

Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.  
9. Jg., S. 497—502, November 1971

## Enzymatische Glucosebestimmung in hämolysierten Blutproben ohne Störung durch Fructose

VON F. DA FONSECA-WOLLHEIM

Aus dem Institut für Klinische Chemie und Klinische Biochemie (Direktor: Prof. Dr. H.-J. Dulce) am Klinikum Steglitz der Freien Universität Berlin

(Eingegangen am 16. Juli 1971)

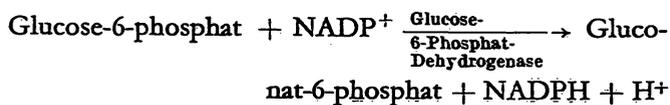
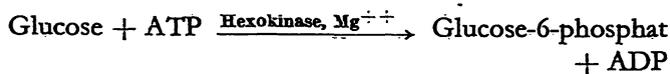
Glucose kann im Hämolysat nach Ausschaltung störender Erythrocytenenzyme zuverlässig mit der Hexokinase-Methode über die NADPH-Fluoreszenz bestimmt werden. Inaktivierung der Erythrocyten-Phosphoglucose-Isomerase, und damit Eliminierung der bisher problematischen Fructoseinterferenz, wird auf einfache Weise durch Hämolysat mit 0,1N Essigsäure erreicht. Die beschriebene Methode zeichnet sich durch geringen Zeitaufwand und ökonomische Reagenzienutzung aus und eignet sich auch besonders für Routineuntersuchungen.

### *The enzymic determination of glucose in haemolysed blood samples without interference by fructose*

Glucose can be reliably determined in erythrocyte haemolysates by the hexokinase method and the measurement of the NADPH fluorescence after the elimination of interfering erythrocyte enzyme activities. The erythrocyte phosphoglucose isomerase, which hitherto has caused the problematic interference by fructose, is inactivated by simply carrying out the haemolysis in 0.1N acetic acid. The described method is characterised by its short time of operation and the economic use of reagents and it is especially suitable for routine investigations.

Die enzymatische Glucosebestimmung direkt im Hämolysat kann für die Praxis wesentliche Vorteile bieten. Der Fortfall der Enteiweißung bei der Blutzuckerbestimmung bedeutet Zeitersparnis und Eliminierung einer Fehlerquelle aus dem Arbeitsgang.

Durch den störenden Einfluß von Erythrocytenenzymen ist allerdings die Hexokinase-Methode bei Anwendung auf Hämolysat ohne zusätzliche Maßnahmen zu unspezifisch (1). Das bei der Reaktionsfolge



gebildete Gluconat-6-phosphat wird durch Erythrocyten-6-Phosphogluconat-Dehydrogenase unter Bildung von NADPH weiter umgesetzt, was sich in einem fortlaufenden Extinktionsanstieg nach Abschluß der eigentlichen Bestimmungsreaktion äußert (2). Durch Zusatz des Enzyminhibitors Maleinimid konnte diese Störung beseitigt werden (1, 3). HAECKEL machte aber auf die verbleibende, im klinischen Bereich nicht ungefährliche Miterfassung von Fructose aufmerksam (1). Wir beschreiben im folgenden Versuche zur Entwicklung einer Methode, die auch bei Anwesenheit von Fructose im Hämolysat korrekte Ergebnisse liefert.

### Methodik

#### Reagenzien

- |   |  |
|---|--|
| <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 0,3M Triäthanolaminpuffer pH 7,5;<br/>4 mM MgSO<sub>4</sub></li> <li>2. 12 mM NADP</li> <li>3. 16 mM ATP</li> <li>4. 1 mg/ml Hexokinase; 1 mg/ml<br/>Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase</li> <li>5. 20 mg/ml Maleinimid (EGA-Chemie). Bei 4° einige Wochen haltbar.</li> <li>6. 0,1N Essigsäure</li> <li>7. Glucose-Stammlösung 4,00 g/l: 3,80 g Glucose (wasserfrei) ad 1000,0 mit dest. Wasser lösen. Der um 5% gegenüber dem Nennwert verminderte Gehalt kompensiert die durchschnittliche Fluoreszenzminderung bei Blutproben (s. u.).</li> <li>8. Glucose-Standard-Gebrauchslösung: Stammlösung 1:21 mit 0,1N Essigsäure verdünnen.</li> <li>9. Reaktionsgemisch:<br/>1,5 ml Lösung 1<br/>0,5 ml Lösung 2<br/>0,5 ml Lösung 3<br/>1,0 ml Lösung 5</li> </ol> | } Bestandteile der<br>Böhringer-Test-<br>kombination TGAA<br>oder TGAB |
|---|--|
- werden gemischt. 1 Woche bei 4° stabil.

