

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.  
Vol. 18, 1980, pp. 275-278

## Kinetische Glucosebestimmung nach der Glucosedehydrogenase-Methode mit dem Analysenautomaten ACP 5040 (Eppendorf)

Von A. Bruckner

Zentrallaboratorium (Chefarzt Dr. med. W. Fritzsche) des Städtischen Krankenhauses Frankfurt/M.-Höchst

(Eingegangen am 10. Oktober 1979/2. Januar 1980)

**Zusammenfassung:** Es wird eine reaktionskinetische Glucosebestimmung in Blut, Urin und Liquor mit Hilfe des neuen Eppendorf Analysenautomaten ACP 5040 beschrieben. Dabei entsteht aus Glucose mittels Glucosedehydrogenase Gluconsäure,  $\text{NAD}^+$  wird zu  $\text{NADH}$  reduziert. Die von uns ausgearbeitete Bestimmungsvariante zeichnet sich durch gute Präzision, Richtigkeit und Durchsatzgeschwindigkeit aus. Die Korrelation mit der Hexokinase/Glucose-6-phosphatdehydrogenase-Endpunktmethode ist gut.

*The kinetic determination of glucose with the glucose dehydrogenase method using the Eppendorf automatic analyzer 5040*

**Summary:** A kinetic determination of glucose from blood, urine and spinal fluid is described with use of the new automatic analyzer ACP 5040 Eppendorf. The method uses glucose-dehydrogenase which converts glucose to gluconic acid. The  $\text{NADH}$  formed can be measured by the increase in absorbance at 334 nm. Our variation of test methodology gives good precision, accuracy and a high performance speed. There is a good correlation with the hexokinase-glucose-6-phosphate-dehydrogenase end point method.

### Einführung

Die Glucosebestimmung ist nach wie vor eine der häufigsten Bestimmungen im klinisch-chemischen Laboratorium. Wir beschreiben in dieser Arbeit eine, unseres Wissens erste, Methodenadaptation an den ACP 5040. Die Methode zeichnet sich durch Wirtschaftlichkeit und hohe Präzision aus. Um einen besseren Vergleich mit der Hexokinase-Methode zu erzielen, haben wir die Untersuchungen aus Perchlorsäure-Überstand durchgeführt. Die für die Bestimmung verwendete Glucosedehydrogenase (EC 1.1.1.47) erfüllt chemische Prinzipien für die kinetische Substratbestimmung im „pseudo-kinetischen“ Verfahren. Das Enzym besitzt eine sehr lange Stabilität, auch bei Raumtemperatur. Thiolgruppenoxidierende Stoffe können das Enzym nicht hemmen, da es keine SH-Gruppen besitzt; Schwermetalle und Chelatbildner inhibieren es ebenfalls nicht (1). Das Enzym besitzt einen  $K_m$ -Wert für Glucose von  $10^{-2}$  mol/l (pH 8) und einen  $K_m$ -Wert für  $\text{NAD}^+$  von  $1,6 \times 10^{-3}$  mol/l (pH 8). Damit ist die theoretische Voraussetzung, daß  $[S] \ll K_m$  ist, auch bei einer Glucose-

konzentration von 55,5 mmol/l noch gegeben. So ist die Gleichung

$$v = -\frac{d[S]}{dt} = \frac{V}{K_m} \times [S] = k' \times [S]$$

bei unten beschriebenen Probe-Reagenz-Verhältnissen erfüllt, da der Wert von  $[S]/K_m$  kleiner als 0,05 ist; d.h.  $v$  ist mit  $[S]$  linear proportional (2, 3).

