

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.
13. Jg. 1975, S. 493–498

Enzymatische Bestimmung des Gesamtcholesterins im Serum mit Zentrifugalanalyzern

Von *Margarethe Knob* und *H. Rosenmund*

Aus dem Medizinisch-chemischen Zentrallaboratorium des Kantonsspitals Zürich (Leiter: Prof. Dr. H. Rosenmund)

(Eingegangen am 2. Mai/4. Juli 1975)

Zusammenfassung: Die von *P. Röschlau* et al (Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 12, 403–407 (1974)) beschriebene vollenzymatische Gesamtcholesterin-Bestimmung wurde von uns modifiziert und auf das Centrifichem-System adaptiert. Die nur 5 µl Serum benötigende Methode ist genau, schnell und einfach. Ein separat anzusetzender Serumleerwert erübrigt sich. Der im Vergleich zur Handmethode geringere Reagenzienverbrauch bzw. die damit verbundene Kostensenkung fällt bei größeren Analysenserien spürbar ins Gewicht.

Der Ablauf der Reaktion bei 30 und 37 °C, die Linearität, die Kalibrierung, die Präzision, die Wiederfindung sowie die Korrelation mit der *Liebermann-Burchard*'schen Methode und der enzymatischen Handmethode werden beschrieben.

Enzymic determination of total serum cholesterol with centrifugal analyzers

Summary: The enzymic determination of total cholesterol described by *P. Röschlau* (Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 12, 403–407 (1974)) was modified and adapted to the Centrifichem system. The method, which requires only 5 µl serum, is accurate, quick and simple. A separate serum blank is not necessary. Compared with the manual method, smaller quantities of reagents used and the resulting decrease in cost are appreciable for large series of analyses. The course of the reaction at 30 and 37 °C, the linearity, calibration, precision, recovery, and correlation with the *Liebermann-Burchard* method and the enzymic manual method are described.

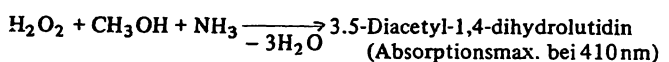
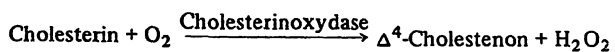
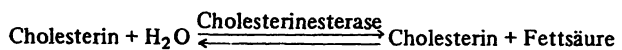
Einleitung

Die halb- (1–4) und vollenzymatischen (5, 6, 7) Handmethoden zur Cholesterinbestimmung weisen gegenüber dem *Liebermann-Burchard*'schen Prinzip (8, 9) und seinen Modifikationen (10, 11) eine bessere Spezifität und Empfindlichkeit auf. Außerdem haben sie den Vorteil, daß keine ätzenden Reagenzien benötigt werden. Serumproteine, Hämoglobin, Bilirubin, Kreatinin, Antikoagulantien und Pharmaka stören nach Angaben der Literatur (5) nicht. Andererseits ist die chemische Verseifung des veresterten Cholesterins bei den halbzymatischen Verfahren (1, 3, 4, 12, 13) arbeitsaufwendig und relativ stör anfällig (hohe Leerwerte, Bildung reduzierender Stoffe). Sowohl die halb- wie auch die vollenzymatischen Handmethoden erfordern einen separaten Serumleerwert, wodurch die Präzision der Resultate naturgemäß beeinträchtigt wird. Mit einer Stunde ist die Inkubationszeit der vollenzymatischen Handmethode (5) verhältnismäßig lang. Durch Verwendung höherer Enzymkonzentrationen konnte die Reaktionszeit wesentlich reduziert und das vollenzymatische Prinzip auf das „Centrifichem“-System adaptiert werden.

