

## Vergleichende Untersuchungen reduktometrischer und enzymatischer Harnsäurebestimmungen

VON CHR. BÜNEMANN UND J. D. KRUSE-JARRES

*Klinisch-Chemisches Labor der Chirurg. Univ. Klinik Freiburg i. Br.*

(Eingegangen am 19. März 1973/30. Mai 1973)

Es werden 6 Methoden zur Harnsäurebestimmung miteinander verglichen: die auf der Reduktion von Phosphorwolframsäure basierenden Tests AccUric Macro bzw. Micro und die Phosphorwolframat-Methode nach Uranylacetat-Enteweißung, sowie die enzymatische Bestimmung durch die direkte Messung des  $O_2$ -Verbrauchs, der UV-Test mit Uricase und die colorimetrische Uricase-Katalase-Methode. Hinsichtlich der Qualität der erzielten Ergebnisse bestehen zum Teil große Unterschiede. Der bisher als Standard-Referenz-Methode dienende sehr zuverlässige Uricase-UV-Test wird von der Uricase-Katalase-Methode hinsichtlich der besseren Reproduzierbarkeit und größeren Stabilität noch übertroffen.

### *Comparative studies on reductometric and enzymic methods for the determination of uric acid*

Six methods for the determination of uric acid were compared: the macro and micro AccUric tests based on the reduction of phosphotungstic acid; the phosphotungstic method after deproteinization with uranyl acetate, the enzymic determination by direct measurement of  $O_2$  consumption; the UV-test with uricase; and the colorimetric uricase-catalase method. There were some large differences in the quality of the results. With respect to reproducibility and stability, the very reliable uricase UV-test, which has hitherto been used as a standard reference, was surpassed by the uricase-catalase method.

Klinische Notwendigkeit bei der anscheinend stetig wachsenden Zahl von Gichtkranken sowie unterschiedliche Bewertung von Ergebnissen verschiedener Bestimmungen der Harnsäure im Serum haben uns bewogen, die zur Zeit gebräuchlichsten Methoden miteinander zu vergleichen. Anlaß waren stark divergierende Darstellungen von Untersuchern und Herstellern über die Güte ihrer Methode. Die verschiedenen Auffassungen dokumentieren sich im Ringversuch der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie vom 19. 2. 1973, in welchem u. a. auch der Parameter Harnsäure von 99 Laboratorien untersucht wurde. Abgesehen von Analysen enzymatischer Bestandteile steht die Harnsäurebestimmung bei einer Präzision von Laboratorium zu Laboratorium mit Variationskoeffizienten für die Phosphorwolframat-Methode von 9,8, einem solchen für die Uricase-Spaltung (pH 9,5) von 8,0 und einem Variationskoeffizienten für alle übrigen Methoden von 9,9 an der unteren Skala der brauchbaren und von Laboratorium zu Laboratorium vergleichbaren Analysen. 27% aller Untersucher hatten Ergebnisse, die mehr als das 3fache der Standard-Abweichung vom Sollwert abweichen. Über ähnlich schlechte Ergebnisse berichten KAISER et al. (1), die 1970 anlässlich einer interlaboritären Qualitätskontrolle in Österreich hinsichtlich der Harnsäure gefunden wurden: 12 von 25 Laboratorien lagen außerhalb des  $\pm 10\%$ -Bereiches des Sollwertes.

Im wesentlichen stehen uns zwei verschiedene Methoden zur Bestimmung der Harnsäure zur Verfügung:

1. die Phosphorwolframsäure-Methode, die FOLIN und DENIS (2) aus der Phosphormolybdänsäure-Methode von OFFER (3) entwickelten; diese Methode liegt den Modifikationen von HEILMEYER und KREBS (4) sowie CAROLL et al. (5) zugrunde.

2. enzymatische Methoden mit Uricase, die auf erste Berichte von KALCKAR und SCHAFFRAN (6) zurückführen. Die bisher gebräuchlichsten Techniken beruhen auf Arbeitsvorschriften von PRAETORIUS und POULSEN (7) im Modifikationsvorschlag von MAHLER (8, 9) nach KORTÜM und KLING (10) (Beimischung von Glycerin zum Blindwert) oder DA FONSECA-WOLLHEIM (11) (niedrigere Enzymkonzentration). Eine Weiterentwicklung des UV-Testes als Farbtest gelang KAGEYAMA (12), über welche erste Erfahrungen bereits veröffentlicht wurden (13, 14). Der Beckman-Analyser mißt die  $O_2$ -Umsetzungsgeschwindigkeit bei der unter Uricaseeinfluß ablaufenden Reaktion von Harnsäure zu Allantoin (15).

### Methoden

Eine übersichtliche Zusammenfassung ist in Tabelle 1 gegeben.

#### Reduktionsmethoden

Die Reduktion von Phosphorwolframsäure im alkalischen Medium durch Harnsäure (FOLIN und DENIS (2)) ist Grundlage aller reduktometrischen Harnsäurebestimmungen. Die Extinktion des entsprechenden blauen Farbstoffs ist der Harnsäurekonzentration proportional und kann im Bereich 560 bis 720 nm gemessen werden. Hierauf baut auf die Phosphorwolframat-Methode

- a) nach HEILMEYER und KREBS (4) sowie
- b) der Testsatz AccUric<sup>1)</sup> (CAROLL (5)).

Eine Enteweißung des Serums ist in beiden Fällen notwendig. Sie geschieht bei der ersten Methode durch Uranylacetat, bei AccUric durch Phosphorwolframsäure, womit der nächste Schritt, die Oxidation der Harnsäure, gleich miteinbezogen wird. Für die Bestimmung nach HEILMEYER und KREBS (4) ist eine Filtration des Ansatzes vorgeschrieben, bei AccUric wird das ausgefällte Eiweiß abzentrifugiert. Abschließend wird der Ansatz durch Zugabe von

<sup>1)</sup> Testpackung der Fa. Gödecke, Freiburg.

