

Untersuchungen über eine teilmechanisierte Glucose-Dehydrogenase-Mikromethode zur Bestimmung der Glukosekonzentration in nicht enteweißtem Vollblut und Serum

U. Eßinger

Institut für Labormedizin, Städtische Kliniken, 6100 Darmstadt

Zusammenfassung:

Eine Adaption der Glucose-Dehydrogenase-Methode an eine LKB-Gerätekombination, bestehend aus Reaction Rate Analyzer 2086, 1-Channel Potentiometer Recorder 2066 und Kinetic Data Processor 2082 wird beschrieben. Die Bestimmung der Blutzuckerkonzentration erfolgt aus Hämolysat von 50 µl Vollblut oder aus 50 µl Serum; eine Enteweißung ist nicht erforderlich. Die vorgestellte Methode bietet die Möglichkeit, in einer Stunde bis zu 124 Blutzuckerbestimmungen in einem Meßbereich zwischen 20 und 1000 mg/dl durchzuführen.

Die Richtigkeit des Verfahrens wird durch Messen wäßriger und eiweißhaltiger Kontrollproben überprüft. Ein Vergleich der Methode mit der Neocuproin-Methode am AutoAnalyzer II und der Hexokinase-Methode am ACA ergibt gute Korrelationskoeffizienten ($r = 0,994$ bis $0,998$).

Schlüsselwörter:

Blutglukosebestimmung – Teilmechanisierte Methode – Glucose-Dehydrogenase-Methode – LKB-Reaction Rate Instrument – Präzision und Richtigkeit.

Summary:

Adaption of the glucose dehydrogenase method to an LKB equipment set-up, consisting of Reaction Rate Analyzer 2086, 1-Channel Potentiometer Recorder 2066 and Kinetic Data Processor 2082, is described. The blood sugar concentration is determined from the haemolysate of 50 µl of whole blood or from 50 µl of serum, deproteinization is not required. The method offers the possibility of performing up to 124 determinations of blood sugar within a measuring range between 20 and 1000 mg/dl within one hour. The accuracy is proved by checking aqueous and protein containing control samples. A comparison with the Technicon neocuproine method and the ACA hexokinase method shows good correlation coefficients ($r = 0,994 - 0,998$).

Key words:

Blood glucose determinations – Partly mechanical method – LKB-Reaction Rate Instrument – Precision and accuracy.

Einleitung

Im klinisch-chemischen Laboratorium ist Glukose neben Hämoglobin der mit Abstand am häufigsten bestimmte Parameter. Die Anwendung einer für großen Probendurchsatz geeigneten Methode ist daher notwendig. Außerdem müssen Einzelmessungen im Rahmen der Notfalldiagnostik ohne größere Zeitverluste für Geräteeichung und -vorbereitung möglich sein.

Heute werden meist enzymatische Blutzuckerbestimmungsmethoden angewandt. Unter diesen hat sich das Bestimmungsverfahren mittels Glucose-Dehydrogenase rasch einen Platz im klinisch-chemischen Labor erobert (1). Die bisher publizierten Methoden dieser Art verwenden als Untersuchungsmaterial chemisch oder durch Dialyse enteweißtes Vollblut, Serum oder Plasma (2–8). In beiden Fällen sind zusätzliche zeit- und arbeitsaufwendige Schritte zur Probenvorbereitung

tung notwendig. An dieser Stelle soll erstmals über Erfahrungen mit einer Hämolyse-methode berichtet werden, die keine vorherige Enteiweißung der Probe notwendig macht.

Material und Methoden

Folgende Methoden zur Blutzuckerbestimmung wurden angewandt und miteinander verglichen:

Neocuproinmethode am AutoAnalyzer II[®] (9)
Hexokinase-methode am ACA[®] (10)
Glucose-Dehydrogenase-Methode (1) in Adaptation an eine LKB-Gerätekombination:

Reagenzien:

System Glukose (Gluc-DH-Methode, UV-Test).
Enzymgemisch und Coenzym.
Merck: Art. Nr. 14055

System Glukose (Gluc-DH-Methode, UV-Test)
Pufferlösung
Merck: Art. Nr. 14051

Digitonin
Merck: Art. Nr. 3043

Maleinimid
Merck-Schuchardt: Art. Nr. 820754

Preciset Glucose
Boehringer Mannheim: Best. Nr. 125563.

