J. Clin. Chem. Clin. Biochem.
Vol. 15, 1977, pp. 109–113

Erfahrungen mit einer neuen Glucosebestimmungsmethode auf dem Greiner Selective Analyzer II (GSA II)

Von E. Wasser

Aus der Medizinischen Klinik (Chefarzt: Prof. Dr. M. Schmid) des Stadtspital Waid, Zürich

(Eingegangen am 25. Mai/15. November 1976)

Zusammenfassung: Die Hexokinasmethode und eine solche mit Glucosedehydrogenase wurden miteinander verglichen. Die Übereinstimmung war im allgemeinen sehr gut. Sodann wurde geprüft, ob Konservierungsmittel, Medikamente und Hämoglobin die Richtigkeit der Resultate von Patientenproben beeinflussen. Es wurde nichts nachteiliges festgestellt. Von den getesteten Kohlenhydraten reagierte 2-Desoxyglucose wie Glucose und kann zu falschen Werten führen. Abgesehen davon, ist diese eine verlässliche und kostengünstige Methode. Der Absorptions-Konzentrationsfaktor bleibt während mindestens 7 Tagen konstant bei einer Linearität zwischen 0,55 und 44,4 mmol/l Glucose.

Investigation of a new method for the determination of glucose, using the Greiner Selective Analyzer II (GSA II)

Summary: The hexokinase method and a method using glucose dehydrogenase are compared. In general, the two methods show good agreement. The samples were not deproteinized and were obtained from fasting patients of the medical, surgical, rheumatological and hemodialysis clinics. The possible influence of anticoagulants, preservatives and hemoglobin on the determination of glucose with glucose dehydrogenase was checked; there was no evidence of interference. Among the carbohydrates which were tested, only 2-deoxyglucose gave a positive reaction. In addition, this is a reliable and cheap method. The multiplication factor for the photometric analysis remains stable for seven days with a linearity between 0.55 and 44.4 mmol/l glucose.

Einführung

Die Reaktion

ist schon lange bekannt (1). Sie wurde nun auf dem GSA II²⁾ als kinetische 2-Punkt-Methode eingesetzt (2, 3). Es galt zu untersuchen, ob die hier angewandte Reaktion ebenso spezifisch sei wie die Hexokinasmethode. Sodann wurde eine bessere Linearität bis in hohe Glucose-Konzentrationen angestrebt.

Material und Methoden

Die Hexokinasmethode und eine solche mit Glucosedehydrogenase wurden miteinander verglichen. Der Vergleich wurde an nicht enteiweißten Proben von Patienten aus der Medizinischen, Chirurgischen und Rheumaklinik, sowie aus der Hämodialysestation durchgeführt. Die Patienten befanden sich im nüchternen Zustand, und die Blutentnahme erfolgte durch Venenpunktion mit Kunststoffspritze.

¹⁾ Glucosedehydrogenase = β -D-Glucose: NAD-oxidoreductase EC 1.1.1.47.

²⁾ Greiner Selective Analyzer II, Greiner Electronic SA, CH-4900 Langenthal.

Glucosedehydrogenase-Methode

Als Reagenzgrundlage dienten die Packungen Nr. 14051 (Phosphatpuffer) und 14053 (Enzymgemisch) der Firma Merck, Darmstadt. NAD (Nicotinamidadeninucleotid) stammte von Boehringer, Mannheim (Produkt Nr. 15613). Pro 1 Liter Pufferlösung wurden 2 Flaschen Enzymgemisch und 1,6 g NAD gelöst. Es ergaben sich folgende Konzentrationen: Mutarotase³⁾ 60 IU/l Glucosedehydrogenase 1733 IU/l, NAD 2,4 mmol/l, Phosphatpuffer 0,12 mol/l, pH 7,6 bei 25 °C.

Die gebrauchsfertige Reagenzmischung ist während mindestens 7 Tagen stabil mit einem linearen Bereich zwischen 0,55 bis 44,4 mmol/l Glucose.

Berechnung

$$[\text{Glucose}] = dA \times 555 \text{ (1 Kommastelle) [mmol/l]}$$

Hexokinase-Methode

Die Hexokinasmethode wurde gemäß Angaben in der Methodensammlung des Geräteherstellers durchgeführt (4).

Sodann wurde geprüft, ob Antikoagulantien, Konservierungsmittel und Hämoglobin die Glucosedehydrogenasemethode beeinflussen.

³⁾ Mutarotase = Aldose-1-epimerase EC 5.1.3.3.