#### Messung der NADPH-Fluoreszenz

Für Fluoreszenzmessungen wurde das Turner-Fluorimeter Modell 110 mit Standardmeßtür benutzt. Blende 3x; Hg-Lampe mit Primärfilter 7/60 (360 nm Narrow Pass); Sekundärfilter 4 (465 nm Sharp Cut). Das Gerät wird mit Reagenzienleerwert in der Küvette auf Null abgeglichen.

### Untersuchungsmaterial

Wir verwenden zur Blutzuckerbestimmung Oxalat-Fluorid-stabilisiertes Venenblut, das in entsprechend präparierten Spezialgefäßen angeliefert wird. Bei sofort nach Entnahme erfolgender Hämolyse (s. u.) kann auch mit Kapillarblut gearbeitet werden.

### Durchführung der Bestimmung

#### Hämolyse

50 µl Blut werden mit 1,00 ml 0,1N Essigsäure hämolysiert. Unter diesen Bedingungen bleibt die Glucosekonzentration 24 Stunden bei Raumtemperatur unverändert.

#### Bestimmungsansätze

Auf den Boden des Inkubationsgefäßes (Einweg-Plastikröhrchen 17 × 90 mm mit Verschlusskappe<sup>1)</sup>) werden mit Marburg-Pipetten dosiert:

	Probe	Standard	Leerwert
Reaktionsgemisch, µl	100	100	100
Hämolytat, µl	20	—	—
Glucosestandard, µl	—	20	—
0,1N Essigsäure, µl	—	—	20
Für Vermischung sorgen!			
Enzymsuspension, µl	5	5	5

Mischen. Frühestens nach 3, spätestens nach 15 Min. Inkubation bei Raumtemperatur 10 ml dest. Wasser (25°) zusetzen, Röhrchen verschließen und durch Umkippen mischen. (Das zur Verdünnung zugesetzte Wasser wird bei konstanter Temperatur gehalten, um bei der Fluoreszenzmessung definierte Temperaturbedingungen in der Küvette zu gewährleisten. Ohne diese Maßnahme könnte die Temperaturabhängigkeit der Fluoreszenz (vgl. (4)) zur Fehlerquelle werden.)

Leerwertansatz in die Küvette gießen und Nullabgleich des Fluorimeters durchführen.

Küvette durch Absaugen mit der Wasserstrahlpumpe entleeren. Fluoreszenz von Probe und Standard messen (Küvette jeweils mit Meßlösung vorspülen).

#### Berechnung

$$\frac{\text{Fluoreszenz}_{\text{Probe}}}{\text{Fluoreszenz}_{\text{Standard}}} \times 4,00 = \text{g Glucose/l.}$$

Bei nicht hämoglobinhaltenen Proben Ergebnis mit 0,95 multiplizieren.

### Ergebnisse

#### Wahl des Meßverfahrens

Meßgröße für den Glucosegehalt der Probe ist bei der Hexokinase-Methode das gebildete NADPH. Für seine Erfassung stehen zwei Möglichkeiten zur Auswahl: Extinktionsmessung oder Fluorimetrie.

Die Voraussetzungen für den „optischen Test“ bei 366 nm sind bei Hämolytat ungünstig. Die Extinktion des Probenleerwertes liegt bei einer Probenendverdünnung von 1:200 und einer Schichtdicke von 1 cm etwa bei 1,0. Unter den gleichen Bedingungen erhält man z. B. bei einer Glucosekonzentration von 0,5 g/l im „optischen Test“ nur eine Extinktionsänderung von 0,046. Es werden daher für präzises Arbeiten hohe Anforderungen an die Meßgenauigkeit und Konstanz des Photometers gestellt.

Eine der Probenleerwertextinktion bei der Photometrie entsprechende hohe Eigenfluoreszenz findet sich bei

<sup>1)</sup> Hersteller: Ernst Bechthold und Sohn D 6124 Beerfelden/Odenwald.

der Fluorimetrie von Hämolytat nicht. Probenleerwert-Ansätze (Hämolytat in Puffer) liefern nur sehr geringe, meist unterhalb der Nachweisgrenze liegende Fluoreszenzintensitäten (siehe Tab. 1). Bei der von BERNT und LACHENICHT angegebenen Methode zur mechanisierten Glucosebestimmung im Hämolytat (5) wurde dies bereits vorausgesetzt und direkte Proportionalität zwischen Fluoreszenz (abzüglich des Reagenzienleerwertes) und Glucosegehalt angenommen. Wir haben an mehreren Hundert Blutproben aus allen klinischen Bereichen diese Frage überprüft und dabei nie eine Eigenfluoreszenz feststellen können, die einer Glucosekonzentration von mehr als 0,05 g/l entsprach. Im Mittel lag die Leerwertfluoreszenz bei 0,15 Skalenteilen und zeigte damit eine scheinbare Glucosekonzentration von etwa 0,01 g/l an. Wegen dieser günstigen meßtechnischen Voraussetzungen ist die Fluorimetrie für die Erfassung des NADPH im Hämolytat zu bevorzugen.