Gebrauchslösungen:

Hämolyse-lösung:
Digitoninstamm-lösung (10 g/l) 10 ml
Maleinimid 100 mg
Aqua bidest. ad 1000 ml

Lösung 1 (Enzymgemisch) = Startreagenz:
Inhalt einer Flasche (1) „Enzymgemisch“ mit 100 ml Puffer lösen.

Lösung 2 (Coenzym):
Inhalt einer Flasche (2) „Coenzym“ mit 500 ml Puffer lösen.

Haltbarkeit der Lösungen bei 25°C ca. 2 Wochen, bei 4°C ca. 4 Wochen.

Konzentrationen im Ansatz:

Gluc-DH	4,000 kU/l
Mutarotase	0,085 kU/l
NAD	0,846 mmol/l
Phosphatpuffer pH 7,6	0,185 mol/l
Natriumchlorid	0,231 mol/l
Digitonin	0,006 mmol/l
Maleinimid	0,073 mmol/l

Tab. 1:

Einstellung des LKB 2086 Reaction Rate Analyzers

Wellenlänge	340 nm
Temperatur	37°C
Lichteinstellung	Operate (AO)
Reaktionsverlauf	Increase
Einspritzdüse	weiß
Dosiervolumen	100 µl
Measure Time	0,5
Range	0,05
Feed in	Timer
Delay	ja
Cuvette	7 mm

Eichstandards:

Zum Erstellen der Eichgeraden wurde Preciset Glucose, Boehringer Mannheim, Best. Nr. 125563, verwendet.

Geräte

Als Meßinstrument diente ein LKB Reaction Rate Analyzer in Verbindung mit einem LKB 2066 1-Channel Potentiometer Recorder und einem LKB 2082 Kinetic Data Processor. Geräteeinstellung siehe Tabelle 1.

Die Auswertung der Analyseergebnisse geschieht vollautomatisch unter Verwendung des LKB-Computerprogramms Fixed Time 2082-075 mit linearer Regression. Die Meßdauer beträgt 15 sec. Die Registrierung beginnt 5 sec nach Zugabe des Startreagenzes. Die interne Eichgerade wird durch Messen von 3 Standardproben (100, 200 und 400 mg/dl) in Doppelbestimmung erstellt und bis zur Messung einer neuen Eichgeraden vom Rechner gespeichert. Wahlweise kann die Umrechnung der Photometermeßwerte in Konzentrationseinheiten auch durch Eingeben eines Faktors in den Data Processor erfolgen.

Zum Pipettieren der Hämolyse-lösung und zum Weiterverdünnen des Hämolyse-sates wurden 2 Eppendorf-Probe-Reagenzdosierer 5231 bzw. 5232 verwendet.

Ausführung der Bestimmungen

Die Probe (Kapillarblut, Venenblut¹, Serum oder Eichstandard) wird mittels 50 µl End-zu-End Kapillarpipetten in 1 ml Hämolyse-lösung, vorgelegt in 12 x 55 mm Kunststoffröhrchen, überführt und durch mehrmaliges

¹ Es wurden EDTA-Kalium und Jodacetat-Natrium enthaltende Probenröhrchen der Fa. W. Sarstedt, 5223 Nümbrecht-Rommelsdorf, verwendet.

Schütteln der mit passenden Kunststoffstopfen verschlossenen Röhrchen ausgespült. LKB-Küvettenmagazine 8650 werden mit 7 mm Rundküvetten 2174-091 gefüllt und diese mittels Probe-Reagensdosierer mit 50 μ l Primärverdünnung und 500 μ l Lösung 2 beschickt. Küvetteninhalt durch Schütteln und Beklopfen der Küvetten von Luftblasen befreien. Nach Einschleiben der Magazine in die Einfüllschiene des Reaction Rate Analyzers kann die Analysenserie gestartet werden. Die Eichung des Rechners sollte täglich zu Beginn der Routinemessungen oder zwischenzeitlich bei Verwendung eines neuen Ansatzes von Hämolyse-lösung, Coenzym oder Enzymgemisch vorgenommen werden. Es empfiehlt sich, am Anfang eines jeden Küvettenmagazins eine Standardprobe zu analysieren. Wird die Messung zwischen zwei Analysenserien längere Zeit unterbrochen, so sollte vor Beginn der neuen Serie die Startreagenzpumpe kurz durchgespült werden.

Ergebnisse

Richtigkeit

Die Richtigkeit der Methode wurde mit 6 verschiedenen käuflichen Kontrollseren überprüft. Die hierbei erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengefaßt.