Material und Methodik

Prinzip der Bestimmung

Die im Serum vorhandenen Cholesterinester werden mit Hilfe von Cholesterinesterase in freies Cholesterin und Fettsäuren übergeführt. Das freie Cholesterin wird dann durch den Sauerstoff in Gegenwart von Cholesterin oxydase zu Δ^4 -Cholestenon oxidiert, wobei gleichzeitig Wasserstoffperoxid entsteht. Als Indikatorreaktion dient die Oxydation von Methanol zu Formaldehyd durch das gebildete Wasserstoffperoxid in Gegenwart von Katalase und die Bestimmung des Formaldehyds mittels der *Hantzsch*-Reaktion (5).



Kontrollseren und Kontrollösungen

Monitrol I und II (Humanserum, lyophilisiert, „Merz und Dade“, Bern).
Liponorm (Rinderserum, lyophilisiert, „Nyegaard & Co“ AS, Oslo).
Seronorm (Pferdeserum, lyophilisiert, „Nyegaard & Co“ AS, Oslo).

Precilip (Humanserum, lyophilisiert, „Boehringer“, Mannheim).
 Preciset Cholesterin (wäßrige Cholesterinlösungen, „Boehringer“).
 Mischserum (Humanserum, selbst hergestellt, nicht lyophilisiert).

Cholesterinreagenz

190 ml Reagenz I enthaltend
 0,9 mol/l Ammoniumphosphatpuffer pH 7
 2,6 mol/l Methanol
 ≥ 1070 U/ml Katalase (EC 1.11.1.6)
 15 ml Reagenz II enthaltend
 0,4 mol/l Acetylaceton
 2,5 mol/l Methanol
 21,0 g/l Hydroxypolyäthoxydodecan
 2 ml Cholesterinesterase (EC 3.1.1.13), Aktivität ≥ 7 U/ml
 1 ml Cholesterinoxydase (EC 1.1.3.6), Aktivität ≥ 20 U/ml

Endkonzentration im Testansatz

≥ 59 mU/ml Cholesterinesterase
 ≥ 93 mU/ml Cholesterinoxydase
 ≥ 855 U/ml Katalase
 1,81 mol/l Methanol
 0,72 mol/l Ammoniumphosphatpuffer pH 7
 0,02 mol/l Acetylaceton

Apparat

Centrifichem Analyzer (Union Carbide Corp., Vertretung:
 Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz)

Pipettor/Probenring

Position 0 und 1 Wasser
 Position 2 bis 5 Standardseren
 Position 6 bis 29 Proben

Pipettor/Einstellung

Probenmenge 5 μ l
 Probe + Diluent 50 μ l
 Reagenz 350 μ l

Analysier/Methodik

Man arbeitet bei 37 °C mit dem Endpunkt- und Autoblanking-Verfahren. Messung der Absorptionszunahme zwischen 1 und 17 Minuten gegen den Reagenzleerwert.

Analysier/Einstellung

Temperatur 37 °C
 Filter 405 nm
 Filter Potentiometer nach Kalibrierung
 Programm auto blank
 terminal
 operate
 absorption
 no. of prints 8/last (resp.all)
 ΔT time interval 2 min
 T_0 time delay 60 s

Berechnung

Die Berechnung erfolgt mit Hilfe von Standardseren von bekanntem Cholesteringehalt, zweckmäßig von mehr als 5,2 mmol/l.

Kalibrierung

Die Kalibrierung der Methode erfolgte mit lyophilisierten Standardseren (Seronorm, Precilip, Monitrol I und II und Liponorm) sowie mit selbst hergestelltem, nicht lyophilisiertem Mischserum, deren Werte zuerst mit der vollenzymatischen Handmethode (5) festgelegt wurden.

Wie aus Tabelle 1 hervorgeht, ist die Übereinstimmung der Werte sehr gut. Dies spricht für die Richtigkeit der hier angegebenen Methode.