Tab. 1

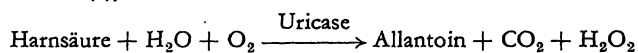
Durchführungskriterien der 6 verschiedenen, getesteten Harnsäure-Methoden (vgl. auch „Arbeitsvorschriften“) \*RT = Raumtemperatur

Methode	Serummenge ml	durchschnittl. Analysezeit min	Wellenlänge nm	Inkubationszeit		Inkubations- temperatur* °C	Zentrifugieren	Filterieren	Phosphorwolfram- säure ml	Uricase (konz. — Angaben laut Hersteller)	Glycerinzusatz	Bestimmungsmilieus	Eichkurve	Faktor	Standard
				min	max.										
A Phosphorwolframsäure HEILMEYER	2	20	578	10	30	RT	∅	+	0,2	∅	∅	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	+	∅	∅
B AccUric Macro CAROLL	0,2	40	560 —720	15	30	RT	+	∅	2	∅	∅	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	+	+	∅
C AccUric Micro Gödecke CAROLL	0,05	40	560 —720	15	30	RT	+	∅	0,5	∅	∅	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	+	+	∅
D O <sub>2</sub> -Verbrauch Beckman	0,05	1	∅	∅	∅	34 ±1	∅	∅	∅	1 mg/ml	∅	pH 2	∅	∅	+
E Uricase-UV-Test KORTÜM	0,2	30	293 297	10	10	25	∅	∅	∅	2 mg/ml	+	Borat pH 9,5	∅	+	∅
F Urica-quant KAGEYAMA	0,5	45	405	30	120	37	∅	∅	∅	5 U/ml	+	Ammonium- phosphat pH 7	∅	∅	+

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> alkalisiert. Die Reduktion der Phosphorwolframsäure ist unspezifisch und kann auch von anderen reduzierenden Substanzen, wie z. B. Ascorbinsäure, beeinflusst werden.

#### Enzymatische Reaktion

Auf einer spezifischen enzymatischen Reaktion beruht die Spaltung der Harnsäure durch Uricase (Urate: Oxygen oxidoreductase, EC 1.7.3.3) in Allantoin und Wasserstoffperoxid (PRAETORIUS und POULSEN (7)):



Im für Harnsäure spezifischen Bereich von 293 nm kann die Abnahme der Harnsäurekonzentration direkt gemessen werden. Dieser UV-Test<sup>2)</sup> wurde zuletzt durch

- KORTÜM und KLING (10) dadurch verbessert, daß der „Glycerinfehler“ durch Zusatz einer der Uricaselösung entsprechenden Glycerinmenge zur Blindlösung vermieden wurde.
- von KAGEYAMA (12) wurde dieser Test 1972 zu einem colorimetrischen Test weiterentwickelt: das durch Harnsäurespaltung mittels Uricase entstehende Wasserstoffperoxid oxidiert mit Hilfe von Katalase Methanol zu Formaldehyd, welches wiederum bei Vorhandensein von Ammonium-Ionen mit Acetylaceton eine gelbgefärbte Verbindung bildet. Die Extinktion zwischen 400 und 420 nm ist der Harnsäurekonzentration proportional. Die Methode liegt dem Testansatz Urica-quant<sup>3)</sup> zugrunde.
- die Messung der Harnsäurekonzentration mit dem Beckman-Analyser Modell ERA 2001<sup>4)</sup> basiert auf der Messung des Sauerstoffverbrauchs während der enzymatischen Oxidation in Gegenwart von Uricase mit Hilfe einer polarographischen Sauerstoffelektrode. Als Meßgröße dient die Abnahmegeschwindigkeit der Sauerstoffkonzentration während der Katalyse, wobei der Gipfelwert bereits nach 10 Sekunden erreicht wird, lange vor dem Endwert der enzymatischen Reaktion. Der Sauerstoffverbrauch, welchem die Harnsäurekonzentration in der Probe proportional ist, wird elektronisch umgerechnet und liefert den Meßwert in mg/100 ml Harnsäure bezogen auf den Eichstandard. Probe und Uricasereagenz müssen auf 34°C erwärmt werden.

#### Arbeitsvorschriften

Diese entsprechen entweder der Originalliteratur (A), den Betriebsvorschriften der Gerätehersteller (D) oder den Reagenzien-Begleit-

<sup>2)</sup> Testpackung der Fa. Boehringer, Mannheim.

<sup>3)</sup> Testpackung der Fa. Boehringer, Mannheim.

<sup>4)</sup> als Harnsäure-Bestimmungszusatz 652523 zum Glucose-Analyser der Fa. Beckman, München.

zetteln (B, C, E und F). Auf Modifikationen wurde bewußt verzichtet.

#### A) Phosphorwolframat-Methode nach HEILMEYER und KREBS

- 2 ml Serum + 2 ml 1,55 proz Uranylacetatlösung + 6 ml H<sub>2</sub>O
- Gut durchschütteln und Eiweiß abfiltrieren.
- 4 ml des klaren Filtrats + 0,2 ml Phosphorwolframsäurereagenz (FOLIN-DENIS) (100 g/l Natriumwolframat, 80 ml/l o-Phosphorsäure) + 1,8 ml 22 proz Sodalösung.
- Frühestens nach 8, spätestens nach 20 min mit Filter 578 nm gegen dest. Wasser bei Schichtdicke 2 cm photometrieren. Berechnung nach Eichkurve.

