Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.
11. Jg. 1973, S. 506—508

Mikroliterbestimmungen von Glucose und Xylose im Blut unter Verwendung von 20- μ l-Einmalkapillaren zur Blutentnahme

VON G. BRÜGMANN, K. H. NIESSEN, KATHRIN SCHMIDT UND DOROTHEA GOLLING

Aus der Kinderklinik (Direktor Prof. Dr. J. R. Bierich) der Universität Tübingen

(Eingegangen am 22. März/1. August 1973)

Im Rahmen einer Serie von Xylose-Lactose-Belastungstests bei Kindern wurden die von Hilger et al. (1970), Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 8, 579—581 beschriebenen 20- μ l-Einmalkapillaren zur Blutentnahme benutzt. Mikroliteranalysen nach direktem Einbringen der gefüllten Röhrchen in eiweißfällende Lösungen zeigten gute Ergebnisse. Das Verfahren ergibt bei geringem Blutbedarf minimales Infektionsrisiko für Patient und Personal und ist besonders zur Durchführung längerer Untersuchungsreihen geeignet.

Micro-liter determination of glucose and xylose in blood using one-way 20 μ l capillaries for blood collection

During a series of xylose-lactose loading tests in children, 20 μ l disposable capillaries according to Hilger et al. (1970), Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 8, 579—581 were used for sampling. Microliter analyses after direct insertion of the filled tubes into deproteinising solutions yielded good results. This method, which requires only small specimens of blood, minimises the risk of infection for patients and laboratory personnel. It is especially useful for long series of tests.

Für eine Serie von Xylose-Lactose-Belastungstesten nach FERNANDES und VAN DE KAMER (1) bei Kindern waren innerhalb von 90 min 6 Blutabnahmen für je 2 verschiedene Analysen erforderlich. Dazu erschienen die von HILGER et al. (2) beschriebenen Einmalkapillaren besonders geeignet. Sie erlauben eine schnelle und exakte Dosierung von 20 μ l Blut bei minimaler Infektionsgefährdung der Patienten und des Laborpersonals. Es wurde untersucht, ob auch nach direktem Einbringen der blutgefüllten Kapillaren in eiweißfällende Flüssigkeiten eine befriedigende Präzision der Analysenergebnisse erzielt werden konnte. Zur weiteren Verarbeitung der Proben wurden bewährte Bestimmungsmethoden für Glucose und Xylose den vorhandenen Probenmengen angepaßt.

Material und Methoden

Die Chemikalien wurden, wenn nichts anderes angegeben ist, von der Fa. E. Merck, Darmstadt, bezogen.

Reagenzien zur Glucosebestimmung

Verwendet wurde der Glucose UV-Test der Fa. Boehringer, Mannheim, Best. Nr. 15931. Durch konzentrierteren Ansatz des Reaktionsgemisches wurden die vorschrittmäßigen Reaktionsbedingungen beim angegebenen Mikroverfahren trotz abweichenden Pipettierschemas im wesentlichen eingehalten (330 ml Wasser zum Ansatz der Lösung 1, Reaktionsgemisch aus 43 ml Lösung 1, je 2 ml Lösung 2 und 3 und 0,4 ml Lösung 4). Zu Vergleichsmessungen mit dem Milliliterverfahren wurde das Reaktionsgemisch, wie vom Hersteller für Serienbestimmungen angegeben, durch Mischen von 130 ml Lösung 1 (angesetzt mit 400 ml Wasser), je 5 ml Lösung 2 und 3 und 1 ml Lösung 4 hergestellt.

Reagenzien zur Xylosebestimmung

p-Bromanilin wurde von Merck (p. a.) und Th. Schuchardt, München (reinst) bezogen. Umkristallisation aus Tetrachlor-kohlenstoff unter Zusatz von 4 g Aluminiumoxid (Woelm, Stufe I) zu 10 g p-Bromanilin erwies sich als vorteilhaft. Benutzt wurde eine

Lösung von 0,12 mol/l in kalt gesättigter Thioharnstofflösung in Essigsäure (0,99—1,01/l p. a.). Trichloressigsäurelösung: 0,61 mol/l in Wasser. Standardlösung: Stammlösung 33,3 mmol/l in kalt gesättigter Benzoesäurelösung, zum Gebrauch jeweils 1:10 mit Wasser verdünnt.