Tab. 1. Vergleich der Centrifichem-Werte mit den Werten der vollenzymatischen Handmethode unter Verwendung verschiedener Kontrollseren.

| Kontrollserum | Sollwerte gemäß Angaben der Herstellerfirmen [mmol/l] | Vollenzymatische Handmethode (Doppelbestimmungen) [mmol/l] | Centrifichem (Doppelbestimmungen) [mmol/l] |
|------------------------------------|--|---|--|
| Seronorm No 124 | 2,61 (L.B.'sche Methode ohne Extraktion) 3,10 (L.B.'sche Methode mit Autoanalyser) 2,25–2,53 (L.B.'sche Methode mit Extraktion) | 2,74/2,49 | 2,41/2,48 |
| Precilip 322 A/B | 3,39–4,16 (Boehringer vollenzymatische Methode) | 3,57/3,88 | 3,57/3,78 |
| Monitrol II 131 A.B. | 3,70 (L.B.'sche Methode ohne Extraktion) 2,87 (L.B.'sche Methode mit Autoanalyser) 2,82 (L.B.'sche Methode mit Extraktion) | 2,59/2,77 | 2,72/2,82 |
| Monitrol I PTD-32 A.B. | 3,78 (L.B.'sche Methode ohne Extraktion) | 3,75/3,85 | 3,75/3,80 |
| Liponorm No 50 | 6,49 (L.B.'sche Methode ohne Extraktion) 6,28 (mit Gaschromatographie) 6,72 (L.B.'sche Methode mit Autoanalyser) | 6,10/6,28 | 6,21/6,31 |
| Mischserum 4 selbst hergestellt | 5,12 (L.B.'sche Methode mit Extraktion und Autoanalyser) | 5,02/5,33 | 4,99/5,22 |

L.B. = Liebermann-Burchard

Ergebnisse

Ablauf der Reaktion

Der Ablauf der Reaktion wurde sowohl mit wäßrigen Cholesterinlösungen (Preciset Cholesterin) wie auch mit Standardseren (Precilip, Liponorm und selbst hergestelltem Mischserum) bei 30 ° und 37 °C verfolgt. Aus den Abbildungen 1 und 2 ist ersichtlich, daß die Reaktion nur langsam anläuft und daß auch bei 37 °C und hohen Cholesterinkonzentrationen in den ersten 75 Sekunden keine wesentliche Extinktionszunahme stattfindet. Die Reaktion ist zwar auch nach 20 Minuten noch nicht ganz beendet, jedoch besteht schon nach 12 Minuten direkte Proportionalität zwischen Extinktion und Cholesterinkonzentration.

Da die Reaktion nur langsam anläuft, können die Leerwertmessungen der Proben auf 60 Sekunden nach Reaktionsbeginn festgesetzt werden. Auf diese Weise lassen sich anfängliche, auf den Einfluß von Esterase zurückzuführende Trübungsänderungen bei lipämischen Seren eliminieren.

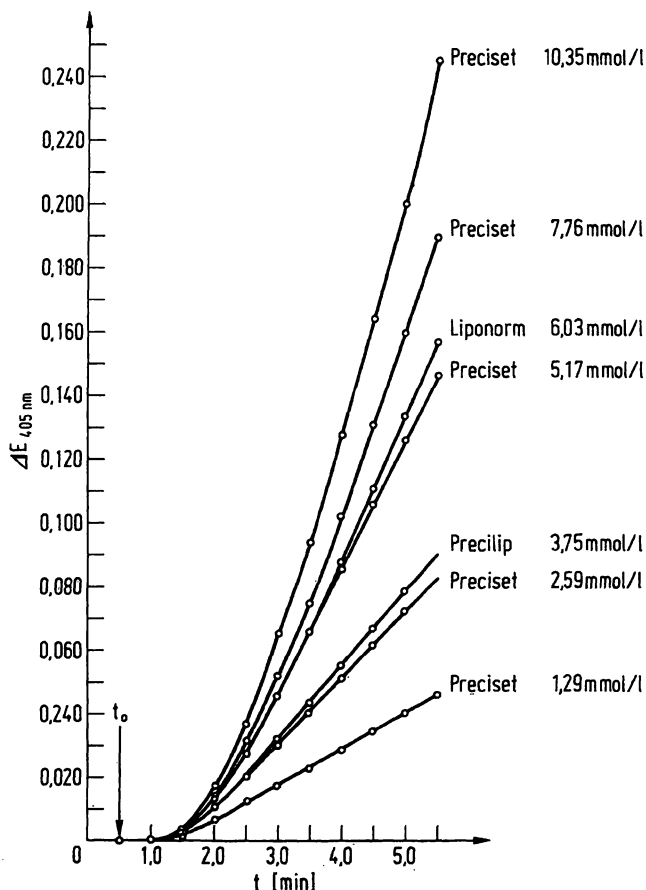


Abb. 1. Reaktionsablauf zwischen 30 und 300 s bei 37 °C.