#### B + C) AccUric Macro (Micro)

Die Angabe für die Micro-Methode jeweils in Klammern:

- Phosphorwolframsäure-Reagenz 2 ml (0,5 ml) + Serum 0,2 ml (0,05 ml) gut mischen und 15 min bei Raumtemperatur stehen lassen.
- Zentrifugieren bei 3000—5000 U/min für 3 min (ca. 15000 U/min für 2 min).
- Macro: Überstand sofort in ein Reagenzglas abgießen (Micro: 0,2 ml des Überstandes in ein Reagenzglas pipettieren).
- Natriumcarbonatlösung 1 ml (0,1 ml) zufügen, gut mischen und 15 min bei Raumtemperatur stehen lassen.
- Extinktion bei einer Wellenlänge zwischen 560 und 720 nm gegen Wasser messen. Berechnung: Faktor oder Eichkurve.

#### D) Beckman Analyser

- Inkubation von Reagenz und Serumproben bei 34 ± 1°C.
- Eichung des Gerätes durch Einpipettierung von 50 µl Standardlösung in die Meßkammer.
- 50 µl der Probe werden in Meßkammer pipettiert. Das Ergebnis kann direkt in mg/100 ml abgelesen werden.

#### E) Uricase-Methode (Modifikation KORTÜM und KLING)

- Auf den Boden von Reagenzgläsern 0,2 ml Serum + 10,0 ml Boratpuffer (100 mol/l; pH 9,5) pipettieren, mischen, verdünnte Probe 15 min bei 20—25°C stehen lassen.
- Zum Leerwert 0,02 ml 50 proz Glycerin; zur Probe 0,02 ml Uricase (2 mg Uricase/ml 50 proz Glycerin) mischen, etwa 10 min bei 20 bis 25°C stehen lassen.
- Messung in Quarzküvetten 1 cm Schichtdicke bei 293 nm gegen Leerwert. Berechnung: c = 68,4 (Extinktion Probe + Extinktion Leerwert) = mg/100 ml.

F) *Urica Quant*

Auf den Boden von Reagenzgläsern pipettieren:

	Standard-leerwert	Standard	Proben-leerwert	Probe
Serum	—	—	0,50 ml	—
Standard (6 mg/100 ml) Harnsäure	0,50 ml	—	—	—
Harnsäure-Reagenz (0,48 mol/l Ammoniumphosphat-Puffer, pH=7; 2,5 mol/l Methanol; 20 mmol/l Acetylaceton; 670 U/ml Katalase	5,00 ml	—	5,00 ml	—
Inhalt der Reagenzgläser gut mischen				
Uricase (5 U/ml 50 proz Glycerin)	—	0,02 ml	—	0,02 ml
Aus dem Reagenzglas des Standard-leerwertes abpipettieren	—	2,50 ml	—	—
Aus dem Reagenzglas des Proben-leerwertes abpipettieren	—	—	—	2,50 ml

gut mischen, Leerwerte, Standard und Probe mindestens 60 min bei 37°C inkubieren.

Extinktion der Probe gegen den Probenleerwert ( $E_{\text{Probe}}$ ) und Extinktion des Standards gegen den Standardleerwert ( $E_{\text{Standard}}$ ) bei 405 nm in 1 cm Glasküvette messen.

Berechnung:  $c = 6 \frac{E_{\text{Probe}}}{E_{\text{Standard}}} [\text{mg}/100 \text{ ml}]$ .

Zur Umrechnung von mg/100 ml in  $\mu\text{mol}/\text{l}$  wird mit dem Faktor 59,48 multipliziert.

Versuchsordnung

Als Testsubstanzen dienen uns

a) selbst eingewogene Eichlösungen. Aus einer 1190  $\mu\text{mol}/\text{l}$ -Stamm-lösung [20 mg Harnsäure (2,6,8-Trihydroxy-purin,  $\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4\text{O}_3$ , MG 168, 11, der Fa. Fluka) wurden in 100 ml Albuminlösung (50 g/l) gelöst] wurden Eichlösungen von 119, 238, 357, 476, 595, 714, 833, 952, 1071 und 1190  $\mu\text{mol}/\text{l}$  Harnsäure hergestellt.

b) käufliche Kontrollseren:

1. Precilip (Boehringer, Mannheim) C-Nr. 102, Sollwert  $286 \pm 42,9 \mu\text{mol}/\text{l}$ .

2. Monitrol I (Merz & Dade, USA) C-Nr. LTD-112 A, B, Sollwert  $286 \pm 13,1 \mu\text{mol}/\text{l}$ .

3. Monitrol II (Merz & Dade, USA) C-Nr. PTD-27A, Sollwert  $506 \pm 20,2 \mu\text{mol}/\text{l}$ .

4. Enzatrol (Merz & Dade, USA) C-ET-237 A, B Sollwert  $518 \pm 15,5 \mu\text{mol}/\text{l}$ .

5. Seronorm (Nyegaard, Oslo) C-Nr. 118, Sollwert  $339 \pm 47,0 \mu\text{mol}/\text{l}$ .

6. Versatol (Warner-Lambert, USA) C-Nr. 2501079, Sollwert  $190 \pm 15,5 \mu\text{mol}/\text{l}$

Zur Ermittlung der *Präzision in der Serie* wurde mit jeder Methode eine Zehnfach-Bestimmung einer jeden Eichkonzentration zwischen 119 und 1190  $\mu\text{mol}/\text{l}$  durchgeführt.

Doppelbestimmungen einer 357  $\mu\text{mol}/\text{l}$ -Eichlösung sowie aller angegebenen Kontrollseren dienten an 10 verschiedenen Tagen zur Feststellung der *Präzision von Tag zu Tag*.