Antikoagulantien

Ethylendiamintetraessigsäure-di-Natriumsalz (Merck, Darmstadt), Ammoniumheparinat (Hoffmann-La Roche SA, Basel).

Konservierungsmittel

N-Ethylmaleinimid (Fluka AG, Buchs), Jodessigsäure-Natriumsalz (Merck, Darmstadt), Benzoesäure (Merck, Darmstadt), Natriumfluorid (Merck, Darmstadt).

Stammlösungen

EDTA 270 mmol/l, Ammoniumheparinat 4500 NIH-Einheiten/ml, Natriumfluorid 120 mmol/l, Jodessigsäure-Natriumsalz 25 mmol/l, D-Xylose 555 mmol/l, Fructose 11,1 mmol/l, Galactose 11,1 mmol/l, Lactose 5,8 mmol/l, Mannose 11,1 mmol/l, 2-Desoxyglucose 6,1 mmol/l, Cephalotin-Natrium 50 mmol/l, Natriumascorbat (Redoxon) 568 mmol/l, Vitamin B₁ (als Hydrochlorid) 60 mmol/l.

Glucose-Bestimmung**Glucosedehydrogenase-Methode**

Zum Einsatz gelangen 10 µl unverdünnte Probe, welche mit 100 µl destilliertem Wasser in das Reaktionsgefäß gespült wird. Die Reaktionstemperatur beträgt 37 °C. Die Reaktionsgefäße I und II enthalten nun 110 µl verdünnte Probe. Bei Station 81 (Abb. 1, 2) wird das Gefäß II mit 1000 µl Reagenz beschickt. Bei Station 8 wird das Gefäß I ebenfalls mit 1000 µl Reagenz beschickt. Station 0 ist die Meßposition, wo die Absorptionsdifferenz von Reaktionsgefäß II (= Vollwert) und Reaktionsgefäß I (= Leerwert) bei einer Wellenlänge von 365 nm gemessen wird. Sodann wird das Resultat in mmol/l Glucose ausgedruckt.

Methodenvergleich

Beim Methodenvergleich Hexokinase-Glucosedehydrogenase waren beide Verfahren gleichzeitig programmiert, so daß aus einer Probe zum selben Zeitpunkt 2 verschiedene Methoden ausgeführt werden können.

Handbook Griner Electronic Selective Analyzer GSA II

METHOD NR. 2 TEST Glucose

REAGENT	TIME	VOLUME		ASSAY	
	min x 10	I	II	I	II
S + DF (X + 100)	100	10+100	10+100	☒	☒
Glucosereagens	81	-	1000	☒	☒
Glucosereagens	8	1000	-	☒	☒
				☐	☐
				☐	☐
				☐	☐
READING	0	1110	1110	$\lambda = 366 \text{ nm}$	

Abb. 1. Programmierschema des GSA II für die Volumina der Dosierer und deren Position.

Abb. 2. Programmierschema des GSA II für die Wahl des Filters, des Leerwertes und der Dosierer.

Ergebnisse**Linearität**

Die Linearität wurde mit wäßrigen Glucose-Lösungen geprüft. Wir verwendeten dazu wasserfreie Glucose „Merck 8337“, welche wir zusätzlich trockneten (Abb. 3). Für unseren Routinebetrieb setzen wir die obere Grenze der Linearität allerdings auf 44,4 mmol/l, um etwaigem Aktivitätsverlust der Enzyme zu begegnen.

Präzision

Präzision von Tag zu Tag: $N = 30$ $\bar{x} = 5,61$ $s = \pm 0,193$
VK = 3,45 %

Es gelangte ein Kontrollserum Ledernorm⁴⁾ zur Anwendung. Dieses lyophilisierte Präparat wurde vorschriftsgemäß täglich rekonstituiert.

Abb. 3. Linearität der Glucosedehydrogenase-Methode auf dem GSA II. Die Standardlösungen wurden mit getrockneter Glucose in gesättigter Benzoesäurelösung angesetzt.

⁴⁾ Opopharma AG CH-8025 Zürich.

Kinetik der Reaktion

Die beiden Meßreihen gegen dest. Wasser zeigen, daß während der Reaktionszeit das NAD nicht verändert wird, wenn keine Glucose vorhanden ist. Im Durchschnitt erreicht der Leerwert 16,8% der Absorption des Vollwertes (Abb. 4).

