

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.
Vol. 14, 1976, pp. 415-417

Erfahrungen mit der Glucose-Dehydrogenase-UV-Methode zur Bestimmung der Blutglucose

Von Roswitha Dolhofer, L. Weiss und O. H. Wieland

Klinisch-Chemisches Institut, Städt. Krankenhaus München-Schwabing, 8000 München 40, Kölner Platz 1

(Eingegangen am 12. März/23. Mai 1976)

Zusammenfassung: Eine Methode zur Blutzuckerbestimmung mit Glucose-Dehydrogenase wird beschrieben. Unserer Erfahrung mit dieser Methode liegen 70 000 Blutzuckerbestimmungen innerhalb von sechs Monaten zu Grunde. Ein weiter Linearitätsbereich, Richtigkeit und Spezifität zeichnen diese Methode aus. Störungen durch physiologischerweise im Blut vorkommende Substanzen sind nicht bekannt. Die Glucose-Dehydrogenase-Methode korreliert gut mit der Hexokinase-Glucose-6-phosphatdehydrogenase-Methode.

Experience with the Glucose-Dehydrogenase-UV-Method for the Determination of Blood Glucose

Summary: A method for glucose determination using glucose-dehydrogenase is described. Our experience with this method is based on 70 000 determinations of blood glucose within six months. Linearity over a wide range, accuracy and specificity highly recommend this method. No interference was noticed by substances physiologically occurring in blood. The glucose-dehydrogenase-method correlated well with the hexokinase glucose-6-phosphatedehydrogenase method for the determination of blood glucose.

Einführung

Die Messung der Blutglucose gehört zu den häufigsten in einem klinisch-chemischen Laboratorium durchgeführten Untersuchungen. Eine Methode, die einfach und schnell durchzuführen ist, Spezifität und nur geringe Störanfälligkeit aufweist und darüber hinaus ökonomische Aspekte berücksichtigt, ist zu empfehlen. Eine von *Banauch et al.* (1) 1975 beschriebene Methode der Glucosebestimmung mit Glucose-Dehydrogenase (EC 1.1.1.47) aus *Bacillus megaterium* M 1286 wird diesen Ansprüchen gerecht. Die vorliegende Arbeit berichtet über unsere Erfahrungen, die wir bei mehrmonatigem Einsatz dieser Methode im klinisch-chemischen Routinebetrieb gesammelt haben.

Material und Methoden

Geräte

1. Eppendorf Photometer 1100M mit Schreiber
2. Eppendorf Substratautomat 5030
3. Mikrolitersystem Eppendorf

Reagenzien

1. 30 g/l (0,33 mol/l) Perchlorsäure
2. Testpackung „Merckotest Glucose“ (Gluc-DH-Methode) UV-Test

3. Glucose-6-phosphat und Glucose-1-phosphat Fa. Boehringer, Mannheim
4. Alle anderen Reagenzien stammten von der Fa. E. Merck, Darmstadt (Reinheitsgrad p.A. oder für biochemische Zwecke).

Herstellung der Reagenzlösung

Zur Glucosebestimmung werden die Enzyme Glucose-Dehydrogenase und Mutarotase in Natrium-Phosphatpuffer pH 7,6, 0,12 mol/l so gelöst, daß der Testansatz 5 kU/l Glucose-Dehydrogenase und 0,18 kU/l Mutarotase (EC 5.1.3.3) enthält. Als Coenzym wird NAD in einer Endkonzentration von 2,2 mmol/l der Pufferenzymlösung zugesetzt.

Bestimmungsmaterial

Für die Bestimmung kann Vollblut oder Plasma verwendet werden. Vollblut oder Plasma werden im Verhältnis 1:11 mit Perchlorsäure gemischt, 2 min bei etwa $10\,000 \times g$ zentrifugiert und der eiweißfreie Überstand zur Bestimmung eingesetzt.

Manuelle Bestimmung

0,05 ml Perchlorsäureüberstand werden mit 0,5 ml Reagenzlösung 10 min bei 37°C (oder 15 min bei 25°C) inkubiert und die Absorption der Probe gegen einen Reagenzienleerwert, bestehend aus 0,05 ml Perchlorsäure und 0,5 ml Reagenzlösung, bei 366 nm gemessen.

