

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.
Vol. 18, 1980, pp. 363–366

Verbesserte Methode zur Bestimmung der Harnsäure auf dem SMAC®¹⁾

Von A. Scholer, A. Pianezzi, R. von Rickenbach und D. J. Vonderschmitt

Zentrallabor des Kantonsspitals Basel (Schweiz)

(Eingegangen am 14. September 1979/21. Januar 1980)

Zusammenfassung: Durch eine neue Anordnung des Analysenkanals für die Bestimmung der Harnsäure auf dem SMAC werden größere analytische Spezifität und Empfindlichkeit erreicht. Die vorgeschlagenen Änderungen sind ohne Eingriff in die Computerprogramme des Analysators möglich.

An improved method for the determination of uric acid on a SMAC® analyzer

Summary: Altering the analytical channel for the determination of uric acid on a SMAC analyzer affords greater analytical specificity and sensitivity. The proposed alterations do not require any change of the analyzer software.

Einführung

Die kürzlich beschriebene Methode zur Bestimmung von Harnsäure auf dem SMAC (1) führte zu einer verbesserten Analytik, wurde aber durch Ascorbinsäure weiterhin gestört. Klose et al. (2) verwendeten zur Eliminierung dieses Störfaktors Ascorbat-Oxidase. Im weiteren dienten die Arbeiten von Gochmann et al. (3, 4) als Basis für die Weiterentwicklung, mit welcher neben einer Erhöhung der Spezifität durch Elimination der Ascorbatstörung auch eine Erhöhung des Meßsignals angestrebt wurde. Die Software des SMAC-Computers wurde durch die beschriebenen Änderungen nicht berührt.

Material und Reagenzien

Geräte

LKB 2086, LKB-Produkte AB, Stockholm, Sweden.
SMAC, sequential multiple analyzer with computer von Technicon.

Reagenzien

Ascorbat-Oxidase (EC 1.10.3.3) aus *Cucurbita* spezie Boehringer Mannheim (236314).

Kalium-dihydrogenphosphat (KH_2PO_4) p. A. Merck Darmstadt (4873).

Die restlichen Substanzen sind die gleichen, die bereits in l. c. (1) unter Reagenzien aufgeführt wurden.

Reagenzherstellung

Die Stammlösungen 1 und 2 entsprechen den Angaben unter Reagenzherstellung in l. c. (1).

Stammlösung 3: 13,6 g KH_2PO_4 (0,1 mol/l) in 1000 ml zweifach destilliertem Wasser lösen, pH auf 5,6 einstellen; im Kühlschrank über drei Monate haltbar.

Stammlösung 4: 10 mg (10 U/l) Ascorbat-Oxidase zu 4 ml Stammlösung 3 geben; 1 ml-Portionen im Kühlschrank tiefgefroren aufbewahren.

Reagenz 1: 1 Portion der Stammlösung 4 wird mit Stammlösung 3 bis zu 250 ml verdünnt. Dazu gibt man 0,25 ml Triton-X-100. Diese Lösung sollte täglich frisch angesetzt werden.

Für die Herstellung der Reagenzien 2, 3 und 4 siehe unter Reagenzherstellung in l. c. (1).

Vergleichsmethoden

1. laut eigenen Angaben (1)

2. Uricquant-Methode nach Kageyama (8) auf einem LKB 2086 (5) mit Reagenzien aus der Packung 124 761 der Firma Boehringer.

Fliebschema auf dem SMAC

Das Fliebschema ist in Abbildung 1 dargestellt.

Will man die Originalmethode auf dem SMAC ersetzen (6), muß das „cartridge“ entsprechend dem Fliebschema geändert werden. Mit Vorteil plaziert man die neue Einheit in der unteren Hälfte der analytischen Konsole, da die Probe direkt vom Probennehmer angesogen wird (keine Verdünnung verwenden). Im übrigen ist lediglich das Photometerfilter durch ein 600 nm-Filter zu ersetzen.

Gegenüber dem Fliebschema in l. c. (1) wurden die folgenden Änderungen vorgenommen:

1. direktes Ansaugen der Probe (keine Vorverdünnung)

2. 12 Zoll-Dialysator

3. 37 °C Heizbad für die Reaktionsbeschleunigung

Alle diese Maßnahmen erhöhen die Empfindlichkeit des Meßsignals wesentlich.

¹⁾ SMAC® eingetragenes Warenzeichen der Firma Technicon GmbH, Tarrytown, N. Y., USA.