Die Abweichungen der Meßwerte vom Sollwert wurden in Prozent angegeben und ergaben einen Anhalt für die *Richtigkeit* der einzelnen Methoden.

Zur statistischen Auswertung der Meßreihen wurden Mittelwerte ( $\bar{x}$ ), Standardabweichung (2s) und Variationskoeffizient (VK) errechnet. Eine Regressions- $(y = ax + b)$  und Korrelations ( $r$ )-Analyse wurde durchgeführt, um die Übereinstimmung der mit den verschiedenen Methoden gefundenen Werte zu beurteilen.

Ergebnisse

Die Abbildungen 1—7 zeigen, in wieweit die mit den einzelnen Methoden gefundenen Werte im Bereich 119 bis 1190  $\mu\text{mol}/\text{l}$  den Sollwerten entsprechen und bis zu welcher Konzentration eine lineare Abhängigkeit besteht.

Die Reduktionsverfahren ergeben im unteren Bereich allgemein höhere Werte (Abb. 1—3) als die enzymatischen (Abb. 4—6). Linearität über den ganzen Bereich zeigen nur die Methode nach KORRÜM und die KAGEYAMA-Methode. AccUric-Macro verläuft bis etwa 900  $\mu\text{mol}/\text{l}$  linear (Abb. 1), die Micro-Methode ergibt unter 350  $\mu\text{mol}/\text{l}$  zu hohe, oberhalb davon zu niedrige Werte. Die Phosphorwolframat-Methode nach HEILMEYER zeigt bis zu 830  $\mu\text{mol}/\text{l}$  Linearität; die Beckman-Methode bis etwa 700  $\mu\text{mol}/\text{l}$ . Für den praktisch wichtigen Bereich zwischen 250 und 700  $\mu\text{mol}/\text{l}$  wurden bei den reduzierenden Methoden im Schnitt 4—5% Abweichung vom Sollwert gefunden (Abb. 7). Die besten Ergebnisse zeigte sowohl hier als auch in der Präzision (Abb. 8) die

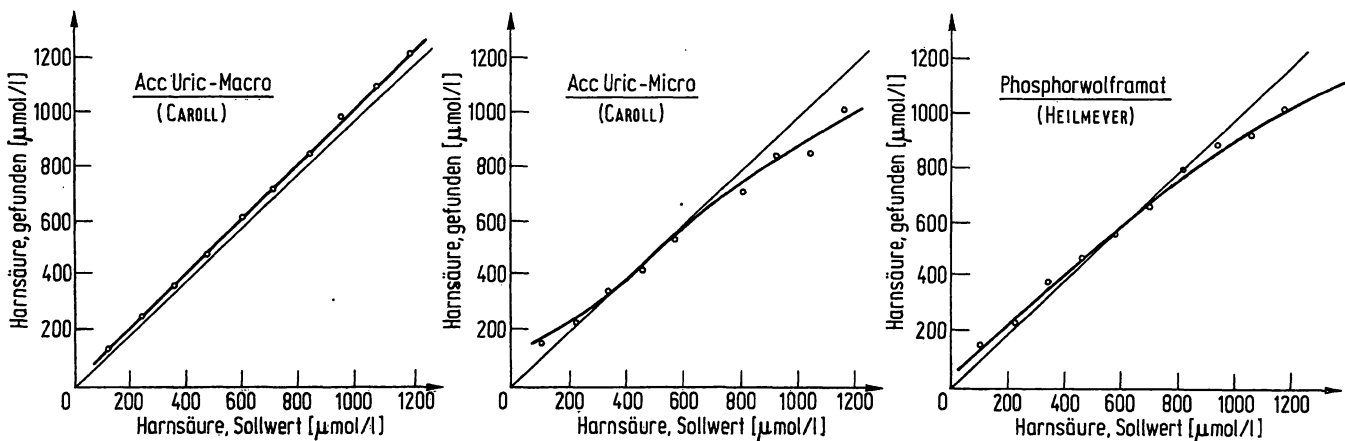


Abb. 1—3

Vergleich der Sollwerte von 10 verschiedenen, eingewogenen Harnsäure-Konzentrationen zwischen 119 und 1190  $\mu\text{mol}/\text{l}$  in Albuminlösung (50 g/l) mit den Mittelwerten der gefundenen Werte aus 10-fach-Bestimmungen in der Serie Phosphorwolframat-Methoden (AccUric-Macro und AccUric-Micro mit gleichzeitiger Phosphorwolframat-Enteweißung, Methode nach HEILMEYER mit Uranylacetat-Enteweißung)