Arbeitsweise: $t = 30$ s
 $\Delta t = 0,5$ min
 Print = 10/all
 Wellenlänge 405 nm
 Standardseren: Preciset Cholesterin 1,29/2,59/5,17/7,76 und 10,35 mmol/l
 Precilip Cholesterin 3,75 mmol/l
 Liponorm Cholesterin 6,03 mmol/l

Bei stark lipämischen Proben hat sich folgende Arbeitsweise bewährt. Zuerst wird je eine Serumverdünnung 1 + 1 und 1 + 2 mit destilliertem Wasser hergestellt (größere Verdünnungen als 1 + 3 sind nicht empfehlenswert). Der Reaktionsablauf muß kontrolliert werden (alle Zwischenwerte werden ausgedruckt: print/all anstatt print/last). Die Resultate sind nur dann verwertbar, wenn die Extinktion der Probe während des ganzen Reaktionsablaufes zunimmt. Bei abnormalem Reaktionsablauf (anfängliche Extinktionsabnahme bei den Zwischenwerten) ist die Auswertung nicht zulässig.

Die Reaktionsgeschwindigkeiten sind stark temperaturabhängig. Bei 30 °C liegen die Extinktionswerte nach 16 Minuten langer Reaktionszeit um 46 % tiefer als bei 37 °C (Abb. 3). Auch das Reagenz selbst zeigt bei 37 °C eine stärkere Extinktionszunahme als bei 30 °C. Es ist deshalb notwendig, das Reagenz als Referenzlösung zu verwenden.

Linearität

Die Linearität der Methode wurde auf zwei Arten geprüft:

- mit wäßrigen Standardlösungen von (freiem) Cholesterin
- mit lyophilisiertem Standardserum, (freies und verestertes) Cholesterin enthaltend, aufgelöst in verschiedenen Volumina bidestilliertem Wasser.

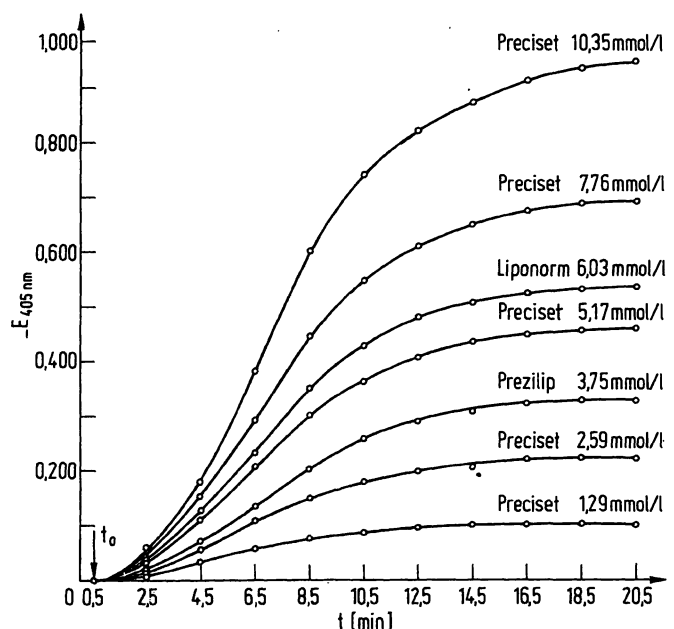


Abb. 2. Reaktionsablauf bei 37 °C

Arbeitsweise: $t = 30$ s
 $\Delta t = 2$ min
 Print = 10/all
 Wellenlänge 405 nm
 Standardseren: Preciset Cholesterin 1,29/2,59/5,17/7,76 und 10,35 mmol/l
 Precilip Cholesterin 3,75 mmol/l
 Liponorm Cholesterin 6,03 mmol/l