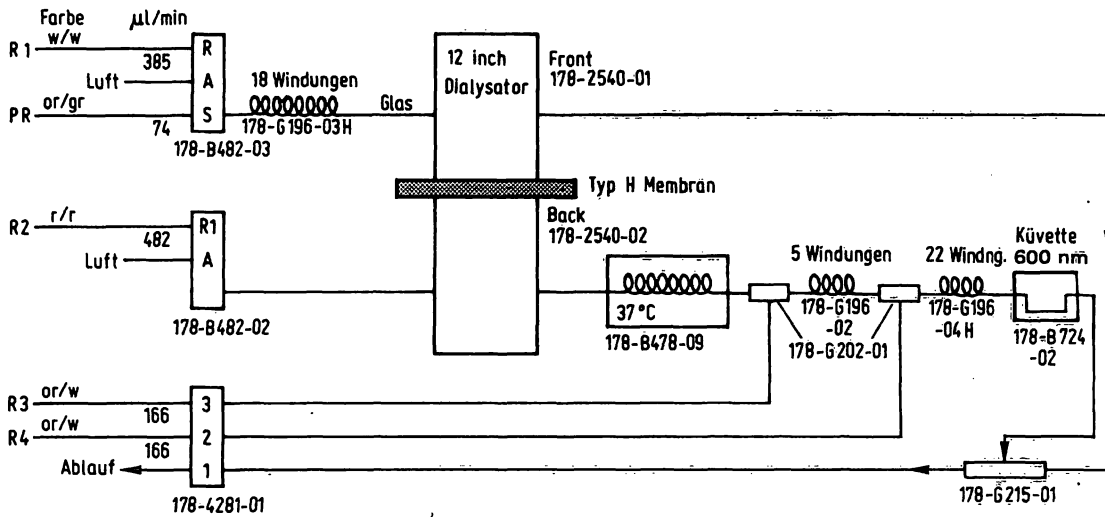


Abb. 1. Fließschema der Harnsäurebestimmung auf dem SMAC (neue Version).
R = Reagenzien; PR = Probe; gr = grün; or = orange; r = rot; w = weiß.

Die Kalibrierung der Methode erfolgte mit dem von der Firma Technicon empfohlenen „Standard I“ für den SMAC (darin sind die Werte für die enzymatische Harnsäurebestimmung deklariert).

Ergebnisse

Der Vergleich durch orthogonale Regression der Ergebnisse der neuen Harnsäuremethode auf dem SMAC (y-Werte) mit der bereits beschriebenen (1) (x-Werte) ist in Abbildung 2 dargestellt. Abbildung 3 zeigt den Ver-

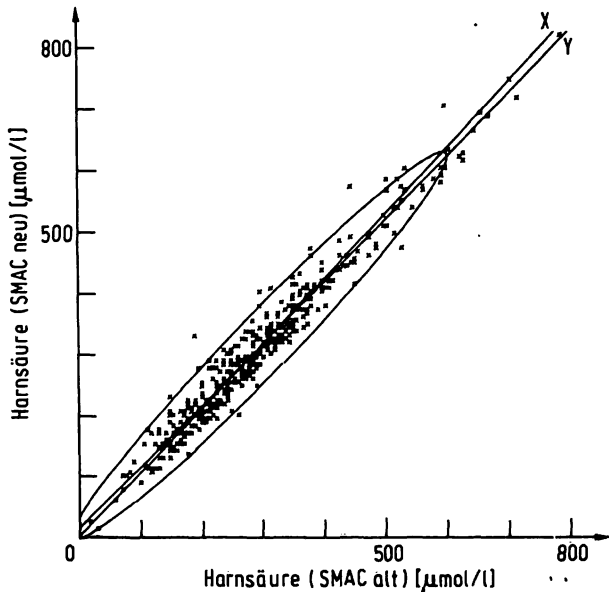


Abb. 2. Vergleich der neuen Harnsäuremethode auf dem SMAC (y-Werte) mit den Werten der in l.c. (1) beschriebenen Methode (x).