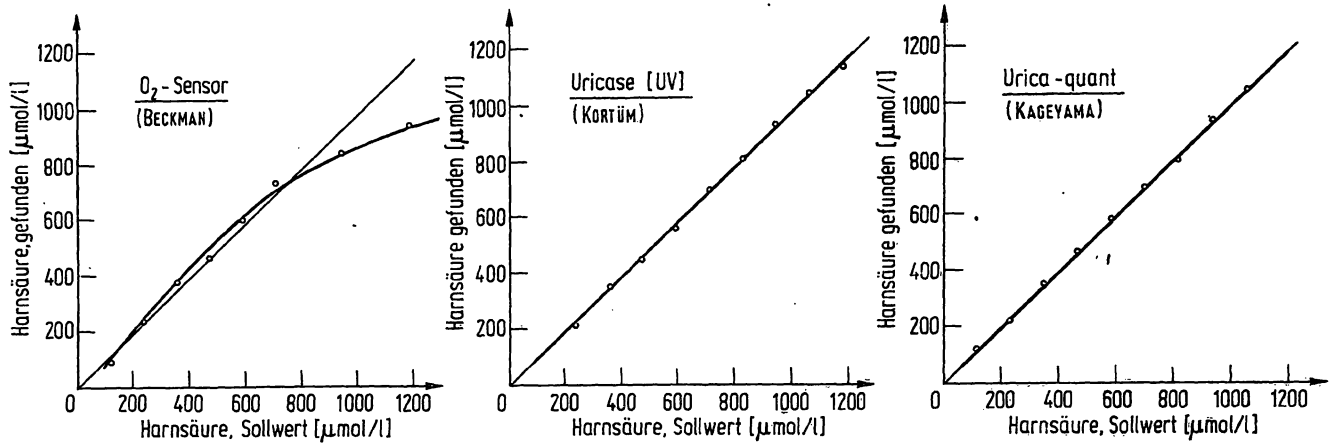


Abb. 4-6

Vergleich der Sollwerte von 10 verschiedenen, eingewogenen Harnsäure-Konzentrationen zwischen 119 und 1190 μmol/l in Albuminlösung (50 g/l) mit den Mittelwerten der gefundenen Werte aus 10-fach-Bestimmungen in der Serie Uricase-Methoden (Sauerstoffmessung bei der Uricasespaltung mit einem O<sub>2</sub>-Sensor, Extinktionsabnahme bei 293 nm, Uricase-Katalase-Farb-reaktion)

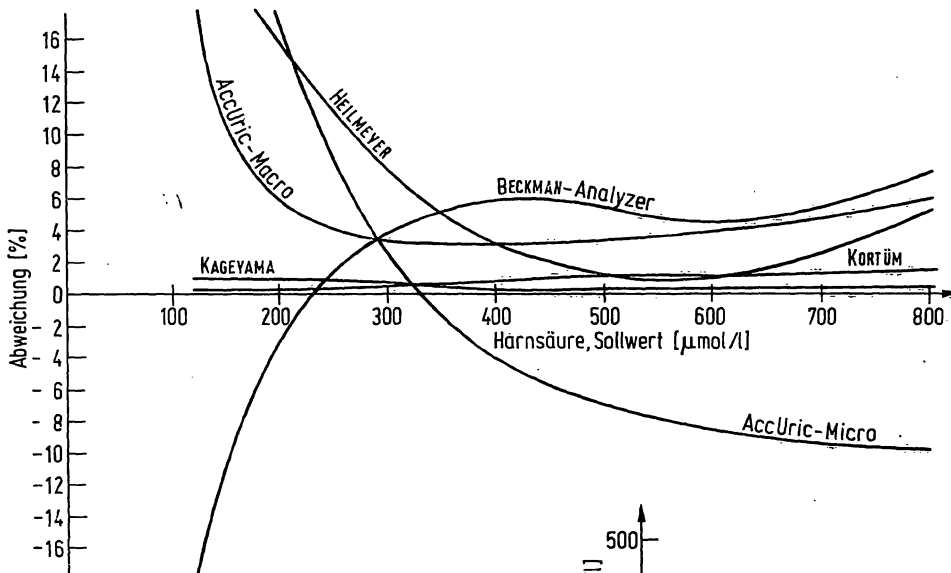


Abb. 7

Mittlere prozentuale Abweichung vom Sollwert bei serieller 10-fach-Bestimmung von eingewogenen Harnsäurelösungen mittels 6 verschiedener Harnsäurebestimmungen

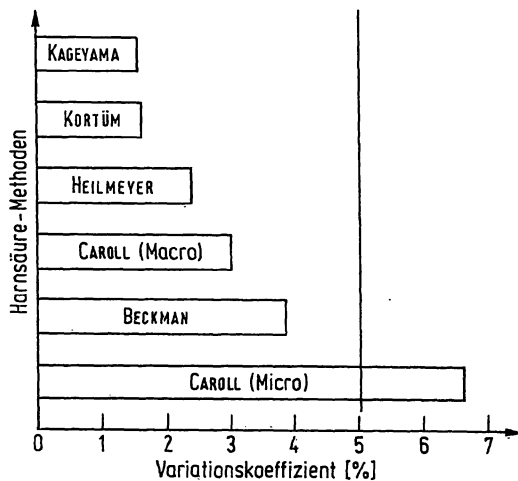


Abb. 8

Variationskoeffizienten 6 verschiedener Harnsäure-Methoden, bestimmt bei 10-fach-Bestimmungen in der Serie in 10 verschiedenen Konzentrationsbereichen zwischen 119 und 1190 μmol/l eingewogener Harnsäure in Albuminlösung (50 g/l)