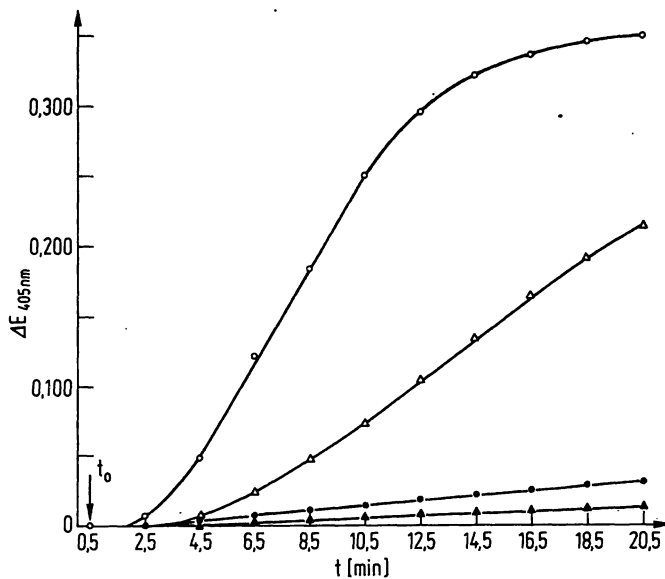


Abb. 3. Reaktionsablauf bei 30 und 37 °C
 Arbeitsweise: $t_0 = 30$ s
 $\Delta t = 2$ min
 Print = 10/all
 Wellenlänge 405 nm
 Ansätze: Reagenz gegen dest. Wasser bei 30 (▲—▲) und 37 °C (●—●)
 Precilip gegen Reagenzleerwert bei 30 (△—△) und bei 37 °C (○—○)

Tab. 2. Linearität der Methode

| Preciset Cholesterin | | Precilip (Lyophilisat) | |
|----------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|
| Sollwert [mmol/l] | Centrifichem [mmol/l] | Sollwert [mmol/l] | Centrifichem [mmol/l] |
| 1,29 | 1,40 | 3,49* | 3,47 |
| 2,59 | 2,72 | 5,24** | 5,17 |
| 5,17 | 5,20 | 10,47*** | 10,53 |
| 7,76 | 7,63 | | |
| 10,35 | 10,40 | | |

* Precilip, aufgelöst in 3,0 ml bidest. Wasser
 ** Precilip, aufgelöst in 2,0 ml bidest. Wasser
 *** Precilip, aufgelöst in 1,0 ml bidest. Wasser

Wie die Werte von Tabelle 2 zeigen, liefert die von uns beschriebene Methode sowohl für das freie, wie auch für das veresterte Cholesterin zwischen 0 und 10,35 mmol/l korrekte Resultate. Testlösungen von Cholesterin in Eisessig sind für die vollenzymatische Methode nicht geeignet, da Cholesterinacetat entsteht, das von der Chol-

Tab. 4. Wiederfindung

| Testansatz | Zugesetztes freies Cholesterin [mmol/l] | Zugesetztes Gesamtcholesterin frei u. verestert [mmol/l] | Cholesterin Konzentration | | |
|------------|---|--|---------------------------|-------------------|-------------------|
| | | | Sollwert [mmol/l] | Gefunden [mmol/l] | Wiederfindung [%] |
| I | 2,586 | — | 6,078 | 6,052–6,155 | 99,6–101,3 |
| II | 5,172 | — | 6,664 | 8,560–8,664 | 98,8–100,0 |
| III | — | 1,748 | 5,240 | 5,276–5,379 | 100,7–102,7 |
| IV | — | 5,250 | 8,741 | 8,690–8,716 | 99,4–99,7 |

esterinesterase nur sehr langsam gespalten wird und sich dadurch der Nachweisreaktion entzieht (6).

