische. Die den Punkten beigefügten Zahlen stellen die Desoxycholsäure/Chenodesoxycholsäure-Mengen dar.

Für die einzelnen Gemische ergibt sich demnach eine charakteristische Lage. Die gefundenen Punkte für Gemische mit gleichbleibendem Desoxycholsäure- und zunehmendem Chenodesoxycholsäuregehalt liegen dabei auf Geraden, deren Steilheit mit dem Chenodesoxycholsäuregehalt zusammenhängt. Mit steigendem Desoxycholsäureanteil dagegen nimmt die beschriebene Extinktionsdifferenz zu. Mit Hilfe dieser Darstellung ist es auf Grund der Beziehung zwischen maximaler Extinktion und der Differenz zwischen maximaler Extinktion und der Extinktion bei 375 m μ möglich, die Zusammensetzung eines Dihydroxycholsäuregemisches zu bestimmen. Dazu wurden die entsprechenden Kieselgelbezirke der beschriebenen Reaktion mit 65proz. Schwefelsäure unterworfen und danach die Absorptionskurven zwischen 375 m μ und dem Absorptionsmaximum aufgenommen. Die maximale Extinktion wird auf der Abszisse, die Differenz der Extinktionen bei 375 m μ und dem Absorptionsmaximum auf der Ordinate aufgesucht. Die in diesen Punkten errichteten Senkrechten schneiden sich in dem Punkt, der die gesuchten Mengen der beiden Dihydroxycholsäuren repräsentiert. Es empfiehlt sich, zur genauen Festlegung des Absorptionsmaximums die Messung der Extinktionen in kleinen Intervallen zwischen 375 und 390 m μ durch-

zuführen. Falls Extinktionswerte außerhalb des von uns angegebenen Bereichs der Maximalextinktionen liegen, ist das Reaktionsgemisch mit 65proz. Schwefelsäure zu verdünnen. Wir bestimmen zur Analyse eines unbekanntes Gemisches 4mal gleiche aufgetragene Mengen. Da wir unser Verfahren auf 5 μg Differenzen eingerichtet haben, ist es weiterhin zweckmäßig, Bestimmungen der doppelten und halben Mengen, eventuell von Dritteln der ursprünglich aufgetragenen Mengen durchzuführen, um Zwischenwerte den bekannten Analysenpunkten zu nähern. Damit lassen sich weitgehend Bestimmungsfehler ausschalten, wenn ungünstige Mischungsverhältnisse (z. B. 2 μg Desoxycholsäure + 10 μg Chenodesoxycholsäure) vorliegen. — Zur Überprüfung unserer Methode isolierten wir nach dem Verfahren von CAREY (7) freie Gallensäuren aus Menschengalle und analysierten die chromatographisch erhaltenen Flecke. Jedem Ansatz wurden in einem zweiten Untersuchungsgang bekannte Mengen freier Gallensäuren auf der Dünnschichtplatte zugesetzt. Die erhaltenen Werte sind aus Tabelle 3 ersichtlich.

Tab. 3

Spektrophotometrische Bestimmung von freien, nach CAREY (7) gewonnenen Gallensäuren (DC + CDC) aus Menschengallen (Nr. 1, 2, 3) mit und ohne Zusätzen. Werte in μg

	ohne Zusatz	zugesetzte Menge	gefundene Menge
Cholsäure			
1	6	20	26,5
2	10	10	20
3	18	10	29
Desoxycholsäure			
1	5	10	15
2	5	20	25
3	10	10	20
Chenodesoxycholsäure			
1	5	20	25
2	10	10	20
3	15	10	25