Zu berücksichtigen ist hierbei allerdings die hämoglobinbedingte Minderung der NADPH-Fluoreszenz: Gibt man zu einer NADPH-Lösung in Puffer Hämolytat, so nimmt die Fluoreszenz merklich ab, und zwar bei einer Hämolytat-Konzentration, wie sie in unserem Testansatz verwirklicht ist, um etwa 5%. Bei der in Tabelle 1 niedergelegten Versuchsreihe betrug die

Tab. 1

Einfluß von Hämolytat auf die gemessene NADPH-Fluoreszenz  
Zu 5 ml einer NADPH-Lösung in Triäthanolaminpuffer pH 7,5 wurden in der Fluorimeterküvette 20 µl Hämolytat (Blutprobe 1:42 in 0,1N Essigsäure) gegeben. Die Fluoreszenz wurde unter Standardmeßbedingungen vor (Spalte 2) und nach (Spalte 3) Hämolytat-zusatz gemessen. Die Fluoreszenzabnahme unter Berücksichtigung der geringen bzw. unterhalb der Meßempfindlichkeit liegenden Probenleerwerte (Hämolytat in Puffer, Nullabgleich des Fluorimeters mit Puffer, Spalte 4) zeigt Spalte 5

1	2	3	4	5
Nr. der Blutprobe	NADPH ohne Hämolytat	NADPH mit Hämolytat	Hämolytat in Puffer	Fluoreszenzabnahme
— Skalenteile —				
1	83,5	79,0	0,0	4,5
2	84,5	81,0	0,5	4,0
3	84,5	81,0	0,0	3,5
4	84,5	80,0	0,0	4,5
5	84,5	80,5	0,0	4,0
6	83,5	79,0	0,5	5,0
7	84,0	79,5	0,0	4,5
8	84,0	80,0	0,0	4,0
9	84,0	80,0	1,0	5,0
10	83,5	79,5	0,5	4,5
11	83,0	79,0	0,0	4,0
12	83,5	79,5	0,0	4,0
13	83,0	79,0	0,0	4,0
14	83,5	79,5	0,0	4,0
15	83,0	79,0	0,0	4,0
16	83,5	79,5	0,0	4,0
17	83,5	79,0	0,5	5,0
18	84,0	79,5	0,0	4,5
19	83,5	79,0	0,0	4,5
20	84,0	80,0	0,0	4,0

durchschnittliche Fluoreszenzabnahme 5,08%, die Standardabweichung  $s = 0,48\%$ . Wegen der nur geringen Schwankungsbreite nehmen wir bei hämoglobinhaltenen Proben eine generelle Korrektur vor (unter Verzicht auf das individuelle Zubereiten interner Glucosestandards bei jeder einzelnen Probe), indem wir die Glu-

cosstandardlösung um 5% gegenüber dem Nennwert verdünnen. Rechnerischer Ausgleich ist ebenfalls möglich.

Um die Fluoreszenzminderung möglichst gering zu halten, messen wir bei hoher Probenendverdünnung (1:10500). Die Methode ist daher nur mit einem ausreichend empfindlichen Fluorimeter anwendbar.

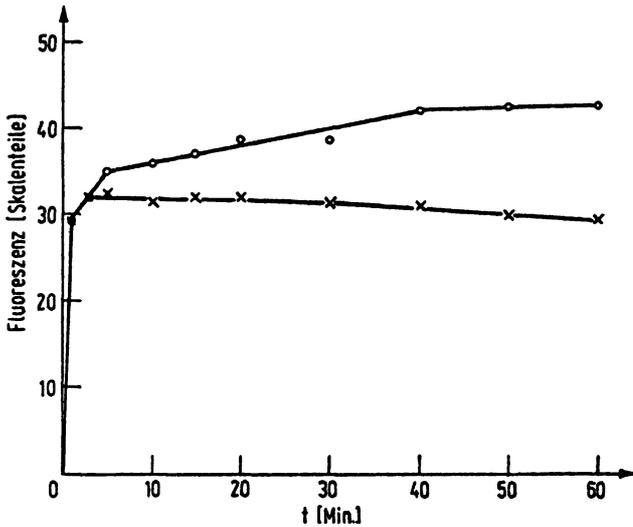


Abb. 1

Einfluß von Maleinimid auf die Meßwertkonstanz bei der fluorimetrischen Glucosebestimmung im Hämolyt. O—O—O ohne Maleinimid; x—x—x mit Maleinimid. Aus einem 10fachen Inkubationsansatz wurden zu den eingezeichneten Zeitpunkten 100 µl entnommen und mit 10 ml H<sub>2</sub>O nachverdünnt. Sofort anschließend wurde die Fluoreszenz unter Standardmeßbedingungen bestimmt