Berechnung

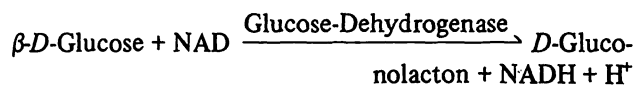
Die Berechnung der Glucosekonzentration erfolgt, sofern nicht anders angegeben, mittels des molaren Absorptionskoeffizienten für NADH, $\epsilon_{366} = 3,3 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}$. Der Verdünnungsfaktor durch Perchlorsäure beträgt für Vollblut 10.85.

Serienbestimmung am Analysenautomaten

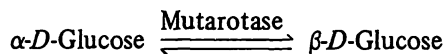
Sämtliche Routinebestimmungen wurden am Eppendorf-Substratautomaten 5030 durchgeführt. Nach einer Inkubationszeit von 10 min bei 37°C erfolgte die Messung bei 366 nm gegen den Reagenzienleerwert. Die Reagenzien- und Probenvolumina entsprachen denen der manuellen Bestimmung.

Ergebnisse und Diskussion

Bei der Blutzuckerbestimmung mit Glucose-Dehydrogenase wird β -D-Glucose durch Glucose-Dehydrogenase zu Gluconsäurelacton dehydriert und dabei NAD zu NADH reduziert:



Die Menge des gebildeten NADH ist der Glucosekonzentration direkt proportional und kann durch seine UV-Absorption photometrisch bestimmt werden. Da im Serum ein Gemisch aus α -D-Glucose und β -D-Glucose vorliegt, die Glucose-Dehydrogenase jedoch nur die β -Form umzusetzen vermag, wird zur raschen Überführung der α -Form in die β -Form dem Reagenz das Enzym Mutarotase zugesetzt.



Bei einer Reaktionstemperatur von 37°C wird bis zu einer Glucosekonzentration von 49,94 mmol/l mit den angegebenen Enzymmengen nach 6 min ein konstanter Endwert erreicht.

Linearität und Richtigkeit

Die Linearität und Richtigkeit der Methode wurde mit eingewogenen Standards wasserfreier Glucose in Perchlorsäure überprüft. Es ergibt sich eine lineare Beziehung zwischen der NADH-Bildung und der eingesetzten Glucosemenge bis 49,94 mmol/l. Als Regressionsgerade ergibt sich $y = 0,991x - 0,334$, bei einem r von 0,9999 (y = gemessene Glucosemenge; x = eingewogene Glucosemenge).

Die Wiederfindung von Glucose im Serum zeigt Tabelle 1. Angegeben ist der Mittelwert aus je 5 Einzelbestimmungen. Es decken sich erwarteter und gemessener Wert.

Tab. 1. Wiederfindungsrate von Glucose im Serum.

Serumkonzentration	Zugesetzt	Wiedergefunden	
12,87 mmol/l	2,77 mmol/l	2,89 mmol/l	104%
12,87 mmol/l	5,16 mmol/l	5,22 mmol/l	101%
12,87 mmol/l	10,65 mmol/l	10,54 mmol/l	99%
12,87 mmol/l	24,97 mmol/l	24,52 mmol/l	98%

Qualitätskontrolle

Die Präzision in der Serie, erstellt am Eppendorf-Automaten, ergab bei einer Konzentration von 5,55 mmol/l einen Variationskoeffizienten von 2,1%, bei 27,75 mmol/l einen von 0,5%. Die Präzision von Tag zu Tag, wurde mit dem Kontrollserum „Ledertröl-U“ (Charge 2908-G 24 K3) (\bar{x} = 15,26 mmol/l) über ein halbes Jahr bestimmt. Der Variationskoeffizient schwankte monatlich von 1,3–2,4%.

Für die kommerziellen Kontrollseren waren zum Zeitpunkt unserer Messungen keine Sollwerte für die Glucose-Dehydrogenase-UV-Methode ermittelt. Das Ergebnis im Vergleich zu den gegenwärtigen Standardmethoden, der Hexokinase-Glucose-6-phosphatdehydrogenase-Methode (2) zeigt Tabelle 2. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte aus Fünffachbestimmungen. Die Werte liegen im Durchschnitt niedriger als die für die Hexokinase-Glucose-6-phosphatdehydrogenase-Methode ermittelten Werte, und entsprechen eher den Sollwerten für die Glucose-Oxidase-Perid-Methode.