Diskussion

Zu dem beschriebenen Verfahren, die dünn-schichtchromatographisch bisher nur ungenügend zu trennenden beiden Dihydroxycholsäuren durch ihre Absorptionskurven zu analysieren, wurden wir durch eine Arbeit von WOOTTON und WIGGINS (8) angeregt. Diese Autoren konnten durch Vergleichen zahlreicher von Gemischen bekannter Mengen von Desoxycholsäure und Chenodesoxycholsäure aufgenommener Infrarotspektrogramme mit dem Kurvenbild des zu analysierenden unbekanntes Gemisches zu einer annähernd quantitativen Aussage kommen. Das von GÄNSHIRT, KOSS und MORIANZ (1) angegebene Verfahren, die dünn-schichtchromatographisch nur un-

vollständig zu trennenden Dihydroxycholsäuren als Summe bei enger Spalteinstellung des Spektralphotometers bei 385 $\text{m}\mu$ zu messen, d. h. bei einer Wellenlänge, wo die Extinktionskoeffizienten beider Gallensäuren nahezu identisch sind, trägt der Tatsache keine Rechnung, daß die Summe der Extinktionen beider Dihydroxycholsäuren keine Rückschlüsse auf die tatsächlichen Anteile von Desoxycholsäure und Chenodesoxycholsäure in dem zu messenden unbekanntes Gemisch erlaubt. Eine Vernachlässigung der Desoxycholsäure zugunsten einer quantitativen Bestimmung der Chenodesoxycholsäure allein bei der Wellenlänge des Absorptionsmaximums der Chenodesoxycholsäure, wie das CAREY (7) vorschlug unter Hinweis auf Befunde anderer Untersucher, wonach die Desoxycholsäure beim Menschen nur in geringen Mengen vorkommen soll, halten wir nicht für angängig, da selbst kleine Beimengungen von Desoxycholsäure zu einer Chenodesoxycholsäurelösung deren Absorptionskurve erheblich verändern. So beträgt das Absorptionsmaximum von 60 μg allein 0,665, die Differenz des Anstiegs $E_{\text{maximum}} - E_{375} = 0,010$, während das Absorptionsmaximum von 55 μg Chenodesoxycholsäure und 5 μg Desoxycholsäure zusammen 0,461 beträgt. In den nach CAREY (7) hergestellten hydrolysierten Extrakten finden wir nach unserem Verfahren der quantitativen Bestimmung beider Dihydroxycholsäuren zwar mehr Chenodesoxycholsäure als Desoxycholsäure, doch sollte diese mit Anteilen von 10, 5 und 5 μg gegenüber einem Chenodesoxycholsäuregehalt von 15, 15 und 5 μg nicht vernachlässigt werden.

Betrachtet man die gefundenen Beziehungen zwischen Absorptionsmaximum und der für ein Gemisch von Desoxycholsäure und Chenodesoxycholsäure zusätzlich charakteristischen Differenz zwischen maximaler Extinktion und Extinktion bei 375 $\text{m}\mu$, so fällt auf, daß die definierten Punkte in den unteren 2 Dritteln der Abbildung annähernd auf Geraden liegen, deren Verläufe durch die Kombination einer bestimmten Menge Desoxycholsäure mit ansteigenden Mengen Chenodesoxycholsäure charakterisiert werden. Im oberen Drittel der Abbildung können wir durch die Meßpunkte teils nach oben, teils nach unten konvexbogene Kurven ziehen. Dieses verschiedene Verhalten in der Verteilung der Meßergebnisse mag seine Ursache in der relativ geringen Zahl von Messungen im oberen Drittel des Meßbereiches haben (vgl. Abbildung 3). Messungen der Zwischenwerte erlauben evtl. ein Interpolieren der Anteile von Desoxycholsäure und Chenodesoxycholsäure auch in kleinen Bereichen. Wir sahen uns gezwungen, unsere Messungen auf den Bereich zwischen 5—60 μg mit 5 μg -Stufen zu beschränken. Durch verschiedene Verdünnungen des zu analysierenden Gemisches unbekannter Mengen Desoxycholsäure und Chenodesoxycholsäure läßt sich dieser Nachteil ausgleichen. Angaben über den Fehlerbereich unserer Methode sind nur in den gewählten 5 μg -Bereichen möglich und deshalb einer statistischen Berechnung nicht zugänglich. Indessen sind die den Messungen zu-

grunde liegenden Absorptionskurven von Desoxycholsäure- und Chenodesoxycholsäuregemischen gut reproduzierbar, wie auch Wiederauffindungsversuche entsprechender Mengen der beiden Dihydroxycholsäuren die Brauchbarkeit des Verfahrens bestätigen.