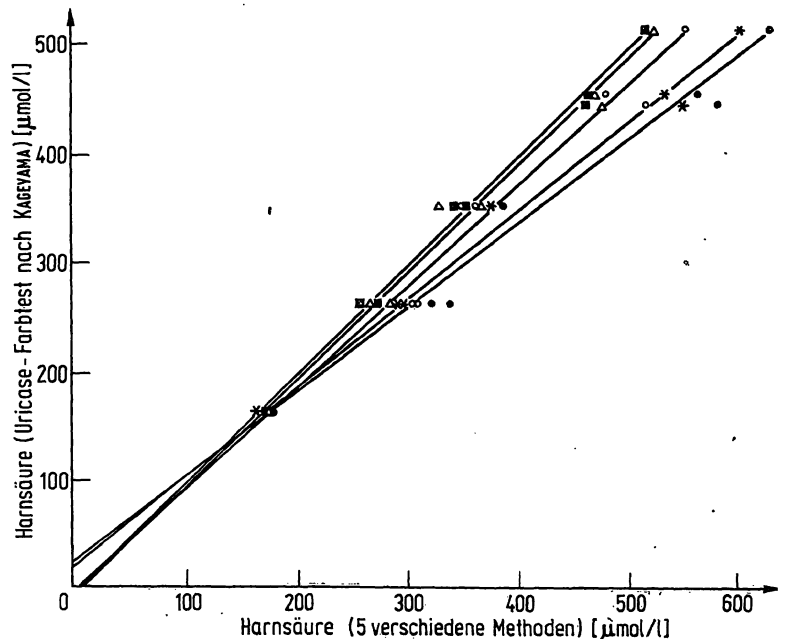


Abb. 9

Regressionsgeraden 5 verschiedener Harnsäure-Methoden im Vergleich zur kolorimetrischen Harnsäure-Bestimmung nach KAGEYAMA. Zugrundeliegende Werte wurden als Mittelwerte aus Doppel-Bestimmungen von Tag zu Tag an 6 verschiedenen Testseren unterschiedlicher Konzentrationen an 10 verschiedenen Tagen ermittelt

- = Uricase-UV-Methode (KORTÜM),  $y = 0,9978 x + 0,1452$ ;
- △ = Uricase-O<sub>2</sub>-Sensor-Methode (Beckman),  $y = 1,0068 x + 0,1803$ ;
- = Phosphorwolframat-Methode (AccUric-Micro),  $y = 1,0704 x + 0,1138$ ;
- × = Phosphorwolframat-Methode (HEILMEYER),  $y = 1,2802 x - 0,8371$ ;
- = Phosphorwolframat-Methode (AccUric-Macro),  $y = 1,2776 x - 0,4436$

Tab. 2

Vergleich der 6 verschiedenen Harnsäure-Methoden untereinander an Hand von 10-fach Bestimmungen in der Serie bei 10 verschiedenen Konzentrationen zwischen 119 und 1190  $\mu\text{mol/l}$  Harnsäure in Albuminlösung (50g/l)

Korrelationskoeffizient ( $r$ ) = errechnet aus dem Vergleich der Mittelwerte verschiedener Harnsäure-Konzentrationen  
 Regressionskoeffizient ( $a$ ) = Steigung der Regressionsgeraden  
 Regressionskonstante ( $b$ ) = Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der x-Achse

x	y	r	a	b
AccUric Macro	AccUric Micro	0,9952	0,7907	0,9745
	HEILMEYER	0,9975	0,8306	1,0320
	Beckman	0,9874	0,8265	0,8104
	KORTÜM	0,9961	0,9713	0,1798
	KAGEYAMA	0,9965	0,7705	0,1924
	HEILMEYER	0,9937	1,0414	0,0999
AccUric Micro	Beckman	0,9881	1,0409	0,1641
	KORTÜM	0,9941	1,2259	1,3166
	KAGEYAMA	0,9951	1,2160	1,2746
	HEILMEYER	0,9924	0,5559	0,275
HEILMEYER	KORTÜM	0,9964	1,1632	1,3209
	KAGEYAMA	0,9963	1,1638	1,2874
	Beckman	0,9874	1,1478	0,8486
	KORTÜM	0,9883	1,1478	0,8486
Beckman	KORTÜM	0,9874	1,1453	0,8457
	KAGEYAMA	0,9988	0,9985	0,0065

KAGEYAMA-Methode. Die mit Abstand größte Streuung der Werte wurde bei AccUric-Micro gefunden. Abbildung 9 und Tabelle 2 zeigen die sehr gute Übereinstimmung der Uricase-UV-Methode und der Uricase-Katalase-Methode.

Die Doppelbestimmungen einer 357  $\mu\text{mol/l}$ -Eichlösung an 10 verschiedenen Tagen zeigen bei den reduzierenden Methoden und beim Beckman-Analyzer höhere Werte als bei der Uricase-Methode oder bei der Uricase-Katalase-Methode. Die mit letzteren Methoden gefundenen Werte bieten hinsichtlich der Streuung sowie der Abweichung vom Sollwert die besten Ergebnisse, während die mit dem Beckman-Analyzer und AccUric-Micro gefundenen Werte stark streuen ( $2s > \pm 60 \mu\text{mol/l}$ ).

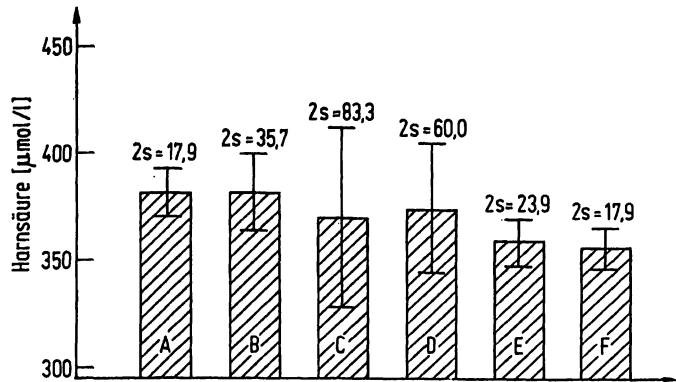


Abb. 10  
 357  $\mu\text{mol/l}$ -Standard an 10 verschiedenen Tagen mit 6 verschiedenen Methoden auf Harnsäure untersucht. Mittelwerte  $\pm 2s$  errechnet aus  $10 \times 1$  Bestimmungen

- A = Phosphorwolframat-Methode (HEILMEYER)
- B = Phosphorwolframat-Methode (AccUric-Macro)
- C = Phosphorwolframat-Methode (AccUric-Micro)
- D = Uricase-O<sub>2</sub>-Sensor (Beckman)
- E = Uricase-UV-Methode (KORTÜM)
- F = Uricase-Katalase-Methode (KAGEYAMA) (vgl. Tab. 1)

Eine gute Reproduzierbarkeit weist die Methode nach HEILMEYER und KREBS auf ( $2s = \pm 17,9 \mu\text{mol/l}$ ) (Abbildung 10).