Kontrollproben

Für Glucose (A) Kontrollserum für die Richtigkeitskontrolle der Fa. Asid, Lohof bei München, Charge Nr. 401 D. Für Xylose (B): 2 ml A mit 0,1 ml wäßr. Xyloselösung (33,3 mmol/l) gemischt. Die laufenden Kontrollanalysen ergaben für A Extinktionen, die einem Xylosegehalt von 0,22 mmol/l entsprachen ($h = 36$). Der Sollwert für B ist danach 1,81 mmol/l. Die Proben wurden in Portionen bei -12°C aufbewahrt.

Apparate

Die Extinktionen wurden am Photometer „Eppendorf“ (Netheler u. Hinz GmbH, Hamburg) gemessen. Für die Analysen wurden weitgehend Teile des Mikrolitersystems „Eppendorf“ wie Rüttler, Zentrifuge (15000 g, Laufzeit jeweils 1—2 min) Marburg-Pipetten und Reaktionsgefäße sowie ein Probe-Reagenz-Dosierer der Fa. Netheler u. Hinz benutzt. Für statistische Berechnungen stand ein programmierbarer Tischrechner (Hewlett-Packard 9810) zur Verfügung.

Die Blutabnahmen

erfolgten wie von HILGER et al. (2) beschrieben. Jede Entnahme wurde doppelt durchgeführt. Die gefüllten 20- μ l-Kapillaren wurden sofort in die Reaktionsgefäße mit Enteiweißungslösung (50 μ l Trichloressigsäure 0,61 mol/l für Xylose-, 200 μ l Perchlorsäurelösung 0,33 mol/l für Glucosebestimmung) gegeben und gut geschüttelt. Zunächst wurden die Gefäße mit den Kapillaren, dann die abgenommenen Überstände zentrifugiert. Im Vorversuch wurde dieses Vorgehen mit einfacher Zentrifugation (mit und ohne vorheriges Entfernen der Kapillare) verglichen. Außerdem wurden 100- μ l-Blutproben in üblicher Weise mit Kapillarpipetten zur Glucosebestimmung in 1 ml Perchlorsäurelösung gegeben. Auch hier wurden die zunächst bei etwa 3000 g gewonnenen Überstände noch einmal bei 15000 g zentrifugiert. Die Überstände wurden in der Regel am gleichen Tag weiterverarbeitet, in Ausnahmefällen wurden sie 1—2 Tage bei -12°C aufbewahrt.

Glucosebestimmung

I. Das hier geprüfte Verfahren wurde in Anlehnung an die Mikrolitervorschrift zum Glucose-UV-Test durchgeführt.

50 μ l Überstand (bzw. Perchlorsäure als Leerprobe),
100 μ l physiologische Natriumchloridlösung und
500 μ l Reaktionsgemisch

wurden gemischt. Nach 15 min wurde in 1-cm-Küvetten bei 366 nm gemessen. Konzentration (C) = Extinktionsdifferenz (ΔE) $\cdot$ 42,7 (mmol/l). Zur Dosierung des Überstandes wurde zur Verbesserung der Präzision eine Probe-Reagenz-Dosierer verwendet, dessen Vorratszylinder zum Gebrauch für verschiedene andere Analysen mit Natriumchloridlösung gefüllt war. Wenn mit einer Marburgpipette gearbeitet wird, entfällt die Zugabe der Natriumchloridlösung und die oben angegebene Modifikation des Reaktionsgemisches, es gilt dann $C = \Delta E \cdot 36,1 = \text{mmol/l}$.

II. Zum Vergleich wurden Bestimmungen nach der vom Hersteller der Testpackung in der Testfibel angegebenen Vorschrift für Serienbestimmungen durchgeführt (200 μ l Überstand bzw. Perchlorsäurelösung als Leerprobe und 2,8 ml Reaktionsgemisch wurden gemischt und nach 15 min gemessen wie bei I, $C = \Delta E \cdot 49,3$).

