Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.
13. Jg. 1975, S. 541–543

Mikromethode zur Bestimmung der Glucosekonzentration aus 20 µl Probe auf dem Auto-Analyzer

Von Hanne Holm, A. Pianezzi und A. Scholer

Klinisch-Chemisches Laboratorium, Kantonsspital Basel, Schweiz

(Eingegangen am 27. Juni/21. Juli 1975)

Zusammenfassung: Es wird ein Continuous Flow Verfahren zur Bestimmung der Glucose aus Hämolyolat und anderen Probenmaterialien mit Hexokinase/Glucose-6-phosphatdehydrogenase beschrieben. Es ist eine Mikromethode (20 µl Probe), welche auf dem Auto-Analyzer 2. Generation eingesetzt werden kann. Das Verfahren wurde mit der Hexokinase-Handmethode verglichen.

A micromethod for the determination of glucose in 20 µl samples with the autoanalyzer

Summary: A continuous flow method is described for the determination of glucose in haemolysates and other materials with hexokinase/glucose-6-phosphate dehydrogenase as reagents. It is a micro-method (20 µl) which can be used with the 2. generation auto-analyzer. The new method was compared with a hexokinase manual method.

Einführung

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Methode ist einfach und spezifisch und eignet sich zur Glucosebestimmung in Serum, Plasma, Vollblut, Liquor cerebrospinalis und verdünntem Urin. Die Probe wird in Einmalkapillaren [1,2] aufgenommen und zu einer hämolysierenden Lösung gegeben. Bei einer Probenanzahl von 300–400 Blutzuckerbestimmungen pro Tag brachte uns das beschriebene Entnahmesystem mit den Einmalkapillaren wesentliche Erleichterungen und zeitliche Einsparungen. Die Methode läuft bei uns seit 12 Monaten im Routinebetrieb und seit 6 Monaten auch im 24 h-Notfallbetrieb ohne größere Störungen. Es schien uns sinnvoll, die Methode zu veröffentlichen, da sie für viele Laboratorien von praktischem Nutzen sein dürfte. Eine ausführlichere Publikation ist in Vorbereitung.

Material und Methode

Reagenzien

Lösung 1

(0,154 mol/l Natriumchlorid + Triton X-100) 9 g Natriumchlorid p.a. werden in 1 Liter zweifach destilliertem Wasser gelöst. Zu dieser Lösung gibt man 1 ml Triton X-100.

Lösung 2

Alle Reagenzien aus Packung 15931 der Firma Boehringer. Puffersubstanz (Inhalt der Flasche 1) in 800 ml zweifach destillier-

tem Wasser lösen (bei neuer Packung den Inhalt beider Flaschen 1 zugeben).

Inhalt der Flasche 2 und 3 (NADP und ATP) in je etwa 10 ml zweifach destilliertem Wasser lösen und zum Puffer geben.

Inhalt der Flasche 4 (Enzymgemisch) in die Pufferlösung spülen. Zu diesem Gemisch 1 ml Triton X-100 zufügen und mit zweifach destilliertem Wasser auf 1 Liter auffüllen.

Spüllösung

(zur Reinigung des Gerätes): 0,1 mol/l NaOH

Hämolysierlösung

0,5 g Natriumfluorid + 0,5 g Kaliumoxalat + 1 g 4-Chlor-3-m-kresol in 1 Liter zweifach destilliertem Wasser lösen.

Standardprobe

Zu genau 200 ml zweifach destilliertem Wasser 2 ml Kontrollserum (z. B. Hyland abnormal) geben und gut mischen.

Geräte

Technicon Auto-Analyzer 2. Generation, Sampler IV mit Cam 60 2/1. Dialyzer: 24" Standard Membrane Type C.

Reaktionsspiralen: 2 × 20 turn.

Colorimeter: 1,5 mm Küvetten (10 mm light path) 340 nm Filter. Phototube 65 CE, Lampe mit gelben Anschlußkabeln.