Regressionsgerade	$y = 19,0 + 1,01 x$ $x = -4,8 + 0,94 y$
Orthogonale Regressionskoeffizienten	$b_0 = 1,03608$ $-1/b_0 = -0,96517$
Korrelationskoeffizient	$r = 0,9776$
Anzahl der Vergleiche	$n = 417$

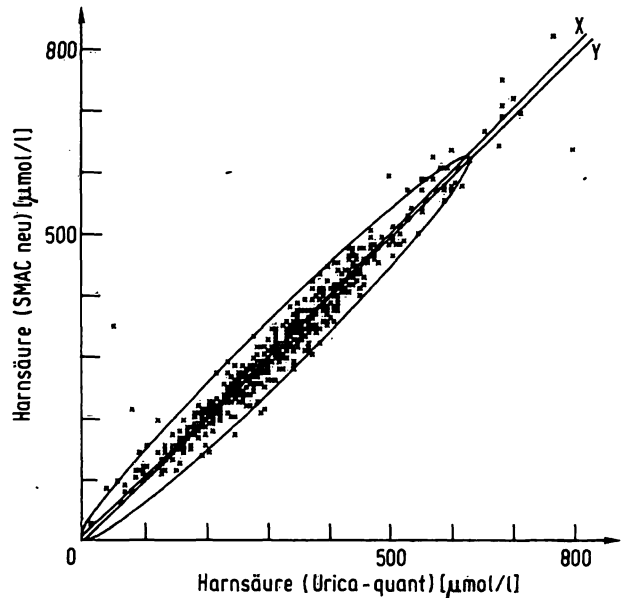


Abb. 3. Vergleich der neuen Harnsäuremethode auf dem SMAC (y-Werte) mit den Werten der Uricaquant-Methode auf dem LKB 2086 (x-Werte).

Regressionsgerade	$y = 6,2 + 0,98 x$ $x = 5,0 + 0,98 y$
Orthogonale Regressionskoeffizienten	$b_0 = 1,00004$ $-1/b_0 = -0,99996$
Korrelationskoeffizient	$r = 0,9822$
Anzahl der Vergleiche	$n = 608$

gleich der Resultate der neuen Harnsäuremethode (y-Werte) mit der Uricaquant-Methode auf einem LKB 2086 (x-Werte).

In den Abbildungen 2 und 3 sind neben den Gleichungen der Regressionsgeraden und den Korrelationskoeffizienten die orthogonalen Regressionkoeffizienten zu finden, die nach Angaben der Geigy-Tabelle (9) berechnet wurden.

Linearität

Es wurde eine Verdünnungsreihe aus einem Kontrollserum analysiert, das mit der Hälfte des zur Rekonstitution vorgesehenen Lösungsmittels gelöst wurde (Faktoren: 0,2/0,4/0,6/0,8 und 1, deklarierter Sollwert 1053 $\mu\text{mol/l}$). Die Methode ist im Bereich von 0–1000 $\mu\text{mol/l}$ linear.

Präzision und Richtigkeit

Die Präzision, wie auch die Richtigkeit der Methode wurde mit käuflichen Kontrollseren geprüft. Die Präzision in der Serie ergab folgende Variationskoeffizienten:

VK = 0,9% (\bar{x} = 280,05 $\mu\text{mol/l}$; n = 20)

VK = 0,8% (\bar{x} = 562,56 $\mu\text{mol/l}$; n = 18)

VK = 1,4% (\bar{x} = 633,22 $\mu\text{mol/l}$; n = 18)

\bar{x} ist der Mittelwert der verwendeten Testseren, n die Anzahl der Bestimmungen.

Tabelle 1 zeigt die relative Richtigkeit der Methode und die Präzision von Tag zu Tag während eines Monats.

Verschleppung

Wie in l. c. (1) beschrieben, wurde auch bei dieser Version der Harnsäurebestimmung auf dem SMAC die Verschleppung nach der Formel von *Hjelm* (7) berechnet. Der Interaktionskoeffizient $q = 0.02$ beweist, daß praktisch keine Verschleppung auftritt.

Tab. 1. Präzision und Richtigkeit der Methode.

Kontrollseren	n	Sollwert Urica- quant ($\mu\text{mol/l}$)	SMAC \bar{x} ($\mu\text{mol/l}$)	s ($\mu\text{mol/l}$)	VK (%)
Monitrol I LTD 144	82	251	250,3	14,5	5,8
Monitrol II PTD 51	83	568	569,6	15,8	2,8
Precinorm U 726	59	239	262,2	9,2	3,5
Hyland N 04	72	287	291,6	12,7	4,3
Hyland P 11	61	634	637,96	18,2	2,9
Seroquant 502	55	371	393,3	13,1	3,3

Tab. 2. Einfluß verschiedener Störsubstanzen auf die neue Harnsäurebestimmungsmethode auf dem SMAC (in vitro Versuch).

