

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.  
Vol. 16, 1978, pp. 235-238

## Die Bestimmung von Glucose im Kapillarblut mit dem automatic clinical analyzer (aca) Dupont

Von G. Heinemann

Institut für Klinische Chemie, (Vorstand: Prof. Dr. med. H. Schivelbein), Deutsches Herzzentrum München

(Eingegangen am 21. September/7. November 1977)

**Zusammenfassung:** Es wird die Bestimmung von Glucose im Kapillarblut nach Enteiweißung auf dem aca beschrieben. Das Verfahren, dem die Hexokinase/Glucose-6-phosphatdehydrogenase-Reaktion zugrundeliegt, wird mit der Glucosedehydrogenase-Methode verglichen. Die Untersuchung zeigt, daß die mit beiden Methoden ermittelten Glucosewerte im Kapillarblut sehr gut übereinstimmen. Die Kriterien der Zuverlässigkeit werden von diesem Verfahren erfüllt, so daß seine Anwendung für Einzelanalysen empfohlen werden kann. Die Bestimmung wird durch Hyperhämolyse, Hypc. bilirubinämie und Hypertriglyceridämie nicht beeinträchtigt.

### *The determination of capillary blood glucose using the automatic clinical analyzer (aca) Dupont*

**Summary:** The determination of capillary blood glucose after deproteinization using the aca is described. The method, which uses the hexokinase/glucose-6-phosphate dehydrogenase reaction, is compared with the glucose dehydrogenase method. The comparison shows that glucose values measured in capillary blood are essentially the same in both methods. The requirements for quality control are fulfilled. The method is not influenced by hemolysis, bilirubinemia, and hypertriglyceridemia.

### Einleitung

Die Bestimmung der Glucose mit dem aca ist bislang lediglich für Serum, Harn und Liquor beschrieben (1). Bei diesen Bestimmungen können jedoch Hyperhämolyse und/oder -bilirubinämie zu falsch negativen Ergebnissen führen (2, 3).

Wir stellten uns die Aufgabe, die Bestimmung der Glucose im Kapillarblut nach Enteiweißung auch auf dem aca zu ermöglichen. Folgende Gründe veranlaßten uns zu diesem Vorgehen:

1. Für Blut-Glucosebestimmungen ist die Kapillarblut-Entnahme die Methode der Wahl,
2. Glucosebestimmungen im Liquor sind in unserer Klinik sehr selten und für Harnzucker-Bestimmungen besteht keine Vordringlichkeit einer schnellen Befundermittlung,
3. die in unserer Klinik häufigen Glucosebestimmungen als Notfall- und damit Einzelanalysen.

Nach Möglichkeit sollten bei der von uns angestrebten Modifikation die oben erwähnten Nachteile behoben werden.

Die Zuverlässigkeit des neuen Verfahrens und seine Korrelation zu einer anderen spezifischen Methode sollten geprüft werden.

### Material und Methoden

#### Reagenzien

1. Triethanolamin-Hydrochlorid (Boehringer Mannheim), Nr. 127426.
2. Perchlorsäure/Perchloratlösung (Merck), Enteiweißungsmittel für die Glucosebestimmung mit Glucosedehydrogenase, Nr. 9431.
3. Testpackung „Merckotest Glucose“ (Glucosedehydrogenase-Methode) UV-Test.
4. Glucose-Standardlösungen (Merck), Nr. 9423.
5. Kontrollseren  
Bilirubin Control, lyophilisiertes Bilirubin-Kontrollserum (Merz- u. Dade); Elevated Chemistry Control, lyophilisiertes Kontrollserum (du Pont de Nemours and Co); Precinorm S, flüssiges Kontrollserum (Boehringer Mannheim)