Ähnliche Ergebnisse hinsichtlich der Reproduzierbarkeit und der Streuung können in der Tag-zu-Tag-Serie (10 verschiedene Tage; Doppelbestimmungen) bei den unterschiedlichsten käuflichen Kontrollseren gefunden werden (Abb. 11). Nur werden mit den durchgeführten Methoden sehr unterschiedliche Ergebnisse hinsichtlich der Richtigkeit erzielt. Während beim Versatol und Seronorm mit Hilfe aller durchgeführten Methoden die Abweichung vom Sollwert sehr gering ist, werden z. B. bei Monitrol II und Enzatrol sehr unterschiedliche Abweichungen festgestellt. Um 10% zu hohe Werte durch die AccUric-Macro-Methode stehen um 12% zu niedrige Werte durch die Urica-quant-Methode bei Kontrollen mit Enzatrol gegenüber. Die Reduktionsverfahren brachten im allgemeinen höhere Werte.

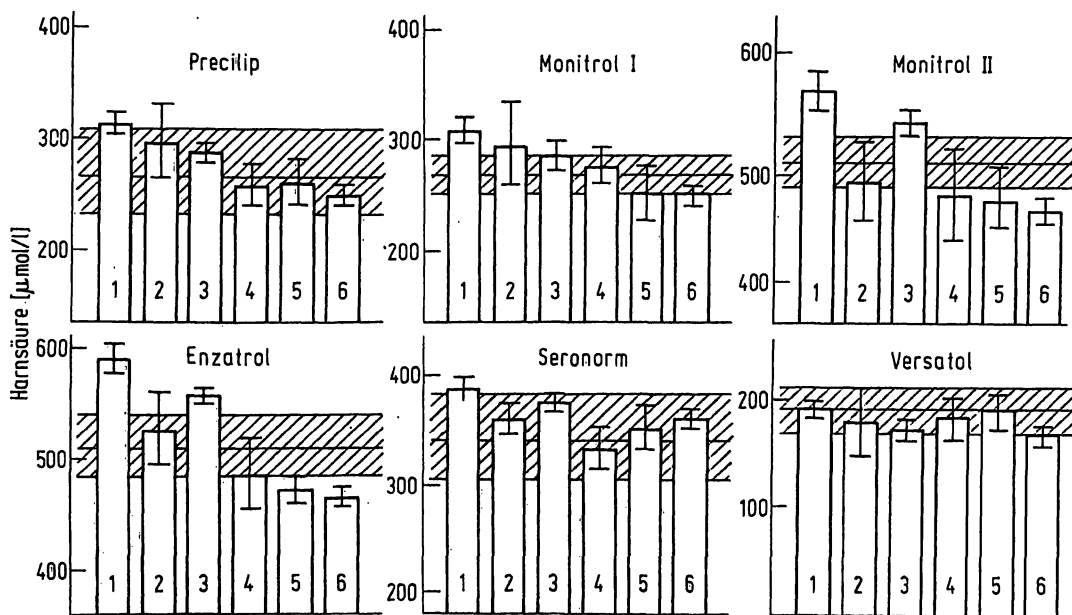


Abb. 11

Bestimmung 6 verschiedener, Harnsäure-haltiger, käuflicher Kontrollseren an 10 verschiedenen Tagen mit 6 verschiedenen Methoden. Schraffierter Bereich: Der von den Firmen angegebene Vertrauensbereich um den Sollwert (1 = AccUric Macro; 2 = AccUric Micro; 3 = HEILMEYER; 4 = Beckman; 5 = KORTÜM; 6 = KAGEYAMA)

## Diskussion

Im Grunde genommen erfüllen alle getesteten Methoden mit Ausnahme der AccUric-Micro-Methode die Bedingungen, die an eine strapazierfähige Routinemethode für die Bestimmung der Harnsäure gestellt werden müssen (VK zwischen 1,6% für die Uricase-Katalase-Methode und 3,7% für Beckman-Analyzer). Die besten Ergebnisse liefert auch in Hinsicht der Handhabung die Methode nach KAGEYAMA. Es besteht eine ausgezeichnete Korrelation zu der bisher als Referenz-Methode üblichen Uricase-UV-Methode ( $r = 0,998$ ). Diese Ergebnisse stimmen mit denen von MERTZ ( $r = 0,9976$ ) voll überein. Die Methode nach KAGEYAMA zeichnet sich im Vergleich zur UV-Methode jedoch durch noch bessere Reproduzierbarkeit aus (Tab. 2).

Die Ergebnisse mit dem Beckman-Analyzer sind wesentlich schlechter. Hier wird der sehr geringe Zeitaufwand für die Analyse sowie die geringe Probenmenge durch erhebliche Instabilität der Analysenergebnisse kompensiert. Trotz Einhaltens möglichst exakter Temperaturkonstanz weichen nach bereits 5 bis 10 Messungen die Meßwerte nach oben hin merklich ab, und es wird eine Korrektur des Standard-Sollwertes am Gerät notwendig. Dadurch erhöhen sich Zeitaufwand und die Kosten pro Analyse erheblich. Außerordentlich wichtig ist ein exaktes Einhalten der Temperatur sowohl beim Reagenz als auch bei der Serumprobe. Durch den schwer einstellbaren Beckman-Inkubator für das Serum kommt es oft zu Temperaturschwankungen mit beträchtlich veränderten Werten.