Tab. 2. Analyse von Kontrollseren.

Kontrollserum	Sollwerte		
	Hexokinase-Methode	Glucose-Oxidase-Perid-Methode	Glucose-Dehydrogenase-UV-Methode
	mmol/l	mmol/l	mmol/l
1) Normosic Nr. 405	3,33	2,94	2,89
2) Kontrollogen L Nr. 415	4,44	4,34	4,16
3) Seronorm Nr. 126	7,49	7,16	6,99
3) Pathonorm B Nr. 11	—	1,94	1,89
3) Pathonorm A Nr. 11	—	14,37	13,87
4) Monitrol II Nr. 32	12,76	12,93	12,76
5) Precipath S Nr. 302	17,87	18,31	16,65

1) Asid, 2) Behring, 3) Molter, 4) Dade, 5) Boehringer.

Probenleerwert

Um abzuklären, ob bei dieser Methode auf einen Probenleerwert verzichtet werden kann, wurden Perchlorsäureüberstände von 136 Blutproben mit NAD-freier Reagenzlösung inkubiert und gegen den Reagenzienleerwert (s. „Manuelle Bestimmung“) gemessen. Die durchschnittliche Absorptionsdifferenz lag bei 0,003, entsprechend einem Glucosegehalt von 0,1 mmol/l (maximal 0,27 mmol/l), so daß im Routinebetrieb auf einen Probenleerwert verzichtet werden kann. Werden jedoch die mit Perchlorsäure enteiweißten Blutproben nur mit etwa 3000 x g zentrifugiert, so werden ohne Probenleerwert-

korrektur durch Resttrübung im Mittel um 0,85 mmol/l (maximal bis zu 1,66 mmol/l) überhöhte Blutglucosewerte vorgetäuscht.

Stabilität des Reagenzgemisches

Zur Prüfung der Stabilität des Reagenzgemisches wurde dieses bei Raumtemperatur aufbewahrt und in 3-tägigen Abständen durch Bestimmung von Standards von 2,77 mmol/l, 22,19 mmol/l und 41,62 mmol/l überprüft. Über den geprüften Zeitraum von 8 Wochen blieb die Reagenzlösung stabil und erlaubte die exakte Bestimmung der Glucosestandards.

Methodenvergleich

An 325 Blutproben wurden Vergleichsuntersuchungen mit der Hexokinase-Glucose-6-phosphatdehydrogenase-Methode (2, 4) durchgeführt. Beide Meßreihen wurden mit dem Eppendorf-Substratautomaten erstellt. Der Korrelationskoeffizient von $r = 0,9951$ zeigt eine gute Über-

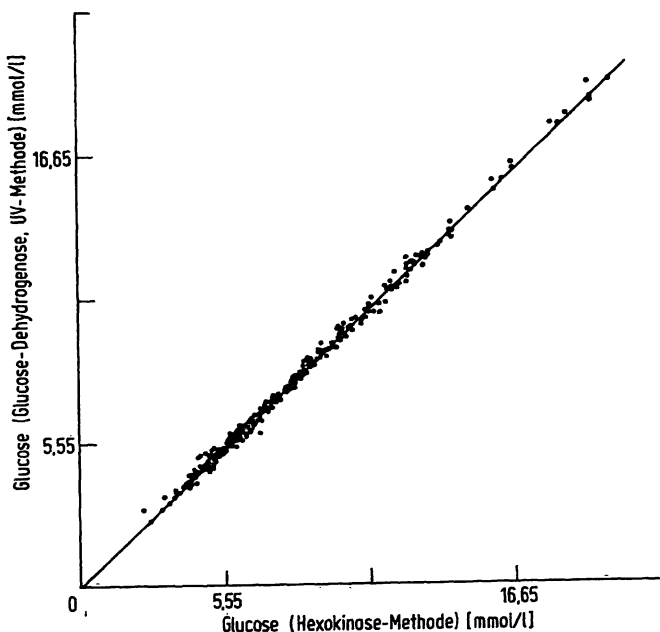


Abb. 1. Vergleich zwischen Hexokinase-Methode (x) und Glucose-Dehydrogenase-UV-Methode (y).