#### Geräte

1. aca (automatic clinical analyzer), Fa. du Pont de Nemours and Co., Wilmington, Del 19898
2. Eppendorf Substratmeßplatz
3. Eppendorf Mikrolitersystem
4. 2 Eppendorf Probe-Reagenz-Dosierer Nr. 5231
5. EDTA-diKalium + Natriumjodacetat-Blutzuckerrührchen 113 ENJ, Fa. Greiner
6. Accupetten (Einmalkapillarpipetten) 100 µl, Fa. Merz u. Dade
7. pH-Meter 801, Fa. Orion Research

#### Lösungen

1. Triethanolamin-Hydrochlorid-Puffer 0,1 mol/l, pH 7,8. Es wird eine wäßrige Puffer-Stammlösung, 1 mol/l hergestellt, die je nach Bedarf 1 : 10 mit bidest. Wasser weiterverdünnt und mit 10 mol/l NaOH auf pH 7,8 eingestellt wird.

## 2. Herstellung der Lösungen für „Merckotest Glucose“ laut Testvorschrift.

### Bestimmungsmaterial und Untersuchungsgang

Für die Glucosebestimmung wird Kapillarblut verwendet. Dazu wird die Accupette über die 100 µl-Ringmarkierung hinaus bis zum blauen Farbring mit Blut gefüllt und anschließend sofort in ein Blutzuckerröhrchen entleert, so daß sich etwa 140 µl Blut auf dem Boden des Röhrchens befinden. Das Röhrchen wird leicht schräg gehalten und mehrfach gedreht, um das Blut mit dem Gerinnungs- und Glykolysehemmer zu vermischen. Danach werden mit einem Probe-Reagenz-Dosierer 0,05 ml Blut entnommen und mit 0,5 ml Perchlorsäure/Perchloratlösung zur Enteiweißung versetzt, kurz geschüttelt, 2 min bei etwa 10.000 g zentrifugiert und der eiweißfreie Überstand zur Bestimmung eingesetzt. Um den Einfluß von Hämolyse und Hyperbilirubinämie auf die modifizierte Methode zu prüfen, wurden Hämolsat und Bilirubin in steigenden Konzentrationen verschiedenen Seren zugesetzt. Für den Bilirubinzusatz benutzen wir Bilirubin-Control (Merz u. Dade).

### Bestimmung auf dem Substratmeßplatz

0,05 ml Überstand werden mit Hilfe eines Probe-Reagenz-Dosierers mit 0,5 ml Reagenzlösung des Merckotests Glucose versetzt und 15 min bei 25°C inkubiert. Dabei wird β-D-Glucose durch Glucosedehydrogenase zu Gluconsäurelacton dehydriert und NAD zu NADH reduziert (4). Anschließend wird die Absorption der Probe gegen einen Reagenzienleerwert bei 334 nm gemessen.

### Bestimmung auf dem aca

#### aca-Originalmethode

Die aca-Glucosemethode ist eine Adaptation der Hexokinase-Glucose-6-phosphatdehydrogenase-Methode, die zuerst von Schmidt (5) publiziert wurde, mit NADP anstelle von NAD als Coenzym. Die Reagenzien befinden sich in Einmal-Testpackungen in trockener Form und in verschiedenen Kompartimenten. Im Gerät werden dann 0,040 ml Probe (Serum, Harn, Liquor) mit 4,96 ml bidest. Wasser verdünnt und in eine Reagenz-Testpackung injiziert. Nach einer Inkubation der Testpackung von 6 min bei 37°C wird die Absorption bei zwei Wellenlängen (340 und 385 nm) gemessen und die Differenz zur Berechnung der Glucosekonzentration benutzt.

#### Modifizierte aca-Methode

Der stark saure Enteiweißungs-Überstand wurde durch Zusatz eines geeigneten Puffers in einen schwach alkalischen Bereich übergeführt und die bei der Enteiweißung entstehende Probenverdünnung ausgeglichen.