Die Reaktion in Prozeßgefäß I verläuft also langsamer als in Prozeßgefäß II. Dies ist mit Sicherheit auf eine unterschiedliche Temperatur in den beiden Gefäßen zurückzuführen. Die Zeit von 48 s reicht nicht aus, um die Lösung im Leerwert auf 37 °C zu bringen.

Prüfung des Einflusses von Antikoagulantien (5) EDTA

Die EDTA-Konzentration wurde absichtlich höher als üblich gewählt, weil die Blutentnahmegefäße eine gewisse Menge des Stoffes vorgelegt haben und die Röhrchen unter Umständen nur mit 1 ml statt 5 ml Blut gefüllt werden.

Bei allen diesen Zumischversuchen wurde der Verdünnungseffekt bei der Berechnung berücksichtigt.

$$N = 32 \quad r = 0,998 \quad y = -0,84 + 1,000x$$

$$\bar{x} = 6,61 \quad x \text{ ohne EDTA}$$

$$\bar{y} = 6,54 \quad y \text{ mit EDTA}$$

$$s_{yx} = \pm 0,048$$

Ammoniumheparinat

Dieses Antikoagulum ist in vielen kommerziell erhältlichen Blutentnahmegefäßen vorgelegt. Auch hier wurde die Konzentration etwa auf das fünffache der üblichen

Abb. 4. Absorptionswerte im GSA II von Glucosestandardlösungen bestimmt mit der Glucosedehydrogenase-Methode.

- △ Inhalt von Prozeßgefäß I aus Dosierer 8 gegen dest. Wasser gemessen; Reaktionszeit 48 s.
- Inhalt von Prozeßgefäß II aus Dosierer 81 gegen dest. Wasser gemessen; Reaktionszeit 486 s.
- Absorptionsdifferenz der beiden Messungen.

gesetzt, d. h. 225 NIH-Einheiten statt etwa 45 NIH-Einheiten.

$$N = 32 \quad r = 0,997 \quad y = 4,07 + 0,964x$$

$$\bar{x} = 6,43 \quad x \text{ ohne Heparin}$$

$$\bar{y} = 6,41 \quad y \text{ mit Heparin}$$

$$s_{yx} = \pm 0,05$$

Konservierungsmittel

Natriumfluorid

Natriumfluorid wird hauptsächlich dort verwendet, wo eine Vollblutprobe längere Zeit aufbewahrt werden muß, da es gleichzeitig die Glykolyse hemmt.

$$N = 20 \quad r = 0,976 \quad y = 0,101 + 0,956x$$

$$\bar{x} = 6,29 \quad x \text{ ohne NaF}$$

$$\bar{y} = 6,11 \quad y \text{ mit NaF}$$

$$s_{yx} = \pm 0,094$$

Jodessigsäure-Natriumsalz (6) (Tab. 1)

Jodessigsäure kann NADH zerstören und die Wasserstoffübertragung verhindern. Die Konzentration im Reaktionsgemisch ist jedoch zu klein, um einen merklichen Einfluß auszuüben. Die Konzentration im Reaktionsgemisch beträgt in diesen Versuchen höchstens 4,5 µmol/l.

Tab. 1. Einem Mischplasma wurden steigende Konzentrationen von Jodacetat zugefügt und dann der Glucosegehalt in Doppelbestimmungen bestimmt.

Jodacetat [mmol/l]	Glucose [mmol/l]	gefunden [%]
0,0	27,5	100
0,05	27,7	100,7
0,1	27,4	99,1
0,5	27,8	101

N-Ethylmaleinimid (7) (Tab. 2)

Dieser Glycolysehemmer gilt allgemein als am besten geeignet, weil er in keine Enzyme der Bestimmungssysteme eingreifen soll. Seine Wirksamkeit als Konservierungsmittel wurde schon von Kohler (7) 1963 überprüft.

Tab. 2. Einem Mischplasma wurde N-Ethylmaleinimid in steigenden Konzentrationen zugefügt und dann die Glucose in Doppelbestimmungen bestimmt.

N-Ethylmaleinimid [mmol/l]	Glucose [mmol/l]	gefunden [%]
0,0	16,33	100
0,08	16,28	99,7
0,8	16,44	100,7

Beeinflussung der Meßergebnisse durch andere Kohlenhydrate

D-Xylose (Tab. 3)

Einerseits wurden wäßrige Lösungen von D-Xylose geprüft, ob sie eine der D-Glucose ähnliche Reaktion zeigen, andererseits wurden Zumischversuche durchgeführt mit einem Mischplasma. Auch bei einem Gehalt von 13,3 mmol/l an D-Xylose wurde der Ausgangswert des Mischplasmas nicht verändert.