Tab. 2:

Richtigkeitskontrolle mit käuflichen Kontrollseren. Vergleich mit den Sollwertangaben der Hersteller für die Hexokinase- und Glucose-Dehydrogenase-Methode in mg/100 ml

Kontrollserum	n	Sollwert		Ergebnis Glucose- DH mg/dl
		Hexokinase mg/dl	Glucose- DH mg/dl	
Monitrol II	20	228	222	228
51 B				
Labtrol	5	115	109	115
52 A				
Fluinorm	5	116	112	117
1601 E				
Precinorm U	5	108	99	110
713				
Precilip	5	103	—	103
456 B				
Seronorm	20	115	—	118
130				

Tab. 3:

Präzision in der Serie und von Tag zu Tag

	n	\bar{x} mg/dl	s mg/dl	VK %
In der Serie	20	234	3,66	1,56
	20	118	2,58	2,19
	20	52	1,77	3,41
Von Tag zu Tag	20	228	3,74	1,64
	20	109	3,94	3,63

Präzision

Die Präzision in der Serie und von Tag zu Tag für 3 bzw. 2 verschiedene Glukosekonzentrationen ist in Tabelle 3 aufgeführt.

Linearität

Die Überprüfung der Linearität erfolgte mit wäßrigen Standards für einen Konzentrationsbereich von 10–1000 mg/dl und mit Jodacetatblut für einen Konzentra-

Abb. 1:

Prüfung der Linearität im Bereich von 0,555–55,5 mmol/l (10–1000 mg/100 ml) mit wäßrigen Standardlösungen unter Verwendung von Preciset-Glucose (Boehringer Mannheim)

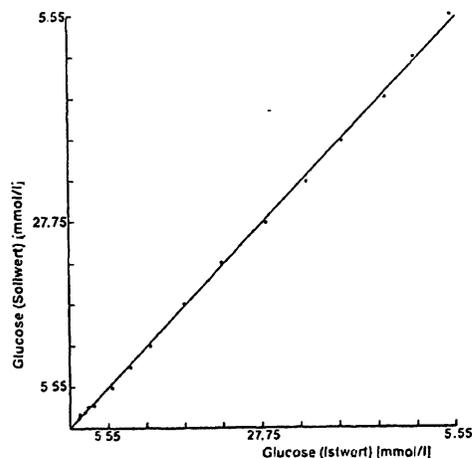


Abb. 2:

Prüfung der Linearität im Bereich von 22,2–55,5 mmol/l (400–1000 mg/100 ml) mit Venenblut. Das „Standardblut“ wurde aus Jodacetatsammelblut durch Zugabe von wasserfreier Glukose hergestellt.

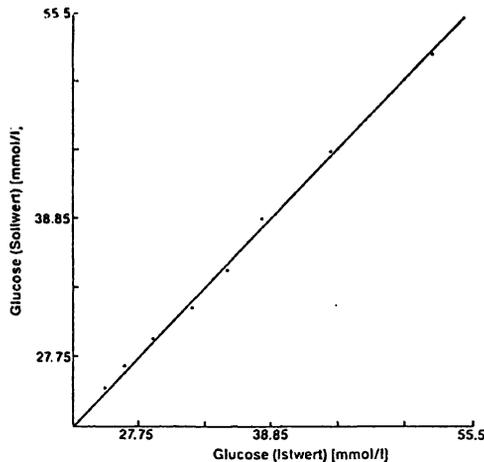
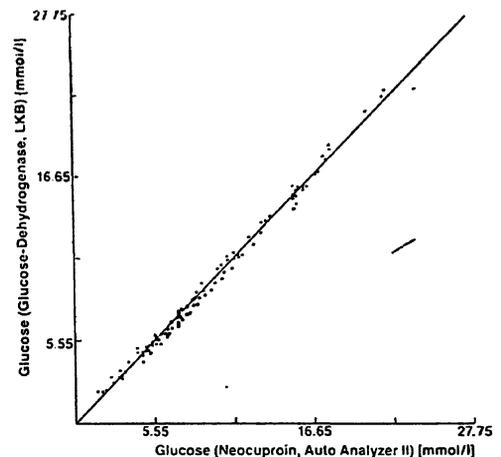


Abb. 3:

Glucosebestimmung in Kapillarblutproben. Vergleich zwischen der Neocuproin-AutoAnalyzer II-Methode (x) und der Glucose-Dehydrogenase-Methode (y). $N = 100$; $y = -0,85 + 1,006 x$; $r = 0,997$; $x = 164,57$; $y = 164,71$; $s_{y,x} = \pm 7,24$. 27,75 mmol/l Glucose = 500 mg/100 ml



tionsbereich von 400–1000 mg/dl. Wie die Abbildungen 1 und 2 zeigen, ist in beiden Fällen eine befriedigende Linearität über den untersuchten Konzentrationsbereich gegeben.