1. Auf dem freien Pufferplatz Nr. 6 wurde ein Kanister mit Triethanolamin-Hydrochlorid 0,1 mol/l, pH 7,8 angeschlossen,
2. die Zufuhr des Puffers zur Probenverdünnung wurde von Pufferplatz Nr. 1 auf Platz Nr. 6 umprogrammiert,
3. das Probe-Ansaugvolumen auf Kanal 1 wurde von 0,040 ml auf 0,240 ml erhöht und damit die Puffermenge auf 4,76 ml vermindert,
4. der vorläufige Skalenfaktor wurde mit 2 multipliziert und eingegeben,
5. der vorläufige Startpunkt wurde zunächst beibehalten.

Die unter Punkt 3 und 4 angeführten Maßnahmen gleichen die Verdünnung durch die Enteiweißung aus.

Für die Kalibrierung des aca wurde Vollblut mit niedriger (etwa 2,5 mmol/l), mittlerer (etwa 13–17 mmol/l) und hoher (24–27 mmol/l) Glucosekonzentration in genügender Menge enteiweißt, so daß aus den drei enteiweißten Überständen Dreifach-Bestimmungen sowohl auf dem aca wie auch auf dem Substratmeßplatz möglich waren. Die Mittelwerte wurden zur Berechnung des endgültigen Startpunktes und Skalenfaktors benutzt. Nach dieser Kalibrierung haben wir im unverdünnten Kontrollserum Elevated Chemical Control und in einer 1 : 2 und 1 : 10 Verdünnung die Glucosekonzentrationen mehrfach bestimmt. Die Meßwerte der Kontrollseren gleicher Charge können dann in Zukunft anstelle von Blut als Sollwerte zur Kalibrierung verwendet werden.

## Ergebnisse

### Konzentration und pH-Wert des Puffers

In Vorversuchen konnte für eine ausreichende Pufferung des enteiweißten Überstandes 0,1 mol/l Triethanolamin-Hydrochlorid ermittelt werden. Der pH-Wert des Puffers von 7,8 wurde gewählt, da er dem pH des Probe-Reagenzgemisches in der aca-Testpackung bei Verwendung von Serum entsprach; denn auch bei pH-Werten des Puffers zwischen 7,6 und 8,1 war eine Beeinträchtigung der Reaktion nicht festzustellen.

### Linearität

Die Linearität wurde mit wäßrigen Glucose-Standardlösungen (Glucose-Konzentration 1,38; 2,77; 5,55; 11,10; 16,65; 27,75 mmol/l) überprüft. Die wäßrigen Standards wurden gleichfalls mit Perchlorsäure/Perchlorat im Verhältnis 1 : 11 verdünnt. Linearität ergab sich über den gesamten Bereich von 0–27,75 mmol/l Glucose (Abb. 1). Die Punkte der Geraden entsprechen Mittelwerten aus Doppelbestimmungen.

### Präzision in der Serie

Es wird die Repetierbarkeit der Methode durch Glucosebestimmungen in je 20 enteiweißten Überständen mit niedriger und erhöhter Glucose-Konzentration überprüft. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 dargestellt.

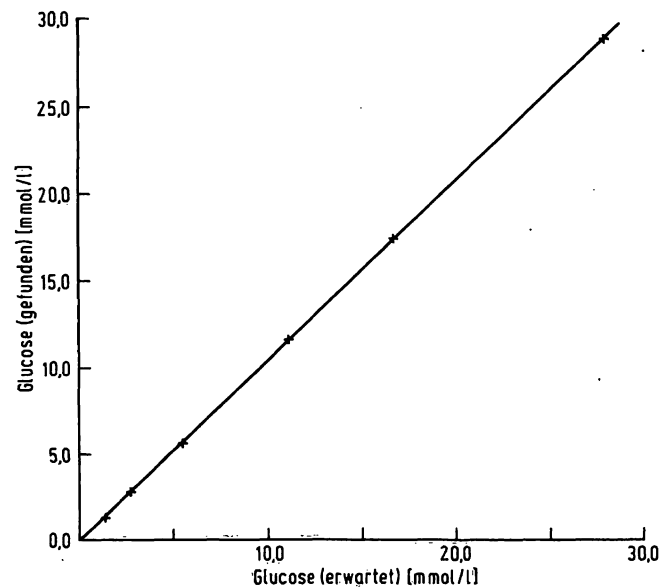


Abb. 1. Darstellung des Linearitätsbereichs bis 27,75 mmol/l Glucose. Sollwerte der Standardlösungen (x), aca-Meßwerte (y). Gerade:  $y = 1,04x - 0,06$ ,  $r = 0,99$ .