#### Hemmung der Erythrocyten-6-Phosphogluconat-Dehydrogenase mit Maleinimid

Durch Oxydation von Gluconat-6-phosphat an Erythrocyten-6-Phosphogluconat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.44) kommt die Fluoreszenzentwicklung nach vollständigem Umsatz des Glucose-6-phosphats nicht zum Stillstand. Abbildung 1 zeigt das Ausmaß dieser Störreaktion unter den Bedingungen unseres Testansatzes. Zusatz von Maleinimid oder N-Äthylmaleinimid (1, 3) führt zur Inaktivierung der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase, und man erhält so einen über etwa 30 Min. konstanten Meßwert. Bei längerem Stehenlassen des Ansatzes nimmt die Fluoreszenz wieder leicht ab (siehe Abb. 1).

Um Fehler durch unvollständige Inaktivierung der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase zu vermeiden, wurde die Hemmwirkung von Maleinimid auf das Enzym unter variierten Bedingungen untersucht. Bei diesen Versuchen wurde Hämolyt mit Maleinimid vorinkubiert. Anschließend wurde ein Aliquot in einem fluorimetrischen Aktivitätstest mit zugesetztem Gluconat-6-phosphat auf noch vorhandene 6-Phosphogluconat-Dehydrogenaseaktivität getestet.

Die pH-Abhängigkeit der Hemmstoffwirkung zeigt Tabelle 2. Vollständige Hemmung des Enzyms wurde bei schwach alkalischem pH erreicht. Dagegen blieb bei niedrigerem pH ein Teil der Enzymaktivität erhalten. Dies entspricht den Beobachtungen bei anderen Enzymen (6).

Tab. 2

pH-Abhängigkeit der Hemmwirkung von Maleinimid auf Erythrocyten-Phosphogluconat-Dehydrogenase. Hämolyt in 0,01M Phosphatpuffer wurde an der Glaselektrode auf das angegebene pH eingestellt. Dann Zusatz von Maleinimid (Endkonzentration 2 mg/ml) und 5 Min. Inkubation bei 25°. 50 µl des Ansatzes wurden entnommen und mit 1,0 ml Reaktionsgemisch für den 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase-Test (0,6 mm Gluconat-6-phosphat; 2 mm NADP; 3,3 mm MgSO<sub>4</sub>; 0,25M Triäthanolaminpuffer pH 7,5) 5 Min. inkubiert. Dann Zusatz von 5 ml H<sub>2</sub>O und Fluoreszenzmessung unter Standardmeßbedingungen. Leerwerte ohne Gluconat-6-phosphat. Die Enzymaktivität wird ausgedrückt als Fluoreszenzzunahme in Skalenteilen pro 5 Min. In der Spalte rechts ist die errechnete Restaktivität, bezogen auf einen Ansatz ohne Maleinimid, angegeben

pH	Fluoreszenzzunahme/5 Min. (Skalenteile)	% Aktivität
5,5	29,0	92
6,5	15,5	49
7,5	0,0	0
8,5	0,0	0
Ohne Maleinimid, pH 7,5	31,5	100

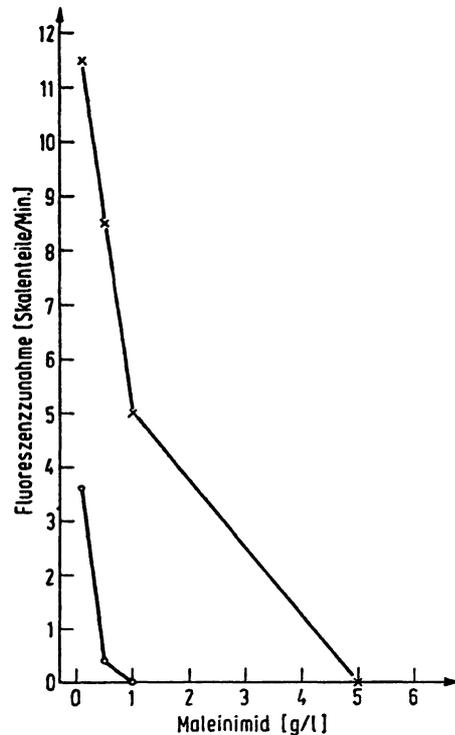


Abb. 2

Abhängigkeit der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase-Inaktivierung von der Maleinimidkonzentration

Die nach 1- bzw. 5-minütigem Einwirken von Maleinimid bei pH 7,5 verbliebene 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase-Aktivität ist in Abhängigkeit von der Maleinimidkonzentration bei der Vorinkubation aufgetragen. x—x—x 1 Minute; O—O—O 5 Minuten Vorinkubation. Durchführung des Hemmversuchs und fluorimetrischer 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase-Test wie bei Tabelle 2 beschrieben

Weiterhin wurden die Parameter Hemmstoffkonzentration und Dauer der Einwirkung variiert. Wie Abbildung 2 zeigt, muß für eine komplette Inaktivierung innerhalb einer Minute eine relativ hohe Maleinimidkonzentration gewählt werden. Bei längerer Einwirkung vor Start der Testreaktion kommt man mit einer geringeren Inhibitorkonzentration aus.