Die Xylosebestimmungen

wurden im Prinzip nach ROE und RICE (3) in Anlehnung an das von RICHTERICH (4) angegebene Verfahren durchgeführt. 20 μ l Überstand (bzw. Trichloressigsäurelösung als Leerprobe) und 200 μ l Reagenzlösung wurden mit dem Probe-Reagenz-Dosierer gemischt, auf dem Rotationsmischer mindestens 30 s gerüttelt, 10 min im Wasserbad auf 70°C erhitzt und nach Abkühlung mit Wasser 1–2 h im Dunkeln stehen gelassen. Die Messung erfolgte bei 546 nm in Mikroküvetten. Zur Korrektur der vom Standard abweichenden Verdünnung der eiweißhaltigen Proben beim Mischen mit Trichloressigsäure wurden die Ergebnisse mit folgenden Faktoren multipliziert: Blut 0,96, Kontrollserum 0,98.

Statistik

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte insbesondere nach RASCH (5) und BÜRTNER (6).

Ergebnisse

Blutzuckerbestimmung

Bei einfacher Zentrifugation des Perchlorsäureüberstandes sammelt sich ein Teil der Fällung an der Oberfläche der Lösung. Eine Verschleppung in den Re-

aktionsansatz läßt sich nicht sicher vermeiden. Wahrscheinlich dadurch bedingt, lagen die Ergebnisse bei Versuchen mit einfacher Zentrifugation im Mittel um etwa 0,4 mmol/l höher als nach erneuter Zentrifugation des Überstandes. Untersucht wurden eine heparinisierte Venenblutprobe (9 Kapillaren je Zentrifugierverfahren) und je 2 Kapillaren pro Verfahren von 10 gesunden Probanden mit der Analysenmethode I. Dabei sind Proben mit eindeutig sichtbarer Verunreinigung des Ansatzes bereits ausgeschlossen. Der Unterschied läßt sich auf einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,001$ sichern. Offenbar ist eine doppelte Zentrifugation nicht zu vermeiden. Die Streuung der Analysen nach zweifacher Zentrifugation ließ sich, wie in Tabelle 1 gezeigt, aufgliedern.

Die Probenleerwerte des Mikroverfahrens (Ansatz mit Reaktionsgemisch ohne Enzyme) entsprachen bei 10 Probanden mit Blutzuckerwerten zwischen 5 und 9 mmol/l im Mittel 0,2 mmol/l, $s = 0,067$ mmol/l. Parallelmessungen mit den Methoden I (Ergebnis y) und II (Ergebnis x) bei 10 Personen mit x zwischen 4,4 und 10,7 mmol/l ergaben die Regressionsgleichung $y = 0,013 + 1,023 x$ mmol/l und den Korrelationskoeffizienten $r = 0,995$.

Xylosebestimmung

Zu Beginn der Untersuchungen traten bei mehreren Ansätzen starke Trübungen und große Differenzen bei den Doppelbestimmungen auf, einige Tests konnten nicht ausgewertet werden. Diese Störungen wurden nicht mehr beobachtet, nachdem, wie in der Arbeitsvorschrift angegeben, die Mindest-Schüttelzeiten auf dem Rotationsmischer genau eingehalten wurden und der Überstand der Enteiweißung wie bei der Blutzuckerbestimmung nachzentrifugiert wurde. Offenbar kann auch zu hoher Wassergehalt des Reaktionsgemisches zu Trübungen führen. Durch Umkristallisation des handelsüblichen p-Bromanilins konnte eine weitere deutliche Verminderung der Leerwerte erreicht werden.

Tab. 1

Streuungszerlegung Analyse/Probennahme bei der Glucosebestimmung. Je 2 Analysen pro Kapillare, Faktor Kapillare hierarchisch Faktor Patient untergeordnet. s^2 erwartungstreue Schätzungen für Varianzanteile, DQ Durchschnittsquadrate, FG Freiheitsgrade, F Fisher-verteilte Testquotienten für die Gültigkeit einer Nullhypothese H_0 , p Wahrscheinlichkeit des Eintreffens der Ergebnisse bei Gültigkeit von H_0 . H_0 wird bei $p < 0,01$ abgelehnt. Alle s^2 in (mmol/l)²