Auch das Standardserum "Scale II" von Nyegaard & Co. AS. Oslo ist für das vollenzymatische automatisierte Verfahren ungeeignet. Andere Möglichkeiten zur Herstellung von brauchbaren Cholesterin-Testlösungen in Äthanol/Dioxan (0,9 : 1,1) und in Oxypolyaethoxydodecan (Pistocain) wurden beschrieben (1, 15).

Präzision

Die Präzision der Methode wurde im Lauf, von Lauf zu Lauf und von Tag zu Tag mit Seren verschiedener Cholesterinkonzentration sowie mit wäßrigen Cholesterinlösungen geprüft und mit derjenigen der Handmethode (5) verglichen.

Tabelle 3 zeigt, daß die Variationskoeffizienten im Lauf zwischen 0,8–1,0 %, von Lauf zu Lauf zwischen 1,1–1,8 %, von Tag zu Tag zwischen 2,0–3,2 % liegen.

Auch die Übereinstimmung der Resultate von Doppelbestimmungen ist bei der Centrifichem-Methode als sehr gut zu bezeichnen, sie ist wesentlich besser als bei der vollenzymatischen Handmethode (5).

Wiederfindung

Es wurden Wiederfindungsversuche sowohl durch Zugabe von wäßrigen Cholesterinlösungen wie auch durch Zugabe von Mischserum zu Precilip (lyophilisiert) durchgeführt. Diese Versuche bestätigen die Wirksamkeit der Cholesterinesterase und Cholesterinoxidase. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 zusammengefaßt.

Tab. 3. Präzision der Methode

| Präzision | Proben | N | \bar{x} [mmol/l] | VK [%] | s [mmol/l] |
|------------------|-------------------------|----|--------------------|--------|------------|
| | | | | | |
| | Preciset 10,35 [mmol/l] | 22 | 10,32 | 1,0 | 0,21 |
| von Lauf zu Lauf | Mischserum 4 | 58 | 5,04 | 1,8 | 0,18 |
| | Preciset 10,35 [mmol/l] | 22 | 10,29 | 1,1 | 0,24 |
| von Tag zu Tag | Mischserum 5 | 36 | 5,25 | 3,2 | 0,34 |
| | Monitrol II | 28 | 2,64 | 2,1 | 0,11 |
| | Liponorm | 68 | 6,03 | 2,0 | 0,25 |

Korrelation

Wie aus den Abbildungen 4, 5 und 6 ersichtlich, ist der Grad des Zusammenhanges ($S_{y,x}$ und r) zwischen der vollenzymatischen Handmethode und der mit dem

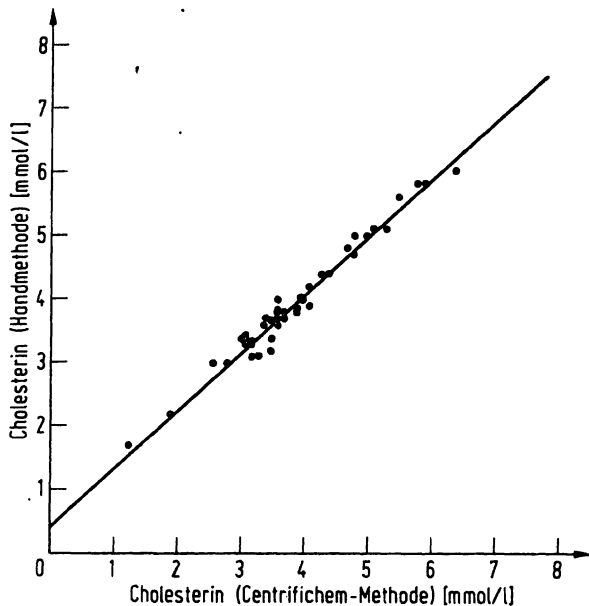


Abb. 4. Korrelation zwischen der Cholesterinbestimmung mit der Centrifichem-Methode und der Handmethode (5).