#### Inaktivierung der Erythrocyten-Phosphogluconose-Isomerase

Nach Beobachtungen von HAECKEL (1) werden Glucosebestimmungen im Hämolyt durch Fructose ge-

stört. Hefe-Hexokinase phosphoryliert auch Fructose, und Fructose-6-phosphat kann durch Erythrocyten-Phosphoglucose-Isomerase (EC 5.3.1.9) in Glucose-6-phosphat umgelagert werden. Bei Hämolyse mit  $H_2O$  ohne weitere Zusätze fällt die Miterfassung von Fructose in unserem Testsystem erheblich ins Gewicht siehe (Abb. 3).

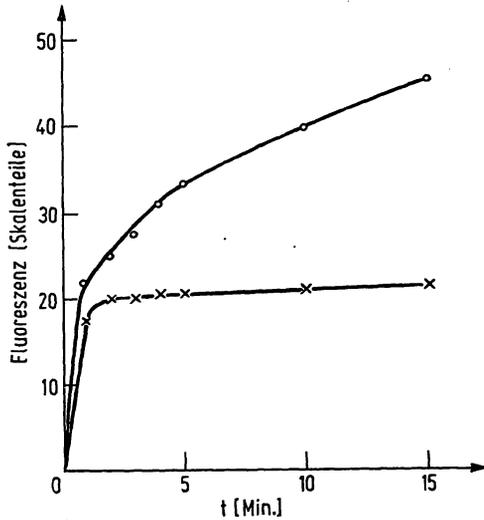


Abb. 3

Fluorimetrische Glucosebestimmung in fructosehaltigem Hämolyolat. Fructosekonzentration 5 g/l. Aus 10fachen Bestimmungsansätzen (siehe unter „Methodik“) wurden zu den angegebenen Zeitpunkten 100  $\mu$ l entnommen, mit 10 ml  $H_2O$  verdünnt und fluorimetriert. O—O—O mit dest. Wasser bereitetes Hämolyolat; x—x—x mit 0,1N Essigsäure bereitetes Hämolyolat

Da Fructose in der Klinik häufig verabfolgt wird, mußte eine Möglichkeit zur Ausschaltung der Erythrocyten-Phosphoglucose-Isomerase gesucht werden. Zunächst prüften wir die Brauchbarkeit der in der Literatur (7) beschriebenen kompetitiven Hemmstoffe des Enzyms. Bei diesen orientierenden Hemmversuchen diente als Maß für die Phosphoglucose-Isomeraseaktivität im Hämolyolat die Fluoreszenzzunahme fructosehaltiger Testansätze zwischen der 5. und 15. Minute (vgl. Abb. 3). Bezogen auf die Aktivität des Kontrollansatzes ohne Inhibitor ergaben sich die folgenden Beziehungen:

	% Aktivität
23 mM ATP	57
11,5 mM Phosphoenolpyruvat	43
2,5 mM Desoxyglucose	44
6.5 mM Gluconat-6-phosphat	8

Mit 20 mM Gluconat-6-phosphat war keine Phosphoglucose-Isomerase-Aktivität mehr meßbar. Unter diesen Bedingungen war der Glucose-Umsatz nicht beeinträchtigt und ein Einfluß auf die mit wäßr. Glucoselösungen erhaltenen Eichkurven nicht festzustellen. Gluconat-6-phosphat kann dem Testansatz aber erst dann zugesetzt werden, wenn die Erythrocyten-6-Phosphogluconat-Dehydrogenase komplett inaktiviert ist (s. o.). Für eine Routinemethode erschien uns daher die Anwendung von Gluconat-6-phosphat als zu riskant.

Tab. 3

Inaktivierung von Erythrocyten-Phosphoglucose-Isomerase in 0,1M Acetatpuffer von unterschiedlichem pH. Hämolyolat wurde 5 Min. bei den angegebenen pH-Werten inkubiert (25°). Dann optischer Phosphoglucose-Isomerase-Test (12)

pH	$\Delta E_{540}/\text{Min.}$
4,2	0,020
3,9	0,001
3,6	0,001
in dest. Wasser	0,042

Eine bessere Möglichkeit zur Ausschaltung des störenden Enzyms fanden wir bei der Untersuchung der Säurelabilität der Erythrocyten-Phosphoglucose-Isomerase. Hält man Hämolyolat kurze Zeit bei einem pH-Wert von unter 4, so sind beim anschließend durchgeführten optischen Phosphoglucose-Isomerase-Test nur noch weniger als 2% der Enzymaktivität des unbehandelten Ansatzes nachweisbar (s. Tab. 3). Bemerkenswerterweise ergaben analog durchgeführte Versuche mit Phosphoglucose-Isomerase aus Hefe (Boehringer Mannheim GmbH), daß dieses Enzym selbst bei pH 3 über 5 Minuten voll aktiv bleibt. Nach der gleichen Zeit in 0,01N HCl waren noch 50% der Aktivität beim Hefeenzym erhalten.