Tab. 1. Repetierbarkeit der Glucosebestimmung in Kapillarblut nach Enteiweißung mit niedriger und erhöhter Glucose-Konzentration

n	Mittelwert $\bar{x}$ mmol/l	$\pm s$ mmol/l	Konzentration mmol/l		VK %
			höchste	niedrigste	
20	2,15	0,07	2,30	2,05	3,41
20	16,34	0,28	17,00	15,81	1,73

### Präzision von Tag zu Tag

Die Präzision von Tag zu Tag wurde an 23 Tagen mit Precinorm S geprüft und erbrachte bei einer Glucose-Konzentration von  $\bar{x} = 5,58$  mmol/l einen Variationskoeffizienten (VK%) von 2,93.

### Richtigkeit

Zur Prüfung der Richtigkeit führten wir Vergleichsversuche durch. Die Glucose-Konzentrationen der entweißten Überstände wurden sowohl auf dem aca wie auch mit der Glucosedehydrogenase-Methode auf einem Eppendorf Substratmeßplatz als Doppelbestimmung ermittelt. Wie Abbildung 2 zeigt, fanden sich mit beiden Methoden sehr gut übereinstimmende Werte. Der Korrelationskoeffizient für  $N = 52$  betrug  $r = 0,9997$ , die Regressionsgerade  $y = 0,9953x + 0,0062$  und die Streuung  $s_{y,x} = \pm 0,636$  mmol/l.

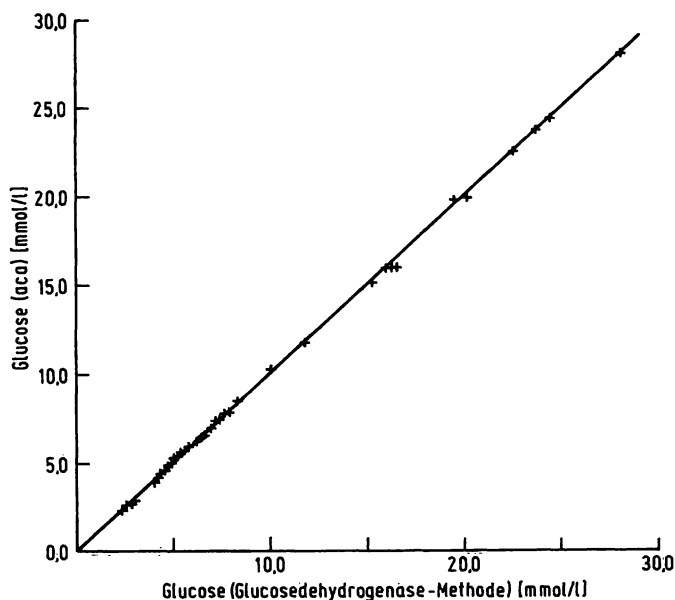


Abb. 2. Vergleich zwischen der für den aca entwickelten Methode und der Glucose-Dehydrogenase-UV-Methode.

### Interferenzen

Beim aca-Originalverfahren zur Bestimmung der Glucose in Serum interferieren Hyperhämolyse und/oder -bilirubinämie je nach Schweregrad.

In den Kliniken des Deutschen Herzzentrums München fallen gehäuft hämolytische und ikterische Blutproben an (Einsatz von Herz-Lungenmaschine, Herzklappenambulanz). Wir haben daher die beschriebene Bestimmung anhand von hämolytischen und ikterischen Blutproben überprüft. Wir fanden keinerlei Störung, auch nicht bei sehr hohen Bilirubin- und Hämoglobinkonzentrationen im Plasma (Tab. 2). Eine Vermehrung von prä- $\beta$ -Lipoproteinen stört die Bestimmungen ebenfalls nicht, da sie bei der Entweißung präzipitieren.