Methodenvergleich

Die Glucose-Dehydrogenase-Methode wurde an 101 Patientenseren mit der Hexokinase-Methode am ACA und an 100 Kapillar- und Jodacetatblutproben mit der Neocuproin-Methode am AutoAnalyzer II verglichen. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 3 bis 5 graphisch und statistisch dargestellt.

Diskussion

Die Glucose-Dehydrogenase besitzt praktisch die gleiche Spezifität wie die Hexokinase (11). Sie erlaubt jedoch die direkte photometrische Erfassung der Glukose ohne Indikatorreaktion, so daß Störeinflüsse bedingt durch Hilfsreaktionen nicht zu befürchten sind. Große Haltbarkeit und günstiger Preis der Reagenzien sind weitere Vorzüge der auf diesem Enzym basierenden Blutzuckerbestimmungsmethoden.

Darüber hinaus bietet die hier gewählte Versuchsanordnung und Gerätekombination eine Reihe zusätzlicher Vorteile. Die kurze Meßdauer gestattet bei einer für die

Abb. 4:

Glucosebestimmung in Jodacetatblutproben. Vergleich zwischen der Neocuproin-AutoAnalyzer II-Methode (x) und der Glucose-Dehydrogenase-Methode (y). $N = 100$; $y = -4,12 + 1,051 x$; $r = 0,994$; $x = 116,74$; $y = 118,57$; $s_{y,x} = \pm 6,39$. 27,75 mmol/l Glucose = 500 mg/100 ml

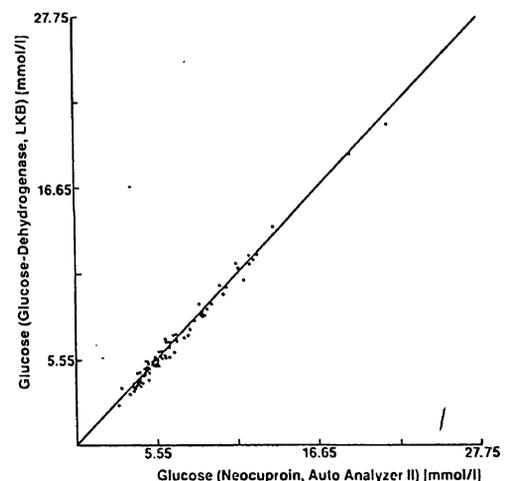
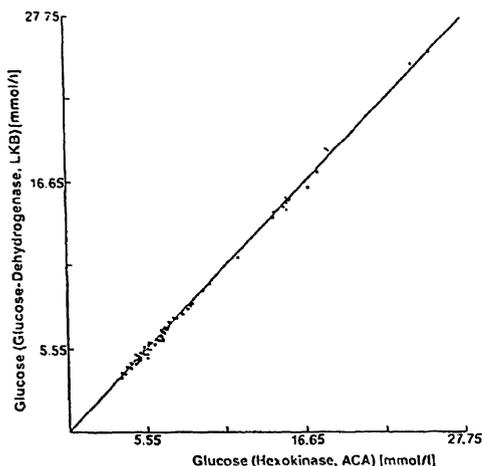


Abb. 5:

Glukosebestimmung in Humansenen. Vergleich zwischen der Hexokinase-Methode am ACA (x) und der Glucose-Dehydrogenase-Methode (y). $N = 101$; $y = -3,92 + 1,023x$; $r = 0,998$; $x = 124,22$; $y = 123,20$; $s_{y-x} = \pm 3,80$. 27,75 mmol/l Glukose = 500 mg/100 ml



Tab. 4:

Einfluß der Hämoglobinkonzentration der Blutproben auf den gemessenen Blutzuckerwert

Serie	N	Hämoglobin g/dl	\bar{x} mg/dl	p I geg. III
I	5	5	127,4	
II	5	10	127,0	0,9 > p > 0,8
III	5	20	127,0	

einer Änderung der Schreiberanzeige um 60 mV ohne signifikanten Einfluß auf die Meßergebnisse bleibt ($0,2 > p > 0,1$).