Für die Praxis ist also zur Ausschaltung der Fructose-Interferenz Hämolyse der Blutprobe in 0,1N Essigsäure die Methode der Wahl. In hoher Konzentration zugesetzte Fructose beeinflusst bei derart vorbehandelten Proben das Ergebnis der Glucosebestimmung nur noch unbedeutend (s. Abb. 3 und Tab. 4).

Tab. 4

Glucosebestimmung in Essigsäure-hämolyolysierten Blutproben mit und ohne Fructosezusatz (5 g/l)

Proben-Nr.	g/l — Fructose	g/l + Fructose
1	0,82	0,82
2	1,07	1,09
3	0,54	0,57
4	0,86	0,85
5	0,38	0,42

#### Anwendung der fluorimetrischen Glucosebestimmung

##### Eichkurve

Der Zusammenhang zwischen Fluoreszenzintensität und Glucosekonzentration ist im Meßbereich von 0—4 g/l linear (s. Abb. 4). Nach Abzug des Reagenzienleerwertes besteht daher direkte Proportionalität zwischen Fluoreszenz und Glucosekonzentration.

##### Präzision

20 Bestimmungen der Glucosekonzentration eines Kontrollserums ergaben:  $\bar{x} = 1,92$  g/l;  $s = 0,03$  g/l;  $VK = 1,6\%$ .

##### Richtigkeit

Von 20 verschiedenen Blutproben wurde die Glucosekonzentration einerseits konventionell mit der Hexokinase-methode (8) photometrisch aus entweißstem



**SIEMENS**

Thema: Medizinische Laboratorien

# Laborautomatisierung – konsequent und zukunftssicher

**Direkte Probenidentifikation  
On-line-Meßwerterfassung  
Real-time-Datenverarbeitung**



Hohe Leistungsfähigkeit des Labors durch effektiveren Einsatz seiner Fachkräfte und wirtschaftlich optimale Ausnutzung der Analysen- und Meßgeräte. Termingerechte Erledigung aller Anforderungen mit vielseitiger automatischer Kontrolle und sicherer Identifikation der Meßdaten. Arbeitsplatz- und patientenorientierte Zusammenstellung der automatisch verarbeiteten Daten und Ausgabe der Gesamtinformation in übersichtlichen Ergebnislisten.

SIEMENS AKTIENGESELLSCHAFT  
Bereich Medizinische Technik · Erlangen

## mit dem SILAB-System von Siemens



# Walter de Gruyter Berlin · New York

## Proceedings of the International Research Conference on Proteinase Inhibitors

Munich, November 4—6, 1970  
Edited by H. Fritz and H. Tschesche  
XII, 304 pages. With 246 figures and  
95 tables. 1971. Bound DM 108,—;  
\$ 31.75

Contents:  
Proteinase Inhibitors in Human Medicine ·  
Specific Isolation Methods · Inhibition  
Mechanism: Theories and Methods ·  
Inhibitors of Plant Tissues · Basic  
Bovine Inhibitor and Related Inhibitors ·  
Pancreatic Secretory Inhibitors · Seminal  
Inhibitors, Inhibitors and Fertilization ·  
Inhibitors from Dog Submandibular  
Glands, *Ascaris Lumbricoides* and Leeches.

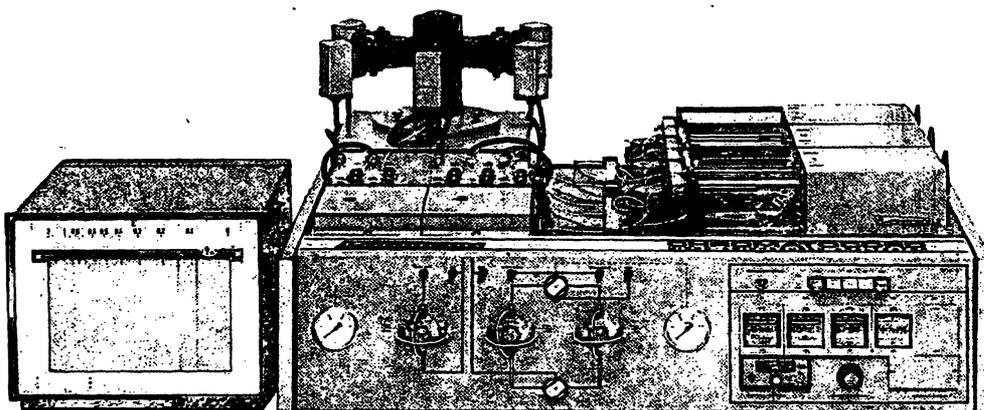
Contributions by:  
Birk, Coan, Čechová, Dlouhá-Keil,  
Feeney, Feinstein, Fink, Fritz, Greene,  
Haendle, Heimbürger, Hochstraßer,  
Huber, Ikenaka, Kassell, Laskowski Jr.,  
Laskowski Sr., Liener, Peanasky, Rigbi,  
Ryan, Schumacher, Shotton, Stevens,  
Tschesche, Werle, Zaneveld.