AccUric-Macro und die Phosphorwolframat-Methode nach HEILMEYER zeigen im Gegensatz zu enzymatischen Methoden durchweg höhere Werte (ähnlich den Ergebnissen von RETTENBACHER (16) zwischen 53,6 bis 69,0  $\mu\text{mol/l}$ ), jedoch zeichnen sie sich durch ausreichende Reproduzierbarkeit aus. Die Micro-Methode hingegen erweist sich als am wenigsten zuverlässig. Die kleinen Mengen führen zu einer starken Erhöhung der zufälligen Fehler. Die Gefahr von Verschleppungsfehlern ist bei den schwer zu reinigenden Micro-Küvetten besonders groß. Dabei ist bei allen drei Reduktionsverfahren eine so sorgfältige Reinigung der Küvetten nach jeder Messung notwendig, da Natriumcarbonatrückstände als Kristallisationskeime dienen. Es werden zum Teil

erhebliche Extinktionsdifferenzen vor und nach Reinigung der Küvetten gefunden. Die Analysendauer wird unter diesen Bedingungen nicht unerheblich verlängert.

Bei der Methode nach HEILMEYER und KREBS ist es oft schwierig, ein Eiweiß-freies, klares Filtrat zu bekommen. Der Arbeitsaufwand, bedingt durch 6 Pipettiervorgänge und das Filtrieren, ist höher als bei allen anderen Methoden.

Der UV-Test hat laut Testpackungsvorschriften gegenüber der Uricase-Katalase-Methode den Nachteil, daß ein exaktes Arbeiten nach Stoppuhr und große Arbeitskonzentration erforderlich und eine Beschränkung auf 10 Proben in einer Arbeitsserie unumgänglich wäre. Jedoch konnten wir bei Überprüfung der Zeitabhängigkeit der Uricasespaltung im UV-Test bei frischen Reagenzien eine stabile Reaktion bereits nach der 6. Minute feststellen. Im beobachteten Zeitraum über eine Stunde konnten lediglich Extinktionsschwankungen  $< 0,001$  festgestellt werden. Ein gefordertes, exakt zeitgebundenes Ablesen der Extinktion ist also nicht erforderlich. Der Arbeitsaufwand ist somit nicht entscheidend größer als bei der KAGEYAMA-Methode. Es muß allerdings erwähnt werden, daß die erwähnte Stabilität der Reaktion nur bei absolut frischen Lösungen festgestellt werden konnte. Stabiler waren die Reaktionen bei der Uricase-Katalase-Methode: Hier konnte noch bis zu  $1\frac{1}{2}$  Monaten eine gleiche Farbentwicklung in der Zeiteinheit festgestellt werden, die von der 30. Minute ab stabil war und innerhalb des Beobachtungszeitraums von 2 Stunden stabil blieb. 3 Monate nach Ansetzen des die Katalase enthaltenden Reagenzes waren zufriedenstellende Ergebnisse nicht mehr zu erzielen.

Lediglich diese Überlegungen sowie die Bedienung eines Spektralphotometers für die UV-Methode und weniger die nur gering schlechtere Reproduzierbarkeit machen den UV-Test der Uricase-Katalase-Methode geringgradig unterlegen.

## Danksagung

Wir danken den Firmen Beckman (München), Boehringer (Mannheim) und Gödecke (Freiburg), die uns Testpackungen und Reagenzien für diese Untersuchungen zur Verfügung gestellt haben.

## Literatur

- KAISER, E., SCHREIBER, V., BAUER, P., HAVELEC, L., WOHLZOGEN, F. X. & GABL, F. (1972), *Wien. Klin. Wochenschr.* **84**, 217—219.
- FOLIN, O. & DENIS, W. (1912/1913), *J. Biol. Chem.* **13**, 469—472.
- OFFER, T. R. (1894), *Centr. Bl. Physiol.* **8**, 801. — 4. HEILMEYER, L. & KREBS, W. (1930), *Biochem. Z.* **223**, 352—365. — 5. CAROLL, J. J., COBURN, H., DOUGLAS, R. & BABSON, A. L. (1971), *Clin. Chem.* **17**, 158—160. — 6. KALCKAR, H. M. & SHAFRAN, J. (1947), *J. Biol. Chem.* **167**, 429—433. — 7. PRAETORIUS, E. & POULSEN, H. (1953), *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **5**, 273—280. — 8. MAHLER, J. L. (1970), *Anal. Biochem.* **38**, 65—84. — 9. MAHLER, J. L. (1972), *Ärztl. Lab.* **18**, 451. — 10. KORTÜM, M. & KLING, O. (1971), *Ärztl. Lab.* **18**, 33—36. — 11. DA FONSECA-WOLLHEIM, F. (1972), *diese Z.* **10**, 136. — 12. KAGEYAMA, N. (1971), *Clin. Chim. Acta* **31**, 421—426. — 13. MERTZ, D. P. (1973), *Klin. Wochenschr.* **51**, 96—98. — 14. THEFELD, W., HOFFMEISTER, H., BUSCH, E. W., KOLLER, P. H. & VOLLMAR, J. (1973), *Deut. Med. Wochenschr.* **98**, 380—384. — 15. Beckman Instructions 83591; Beckman Instruments Fullerton USA, 1971. — 16. RETTENBACHER, F. (1972), *Wien. Klin. Wochenschr.* **84**, 214—216.

PD Dr. J. D. Kruse-Jarres  
Chirurg. Univ.Klinik Klin. Chemie  
78 Freiburg/Br.  
Hugstetterstraße 55