Nach unseren Modellversuchen im Spektralphotometer beträgt die Umsatzgeschwindigkeit von D-Xylose etwa 1 % derjenigen von D-Glucose. Eine Störung der Glucosebestimmung durch Xylose während einer Xylose-Belastung ist somit kaum gegeben (8).

Tab. 3. Einem Mischplasma wurde Xylose in Konzentrationen, wie sie im „Xylose-Test“ vorkommen können, zugesetzt.

Xylose [mmol/l]	Glucose [mmol/l]	gefunden [%]
0,0	6,67	100
0,67	6,67	100
3,3	6,67	100
13,3	6,67	100

Andere untersuchte Zucker

Bei den übrigen Zuckern, welche wir untersuchten, ist noch die *Fructose* zu erwähnen, welche auf dem GSA II keine Reaktion zeigte mit der Glucosedehydrogenase-Methode, mit der Hexokinase-Methode jedoch zu etwa 5 % umgesetzt wurde. Für dieses Phänomen ist der Isomerasegehalt der Hexokinase verantwortlich (s. Tab. 4).

Die 2-Desoxyglucose wird gelegentlich für den Hollander-Test verwendet (9, 10). Wir fanden für die 2-Desoxyglucose mit Glucosedehydrogenase eine Umsatzrate von 107 % verglichen mit Glucose. Steht ein Patient also unter 2-Desoxyglucose, so kann mit dieser Methode kein richtiger Glucosewert erhalten werden.

Tab. 4. Wäßrige Lösungen der Zucker wurden in Abwesenheit von Glucose geprüft, ob sie eine positive Reaktion ergeben.

Zucker	„Glucose“ [mmol/l]	gefunden [mmol/l]
Fructose	11,1	0
Galactose	11,1	0
Lactose	5,8	0
Mannose	11,1	0,11
D-Xylose	11,1	0,11
D-Xylose	555,5	8,55
2-Desoxyglucose	12,2	13,0

Medikamente (11)

Beim Testen von Medikamenten, ob sie chemische Reaktionen beeinflussen können, muß man sich bewußt sein, daß es sich um in vitro-Modellversuche handelt. Wir prüften 1 Antibiotikum und 2 Vitamine (Tab. 5, 6 und 7). Wenn auch mit diesem Verfahren keine Beeinflussungen festgestellt werden konnten, so wäre es möglich, daß Metabolite dieser Substanzen stören könnten.

Tab. 5. Einem Mischplasma wurden steigende Konzentrationen von Cephalotin-Natrium zugegeben und dann die Glucose bestimmt.

Cephalotin-Natrium [mmol/l]	Glucose [mmol/l]	gefunden [%]
0	6,77	100
0,12	6,77	100
0,50	6,83	100,9
2,5	6,77	100

Tab. 6. Einem Mischplasma wurden steigende Konzentrationen einer Natriumascorbatlösung zugegeben und dann der Glucosegehalt in Doppelbestimmungen bestimmt.

Natriumascorbat [mmol/l]	Glucose [mmol/l]	gefunden [%]
0,0	7,1	100
0,6	7,0	98,6
1,2	7,2	101
3,0	7,3	102,8

Tab. 7. Einem Mischplasma wurden steigende Konzentrationen einer Vitamin-B₁-Lösung zugesetzt und danach der Glucosegehalt im Doppel bestimmt.

Vitamin B ₁ [mmol/l]	Glucose [mmol/l]	gefunden [%]
0	7,1	100
0,3	7,1	100
0,6	7,0	98,6
3,0	7,1	100

Hämoglobin

Hämoglobin stört bis zu einer Konzentration von 0,6 mmol/l Plasma die Bestimmungen nicht (Tab. 8, 9).

Tab. 8. Einem Mischplasma wurden steigende Mengen einer Hämoglobininlösung beigemischt und die Glucose in Doppelbestimmungen bestimmt.

Hämoglobin [mmol/l]	Glucose [mmol/l]	gefunden [%]
0	11,8	—
0,03	11,9	100,8
0,06	11,8	100
0,3	12,1	102,5
0,6	12,1	102,5

Tab. 9. Glucosebestimmung in wäßrigen Standardlösungen von Glucose, von denen jede einen Hämoglobingehalt von 0,07 mmol/l aufweist.