Tab. 2. Vergleich von Glucose-Konzentrationen im Serum vor (a) und nach (b) Zusatz von Hämolytat bzw. Bilirubin

Hämoglobin im Serum (g/l)	Glucose im Serum (mmol/l)		Bilirubin im Serum ( $\mu$ mol/l)	Glucose im Serum (mmol/l)	
	a	b		a	b
0,7	7,19	7,14	63	4,83	4,86
1,4	7,17	7,23	91	4,06	4,03
2,8	7,02	7,05	176	2,60	2,61
4,2	7,06	7,00	206	4,98	4,99
			259	5,11	5,15
14,0	6,59	6,64	307	5,21	5,22
18,0	6,06	5,99			
140,0	28,06	27,88			

Der in der Kardiologie zur Messung der Herz-Kreislaufzeit verwendete Farbstoff Indozyanin-Grün stört wegen seiner geringen Konzentration im Blut die Bestimmung ebenfalls nicht.

### Normbereich

Die durch die Kalibrierung des aca erzielte Übereinstimmung der Meßwerte beider Methoden gestattet es, den für die Glucosedehydrogenase-Methode ermittelten Bereich von 2,77–5,55 mmol/l (4) Glucose für Kapillarblut zu verwenden.

### Diskussion

Beim Vergleich der Zuverlässigkeitskriterien zeigen die Ergebnisse der Modifikation und diejenigen der aca-Originalmethode (6) wie auch die der Glucosedehydrogenase-Methode (4) eine gute Übereinstimmung. Das Ergebnis des Methodenvergleichs in Abbildung 2 verdeutlicht die Richtigkeit im Bereich bis 27,75 mmol/l. Die nun ermöglichte Glucosebestimmung im Kapillarblut auf dem aca kommt damit auch den erneuten Empfehlungen der Deutschen Diabetesgesellschaft entgegen, Kapillarblut zur Diabetesdiagnostik zu verwenden (7).

Als wesentliche Bereicherung der Modifikation gegenüber der aca-Originalmethode betrachten wir, zumindest für unseren Bereich, die durch die Entweißung wieder-gewonnene Unempfindlichkeit der Methode gegenüber Hyperhämolyse und Hyperbilirubinämien. Weiterhin bleibt auch der dem Pflegepersonal vertraute Vorgang der Kapillarblutentnahme und die Handhabung des Zuckerröhrchens gleich. Die Frage des Normbereichs wird nicht berührt, da keine Änderung eintritt.

Die beschriebene Modifikation wird seit einigen Monaten in unserem Zentrallabor verwendet. Sie hat sich bewährt und wird bei Notfall-Untersuchungen durchgeführt; bei Serienmessungen bevorzugen wir aus ökonomischen Gründen den Substratmeßplatz.

**Literatur**

1. Test Methodology Glucose in Chemistry Instruction Manual, du Pont Corp., Wilmington, Del. 19898, (1975),
2. Gochman, N., Ryan, W. T., Sterling, R. E. & Widdowson, G. M. (1975), *Clin. Chem.* 21, 356–361.
3. Carey, R. N., Feldbruegge, D. & Westgard, O. (1974), *Clin. Chem.* 20, 595–602.
4. Banauch, D., Brümmer, W., Ebeling, W., Metz, H., Rindfrey, H., Lang, H., Leybold, K. & Rick, W. (1975), *diese Z.* 13, 101–107.
5. Schmidt, F. H. (1961), *Klin. Wochenschr.* 39, 1244–1247.
6. Westgard, J. O. & Lahmeyer, B. L. (1972), *Clin. Chem.* 18, 340–348.
7. Jahrestagung der Deutschen Diabetesgesellschaft, Bad Homburg (1977).

Dr. G. Heinemann  
Institut für Klinische Chemie  
Deutsches Herzzentrum München  
Lothstr. 11  
8000 München 2