## AMINO ACID ANALYZER CHROMATOCORD CHR-1

# NEW

## MODEL HMZ-1

Semi Mikro Attachment  
Automatic Analyses on  
Picomol - Samples  
Sensitivity: 20 Picomol



**FEATURES :** .7 mm I. D. Tube columns, minimal resin and reagent requirement:  
.5 ml/h Ninhydrin; micro flow cells; simultaneous monitoring of  
2 columns by 5-channel photometer.  
Analysis time: picomol range 400 min. micro range 80 min. using  
semi micro attachment HMZ-1.  
An other precision instrument of

# Labotron

**LABOTRON MESSTECHNIK GMBH 8191 GELTING WOLFRATSHAUSER STR.2 GERMANY**

Picomol - Analyses · Precision - Pumps · Switch - Valves · Photometers

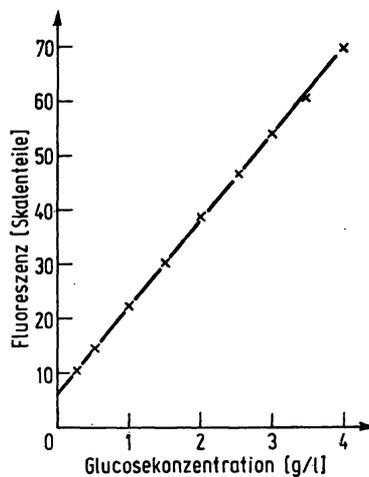


Abb. 4

Abhängigkeit der Fluoreszenz von der Glucosekonzentration

Überstand, andererseits fluorimetrisch im Hämolyolat bestimmt. Die sehr enge Korrelation zwischen den erhaltenen Ergebnissen zeigt Abbildung 5 ( $r = 0,999$ ). Der  $\text{tg } \alpha$  für die errechnete Regressionsgerade liegt etwas unter dem theoretischen Wert von 1. Dazu ist zu bemerken, daß unsere photometrischen Bestimmungen auf Extinktionsmessungen im Eppendorf-Spektrallinienphotometer bei 366 nm beruhen. Es ist anzunehmen, daß die mit  $\epsilon_{\text{NADPH}} = 3,30 \cdot 10^6 \text{ cm}^2/\text{Mol}$  errechneten Glucosewerte zu hoch liegen. Wir erhielten nämlich mit wäßr. Glucoselösungen im „optischen

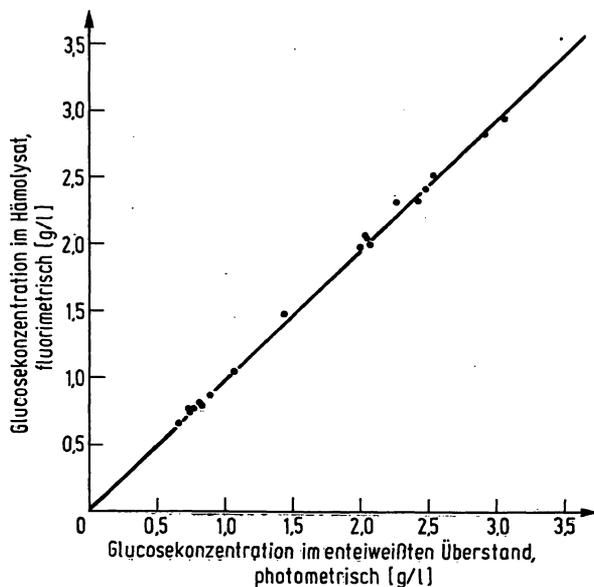


Abb. 5

Vergleich der Glucosewerte, die mit der klassischen Hexokinase-methode mit Enteiweißung (Abszisse) und der fluorimetrischen Methode im Hämolyolat (Ordinate) bestimmt wurden  
 $r = 0,999$ ;  $a = 0,0019$ ;  $b = 0,970$

Test“ bei 366 nm Analyseergebnisse, die mehr als 100% der Theorie entsprachen. Photometriert man denselben Bestimmungsansatz bei 334 und 366 nm und multi-

pliziert mit den entsprechenden Berechnungsfaktoren, so ergeben sich bei 366 um 2,5–3,0% höhere Glucosewerte als bei 334 nm. Ähnliche Beobachtungen wurden vor kurzem von anderer Seite mitgeteilt (9). Hierdurch dürfte die geringe systematische Abweichung der Ergebnisse beim Vergleich beider Methoden hinreichend erklärt sein.