Regressionsgerade: $y = 0,910 x + 0,409$
 Korrelationskoeffizient: $r = 0,986$
 Standardabweichung von y für ein gegebenes x :
 $S_{y,x} = 0,151$
 Anzahl der Wertepaare: $N = 42$

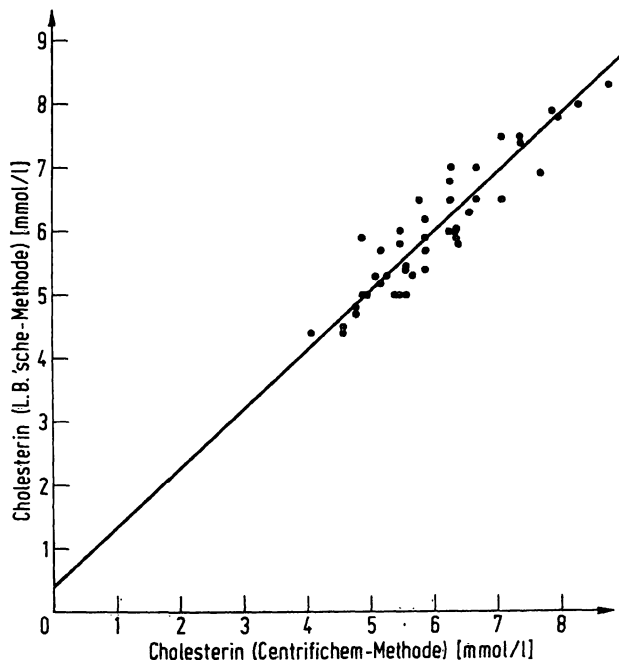


Abb. 5. Korrelation zwischen der Cholesterinbestimmung mit der Centrifichem-Methode und der *Liebermann-Burchard*'schen Methode (mit Autoanalyzer und vorheriger Extraktion mit Isopropanol).

Regressionsgerade: $y = 0,932 x + 0,416$
 Korrelationskoeffizient: $r = 0,936$
 Standardabweichung von y für ein gegebenes x :
 $S_{y,x} = 0,367$
 Anzahl der Wertepaare: $N = 45$

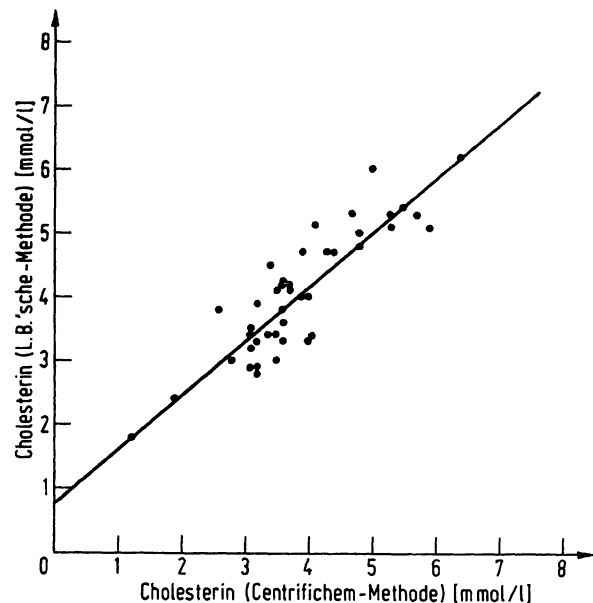


Abb. 6. Korrelation zwischen der Cholesterinbestimmung mit der Centrifichem-Methode und der *Liebermann-Burchard*'schen Methode (Direktmethode, ohne Extraktion).

Regressionsgerade: $y = 0,851 x + 0,747$
 Korrelationskoeffizient: $r = 0,878$
 Standardabweichung von y für ein gegebenes x :
 $S_{y,x} = 0,462$
 Anzahl der Wertepaare: $N = 42$

Centrifichem automatisierten vollenzymatischen Methode am engsten. Hingegen ist die Standardabweichung etwa doppelt so groß beim Vergleich der vollenzymatischen Centrifichem-Methode mit dem *Liebermann-Burchard*'schen Prinzip nach vorheriger Extraktion des Cholesterins mit Isopropanol.