Substanz	Testserum ohne Zusatz Harnsäure ($\mu\text{mol/l}$)	Zusatzmenge zu 100 ml Testserum			
		5 mg Harnsäure ($\mu\text{mol/l}$)	10 mg Harnsäure ($\mu\text{mol/l}$)	50 mg Harnsäure ($\mu\text{mol/l}$)	100 mg Harnsäure ($\mu\text{mol/l}$)
Ascorbinsäure	553	—	559	559	553
Kreatinin	553	—	565	559	559
3,4-Dihydroxybenzoesäure	586	—	585	584	582
L-Dopa	586	—	599	596	587
2,5-Dihydroxybenzoesäure	586	—	573	552	523
	555	555	—	—	—
L-Cystein	586	—	418	125	65
Glutathion	586	—	655	362	286
	555	572	—	—	—
3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure	553	—	571	494	458
Allantoin	553	—	559	—	553

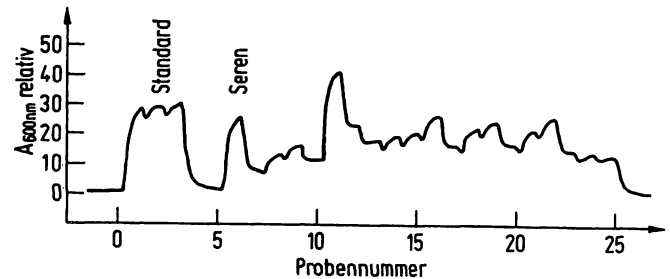


Abb. 4. Ausschnitt aus einer Aufzeichnung des neuen Harnsäurekanals auf dem SMAC-Schreiber.

Kurvenform

Aus Abbildung 4 ist ersichtlich, daß die Kurvenform den üblichen „steady-state“ Aufzeichnungen des SMAC entspricht. Die neue Methode weist eine bessere Empfindlichkeit auf als die in l. c. (1) beschriebene. Das Signal des Standards ist um das dreifache höher.

Störungen

Aus Tabelle 2 wird ersichtlich, welche Konzentrationen an Störsubstanzen in vitro auftreten dürfen, ohne daß die Resultate der Methode beeinflusst werden. Es wurden Substanzen gewählt, die laut *Gochmann et al.* (3) für eine Störung bei diesem Test in Frage kommen.

Diskussion

Die in dieser Arbeit beschriebene Harnsäurebestimmungsmethode auf dem SMAC zeichnet sich durch eine größere Präzision, höhere Empfindlichkeit und eine größere Spezifität gegenüber der bereits beschriebenen Methode (1) aus.

Seit über sechs Monaten ist diese neue Version auf dem SMAC in Betrieb und zeigt keine wesentlichen Störungen. Wie aus den Vergleichen zu sehen ist, stimmt die neue Methode besser mit der Uricaquant-Methode auf dem LKB 2086 überein als die alte Methode auf dem SMAC,

was der höheren Spezifität und der besseren Präzision zuzuschreiben ist.

Wir verwenden seit zehn Monaten die Werte der neuen Methode für das SMAC-Profil.

Danksagung

Wir danken allen Mitarbeitern im Labor für die Mithilfe zum Gelingen dieser Methode. Frau *Madéleine Saner* danken wir für das Schreiben des Manuskriptes.

Literatur

1. Scholer, A., Müller, Eva, Toth, F. & Vonderschmitt, D. J. (1978), *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 16, 255–257.
2. Klose, S., Stoltz, M., Munz, E. & Portenhauser, R. (1978), *Clin. Chem.* 24, 250–255.
3. Gochmann, N. & Schmitz, J. M. (1971), *Clin. Chem.* 17, 1154–1159.
4. Adler, B. R., Technicon Deutschland, Methode 020.
5. Kinetic Determination of Uric Acid in Serum, Application Note 418, LKB, Stockholm Schweden.
6. SMAC Methode Nr. SG4-0013FJ6. Publikation der Firma Technicon Tarrytown, N. Y.
7. Hjelm, M. Z. (1968), *Anal. Chem.* 243, 781–790.
8. Kageyama, N. (1971), *Clin. Chim. Acta* 31, 421–426.
9. Documenta Geigy, Wissenschaftliche Tabellen, 6. Auflage. S. 170.11–170.14 (1960).

Dipl. Chem. A. Scholer
Chem. Zentrallabor
Kantonsspital Basel
CH-4031 Basel