Literatur

1. Banauch, D., Brunner, W., Ebeling, W., Metz, H., Rindfrey, H. & Lang, H. (1975), diese Z. 13, 101–107.
2. Bergmeyer, H. U., Bernt, E., Schmidt, F. & Stork, H. (1974). In: Methoden der enzymatischen Analyse. (Bergmeyer, H. U., Ed.) 3. Aufl., pp. 1241–1246, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße.
3. Bergmeyer, H. U. & Bernt, E. (1974). In: Methoden der enzymatischen Analyse. (Bergmeyer, H. U., Ed.) 3. Aufl., pp. 1250–1259, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße.

einstimmung zwischen beiden Bestimmungen. Als Regressionsgerade findet man $y = 0,969 x - 0,452$. Die mit der Glucose-Dehydrogenase-Methode erhaltenen Werte liegen also durchschnittlich um 3,5% niedriger als die mit der Hexokinase-Methode erhaltenen (Abb. 1). Diese konstante Abweichung ergab sich jedoch nur, wenn in beiden Methoden mit dem bisher noch gebräuchlichen Absorptionskoeffizienten von $\epsilon_{366} = 3,3 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}$ gerechnet wurde. Benützt man für NADPH den Wert $\epsilon_{365} = 3,5 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}$ und für NADH $\epsilon_{365} = 3,4 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}$ (5), so findet man nahezu identische Werte. Bei einem $r = 0,9988$ wird $y = 1,002 x - 1,289$.

Spezifität und Störungen

Zur Prüfung der Spezifität der Glucose-Dehydrogenase-Methode wurden anstelle von Glucose folgende Substanzen als Substrate in einer Konzentration von 100 mg/dl zur Bestimmung eingesetzt: Fructose, Galaktose, Mannose, Ribose, Desoxyribose, Xylose, Lactose, Glucose-1-P, Glucose-6-P. Meßbare Absorptionen wurden nur mit Xylose und Mannose erhalten, nämlich 16% bzw. 3% der Absorption einer Glucoselösung gleicher Konzentration. Da die Konzentration für Mannose im Blut von Normalpersonen bei $55,5 \mu\text{mol/l}$ (6) liegt, ist dieser Wert zu vernachlässigen. Die Xylose-Konzentration im Normalblut liegt bei etwa $165 \mu\text{mol/l}$ (7), so daß auch hier keine Störungen zu erwarten sind. Nach oraler Xylose-Belastung werden jedoch Blutspiegel erreicht, die mit der Glucose-Dehydrogenase-Methode zu fälschlich erhöhten Glucosewerten führen.

Bilirubin $342 \mu\text{mol/l}$, Harnsäure $1190 \mu\text{mol/l}$, Kreatinin $2211 \mu\text{mol/l}$, Ascorbinsäure $11,36 \text{ mmol/l}$, Glutathion $651 \mu\text{mol/l}$ (1) und Antikoagulantien (1) beeinflussen die Methode nicht.

Bei bisher etwa 70 000 durchgeführten Bestimmungen erwies sich die beschriebene Methode als spezifisch, störunanfällig, schnell und einfach durchführbar. Die große Reagenzienstabilität, der weite Linearitätsbereich und nicht zuletzt die Wirtschaftlichkeit gehören zu den weiteren Vorzügen der Glucose-Dehydrogenase-UV-Methode.

4. Weiss, L. In: Laboratoriumsdiagnose akuter Syndrome. Thieme Stuttgart, in Druck.
5. Bergmeyer, H. U. (1975), diese Z. 13, 507–508.
6. Jolley, R. L., Warren, K. S., Scott, C. D., Jainchill, J. C. & Freeman, M. L. (1970). J. Clin. Pathol. 53, 793–802.
7. Hawkins, K. J. (1970). Clin. Chem. 16, 749–752.
8. Müller-Matthesius, R. (1975), diese Z. 13, 169–170.
9. Müller-Matthesius, R. (1975), diese Z. 13, 187–189.

Dr. Roswitha Dolhofer
Städt. Krankenhaus München-Schwabing
Klinisch-chemisches Institut
Köln Platz 1
8000 München 40