

KURZMITTEILUNG

Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.
10. Jg. 1972, S. 136

Rationalisierung der enzymatischen Harnsäurebestimmung

The rationalisation of the enzymic measurement of uric acid

Von F. DA FONSECA-WOLLHEIM

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

(Eingegangen am 30. August 1971)

Harnsäurebestimmungen im Serum mit glycerinhaltigen Uricasepräparaten liefern nach MAHLER (1) zu hohe Ergebnisse, da in den Bestimmungsansatz gelangende Glycerin eine merkliche unspezifische Extinktionsabnahme der Serumverdünnung bei 293 nm verursacht.

Wir können diese Beobachtung bestätigen. Bei 50 Seren fanden wir unter den Bedingungen des Bestimmungsansatzes nach BERNT und BERGMAYER (2)¹⁾ nach Zusatz von 20 μ l 50proz. Glycerin einen durchschnittlichen Extinktionsabfall von 0,0045; $s = 0,0015$. Demnach werden bei Seren mit glycerinhaltiger Uricase²⁾ um 1–6 mg/l, im Mittel um 3,5 mg/l, zu hohe Werte bestimmt.

Wir haben daraufhin eine Modifikation ausgearbeitet, bei der durch Verminderung der verwendeten Enzymmenge der Störeffekt des Glycerins vernachlässigbar klein ist. Die Reduzierung der Enzymmenge hat weiterhin den Vorteil, daß Reagenzienkosten gespart werden, bedingt aber auf der anderen Seite eine längere Inkubationszeit für vollständigen Harnsäureumsatz. Um Wartezeiten am Photometer zu vermeiden, führen wir die Bestimmungsreaktion nicht in Küvetten, sondern in Zentrifugenröhrchen durch und messen nach abgeschlossener Umsetzung in Absaugküvetten die Extinktionsdifferenz zwischen Probenleerwert- und Probenansatz. Das serielle Pipettieren und Photometrieren ermöglicht eine sehr rationelle Bearbeitung von größeren Probenreihen und erhöht somit die Arbeitskapazität des Laboratoriums. Eine im Prinzip ähnliche Methode im Mikrolitermaßstab wurde von RICHTERICH (3) beschrieben.

Methodik

Geräte

Probe-Reagenz-Dosierer „Dilumatik“ der Fa. Braun/Melsungen; Zeiss-Spektrophotometer PM 4 mit 2 Quarz-Absaugküvetten $d = 1$ cm.

¹⁾ Biochemica Testcombination TC-HS, Boehringer Mannheim GmbH.

²⁾ Enzym: Uricase = Urat: O₂ Oxidoreduktase (EC 1.7.3.3).

³⁾ Hersteller: Ernst Bechthold & Sohn 6124 Beerfelden/Odenwald.

Reagenzien

1. 0,2M Boratpuffer pH 9,5: 12,5 g Borsäure und 20,0 g Na₂CO₃ mit 900 ml H₂O lösen. Nach pH-Kontrolle an der Glaselektrode und eventueller pH-Korrektur auffüllen ad 1000 ml.

2. Uricase 0,4 mg/ml: jeweils frisch vor Gebrauch Uricase-Stammlösung (2 mg/ml in 50proz. Glycerin $\geq 4,5$ U/mg, Boehringer Mannheim GmbH) 1 + 4 mit Boratpuffer verdünnen.

Bestimmungsansatz

100 μ l Serum + 6,00 ml Boratpuffer mit Dosierautomat in ein verschließbares Plastikröhrchen (90 \times 17 mm³⁾ geben. Röhrchen verschließen und durch mehrfaches Umkippen für exakte Durchmischung sorgen.

Von jedem Ansatz 3 ml in ein zweites Röhrchen überführen und mit 20 μ l Uricase versetzen (Probenansatz). Zu dem restlichen Teil 20 μ l Boratpuffer geben (Probenleerwertansatz). Nach sorgfältigem Durchmischen und 90-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur Extinktion des Probenleerwertes gegen den Probenansatz in Absaugküvetten bei 293 nm messen. Zum Vermeiden von Verschleppungsfehlern Küvetten vor jeder Messung mit der zu photometrierenden Lösung vorspülen.

Die Enzymeigenextinktion für jede Probenreihe bestimmen (3 ml Boratpuffer + 20 μ l Uricase gegen Boratpuffer photometrieren). Sie liegt bei der angewendeten Verdünnung erfahrungsgemäß um 0,003.

Berechnung

$(E_{\text{Probenleerwert}} - E_{\text{Probe}} + E_{\text{Enzym}}) \cdot 818 = \text{mg Harnsäure/l.}$

Ergebnisse

Präzision: 35 Harnsäurebestimmungen aus der gleichen Serumprobe an verschiedenen Arbeitstagen: $\bar{x} = 50,6$ mg/l; $s = 2,0$ mg/l.

Empfindlichkeit (2 s): 4,0 mg/l.
Vergleichsbestimmungen von 20 Seren, einerseits nach der Vorschrift von l. c. (2) mit 20 μ l unverdünnter, durch Dialyse glycerinfrei gemachter Uricase, andererseits mit der eigenen Modifikation, ergaben gute Übereinstimmung (Korrelationskoeffizient $r = 0,997$).

Normalwerte: Serumharnsäurebestimmungen an nicht ausgewählten Probanden (Krankenhauspersonal zwischen 18 und 65 Jahren, 220 Frauen und 110 Männer) ergaben die folgenden Normalbereiche (2,5–97,5% — Intervall, hervorgehoben die Zentralwerte): ♀ 18,6 — 35,2 — 55,4 mg/l; ♂ 21,8 — 49,6 — 68,2 mg/l.

Fräulein E. THORSTEINSDOTTIR und Frau K. KRÜGER danke ich für sorgfältige technische Assistenz, Frau E. BORNER für die statistische Auswertung der Normalwerte.

Literatur

1. MAHLER, J. L., *Analytic. Biochem.* 38, 65 (1970). — 2. BERNT, E. und H. U. BERGMAYER, in *Methoden der enzymatischen Analyse*, Hrsg. H. U. BERGMAYER, 2. Auflage, S. 1885 Weinheim (1970). — 3. RICHTERICH, R., *Klinische Chemie — Theorie und Praxis*, 2. Auflage, S. 279 Frankfurt (1968).

Dr. F. da Fonseca-Wollheim
1000 Berlin 45
Hindenburgdamm 30