Analyse

Die Probe wird in die Kapillare aufgenommen, zu 2 ml Hämolysierlösung gegeben und gut geschüttelt¹⁾.

¹⁾ Vollblut, Plasma, Kapillarblut, Liquor direkt verwenden; Urin vorher 1:10 verdünnen.

Abb. 1. Fließschema der Methode für den Auto-Analyzer 2. Generation.

Über den Probennehmer wird die Probe angesogen, weiter verdünnt und mit Luft segmentiert. In einem 24" Dialyzer wird gegen das Reagenz dialysiert. Hochmolekulare Stoffe wie Eiweiß gelangen so nicht in die Reaktionsphase. Die Reaktion läuft in mehreren Verweilschleifen ab (Reaktionsschema siehe l.c. [3,4]).

Das gebildete NADPH wird, nach Entfernung der Luft, in der Durchflußzelle des Colorimeters bei 340 nm gemessen.

Ergebnisse

Geprüft wurde die Methode auf ihre Richtigkeit, Präzision, Linearität, Störungsfreiheit und praktische Anwendbarkeit. Abbildung 2 zeigt die Korrelation zwischen der Methode auf dem Auto-Analyzer und der Hexokinase-Handmethode (Originalmethode) für 55 Werte.

Abb. 2. Korrelation der Glucosebestimmungsmethode auf dem Auto-Analyzer mit der Hexokinase-Handmethode (Originalmethode der Firma Boehringer). Die Werte der Handmethode sind oberhalb 16,65 mmol/l (3,00 g/l) nicht mehr linear.

Korrelationskoeffizient $r = 0,9955$
Regressionsgerade $y = 11,2 + 0,9035x$

Die Linearität im Bereich von 0–27,75 mmol/l (5,00 g/l) ist in Abbildung 3 gezeigt. Die Richtigkeit wurde durch verschiedene käufliche Kontrollseren überwacht (Tab. 1). Zugleich ist in Tabelle 1 die Präzision von Tag zu Tag während einer Woche aufgeführt.

Abb. 3. Linearität der Auto-Analyzermethode im Bereich von 0–27,75 mmol/l (0–5,00 g/l).

Tab. 1. Prüfung der Richtigkeit und der Präzision von Tag zu Tag während einer Woche (VK_A) und eines Monats (VK_B) (Routinebedingungen).

Kontrollserum	Deklaration [mmol/l]	Ergebnis [mmol/l]	VK_A [%]	VK_B [%]
Hyland I 0369T009A1	4,718	4,828	2,59	4,3
Versatol Hi 0922110	17,76	17,93	1,89	3,2
Caltrol norm. 233094	3,61	3,72	6,9	6,7
Calibrate 0212030	10,55	10,49	2,25	4,2

Der Schreiberausschlag für eine Konzentration von 27,75 mmol/l Glucose ist 100 % der Skalenbreite für 13,875 mmol/l Glucose, dementsprechend 50 % der Skala.

Das Signal erreicht ~97 % des "steady state" Signals. Die Störung durch Fructose nach Interaktion mit Hexo-

kinase²⁾ und Phosphoglucose-Isomerase³⁾ der Erythrocyten im Hämolysat entfällt, da das zweite Enzym wegen der Dialyse gar nicht ins Reagenzgemisch gelangt.

²⁾ ATP: *D*-hexose 6-phosphotransferase, EC 2.7.1.1

³⁾ *D*-Glucose-6-phosphate ketol-isomerase, EC 5.3.1.9

Literatur

1. Hilger, P., Henkel, E. & Delbrück, A., (1970). *diese Z.* 8, 579–581.
2. Brüggmann, G., Niessen, K. H., Schmidt, Kathrin & Golling, Dorothea, (1973), *diese Z.* 11, 506–508.

3. Neeley, W. E., *Clin. Chem.* 18, 509–515 (1972).
4. Bergmeyer, H. U., (1974), ed. *Methoden der enzymatischen Analyse* 3. Auflage Bd. II S. 1241, Verlag Chemie, Weinheim.

A. Scholer
Kantonsspital
CH-4004 Basel