### Material und Methoden

#### Reagenzien

1. Pufferlösung Art. Nr. 14051, Fläschchen Enzymgemisch (enthält Glucosedehydrogenase und Mutarotase), Fläschchen Coenzym ( $\text{NAD}^+$ ), beide aus System Glucose, Glucosedehydrogenase-Methode, UV-Test Art. Nr. 14055, Glucose-Standardlösung von 2,78 bis 27,75 mmol/l Art. Nr. 9423/1-5,  $D(+)$ Glucose wasserfrei, für biochemische Zwecke Art. Nr. 8337, Benzoesäure p.a. Art. Nr. 136 von E. Merck AG (Darmstadt).
2. Perchlorsäure etwa 0,33 mol/l Art. Nr. 125369, Test-Combination, Glucose, Hexokinase-Methode, UV-Test Art. Nr.

124346, Kontrollseren: Precipath U Chargen-Nr. 701 und Precinorm UPX Chargen-Nr. 704 von Boehringer Mannheim.

3. Flüssiges Kontrollserum Fluinorm N Chargen-Nr. 1601 E von Behringwerke AG (Marburg).

#### Lösungen

1. Enteiweißungsmittel (gleich für beide Methoden): 0,33 mol/l Perchlorsäure.

#### Glucosedehydrogenase-Methode

2. Reaktionslösung: zwei Fläschchen Enzymgemisch in 1 l Puffer lösen. Konzentrationen in der Reaktionslösung: 0,12 mol/l Phosphatpuffer pH 7,6; 0,15 mol/l Natriumchlorid; 5,2 kU/l Glucosedehydrogenase; 110 U/l Mutarotase (EC 5.1.3.3). Haltbarkeit bei Raumtemperatur mindestens zwei Monate, bei +4 °C mindestens fünf Monate.
3. Startreagenz: eine Flasche Coenzym in 100 ml Puffer lösen. Konzentration im Startreagenz: 5,5 mmol/l NAD<sup>+</sup>. Haltbarkeit wie bei der Reaktionslösung.

#### Hexokinase/Glucose-6-phosphatdehydrogenase-Methode

4. Vorbereitung der Lösungen 1 bis 4 aus Test-Combination, nach Angaben des Herstellers lt. Begleitzettel. Haltbarkeit siehe Begleitzettel.
5. Herstellung des Reaktionsgemisches: In Puffer, der mit 100 ml dest. Wasser verdünnt ist, wie folgt pipettieren: 8 ml Lösung 2 (NADP<sup>+</sup>); 8 ml Lösung 3 (ATP); 2 ml unverdünnte Lösung 4 (Hexokinase EC 2.7.1.1 und Glucose-6-phosphatdehydrogenase EC 1.1.1.49). Haltbarkeit des Reaktionsgemisches bei +4 °C mindestens 1 Tag, bei Raumtemperatur etwa 7 Stunden. Konzentration des Reaktionsgemisches: 300 mmol/l Triethanolaminpuffer pH 7,5; 4 mmol/l MgSO<sub>4</sub>; 0,32 mmol/l NADP<sup>+</sup>; 0,4 mmol/l ATP; ≥ 1,15 kU/l Hexokinase; ≥ 1,15 kU/l Glucose-6-phosphatdehydrogenase.
6. Glucose-Standardlösungen in den Konzentrationen 33,3; 38,85; 44,4; 49,95 und 55,5 mmol/l sind durch Auswiegen aus wasserfreier Glucose in kalt gesättigter Benzoesäure-Lösung hergestellt.
7. Glucose-Standardlösungen in den übrigen Konzentrationen stammten von E. Merck (siehe Reagenzien) oder sind durch Zusammenmischen oder Verdünnen mit Benzoesäure-Lösung vorbereitet. Die Haltbarkeit aller Standardlösungen bei Raumtemperatur ist praktisch unbegrenzt.
8. Glucose-Standardlösung für ACP 5040: Zu 250 ml 0,33 mol/l Perchlorsäure gibt man 10 ml 11,1 mmol/l Glucoselösung. Die Glucosekonzentration der Lösung ist 426,9 µmol/l. Dieser Standard wird für geräteinterne Faktor-Ermittlung *unverdünnt* verwendet. Im Kühlschrank aufbewahren.