#### Wiederfindung

Bei 5 verschiedenen Blutproben, denen 1,00 g/l Glucose zugesetzt wurde, ergab sich eine durchschnittliche Wiederfindung von 101%.

#### Diskussion

Das von BERNT und LACHENICHT vorgeschlagene sehr elegante Verfahren zur kontinuierlichen fluorimetrischen Glucosebestimmung im Hämolyolat (5) gab uns die Anregung, die Besonderheiten der Hexokinase-methode bei Anwendung auf dieses Material eingehender zu studieren.

Nachdem es als Resultat dieser Untersuchungen gelungen ist, durch Inaktivierung der störenden Erythrocytenenzyme die Spezifität der Hexokinase-methode auch bei Glucosebestimmungen in hämolytierten Blutproben zu erhalten, scheint uns der breiteren Anwendung der ausgearbeiteten Methode nichts im Wege zu stehen. Wir selbst verwerten die gewonnenen Erfahrungen für eine bei uns im Routinelaboratorium eingeführte Glucosebestimmung im Vollblut mit dem AutoAnalyzer (10).

Die in dieser Arbeit beschriebene manuelle Methode zur Glucosebestimmung im Hämolyolat lehnt sich hinsichtlich der Bedingungen des Inkubationsansatzes an die von SCHERSTÉN und TIBBLING (11) für Harn-glucosebestimmungen empfohlene Vorschrift an. Der Vorteil des geringen Inkubationsvolumens liegt in der sehr ökonomischen Nutzung der Hexokinase- und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase-Aktivität. Aus Gründen der unterschiedlichen Enzymsättigung ist die Umsetzung der gleichen Glucosemenge im „konzentrierten Inkubationsansatz“ (Volumen = 125  $\mu\text{l}$ ) viel rascher abgeschlossen, als wenn primär schon das für die Fluorimetrie günstige Endvolumen von etwa 10 ml gewählt würde. Bei geringem Enzymverbrauch ist daher unsere fluorimetrische Glucosebestimmung nicht nur wegen des Fortfalls der Enteiweißung, sondern auch wegen der kürzeren Inkubationsdauer schneller durchführbar als die klassische photometrische Hexokinase-methode.

Frau MONIKA KLEINE-TEBBE hat durch ausgezeichnete technische Assistenz bei der Durchführung der Versuche wertvolle Hilfe geleistet.

#### Literatur

1. HAECKEL, R., diese Z. 8, 480 (1970). — 2. STORK, H. und F. H. SCHMIDT, Klin. Wschr. 46, 789 (1968). — 3. BERGMAYER, H. U., E. BERNT, F. H. SCHMIDT und H. STORK, in: Methoden

der enzymatischen Analyse, S. 1167. Hrsg. H. U. BERGMAYER, 2. Aufl., Weinheim (1970). — 4. RUBIN, M. und L. KNOTT, Clin. Chim. Acta, Amsterdam 18, 409 (1967). — 5. BERNT, E.

und R. LACHENICHT, in: Methoden der enzymatischen Analyse, S. 1168. Hrsg. H. U. BERGMAYER, 2. Aufl., Weinheim (1970). — 6. WEBB, J. L., Enzyme and Metabolic Inhibitors Vol. 3, S. 337ff., New York and London (1966). — 7. KAHANA, S. E., O. H. LOWRY, D. W. SCHULZ, J. V. PASSONEAU und E. J. CRAWFORD, J. biol. Chemistry 235, 2178 (1960). — 8. SCHMIDT, F. H., Klin. Wschr. 39, 1244 (1961). — 9. HAECKEL, R. und H. HAECKEL, Die Zuverlässigkeit der automatisierten Aktivitätsbestimmung der

Kreatinphosphokinase. Arbeitstagung der Dt. Ges. für Klin. Chemie, der Schweiz. Vereinig. für Klin. Chemie und der Österr. Ges. für Klin. Chemie, Wien 1971. — 10. Manuskript in Vorbereitung. — 11. SCHERSTÉN, B. und G. TIBBLING, Clin. Chim. Acta, Amsterdam 18, 383 (1967). — 12. Methoden der enzymatischen Analyse S. 462. Hrsg. H. U. BERGMAYER, 2. Aufl., Weinheim (1970).

Dr. F. da Fonseca-Wollheim  
Institut für Klinische Chemie und Klinische Biochemie  
Klinikum Steglitz der FU Berlin  
1 Berlin 45  
Hindenburgdamm 30