Durch die geräteinterne Speicherung der in der Regel einmal täglich einzugebenden Eichgeraden können in Nacht- und Notfalldienst jederzeit Einzelblutzuckerbestimmungen ohne vorherige nochmalige Geräteeichung durchgeführt werden. Während des Vorwärm- und Meßvorgangs ist das med.-technische Personal für andere Arbeiten frei.

tägliche Routine akzeptablen Präzision die Analyse von 124 Proben pro Stunde. Die Methode ist bis 1000 mg/dl linear, so daß eine zusätzliche Probenverdünnung bei hohen Glukosekonzentrationen fast ausnahmslos entfällt. Eine Enteiweißung des Untersuchungsmaterials ist nicht notwendig. Hieraus resultiert eine nicht unerhebliche Zeit- und Arbeitersparnis. Das Meßgerät kann Änderungen der Hintergrundextinktion bis zu 1,1 E automatisch ausgleichen. Dieser Kompensationsbereich kann durch Veränderung der Lampenspannung innerhalb des vom Gerät gedeckten Extinktionsbereiches von 0 bis 1,8 E beliebig verschoben werden. So ist es möglich sowohl wäßrige Standards und Seren als auch Kapillar- und Venenblutproben bis zu einer Hämoglobinkonzentration von 20 g/dl mit derselben in Tabelle 1 angegebenen Lichteinstellung zu messen. Wie Tabelle 4 zeigt, haben Hämoglobinkonzentrationen von 5 bis 20 g/dl keinen signifikanten Einfluß auf die Meßergebnisse ($0,9 > p > 0,8$). Bei Hämoglobinwerten über 20 g/dl kann das Meßgerät die Hintergrundextinktion gelegentlich nicht mehr kompensieren, es erfolgt der Ausdruck „dark“ am Rechner. In diesen Fällen kann die Messung bei leicht veränderter Lichteinstellung (Verdrehen des entsprechenden Regelknopfes um ca. 90° im Uhrzeigersinn) durchgeführt werden. Experimentelle Untersuchungen haben gezeigt, daß die Veränderung der Lichteinstellung in dem in Frage kommenden Bereich entsprechend

Schrifttum:

- BANAUCH, D., BRÜMMER, W., EBELING, W., METZ, H., RINDFREY, H., LANG, H.: Eine Glucose-Dehydrogenase für die Glucose-Bestimmung in Körperflüssigkeiten. Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 13, 101 (1975).
- RINDFREY, H., HELGER, R., LANG, H.: Kinetic determination of glucose concentrations with glucose dehydrogenase. Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 15, 217 (1977).
- KELLER, H., WOLF, V.: Ein Verfahren zur enzymkinetischen Bestimmung von Glucose. Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 14, 27 (1976).
- SCHOLER, A., PIANEZZI, A.: Mikromethode zur Bestimmung der Glucose-Konzentration mit Glucose-Dehydrogenase auf dem AutoAnalyser. Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 14, 189 (1976).
- KORNMÜLLER, K. J., MÜLLER-PLATHE, O.: Reagenziensparende Modifikation der Glucose-Dehydrogenase-Methode für den AutoAnalyzer II zur Glucosebestimmung in Venen- und Kapillarblut. Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 15, 603 (1977).
- MÜLLER, H. A. G.: Eine Glucosebestimmung aus Kapillarblut mit der Glucose-Dehydrogenase-Methode am AutoAnalyzer II. Lab. med. 2, 88 (1978).
- LUTZ, R. A., FLÜCKIGER, J.: Kinetic determination of glucose with the GEMSAEC (ENI) centrifugal-analyzer by the glucose dehydrogenase reaction, and comparison with two commonly used procedures. Clin. Chem. 21, 1372 (1975).
- MÜLLER-MATTHESIUS, R.: Enzymkinetische Glucosebestimmung nach der Glucose-Dehydrogenase-Methode. Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 13, 187 (1975).
- AutoAnalyzer Bulletin 2032-11-70-2. Technicon (1970).
- ACA Chemistry Instruction Manual.
- GERBIG, K.: Eine neue hochspezifische und praktikable Methode zur Glucose-Bestimmung mit Glucose-Dehydrogenase. Med. Labor. 29, 1 (1976).

Anschrift des Verfassers:

Dr. med. Udo Eßinger
Institut für Labormedizin
Städtische Kliniken
6100 Darmstadt
Grafenstraße 9