#### Materialien

1. Glaskapillaren Blaubrand intraEND (20 µl) kauften wir von der Fa. Brand (Wertheim).
2. Die verschließbaren Reaktionsgefäße 3810 stammten von der Fa. Eppendorf.
3. Die Lanzetten sind Erzeugnisse der Fa. Feather aus Japan.

#### Geräte

1. Eppendorf Gerätebau (Hamburg): Analysenautomat ACP 5040, Endpunktautomat 5030, Kettenmischer 5431, Zentrifuge 5411, Zentrifuge 3200, Reagenz-Dosierer 5210, Mikroliterpipetten (Eppendorf).
2. Diehl Datensysteme GmbH (Nürnberg): für statistische Rechnungen: Alphatronic mit Magnetbandstation und Programm-Paket „Statistik I“.

#### Probengewinnung

Die Blutentnahme erfolgte mit 20 µl Glaskapillaren, die sofort in 500 µl Perchlorsäure hineingebracht und gut durchgeschüttelt wurden. Im Labor wurden die Gefäße in Probenketten sortiert, nochmals mit dem Kettenmischer geschüttelt, anschließend in der Kettenzentrifuge zentrifugiert. Plasma, Serum, Vollblut, Liquor und Urin (bis zu einer Glucosekonzentration von 55,5 mmol/l für Glucosedehydrogenase-Methode ohne Verdünnung) können ebenfalls verwendet werden.

#### Einstellung des ACP 5040

Beim ACP 5040 wird die Kinetik aus vier Meßpunkten ermittelt, wobei die Meßpunkte, abhängig vom Takt des Gerätes, aus mehreren, in 80 ms Abstand festgestellten Einzelmessungen gebildet worden sind. Bei Taktzeit 12 s bedeutet das 21 Einzelmessungen pro Meßpunkt (84 Einzelmessungen).

Der ACP 5040 ist wie folgt programmiert:

Name: Gluc; Einheit: mmol/l (mg/dl); Temperatur: 37 °C; Takt: 12 s; Wellenlänge: Hg 334 nm; Abgleich E: 0,0; Standard: 11,1 mmol/l (200 mg/dl); Rotordrehung: 1; Spülposition: 19; Startposition: 1; Volumenposition 1: 250 µl (Reaktionslösung); Volumenposition 2: 50 µl (enteiweißter Überstand); Volumenposition 5: 50 µl (Startreagenz).

#### Kalibrierung des ACP 5040

Bei der kinetischen Substratbestimmung muß man mit einem Standard arbeiten. Dazu wird bei der Programmierung der Methode der numerische Wert des Standards eingegeben. In 3–5 speziellen Kettengliedern (Farbe violett) werden die Standards (Lösung 8) vor die Serie plaziert. Die speziellen violetten Kettenglieder übertragen den Impuls = Standard an das Gerät. Das Gerät mißt bei diesen Proben die für jedes Kettenglied dazugehörenden  $\Delta A/\text{min}$ . Daraus wird ein Mittelwert gebildet, die Werte auf  $\pm 5\%$  Abweichung überprüft und aufgrund der eingespeicherten Standardkonzentration ein interner Faktor ermittelt. Damit werden dann alle weiteren Proben-Absorptionen multipliziert.

#### Ergebnisse

##### Linearität, Präzision und Richtigkeit

Die Linearität wurde mit Primärstandard von 0,555 bis 55,5 mmol/l überprüft. Die Messungen zeigten eine gute Linearität im ganzen Bereich.  $N = 15$ ;  $y = 0,1306 + 0,9861x$ ;  $r = 0,9999$ ;  $\bar{x} = 20,89$ ;  $\bar{y} = 20,73$ ;  $s_{xy} = \pm 0,239$  mmol/l.

Die Präzision der kinetischen Glucosebestimmung wurde mit verschiedenen Standardlösungen und Kontrollproben an mehreren Tagen bestimmt (Tab. 1).