Die Standardabweichung ist etwa dreimal größer, wenn die Centrifichem-Methode mit dem *Liebermann-Burchard*'schen Verfahren ohne Extraktion verglichen wird. Diese Differenzen sind auf die geringere Cholesterin-Spezifität der *Liebermann-Burchard*'schen Methode bzw. auf deren Beeinflussung durch andere Serumbestandteile zurückzuführen, die bei der direkten Ausführung ohne Extraktion am stärksten ist.

Diskussion

Obwohl die vollenzymatischen Methoden nicht absolut cholesterinspezifisch sind (1), interferieren die übrigen im Serum vorhandenen Steroide nur unwesentlich, da sie im Vergleich zum Cholesterin nur in sehr geringen Konzentrationen vorliegen. Die Spezifität ist indessen viel höher als bei der *Liebermann-Burchard*'schen Methode (1).

Unsere Versuche haben im Unterschied zu den Feststellungen anderer Autoren (14) ergeben, daß die Probenleerwerte bei lipämischen Seren unter den beschriebenen Versuchsbedingungen, ohne Cholesterinesterase-Zusatz keine nennenswerte Extinktionsabnahme zeigen. Nur auf Zugabe von Cholesterinesterase erfolgt eine Klärung, das heißt eine Extinktionsabnahme der Proben,

die bei mäßig starken Trübungen nach 60 Sekunden abgeschlossen ist.

Bei sehr stark lipämischen (crémartigen) Proben ist die enzymatische Cholesterinbestimmung auch bei der Handmethode (5) problematisch. Was die Präzision anbetrifft, so ist dieselbe bei der mit dem Centrifichem automatisierten Methode wesentlich besser als bei der Handmethode

(5). Dies hängt damit zusammen, daß beim automatisierten Verfahren kein separat anzusetzender Probenleerwert mitgeführt werden muß.

Selbstverständlich bietet die automatisierte Methode auch die Möglichkeit, das freie Serumcholesterin zu bestimmen, indem die Probe ohne Zugabe von Cholesterinesterase angesetzt wird.

Literatur

1. Flegg, H. M., (1973). *Ann. Clin. Biochem.* 10, 79–84.
2. Richmond, W., (1972). *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 29, Suppl. 126.
3. Richmond, W., (1973). *Clin. Chem.* 19, 1350–1356.
4. Röschlau, P., Bernt, E. & Gruber, W., (1974). *Methoden der enzymatischen Analyse* (H.-U. Bergmeyer ed) 3. Aufl. Bd. 2, S. 1938–1941. Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr.
5. Röschlau, P., Bernt, E. & Gruber, W., (1974). *diese Z.* 12, 403–407.
6. Klein, B. & Leinman, N. B., (1974). *Clin. Chem.* 20, 90–91.
7. Tarbutton, P. N., (1974). *Clin. Chem.* 20, 724–725.
8. Liebermann, C., (1885). *Ber.* 18, 1803–1809.
9. Burchard, H., (1889). *Dissertation*, Rostock (zit. nach l.c. (2)).
10. Zlatkis, A., Zak, B. & Boyle, A. J., (1953). *J. Lab. Clin. Med.* 41, 486–492.
11. Watson, D., (1960). *Clin. Chim. Acta* 5, 637–643.
12. Okey, R., (1930). *J. Biol. Chem.* 88, 367–369.
13. Henry, R. J., (1974). *Clinical Chemistry, Principles & Techniques* Sec. Ed. 1431. Harper & Row, New York.
14. Ziegenhorn, J., (1974). *Abstract, Meeting of the European Society of Medical Users of GEMSAEC*, Düsseldorf.
15. Vass, J., (1974). *Ärztli. Lab.* 5, 148.

Dr. Margarethe Knob
Kantonsspital
CH 8006 Zürich
Rämistr. 100