Blutentnahme aus	Analysenverfahren	DQ _K (zwischen Kapillaren)		DQ (zwischen Analysen)		Test $H_0: s_K^2 = 0$	Varianz einer Einzelbestimmung Gesamt	Anteil der Kapillare s_K^2
		$s^2 + 2s_K^2$	FG	s^2	FG	$F = \frac{DQ_K}{s^2}$		
10 Personen, je 2 Kapillaren mit 20 μ l Kapillarblut	I	0,0327	10	0,0098	20	$F = 3,35$ $0,01 < p < 0,05$	0,0213	0,0115 (54 %)
10 Personen, je 2 Pipetten mit 100 μ l Kapillarblut	II	0,0606	10	0,0034	20	$F = 17,93$ $p < 0,001$	0,0320	0,0286 (89 %)
1 heparinisierten Venenblutprobe, 10 Kapillaren mit 20 μ l	I	0,0131	9	0,0128	10	$F = 1,02$ $p > 0,2$	0,0129	0,00015 (1 %)

Tab. 2
Kontrollanalysen (je 2 pro Tag)

Bestimmung	Tage	Mittel mmol/l	Richtigkeit % des Sollwertes	Standardabweichung (Präzision) der Einzelbestimmungen (mmol/l) von Tag zu Tag in der Serie	
Glucose	29	4,87	99,7	0,186	0,108
Xylose	18	1,82	100,7	0,130	0,085

Qualitätskontrolle

Glucosebestimmungen wurden an 29 Tagen, Xylosebestimmungen an 18 Tagen nach den angegebenen Arbeitsvorschriften durchgeführt. Die Auswertung der jeweils ersten beiden Kontrollanalysen ist in Tabelle 2 dargestellt.

Diskussion

Für die Glucosebestimmung im Kapillarblut zeigt die Streuungszerlegung, daß die Varianzkomponente s_k^2 bei der Referenzmethode einen wesentlich deutlicheren Einfluß hat als beim untersuchten Verfahren. In s_k^2 geht neben der Wirkung von Kapillare und Enteiweißung auch die Abnahmetechnik ein. Vereinfacht man letztere durch Entnahme aus frischem, heparinisiertem Venenblut, wird dieser Varianzanteil sehr klein. Die vorgeschlagene Dosierung und Enteiweißung von Kapillarblut arbeitet also sehr präzise. Die Gesamtvarianz der Methode ist im vorliegenden Versuch etwas geringer als die der Referenzmethode. Die Korrelation

beider Verfahren ist gut. Die Probenleerwerte liegen niedriger, als nach den Angaben von HAECKEL (9) zu erwarten war, obwohl näher an dem dort angegebenen Extinktionsmaximum der Störsubstanzen gemessen wurde. Die Kontrollanalysen zeigen, daß die beschriebenen Verfahren auch im Gebrauch bei Einzelbestimmungen von Glucose und Xylose gute Präzision und Richtigkeit aufweisen. Es sind zwar zwei Zentrifugationen nötig, dieser Aufwand wird aber durch die geringe benötigte Blutmenge und die angenehme Handhabung der Kapillaren voll ausgeglichen. Gegenüber Blutzuckerbestimmungsmethoden ohne Enteiweißung, die mit noch geringeren Blutmengen auskommen, aber 2 Messungen pro Probe erfordern, (7, 8) weist unser Verfahren den Vorteil einer besseren Eignung für Serienanalysen auf.

Insgesamt zeigen die Untersuchungen, daß die 20 µl-Kapillaren nach HILGER et al. zur Dosierung von Blut in eiweißfällende Lösungen gut geeignet und auch auf diese Weise vorteilhaft einsetzbar sind.

Literatur

1. FERNANDES, J. & VAN DE KAMER, J. H. (1971), Acta Paediat. Scand. 60, 187—191. — 2. HILGER, P., HENKEL, E. & DELBRÜCK, A. (1970), diese Z. 8, 579—581. — 3. ROE, J. H. & RICE, E. W. (1948), J. Biol. Chem. 173, 507—512. — 4. RICHTERICH, R. (1971), Klinische Chemie, 3. Aufl., S. 281—282. Verlag S. Karger, Basel. — 5. RASCH, D. (1971), Elementare Einführung in die mathematische Statistik, 2. Aufl. VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin. — 6. BÜTTNER, H. (1965), diese Z. 3, 69—74. — 7. STORK, H. & SCHMIDT, F. H. (1968), Klin. Wochenschr. 46, 789—790. — 8. WIEDEMANN, G. (1970), diese Z. 8, 655—656. — 9. HAECKEL, R. & HAECKEL, H. (1972), diese Z. 10, 453—461.

Dr. Gerd Brüggmann
Universitäts-Kinderklinik
D 74 Tübingen
Rümelinstraße 23