Die Präzisions- und Richtigkeitskontrolle für die Hexokinase/Glucose-6-phosphatdehydrogenase-Endpunkt-methode stammt aus unserer Routine und umfaßt den gleichen Vergleichszeitraum wie die kinetische Glucose-dehydrogenase-Methode (Tab. 2).

Die Nachweisgrenze ist nach *Kaiser* (zitiert nach l.c. (4)) und kürzlich empfohlen von l.c. (5), an 20 Tagen als Doppelbestimmung ermittelt worden. Dabei wurde Wasser als Probe unter gleichen Bedingungen analysiert. Umgerechnet in die benutzte Einheit ist die dreifache Standardabweichung 0,16 mmol/l ( $n = 40$ ).

Tab. 1. Präzision der kinetischen Glucosebestimmung mit ACP 5040.

Die Proben wurden in jeder Serie, wie unter Methodik beschrieben, analysiert. Bei Aliquot I und II handelt es sich um zwei Poolseren, wobei Aliquot I mit Benzoesäure 1:2 verdünnt und Aliquot II Glucose zugesetzt wurde. Die beiden Proben waren im Verhältnis 1:26 mit Perchlorsäure enteiweißt und in kleineren Portionen tiefgefroren. Täglich wurde je ein tiefgefrorenes Röhrchen Aliquot I, Aliquot II und Precipath-U aufgetaut und untersucht. Precinorm UPX wurde täglich frisch gelöst, Fluinorm N im Kühlschrank und die wäßrigen Standards bei Raumtemperatur aufbewahrt. Jede Probe wurde zweifach bestimmt, um eine eventuelle Verschleppung auszuschalten. In die Berechnung wurden nur die zweiten Werte einbezogen.

Probe (Sollwert in mmol/l)	Präzision in der Serie					Präzision von Tag zu Tag				
	n	$\bar{x}$ (mmol/l)	s (mmol/l)	VK (%)	R (%)	n	$\bar{x}$ (mmol/l)	s (mmol/l)	VK (%)	R (%)
Precinorm UPX	40	5,73	0,08	1,4		21	5,50	0,11	1,9	
Fluinorm N (6,22)	17	6,26	0,15	2,4	+ 0,64	21	6,15	0,11	1,8	- 1,13
Precipath U (11,3)	38	11,27	0,22	1,9	- 0,26	21	11,07	0,09	0,9	- 2,04
wäßr. Standard (11,1)	40	11,12	0,16	1,4	+ 0,18	21	11,06	0,18	1,7	- 0,36
wäßr. Standard (16,65)	40	16,69	0,28	1,7	+ 0,24	21	16,75	0,18	1,1	+ 0,60
wäßr. Standard (27,75)	39	27,77	0,37	1,3	+ 0,07	21	27,11	0,35	1,3	- 2,31
wäßr. Standard (55,5)	37	55,05	0,59	1,07	- 0,82	21	53,79	0,66	1,2	- 3,10
Aliquot I	18	2,71	0,08	2,8		21	2,74	0,09	3,4	
Aliquot II	20	52,12	0,47	0,9		21	51,70	0,73	1,4	

Tab. 2. Präzision und Richtigkeit der Hexokinase/Glucose-6-phosphatdehydrogenase-Endpunktmethod, die in unserer Routine verwendet wurde. Die in dieser Tabelle angeführten von Tag zu Tag-Werte stammen aus unseren Qualitätskontrollen und decken den Vergleichszeitraum. Täglich wurde mit frisch aufgelöstem Präzisionskontrollserum Precinorm UPX (ohne Sollwertangabe) und zur Richtigkeitsprüfung etwa alle 3 Tage mit flüssigem Richtigkeitskontrollserum Fluinorm N gearbeitet. Für die Prüfung der Präzision in der Serie haben wir zusätzliche Kontrollen durchgeführt. Aliquot II (s. a. Tab. 1) ist hier 1:5 verdünnt.