Standardlösung [mmol/l]	Glucose [mmol/l]	gefunden [%]
0	0	—
1,39	1,41	101,4
2,78	2,70	97,1
5,55	5,55	100
11,1	12,2	109,9
27,7	29,1	105,0
55,5	54,4	98,0

Vergleich der Glucosedehydrogenase-Methode mit der Hexokinase-Methode

Die Proben stammten aus der täglichen Routine unserer Kliniken. Die Gefäße für die Blutentnahme enthielten Ammoniumheparinat, wurden nach der Blutentnahme sofort zentrifugiert und das Plasma abgehebert. Das Verhältnis Männer zu Frauen beträgt etwa 1:1, und das Alter der Patienten liegt zwischen 18 und 80 Jahren. Abbildung 5 zeigt das Korrelationsdiagramm.

Die Hämodialysepatienten wurden im Methodenvergleich gesondert behandelt (Korrelationskoeffizient $r = 0,994$, $N = 41$). Frühere Untersuchungen an anderen Parametern zeigten, daß Hämodialysepatienten oftmals besondere Veränderungen ihrer Blutzusammensetzung aufwiesen.

Diskussion

Gemäß den vorliegenden Resultaten kann diese Methode als geeignet gelten, um auf dem GSA II routinemäßig gefahren zu werden. Die Spezifität läßt nach unserer Auffassung kaum zu wünschen übrig. Die mit der Glucosedehydrogenase-Methode gemachten Erfahrungen gelten nicht für die Hexokinase-Methode, die auch hier absolut spezifisch ist. Nach eigenen Beobachtungen liefert die Glucoseoxidase-Methode, wie sie im Beckman-

Abb. 5. Vergleich zwischen der Hexokinase-Methode und Glucosedehydrogenase-Methode (Patienten der medizinischen und chirurgischen Klinik sowie Hämodialysepatienten).

$$y = -0,13 + 1,009x, \quad r = 0,997$$

$$\bar{x} = 6,23, \bar{y} = 6,18, \quad s_{yx} = \pm 0,019 \quad N = 159$$

Glucoseanalyzer angewendet wird, auch falsche Werte, wenn 2-Desoxyglucose vorhanden ist. Wir konnten mit dieser Glucosedehydrogenase-Methode ca. 80% Reagenzienkosten einsparen. Dies gilt nicht nur für den Kauf des Materials, sondern auch für die Herstellung der Lösung: es wird nur ein einziges, einfach herzustellendes Reagenz benötigt.

Als neue Referenzmethode eignet sich das Glucosedehydrogenase-System nicht; hierzu reicht die Spezifität nicht aus.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. M. Schmid danke ich für die kritische Durchsicht des Manuskriptes und Frl. G. Bächtold für das Schreiben der endgültigen Fassung.

Der Firma Merck, Darmstadt, danken wir für die kostenlose Überlassung von Reagenzien für die Glucosedehydrogenase-Methode.

Literatur

1. Metzger, R. P., Wilcox, S. S. & Wick, A. N. (1964), J. Biol. Chem. 239, 1769–1772.
2. Greiner, R. (1973), diese Z. 11, 76–86.
3. Bergmeyer, H. U. (1970), Methoden der enzymatischen Analyse, S. 273–279 (Bergmeyer, H. U., ed.), Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße.
4. Bestimmung der Glucose in Plasma, Serum und Urin mit einer Hexokinase/Glucose-6-Phosphatdehydrogenase-Methode. Handbook Greiner Electronic Selective Analyzer II, 1972.
5. Richterich, R. (1968), Klinische Chemie in Theorie und Praxis, 2. Auflage, S. 68–71, Karger, Basel.
6. Marbach, E. P., McLean, M., Scharn, Marylin & Tom Jones (1975), Clin. Chem. 21, 1810–1812.
7. Köhler, K. (1963), Intern. Technicon Symposium, Automation in der Analytischen Chemie, S. 123–127.
8. Banauch, D., Brümmer, W., Ebeling, H., Metz, H., Rindfrey, H. & Lang, H. (1975), diese Z. 13, 101–107.
9. Duke, W. W., Hirschowitz, B. I. & Sachs, G. (1965), Lancet, II, 871–875.
10. Gogh, A. L. & Keddle, N. C. (1975), Gut, 16, 171–175.
11. Walter, A. M. & Heilmeyer, L. (1975), Antibiotika Fibel, G. Thieme Verlag, Stuttgart, S. 272–292.

Edwin Wasser Dipl. Chem. HTL
Zentrallaboratorium
Medizinische Klinik
Stadtsptal Waid
CH-8037 Zürich