Über die Anwendung dieser Methode an biologischem Material und die Analyse der dünn-schichtchromatographisch ebenfalls nicht zu trennenden Dihydroxycholsäurekonjugate des Taurins und des Glycins wird gesondert berichtet.

Literatur

1. GÄNSHIRT, H., F. W. KOSS und K. MORIANZ, *Arzneimittel-Forsch.*, Aulendorf 10, 943 (1960). — 2. HOFMANN, A. F., *J. Lipid Res.* 3, 127 (1962). — 3. FROSCHE, B. und H. WAGENER, diese Z., im Druck. — 4. HAMILTON, J. G., *Gas-Chrom Newsletter* 4, 1

(1963). — 5. ENEROTH, P., *J. Lipid Res.* 4, 11 (1963). — 6. NORMAN, A., *Acta chem. scand.* 7, 1413 (1953). — 7. CAREY, B. B., *J. Clin. Invest.* 37, 1944 (1958). — 8. WOOLTON, I. D. P. und H. S. WIGGINS, *Biochem. J.* 55, 292 (1953).

Dr. med. Bruno Frosch

II. Medizinische Klinik und Poliklinik der Freien Universität Berlin

1 Berlin 19, Spandauer Damm 130

Über die Bestimmung von glykolytischen Fermenten beim Krebskranken

Von

W. LÜHNS und K. CHROMETZKA

Aus dem Sanatorium „Bergfrieden“ — Rottach-Egern der Arbeitsgemeinschaft für Krebsbekämpfung Sitz Bochum — Rubriknappschafft (Chefarzt: Prof. Dr. W. Lühns)

Herrn Professor WARBURG zum 80. Geburtstag in dankbarer Verehrung gewidmet

(Der Schriftleitung zugegangen am 22. Juni 1963)

Die heute in der Klinik gebräuchlichen Fermentbestimmungen werden aufgezeigt. Es werden die Serumfermentwerte bei 144 Krebskranken ausgewertet. Der Effekt einer Behandlung bei Krebskranken kann durch die Fermentwerte objektiviert werden. Als neuestes Ferment wurde die Glutathionreduktase-Aktivität im Serum bestimmt. Bei 303 Patienten, die wegen eines Malignoms operiert und/oder bestrahlt worden waren, wurden die Aldolase, Milchsäuredehydrogenase und die Glutathionreduktase bestimmt. Hierbei zeigte sich beim Vorhandensein von Rezidiven oder Metastasen ein schnelleres Ansprechen der SGR auf diesen pathologischen Befund.

The customary enzyme determinations currently used in clinical investigation are given. Serum enzyme levels are evaluated for 144 cancer patients. The effect of treatment on cancer patients can be made objective by these enzyme values. The most recent enzyme test measures serum glutathione reductase. Aldolase, lactic acid dehydrogenase and glutathione reductase were measured in 303 patients who had been operated on and/or irradiated for cancer. SGR showed the most rapid response to relapses or metastases.

In zunehmendem Maße werden heute Fermentaktivitäten im Serum zur klinischen Diagnostik benutzt. Neben der Bestimmung der Fermente in Exkreten oder Körperflüssigkeiten hat der Fermentnachweis im Blut an Bedeutung gewonnen. Er kann unter gewissen Umständen ein gutes Maß für das Vorliegen und die Ausbreitung, damit die Progredienz (1, 2) bestimmter Tumoren abgeben. Es muß aber betont werden, daß es sich *nicht* um sogenannte „spezifische Krebsteste“ handelt, sondern um Nachweismethoden, die uns bei der Differentialdiagnose helfen, über latente oder

progrediente Phasen der Krebskrankheit etwas auszusagen und eine objektive Auswertung der Therapie (1, 2) ermöglichen. — Der älteste Fermentnachweis, die Diastasebestimmung im Blut und im Urin ist über 50 Jahre alt. Ebenso ist die Bestimmung der Phosphatasen seit 30 Jahren im klinischen Gebrauch. Für die Klinik ist, auch im Hinblick auf ein karzinomatöses Geschehen die Bestimmung der alkalischen und sauren Phosphatase noch heute wichtig. Die *alkalische Serumphosphatase* ist ein Ferment, das aus organischen Verbindungen Phosphorsäure abspaltet.