Probe (Sollwert in mmol/l)	Präzision in der Serie					Präzision von Tag zu Tag				
	n	$\bar{x}$ (mmol/l)	s (mmol/l)	VK (%)	R (%)	n	$\bar{x}$ (mmol/l)	s (mmol/l)	VK (%)	R (%)
Precinorm UPX	11	5,62	0,08	1,4		31	5,61	0,13	2,3	
Fluinorm N (6,22)	20	6,15	0,07	1,1	- 1,1	11	6,26	0,08	1,3	+ 0,6
Precipath U (11,3)	18	11,28	0,29	2,6	- 0,2					
Aliquot II, verdünnt	10	10,35	0,07	0,7						

Um einen Verschleppungsfehler festzustellen, haben wir 20 Tage nach jedem Standard (11,1; 16,65; 27,75; 44,4 und 55,5 mmol/l) Wasser als Probe analysiert. Die ermittelte dreifache Standardabweichung bis zu Standard 27,75 mmol/l betrug umgerechnet in die verwendete Einheit 0,15 mmol/l (n = 20); d. h. sie ist gleich groß wie die untere Nachweisbarkeitsgrenze. Bei den Konzentrationen ab 33,3 und 44,4 mmol/l sind diese Werte 0,20 und 0,20 mmol/l, ab 55,5 mmol/l 0,31 mmol/l; somit kleiner als 1,8 mmol/l, die durchschnittliche dreifache Standardabweichung für diesen Bereich (s. a. Tab. 1).

Der prozentuale Verschleppungskoeffizient (Q) wurde nach *Hjelm* (zitiert in l.c. (6)) an 16 Tagen aus einer Serie von Glucosestandards 5 mal 5,55; 55,5; 5,55 mmol/l bestimmt. Der prozentuale Koeffizient  $Q_1$  (für die Verschleppung von der niedrigen zur hohen Konzentration) ist 0,36% und  $Q_2$  (für die Verschleppung von der hohen zur niedrigen Konzentration) 0,34%.

Wir schließen daraus auf einen praktisch unbedeutenden Verschleppungsfehler.

Die Wiederfindung von Glucose im Serum zeigt Tabelle 3. Die Wiederfindungsrate ist aufgrund der Ergebnisse als gut zu bezeichnen.

Tab. 3. Wiederfindung von Glucose im Serum.

Angegeben sind die Mittelwerte aus je 5 Einzelbestimmungen. Die Aufstockungen sind anhand von zwei Patientenseren hergestellt.

Glucosekonzentration berechnet (mmol/l)	gefunden (mmol/l)	n	s (mmol/l)	VK (%)	Prozentuale Wiederfindung
1,47	1,44	5	0,045	3,1	97,9
2,942	2,953	5	0,025	0,8	100,4
5,883	5,905	5	0,063	1,1	100,4
8,664	8,902	5	0,128	1,4	102,7
14,774	14,90	5	0,290	1,9	100,9
28,111	28,993	5	0,276	0,9	103,1
35,52	37,263	5	0,253	0,7	104,9
41,447	42,824	5	0,489	1,1	103,3
47,558	47,475	5	0,210	0,4	99,8

Korrelation mit der Vergleichsmethode

Die Abbildung 1 zeigt die aus 355 Wertepaaren ermittelte Korrelation mit der Hexokinase/Glucose-6-phosphatdehydrogenase-Endpunktmethod. Die Ergebnisse sprechen für eine gute Übereinstimmung zwischen beiden Methoden.

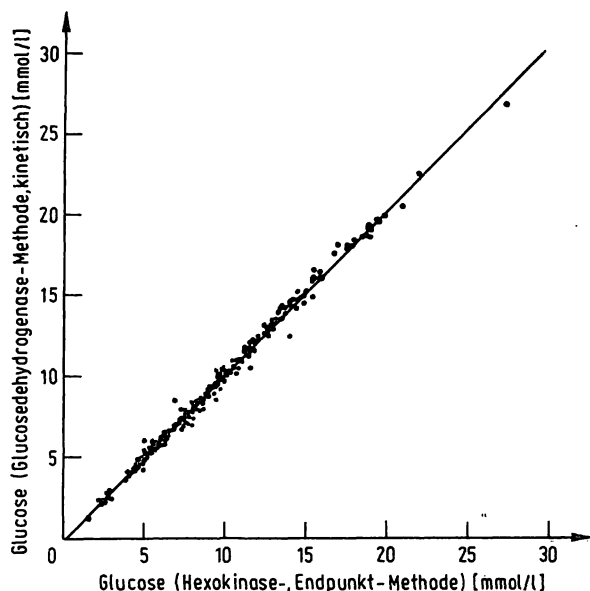


Abb. 1. Korrelation der Meßergebnisse: Glucosedehydrogenase-Methode, kinetisch (y) mit Hexokinase/Glucose-6-phosphatdehydrogenase-Methode, Endpunkt (x). Der berechnete Korrelationskoeffizient aus 355 Wertepaaren lautet  $r = 0,9967$ ; die Regressionsgleichung ist  $y = -0,07 + 1,012x$ ;  $s_{xy} = \pm 0,329$  mmol/l.

## Diskussion

Die Bestimmung der Glucosekonzentration mit der Hexokinase/Glucose-6-phosphatdehydrogenase-End-

punktmethode wird gewöhnlich aus eiweißfreiem Überstand, der nach der Behandlung der Proben mit Perchlorsäure entsteht, durchgeführt. Um Pipettierungs- und Kapillarfüllungsfehler bei unseren Vergleichsuntersuchungen ausschalten zu können, enteiweißten wir nicht wie für die Glucosedehydrogenase-Methode vorgeschrieben mit Perchlorsäure-Perchloratlösung, sondern mit Perchlorsäure.

Dabei fanden wir, daß die theoretisch notwendige  $\text{NAD}^+$ -Konzentration nur bis zu einer Glucosekonzentration von etwa 44 mmol/l ausreicht. Um eine Linearität bis 55,5 mmol/l Glucose erreichen zu können, mußten wir die  $\text{NAD}^+$ -Konzentration auf 5,5 mmol/l erhöhen.

Die Ergebnisse zeigen, daß ein niedriger pH-Wert des Überstandes unter den gewählten Kriterien nicht stört.

Unter den beschriebenen Bedingungen sind 300 Proben in einer Stunde zuverlässig bestimmbar.

## Danksagung

Der Fa. E. Merck danken wir für das Überlassen von Reagenzien.

## Literatur

1. Brümmer, W. & Ebeling, W. (1976), Eigenschaften und Anwendung der Glucose-Dehydrogenase. Kontakte 2, 3-7, E. Merck AG, Darmstadt.
2. Ziegenhorn, J. (1977), In: Grundlagen der enzymatischen Analyse (Bergmeyer, H. U., ed.), 1. Aufl., pp. 81-83, Verlag Chemie, Weinheim, New York.
3. Müller-Matthesius, R. (1975), Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 13, 169-170.
4. Haeckel, R. & Haeckel, H. (1972), Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 10, 453-461.
5. Stamm, D. (1979), Recommendations for the Description of a Selected Method in Clinical Chemistry. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 17, 180-282.
6. Haeckel, R. (1975), In: Qualitätssicherung im medizinischen Labor (Haeckel, R., ed.), 1. Aufl., pp. 133-135, Deutscher Ärzte-Verlag GmbH, Köln-Lövenich.

Dipl. Ing. med. Biochem. Aladár Bruckner  
Städtisches Krankenhaus – Zentrallabor  
Gotenstraße 6-8  
D-6230 Frankfurt/M.-Höchst